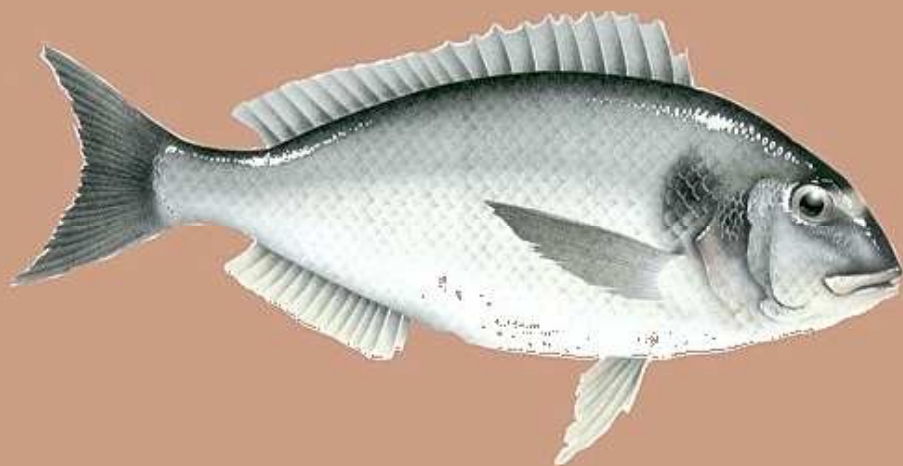


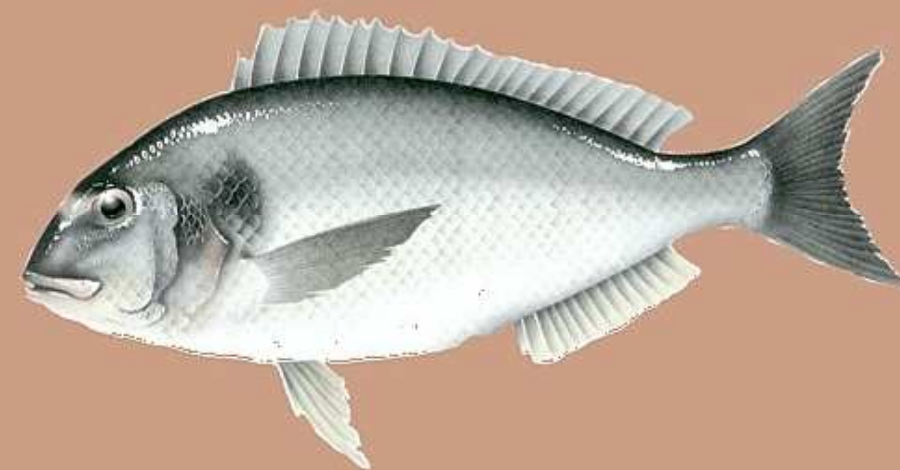
Los inmunostimulantes se han ido convirtiendo en una eficaz herramienta para controlar las enfermedades infecciosas, ya que pueden aumentar la resistencia a infecciones víricas, bacterianas, fúngicas y parasitarias.

La finalidad del presente estudio es comprobar el efecto inmunostimulante en la dorada de distintos productos de dos patógenos muy prevalentes en la acuicultura canaria (*Vibrio alginolyticus* y *Photobacterium damselae* subspecies *piscicola*), identificando su interés para la prevención de enfermedades, y permitiendo avanzar en el conocimiento del papel que juega la dorada en la epidemiología de las infecciones por nodavirus.

En este trabajo se obtuvo como mejor inmunostimulante el LPS de *Vibrio alginolyticus*, ya que presentó una gran intensidad y un amplio margen de actuación del sistema inmune frente al patógeno. Además, disminuye en casi tres veces la titulación viral de *Nodavirus* con respecto a los peces no inmunostimulados.



SISTEMA INMUNE INESPECÍFICO EN DORADA (*SPARUS AURATA*): ACTIVACIÓN DEL SISTEMA INTERFERÓN



Tesis Doctoral

Jimena Bravo García

Arucas, 2011



Anexo I

D^a MARIA SORAYA DÉNIZ SUÁREZ, SECRETARIA DEL INSTITUTO UNIVERSITARIO DE SANIDAD ANIMAL Y SEGURIDAD ALIMENTARIA DE LA UNIVERSIDAD DE LAS PALMAS DE GRAN CANARIA.

CERTIFICA

Que el Consejo de Doctores del Departamento en su sesión de fecha de 04 de julio del presente tomó el acuerdo de dar el consentimiento para su tramitación, a la Tesis Doctoral Europea titulada **“SISTEMA INMUNE INESPECÍFICO EN DORADA (*SPARUS AURATA*): ACTIVACIÓN DEL SISTEMA INTERFERÓN”**, presentada por la doctoranda Doña Jimena Bravo García, dirigida por el Catedrático Fernando Real Valcárcel, por el Doctor Félix Acosta Arbelo y por el Doctor Daniel Padilla Castillo

Y para que así conste, y a efectos de lo previsto en el Artº 73 2 del reglamento de Estudios de Doctorado de esta Universidad, firmo la presente en Las Palmas de Gran Canaria, a cinco de julio de dos mil once





Anexo II

UNIVERSIDAD DE LAS PALMAS DE GRAN CANARIA

Instituto Universitario de Sanidad Animal y Seguridad Alimentaria

PROGRAMA DE DOCTORADO EN SANIDAD ANIMAL Y SEGURIDAD ALIMENTARIA

Título de la Tesis

**“SISTEMA INMUNE INESPECÍFICO EN DORADA (*SPARUS AURATA*):
ACTIVACIÓN DEL SISTEMA INTERFERÓN”**

Tesis Doctoral **Europea** presentada por **Dña. Jimena Bravo García**

Dirigida por el **Dr. D. Fernando Real Valcárcel** y codirigida por el **Dr. D. Félix Acosta Arbelo** y **Dr. D. Daniel Padilla Castillo**

El Director

El Codirector

El Codirector

Fernando Real Valcárcel

Félix Acosta Arbelo

Daniel Padilla Castillo

La Doctoranda

Jimena Bravo García

Arucas, a 13 de Junio de 2011

D. FERNANDO REAL VALCÁRCEL, CATEDRÁTICO DE LA UNIVERSIDAD DE LAS PALMAS DE GRAN CANARIA EN EL DEPARTAMENTO DE PATOLOGÍA ANIMAL, PRODUCCIÓN ANIMAL, BROMATOLOGÍA Y TECNOLOGÍA DE LOS ALIMENTOS DE LA FACULTAD DE VETERINARIA.

INFORMA:

Que la presente tesis doctoral titulada “SISTEMA INMUNE INESPECÍFICO DE DORADA (*SPARUS AURATA*): ACTIVACIÓN DEL SISTEMA INTERFERÓN” realizada por Dña. Jimena Bravo García, Licenciada en Ciencias del Mar, para optar al grado de Doctora por la Universidad de Las Palmas de Gran Canaria, ha sido realizada bajo mi dirección y considerando que reúne las condiciones y calidad científica para optar al grado de Doctor, autorizo su presentación para que pueda ser juzgada por el tribunal correspondiente.

Y para que así conste, firmo la presente en Arucas, a 13 de Junio de 2011.

Fdo. Fernando Real Valcárcel

D. FÉLIX ACOSTA ARBELO, PROFESOR TITULAR DE LA UNIVERSIDAD DE LAS PALMAS DE GRAN CANARIA EN EL DEPARTAMENTO DE PATOLOGÍA ANIMAL, PRODUCCIÓN ANIMAL, BROMATOLOGÍA Y TECNOLOGÍA DE LOS ALIMENTOS DE LA FACULTAD DE VETERINARIA.

INFORMA:

Que la presente tesis doctoral titulada “SISTEMA INMUNE INESPECÍFICO DE DORADA (*SPARUS AURATA*): ACTIVACIÓN DEL SISTEMA INTERFERÓN” realizada por Dña. Jimena Bravo García, Licenciada en Ciencias del Mar, para optar al grado de Doctora por la Universidad de Las Palmas de Gran Canaria, ha sido realizada bajo mi dirección y considerando que reúne las condiciones y calidad científica para optar al grado de Doctor, autorizo su presentación para que pueda ser juzgada por el tribunal correspondiente.

Y para que así conste, firmo la presente en Arucas, a 13 de Junio de 2011.

Fdo. Félix Acosta Arbelo

D. DANIEL PADILLA CASTILLO, PROFESOR ASOCIADO DE LA UNIVERSIDAD DE LAS PALMAS DE GRAN CANARIA EN EL DEPARTAMENTO DE PATOLOGÍA ANIMAL, PRODUCCIÓN ANIMAL, BROMATOLOGÍA Y TECNOLOGÍA DE LOS ALIMENTOS DE LA FACULTAD DE VETERINARIA.

INFORMA:

Que la presente tesis doctoral titulada “SISTEMA INMUNE INESPECÍFICO DE DORADA (*SPARUS AURATA*): ACTIVACIÓN DEL SISTEMA INTERFERÓN” realizada por Dña. Jimena Bravo García, Licenciada en Ciencias del Mar, para optar al grado de Doctora por la Universidad de Las Palmas de Gran Canaria, ha sido realizada bajo mi dirección y considerando que reúne las condiciones y calidad científica para optar al grado de Doctor, autorizo su presentación para que pueda ser juzgada por el tribunal correspondiente.

Y para que así conste, firmo la presente en Arucas, a 13 de Junio de 2011.

Fdo. Daniel Padilla Castillo



Instituto Universitario de Sanidad Animal y Seguridad Alimentaria
**PROGRAMA DE DOCTORADO EN SANIDAD ANIMAL Y SEGURIDAD
ALIMENTARIA**

SISTEMA INMUNE INESPECÍFICO EN
DORADA (*SPARUS AURATA*):
ACTIVACIÓN DEL SISTEMA INTERFERÓN

Tesis Doctoral

Jimena Bravo García

Arucas, 2011

El trabajo realizado ha sido posible gracias al Gobierno de Canarias por financiar el proyecto de investigación (Código: PI042004/153) así como a una beca para la Formación de Personal Docente e Investigador (FPI) del Gobierno de Canarias.

*A mis padres
y mis dos amores
Pedro y Rodrigo*

Índice general

Índice Tablas	I
Índice Figuras	III
Índice Esquemas	V
Abreviaturas empleadas	VII
Resumen	XIII
Summary	XVII
Introducción	1
Objetivos	7
Revisión bibliográfica	11
1. Importancia de la acuicultura	11
2. Enfermedades más importantes en acuicultura	16
3. Agente responsable de la Vibriosis	30
4. Agente responsable de la Pasterelosis	38
5. Estudio de la Nodaviriosis	47
6. Mecanismos de defensa frente a una infección en los teleósteos	51
6.1. Sistema Inmune. Generalidades	51
6.2. Sistema Inmune. División	55

6.3. Sistema Inmune Inespecífico	59
6.3.1. Sistema Interferón	65
6.3.2. Proteína antiviral Mx	67
7. Importancia del control de las enfermedades	76
8. Uso de Inmunoestimulantes	90
8.1. ADN	93
8.2. LPS	98

Material y Métodos 113

1. <u>Primera fase</u> : Intensidad y duración <i>in vivo</i> de la respuesta inmune inducida por productos bacterianos	113
I. Instalaciones y peces de experimentación	113
II. Cepas bacterianas empleadas	114
III. Extracción ADN y LPS de las cepas de estudio	115
III.a. Extracción de ADN bacteriano	115
III.b. Extracción de LPS bacteriano	117
IV. Extracción de ARN	118
V. Transcripción inversa (RT-PCR)	119
VI. Amplificación del gen Mx mediante la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)	120
VII. Electroforesis en geles de agarosa	121
1.1. <u>Experiencia I</u>	122
1.2. <u>Experiencia II</u>	125

2. <u>Segunda fase: Respuesta inmune a infecciones víricas inducida por la activación del sistema interferón</u>	128
I. Instalaciones y peces de experimentación	128
II. Patógeno vírico empleado	129
III. Diagnóstico de <i>Nodavirus</i> mediante PCR	130
IV. Electroforesis en geles de agarosa	132
2.1. <u>Experiencia III</u>	132
Resultados	139
1. <u>Experiencia I</u>	139
1.1. Experimento preliminar	139
1.2. Experimento definitivo	145
2. <u>Experiencia II</u>	149
3. <u>Experiencia III</u>	153
Discusión	163
Conclusiones	183
Conclusions	187
Bibliografía	191

Anexos	257
1. <u>Anexo I</u> : Medios y soluciones empleados	257
2. <u>Anexo II</u> : Direcciones de Laboratorios y Casas Comerciales empleadas	260
Agradecimientos	263
Publicaciones en revistas indexadas	269

Índice Tablas

Tabla I.-	Países productores de acuicultura por toneladas anuales en 2008	12
Tabla II.-	Características bioquímicas de <i>Vibrio alginolyticus</i>	33
Tabla III.-	Características bioquímicas de <i>Photobacterium damsela</i> subsp. <i>piscicida</i>	44
Tabla IV.-	Diferencias bioquímicas entre diferentes patógenos comunes en la acuicultura	46
Tabla V.-	Síntomas clínicos más comunes de la nodaviriosis	48
Tabla VI.-	Lista de enfermedades infecciosas de notificación obligatoria	79
Tabla VII.-	Resumen de patógenos frente a los que se han utilizado vacunas de ADN	96
Tabla VIII.-	Cebadores utilizados para amplificar los genes β -actina y Mx en el presente estudio	120
Tabla IX.-	Protocolo de ciclos de PCR empleados para la primera fase del presente estudio	121
Tabla X.-	Cebadores para detectar <i>Nodavirus</i> en el presente estudio	130
Tabla XI.-	Protocolo de ciclos de PCR empleados para la segunda fase de este trabajo	130

Tabla XII.-	Cebadores utilizados para realizar una <i>Nested-PCR</i> para detectar <i>Nodavirus</i> en este estudio	131
Tabla XIII.-	Protocolo de ciclos para <i>Real Time-PCR</i> utilizada para cuantificar la carga vírica por <i>Nodavirus</i> en los peces de este estudio	134
Tabla XIV.-	Valores de los niveles de expresión del gen Mx de la experiencia preliminar obtenidos en el presente trabajo	143
Tabla XV.-	Valores de los niveles de expresión del gen Mx del experimento definitivo obtenidos en este estudio	147
Tabla XVI.-	Valores de los niveles de expresión del gen Mx de la experiencia II del presente estudio	151
Tabla XVII.-	Valores de titulación vírica de <i>Nodavirus</i> en dorada de la experiencia III obtenidos en este trabajo	156
Tabla XVIII.-	Valores de los niveles de expresión de la proteína Mx de la experiencia III que se obtuvieron en este estudio	159

Índice Figuras

Figura I.-	Producción acuícola mundial (t.) por entornos de producción en 2008	13
Figura II.-	Producción acuícola mundial (t.): principales grupos de especies en 2008	13
Figura III.-	Producción acuícola española en 2008	15
Figura IV.-	Distribución de la producción de peces por especies en España	15
Figura V.-	Componentes moleculares de un LPS	100
Figura VI.-	Electroforesis en agarosa 2% de la primera fase del presente estudio	140
Figura VII.-	Nódulos algodonosos encontrados en los peces experimentales afectados por linfocistis	142
Figura VIII.-	Análisis de los niveles de expresión del gen Mx en hígado con los inmunoestimulantes de <i>Vibrio alginolyticus</i> inoculados (Experimento preliminar) de este trabajo	144
Figura IX.-	Análisis de los niveles de expresión del gen Mx en hígado con los inmunoestimulantes de <i>Vibrio alginolyticus</i> inoculados (Experimento definitivo) del presente estudio	148
Figura X.-	Análisis de los niveles de expresión del gen Mx en hígado con los inmunoestimulantes de <i>Photobacterium damsela</i> subsp. <i>piscicida</i> inoculados en este estudio	152

Figura XI.-	Electroforesis en agarosa 2% de la <i>Nested</i> -PCR realizada en este estudio	154
Figura XII.-	Electroforesis en agarosa 2% de la experiencia III de este estudio	155
Figura XIII.-	Titulación vírica de <i>Nodavirus</i> en dorada después de la infección en los siguientes grupos: control (PBS-L15), sólo infectado con <i>Nodavirus</i> y previamente inmunoestimulado con LPS	157
Figura XIV.-	Análisis de los niveles de expresión del gen <i>Mx</i> en hígado con el inmunoestimulante (LPS de <i>Vibrio alginolyticus</i>) y el agente patógeno (<i>Nodavirus</i>) inoculados	160

Índice Esquemas

Esquema I.-	Esquema de la experiencia I	124
Esquema II.-	Esquema de la experiencia II	127
Esquema III.-	Esquema de la experiencia III	135

Abreviaturas empleadas

ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNc	Ácido desoxirribonucleico complementario
APC	Células presentadoras de antígeno
APROMAR	Asociación Empresarial de Productores de Cultivos Marinos de España
ARN	Ácido ribonucleico
ARNds	Ácido ribonucleico de doble cadena
BHIA	Agar Infusión Cerebro Corazón
BHIB	Caldo Infusión Cerebro Corazón
CAS	Agar sulfato azulol cromo
CCV	Virus del bagre del canal
CGE	Células granulares eosinofílicas
CMM	Centro melanomacrofágico
CD	Célula dendrítica
EGH	Eosinófilos granulares homogéneos
EPC	Producto extracelular
FAME	Ésteres metílicos de ácidos grasos
FAO	Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación
FEAP	Federación de Productores Acuícolas Europeos
IFN	Interferón
IHN	Necrosis Hematopoyética Viral
IL	Interleuquina

IPN	Necrosis Pancreática Infecciosa
ISA	Anemia Infecciosa del Salmón
ISG	Gen estimulado por interferón
JACUMAR	Junta Nacional Asesora de Cultivos Marinos
LPS	Lipopolisacáridos
MAF	Factor de activación de macrófagos
MARM	Ministerio de Medio Ambiente y Medio Rural y Marino
mM	Milimolar
MPO	Mieloperoxidasa
NET	Trampa extracelular de neutrófilos
NK	Células natural killer
OAS	2',5'-oligoadenilato sintetasa
OIE	Organización Mundial de Sanidad Animal
OMP	Proteína de la membrana externa
pb	Pares de bases
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa
PKR	Proteína kinasa R
Poly I:C	Ácido poliinosínico-policitídílico
PRP	Proteína de reconocimiento de patrones
PRR	Receptores de reconocimiento de patrones
RAG	Gen de activación recombinante
rpm	Revoluciones por minuto

RT-PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa en Transcripción Inversa
TCBS	Agar tiosulfato citrato sales biliares sacarosa
TSA	Agar Trypticase-Soja
xg	Fuerza de gravedad
ufc	Unidades formadoras de colonias
VBNC	Viable pero no cultivable
VER	Encefalopatía y retinopatía Viral
VHS	Septicemia Hemorrágica Viral
VNN	Necrosis Nerviosa Viral



Resumen
Resumen

Las enfermedades infecciosas están limitando el desarrollo de la industria acuícola, por ello, a lo largo de los años se ha intentado controlar estas enfermedades empleando agentes antimicrobianos, quimioterapéuticos, desinfectantes o vacunas, que incrementan la eficiencia de la producción. Los inmunoestimulantes se han ido convirtiendo en una eficaz herramienta. Si son administrados en forma adecuada y anticipadamente, se pueden evitar situaciones de estrés o enfermedades, activando las defensas específicas e inespecíficas del organismo y, así, aumentar la resistencia a infecciones víricas, bacterianas, fúngicas y parasitarias.

En este trabajo se propusieron los siguientes objetivos principales: establecer la intensidad y duración de la respuesta inmune inducida por productos bacterianos obtenidos de *Vibrio alginolyticus* y *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* y determinar el estado inmune que deriva como consecuencia de una infección por *Nodavirus*, inducida por la activación de la respuesta vía interferón por uno de esos productos bacterianos, que mejores resultados mostró en la primera parte del trabajo.

Se obtuvo como mejor inmunoestimulante el LPS de *Vibrio alginolyticus*, ya que a partir de las 24 horas tras su inoculación la acción antiviral de *Mx* ya está en marcha, la máxima acción se presenta el día 3 y su duración se mantiene casi 24 días, siendo éste un amplio margen de actuación del sistema inmune frente al patógeno. Además, disminuye en casi tres veces la titulación viral con respecto a los peces no inmunoestimulados.

Resumen

Asimismo, en este trabajo se puede observar que los virus causantes de la nodaviriosis y linfocistis inducen la expresión del gen de la proteína Mx.



Summary
Summary

Infectious diseases are limiting the development of the aquaculture industry, therefore, over the years has tried to control these diseases using antimicrobial agents, chemotherapeutic agents, disinfectants and vaccines, to increase production efficiency. Immunostimulants have become a powerful tool. If they are administered properly and early, to avoid situations of stress or illness, they activate specific and nonspecific defenses of the organism and thus increasing resistance to viral, bacterial, fungal and parasitic infections.

This study proposed the following main objectives: to establish the intensity and duration of the immune response induced by bacterial products derived from *Vibrio alginolyticus* and *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* and to determine the immune status that comes as a result of a *Nodavirus* infection, induced by activation of the interferon response pathway by one of these bacterial products, which had showed the best results in the first part of this study.

We obtained as the best immunostimulant LPS of *Vibrio alginolyticus*, Mx antiviral action is underway 24 hours after been injected, with the highest level presented on the day 3 and its duration remains nearly 24 days, this wide breadth of the immune system against the pathogen. In addition, the response decreases by almost three times the viral titration with respect to the no immunostimulated fish.

Also, this study can be seen that the virus causing nodaviriosis and lymphocystis induce the expression of Mx protein gene expression.



Introducción

Introducción

La acuicultura es una actividad que abarca muy variadas prácticas y una amplia gama de especies, sistemas y técnicas de producción. Puede definirse como el cultivo de organismos acuáticos con técnicas encaminadas a hacer más eficiente la producción.

Aunque la producción de la acuicultura a nivel mundial está decreciendo, ésta sigue siendo la producción de animales de crecimiento más rápido y en la actualidad produce casi la mitad del suministro total de pescado para el consumo humano. Actualmente juega un papel importante en los esfuerzos por eliminar el hambre y la malnutrición al proveer alimentos ricos en proteínas, vitaminas y minerales. Además puede contribuir a reducir la pobreza mejorando los ingresos económicos, fomentando el comercio local e internacional y ofreciendo oportunidades de empleo. La FAO (2008) considera que la acuicultura contribuye de manera efectiva a la utilización eficaz de los recursos naturales, a la seguridad alimentaria y al desarrollo económico, con un limitado y controlable impacto sobre el medio ambiente.

A medida que la acuicultura se intensifica y diversifica, los peligros y riesgos biológicos para los animales, las personas y los ecosistemas también aumentan en número y diversidad. Entre los peligros se encuentran las enfermedades infecciosas que afectan a las explotaciones, los problemas de la salud pública en relación con los residuos y la resistencia a agentes antimicrobianos, las zoonosis, la aparición de especies exóticas invasoras, la liberación de organismos modificados genéticamente y los riesgos que el cambio climático plantea para la bioseguridad.

El movimiento no controlado, a nivel nacional e internacional, de huevos y progenitores infectados constituye una vía probada de introducción y diseminación de estos patógenos. Las enfermedades infecciosas están limitando el desarrollo y la sostenibilidad de la industria a causa de las pérdidas directas, los crecientes costes de funcionamiento, el desempleo, las restricciones del comercio y los efectos en la biodiversidad.

Para controlar estas enfermedades se emplean, habitualmente, agentes quimioterapéuticos, desinfectantes o vacunas. En general, estos productos han incrementado la eficiencia de la producción y la industria acuícola las ha ido incorporando rápidamente gracias a un aprendizaje mejorado y un mayor entendimiento de la aplicación de la gestión sanitaria y de la bioseguridad a la acuicultura. Se reconocen sus beneficios en una amplia gama de aplicaciones, entre las que se encuentran, el desarrollo de nuevas especies destinadas a la acuicultura, las alternativas a estrategias de prevención fallidas, el desarrollo de la tecnología de cría y el bienestar de los animales.

No obstante, cada vez resultan más preocupantes las limitaciones de muchos medicamentos veterinarios y los daños que pueden causar. Tales daños están relacionados con la resistencia bacteriana, los residuos de agentes antimicrobianos en los productos de consumo, los costes para poner remedio a los efectos no deseados y la fiabilidad de su eficacia en diferentes medios acuáticos. A medida que se extiende su utilización aumentan las preocupaciones sobre el uso irresponsable, como por ejemplo el uso encubierto de productos prohibidos, la utilización inadecuada derivada de un

diagnóstico incorrecto o el abuso debido a una falta de asesoramiento profesional.

A medida que la industria acuícola se aleja del empleo de antibióticos, los inmunoestimulantes se han ido convirtiendo en una eficaz herramienta frente a diversas enfermedades. Si es administrado en forma adecuada y anticipadamente, se pueden evitar situaciones de estrés o enfermedades. Su uso, prácticamente en todas las especies animales y la especie humana, permite activar las defensas específicas e inespecíficas del organismo y, por ello, aumentar la resistencia a infecciones víricas, bacterianas, fúngicas y/o parasitarias.

Uno de los efectos que producen los inmunoestimulantes es la activación del sistema interferón, que ocurre de forma natural en respuesta a una infección vírica, una estimulación inmune o diferentes estimuladores químicos. En este sistema, uno de los genes que se regulan es el de la proteína Mx. La expresión de las proteínas Mx podría servir como un marcador para la producción *in vivo* de interferón y la infección por un virus. Esto sería particularmente útil, ya que los patógenos víricos son un problema importante en la industria de la acuicultura (Jensen *et al.*, 1998).

En esta búsqueda de inmunoestimulantes, el uso de sustancias naturales no perjudiciales ni para el medio ambiente ni para los peces ni, por supuesto, para los consumidores, está haciendo avanzar este campo. En este sentido, a las conocidas y probadas vitaminas, quitina y glucanos se están añadiendo el uso de probióticos, prebióticos y productos bacterianos.

Además, los inmunoestimulantes no son tóxicos, no requieren de periodos de carencia, no son genéticamente modificados y tienen resultados comprobados. Claro que hay que tener en cuenta que son productos profilácticos y no curativos, es decir, solo van dirigidos a la prevención.

Continuando el trabajo realizado por Acosta *et al.* (2004), la finalidad del presente estudio es comprobar el efecto como inmunoestimulante en la dorada de distintos productos obtenidos a partir de dos patógenos muy prevalentes en la acuicultura canaria, identificando su interés para la prevención de enfermedades de importancia para el subsector de la acuicultura marina, y permitiendo avanzar en el conocimiento del papel que juega esta especie (dorada) en la epidemiología de las infecciones por nodavirus. Estos patógenos que producen grandes pérdidas económicas en el subsector de la acuicultura en esta región, son *Vibrio alginolyticus* y *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*.



Objetivos
Objetivos

Los objetivos concretos que nos planteamos para el presente estudio son:

1. ESTABLECER *IN VIVO* LA INTENSIDAD Y DURACIÓN DE LA RESPUESTA INMUNE INDUCIDA POR PRODUCTOS BACTERIANOS OBTENIDOS DE *VIBRIO ALGINOLYTICUS* Y DE *PHOTOBACTERIUM DAMSELAE* SUBSP. *PISCICIDA* EN DORADA (*SPARUS AURATA*, L.).
2. DETERMINAR EL ESTADO INMUNE QUE DERIVA A CONSECUENCIA DE UNA INFECCIÓN POR *NODAVIRUS* DE LA DORADA, INDUCIDA POR LA ACTIVACIÓN DE LA RESPUESTA VÍA INTERFERÓN A PARTIR DE LOS PRODUCTOS QUE MOSTRARON MEJORES RESULTADOS EN EL OBJETIVO ANTERIOR.
3. ESTUDIAR EL PATRÓN DE EXPRESIÓN DE LA PROTEÍNA ANTIVIRAL MX EN EL HÍGADO DE DORADAS INFECTADAS INTRAMUSCULARMENTE CON *NODAVIRUS*.



Revisión bibliográfica
Revisión bibliográfica

1. Importancia de la acuicultura

Hoy en día, el mundo está sumido en una fuerte crisis financiera provocando fluctuaciones en los precios de los alimentos y energías, variando así el panorama mundial ya que se tienen que plantear desafíos sin precedentes en todos los sectores y en todas las regiones. En la pesca y acuicultura, estos desafíos consisten en aprovechar las nuevas oportunidades y reducir al máximo las amenazas, evaluando las fortalezas y las debilidades de estos sectores.

El repentino aumento de los precios de los alimentos básicos y de las energías en todo el mundo en la segunda mitad de 2007 y primera de 2008, afectó también al pescado, originando una suave caída en la demanda de este producto. Aun así, según un informe elaborado por la FAO, se espera que a largo plazo, el mercado mundial de pescado continúe creciendo siguiendo la tendencia de las últimas décadas (FAO, 2008).

La producción mundial de pesca extractiva y acuicultura proporcionó unos 117,8 millones de toneladas de pescado para consumo humano en 2009, de los cuales, un 47% correspondió a la acuicultura (FAO, 2010). Los principales países productores de acuicultura los encontramos en la **Tabla I**.

Tabla 1.- Países productores de acuicultura por toneladas anuales en 2008 (APROMAR, 2010)

País	Volumen (toneladas)
China	42.669.744
Indonesia	3.854.844
India	3.478.692
Vietnam	2.497.400
Filipinas	2.407.698
República de Corea	1.394.818
Tailandia	1.374.024
Japón	1.187.774
Bangladesh	1.005.542
Chile	870.845
Resto países	7.607.561
Total mundial	68.348.942
España (Ranking 19º país)	249.074

Nota: No se contabilizan las plantas acuáticas

El subsector de la acuicultura crece más rápidamente que cualquier otro sector de producción de alimentos de origen animal, y a mayor ritmo que la población (3,4%), ya que su tasa de crecimiento media anual es del 6,6%, en comparación con el 3% del subsector bovino y del subsector pesquero. La acuicultura puede suministrar la mitad de todo el pescado consumido en el mundo (FAO, 2010).

En las dos próximas décadas, la acuicultura será de suma importancia en los abastecimientos mundiales de pescado y contribuirá aún más a reducir la pobreza y la inseguridad alimentaria en todo el mundo, según se desprende de “Acuicultura en el Tercer Milenio”, una publicación que da a conocer la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO, 2000). Por ello es necesaria la intensificación de las producciones para poder responder a la demanda.

La producción acuícola de pescado, crustáceos y moluscos proviene un 46,2% de zonas de agua dulce, un 47,5% de aguas marinas y solo un 6,3% de la producción total de aguas salobres (**Figura I**). La mayor parte de la producción marina la constituyen los peces, aunque, cada vez más, se va aumentando la producción de mejillones y ostras (**Figura II**).

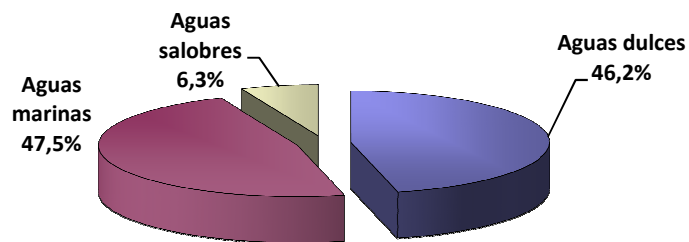


Figura I.- Producción acuícola mundial (t.) por entornos de producción en 2008 (APROMAR, 2010)

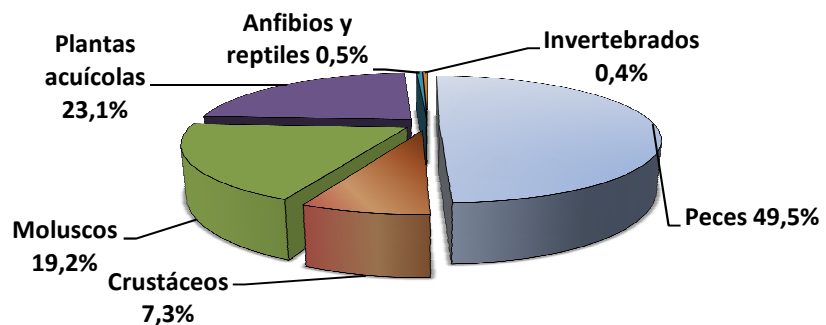


Figura II.- Producción acuícola mundial (t.): principales grupos de especies en 2008 (APROMAR, 2010)

El subsector de la acuicultura es cada vez más importante para aportar pescado de calidad a la Unión Europea. En el año 2008 aportó un 19,8% del volumen de la producción acuática total de Europa. La producción de peces supuso el 49,0% en volumen de la producción total, pero solo representa el

4% de la producción mundial, aunque es líder en algunas especies como la trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*), salmón del Atlántico (*Salmo salar*), dorada (*Sparus aurata*), carpa común (*Cyprinus carpio*), lubina (*Dicentrarchus labrax*), anguila europea (*Anguilla anguilla*) y rodaballo (*Scophthalmus maximus*). La producción de moluscos supuso un 50,9% (APROMAR, 2010).

La producción acuícola europea en toneladas, está liderada por España (19,5% del total de la Unión Europea), seguida de Francia (18,6%) e Italia (14,2%) (APROMAR, 2010).

En 2007, según los datos que posee la Junta Nacional Asesora de Cultivos Marinos (JACUMAR), el 90% de la actividad acuícola se desarrolla en zonas marinas, y el resto en aguas continentales. La evolución de la producción de peces marinos está muy influenciada por el crecimiento del salmón, que según datos de la Federación de Productores Acuícolas Europeos (FEAP), hasta el 2008 creció en un 6,4%. También se ha incrementado la producción de otras especies como los peces planos, la lubina o la dorada (6,4%), siendo estas dos últimas especies las que dominan la acuicultura marina dentro de la Unión Europea.

La producción acuícola española, según el Ministerio de Medio Ambiente y Medio Rural y Marino (MARM), representa en los últimos años cerca del 25% de la producción pesquera. La mayor producción española corresponde a moluscos, especialmente mejillón (*Mytilus mytilus*) (74,5%). La producción de peces, tanto de acuicultura marina como continental, supone un 24,59% del total. Lubina, rodaballo, túnidos y especialmente dorada, aglutinaron casi el 50% de la producción (**Figuras III-IV**).

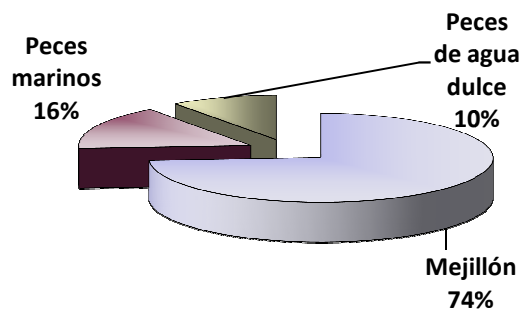


Figura III.- Producción acuícola española en 2008 (JACUMAR)

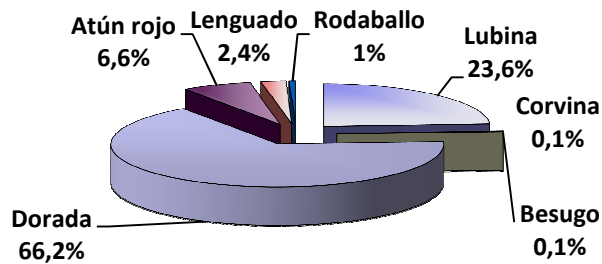


Figura IV.- Distribución de la producción de peces por especies en España (MARM, 2008)

El cultivo en jaulas se practica ampliamente a lo largo de toda la costa mediterránea española y en aguas de las Islas Canarias. En la región canaria se ha potenciado en los últimos años el cultivo en jaulas flotantes debido a unas condiciones oceanográficas muy favorables, que permiten la cría de dorada y lubina. Canarias ocupa el tercer lugar en términos absolutos de producción a nivel nacional con un 25%, precedida solo por las comunidades gallega y valenciana, según la Asociación Empresarial de Productores de Cultivos Marinos de España (APROMAR).

Entre las especies cultivadas en Canarias se encuentra la dorada, siendo esta comunidad la tercera productora española de esta especie (15% de la producción nacional), precedida por la Comunidad Valenciana (39%) y Murcia (27%). La especie más cultivada en las Islas Canarias es la lubina, con una producción del 32% de la producción nacional, seguida de las regiones de Murcia (30%) y Andalucía (22%). Existen otras dos especies nuevas en su comercialización, como son la corvina (*Argyrosomus regius*), cuya producción en Canarias representa el 30% de la producción total española, precedida únicamente por la región de Murcia (42%). Y la otra especie que se produce en el Archipiélago Canario es el lenguado (*Solea senegalensis*), con una producción del 15% de la producción nacional y precedida por Galicia, que produce el 80% de la producción total (APROMAR, 2010).

2. Enfermedades más importantes en acuicultura

Muchas son las infecciones bacterianas que pueden afectar a las explotaciones y pueden convertirse en un importante problema si no son controladas efectivamente. En la bibliografía se describen infecciones por *Vibrio* spp., *Aeromonas* spp., *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*, *Tenacibaculum maritimum* y otras flexibacterias y *Pseudomonas anguilliseptica*, entre otras. La mayoría de estos microorganismos forman parte del medio marino, y solo en determinadas circunstancias van a sobrepasar las barreras defensivas de los peces.

Las enfermedades bacterianas son la causa más importante de mortalidad en la acuicultura y, aunque suceden como resultado de la interacción de múltiples factores (patógeno, hospedador y medio ambiente) (Ellis, 1988), sin duda uno de los más importantes es el propio sistema inmunitario de los peces.

Como ejemplo se pueden citar algunos casos que suceden en la actualidad en el ámbito nacional (Skretting, 2008):

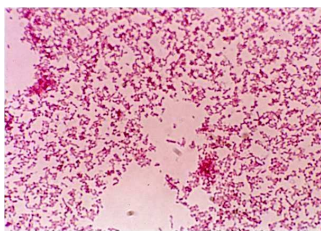
- La pasteurelisis ha frenado continuamente el cultivo del lenguado en el Mediterráneo y Galicia.
- La nodaviriosis en la lubina está causando elevadas mortalidades en zonas endémicas de jaulas durante el verano, agravándose con brotes mixtos de pasterelosis y vibriosis.

Por esto es muy importante tener el mayor conocimiento de los patógenos que pueden afectar a los peces, para así poder controlarlos y evitar grandes pérdidas económicas.

Entre las enfermedades bacterianas más importantes que nos podemos encontrar en la acuicultura española, podemos citar las siguientes:

- ~ **Pasterelosis**: es una de las enfermedades más importantes que afectan al cultivo de dorada, lubina y lenguado. Está ocasionada por la bacteria *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*. Se pone de manifiesto cuando la temperatura del agua es superior a 18°C. Por ello, por su perfil de temperatura, en Canarias es una enfermedad endémica todo el año. El riesgo se produce principalmente en fases tempranas del desarrollo de la

dorada y la lubina, pero debido al aumento de biomasa, están apareciendo brotes de la enfermedad en talla comercial, donde el impacto económico es mayor. La transmisión de esta enfermedad puede ser horizontal, de pez a pez (Toranzo *et al.*, 1982) o vertical, a través del fluido ovárico y seminal (Romalde *et al.*, 1999). Puede cursar como enfermedad aguda, con elevada mortalidad o como una enfermedad crónica con una mortalidad en goteo. Externamente no presenta síntomas diferenciales, a nivel interno puede aparecer una inflamación del bazo, que en curso crónico presenta unos gránulos blanquecinos (Daly, 1999). El diagnóstico se puede hacer por cultivo e identificación por métodos bioquímicos, aislando bacilos Gram-negativos inmóviles con tinción bipolar (Romalde, 2002), métodos serológicos y PCR (Osorio *et al.*, 1999). Existen vacunas comerciales frente a esta enfermedad.



Tinción de Gram de *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* (Caso clínico del laboratorio de Enfermedades Infecciosas e Ictiopatología – Instituto Universitario de Sanidad Animal y Seguridad Alimentaria de la Universidad de Las Palmas de Gran Canaria)

Lubina infectada por *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*
http://www.vetcare.gr/SIPI_presentation.htm#Important

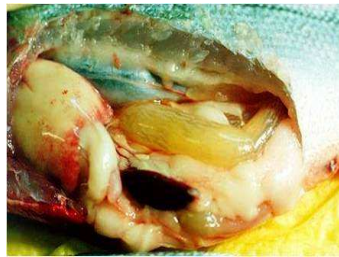


~ **Vibriosis:** ocasionada por diferentes especies del género *Vibrio*, se suele dar en verano, con elevadas temperaturas. Es uno de los géneros que causa mayores pérdidas económicas en la acuicultura (Toranzo *et al.*, 2005), afectando a numerosas especies de peces. En la lubina se describen infecciones por *Listonella anguillarum* y *Vibrio alginolyticus*, mientras, en la dorada, predomina esta última. *Vibrio alginolyticus* se puede comportar como un patógeno oportunista con posibilidad de dañar los tejidos o como un patógeno no muy virulento que puede favorecer el estrés en los peces. Se suele aislar de aguas costeras templadas y tropicales. El reservorio de este microorganismo lo constituyen el agua, principalmente salada, y los alimentos de origen marino o contaminados con agua de mar. Externamente el animal presenta una distensión abdominal y hemorragias en piel y base de aletas (Martínez y Vélez, 2002), e internamente se observa una congestión y dilatación del tubo digestivo, al igual que hemorragias en las vísceras (Balebona *et al.*, 1998a,b). Para su diagnóstico se puede emplear la misma metodología que para la enfermedad anterior (Kim *et al.*, 1999). Liu, P.C. *et al.* (2004) estudiaron la sensibilidad de la bacteria ante algunos agentes quimioterapéuticos y los resultados fueron: sensible a cloranfenicol, ciprofloxacina, doxiciclina, eritromicina, kanamicina, ácido nalidíxico, nitrofurantoína, ácido oxolínico, oxitetraciclina, estreptomina, sulfonamida y tetraciclina. Existen vacunas para prevenir infecciones por vibrios.



Tinción de Gram de *Vibrio alginolyticus*

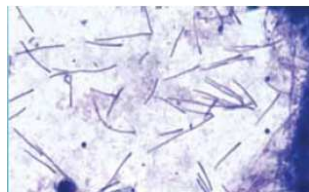
<http://www.revista.unam.mx/vol.6/num4/art36/int36.htm>



Palidez hepática con petequias, esplenomegalia, distensión abdominal y vejiga natatoria, son algunas de las lesiones que produce *Vibrio alginolyticus*.

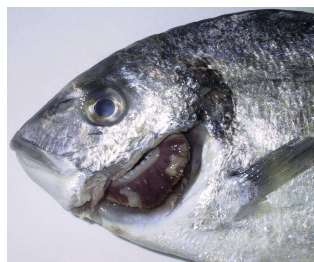
http://www.vetcare.gr/pics_vibriosis_lesions.htm

- ~ **Flexibacteriosis marina**: producida por *Tenacibaculum maritimum* (Toranzo *et al.*, 2005). Afecta principalmente a la lubina, lenguado, rodaballo y salmónidos. Los alevines y juveniles sufren la forma más severa de esta enfermedad. Es más frecuente en invierno y en primavera. Es una enfermedad fácilmente diferenciable ya que ocasiona zonas necróticas en la piel y la aleta caudal, con posibilidad también de que afecte a las branquias. En el frotis de las zonas dañadas pueden observarse bacterias, que son alargadas y flexibles y con tendencia a agruparse. La puerta de entrada al pez son pequeñas heridas o erosiones en la piel. Para su diagnóstico se puede emplear la misma metodología que para la enfermedad anterior. Existe una vacuna disponible patentada por la Universidad de Santiago de Compostela (España) para rodaballo (Santos *et al.*, 1999). La bacteria es sensible a sulfamidas potenciadas, oxitetraciclina o florfenicol, combinada con baño de formol o agua oxigenada.



Tenacibaculum maritimum. Tinción Giemsa de un frotis de lesiones (Toranzo, 2010)

Úlceras ocasionadas por dicha bacteria



(Caso clínico del laboratorio de Enfermedades Infecciosas e Ictiopatología – Instituto Universitario de Sanidad Animal y Seguridad Alimentaria de la Universidad de Las Palmas de Gran Canaria)

Lamelas con lesiones producidas por *Tenacibaculum maritimum*

- ~ **Forunculosis:** enfermedad muy contagiosa producida por *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida*. Causa bajas devastadoras en salmónidos, pero también afecta a otras especies de peces mostrando una distribución generalizada (Toranzo *et al.*, 2005). Los peces presentan signos de septicemia hemorrágica de curso agudo o crónico, y a veces forúnculos de tamaño variable que se localizan en cualquier zona de la superficie corporal. En los casos agudos suelen aparecer úlceras. La bacteria se puede aislar en medios microbiológicos convencionales, en los que es frecuente el crecimiento de colonias de color marrón a las 48 horas. Se comercializan vacunas desde 1980, presentando mejores resultados con vacunas polivalentes frente a *Vibrio* spp. y *Aeromonas salmonicida*. Los

antibióticos a los que no suele presentar resistencia el agente causal son: oxitetraciclina, flumequine y ácido oxolínico.



Lesión producida por *Aeromonas salmonicida*
<http://www.lsc.usgs.gov/FHB/leaflets/FHB66.pdf>

- ~ **Edwardsielosis:** enfermedad infecto-contagiosa producida, principalmente por *Edwardsiella tarda*, que afecta a una gran cantidad de peces tanto cultivados como salvajes con una amplia distribución geográfica (Toranzo, 2007) a temperaturas entre 16-18°C. Es una enfermedad emergente en toda Europa y es capaz de provocar alta mortalidad. Se caracteriza por la aparición de abscesos enfisematosos en tejido subcutáneo y musculatura que desprende un olor nauseabundo. Produce, también, tumefacción alrededor de los ojos. Internamente, se aprecia acumulación de fluido ascítico en la cavidad abdominal y riñón hemorrágico. Existen vacunas comerciales, aunque la investigación sigue sobre vacunas frente a esta enfermedad (Kawai *et al.*, 2004; Kwon *et al.*, 2006; Hou *et al.*, 2009). La bacteria responde a los antibióticos de amplio espectro, que pueden ocasionar fenómenos de resistencia tras varios tratamientos. Para su prevención da buen resultado enriquecer la dieta con vitamina C.

Múltiples abscesos en bazo y riñón en rodaballo afectado por *Edwardsiella tarda* (Skretting, 2007)



- ~ **Enfermedad de la boca roja (RMD)**: enfermedad que afecta principalmente a peces de acuicultura continental y que puede ocurrir a lo largo de todo el año. Enfermedad infecto-contagiosa producida por *Yersinia ruckeri*, bacteria Gram-negativa. Aparece un cuadro septicémico en el que los peces presentan hemorragias de distinta magnitud que afectan principalmente a la zona ventral de la cabeza, boca y base de las aletas. Los peces afectados pueden presentar distensión abdominal debido al acúmulo de gas y líquido en el estómago. Produce un 35% de mortalidad de los animales afectados. Existen numerosas formas de transmisión incluyendo pájaros y peces salvajes, coexistiendo también el estado portador con la transmisión de la enfermedad (Willumsen, 1989). Hasta hace unos años, la enfermedad se controlaba muy bien por medio de programas de vacunación frente a las cepas clásicas de la enfermedad. Pero recientemente ha aparecido una nueva cepa, frente a la cual las vacunas clásicas no protegen (Skretting, 2007). La bacteria es sensible a los antibióticos de amplio espectro.



Enfermedad de la boca roja: tejidos afectados por *Yersinia ruckeri*
web.abo.fi/instut/fisk/Swe/Bakterier/yersinia.htm

- ~ **Estreptococosis**: enfermedad que suele aparecer en épocas más calurosas. Los estreptococos están considerados uno de los principales agentes etiológicos causantes de enfermedades en acuicultura marina (Toranzo *et al.*, 2005). La enfermedad está ocasionada por cocos Gram-positivos, catalasa negativos. Los signos clínicos externos son natación errática, giros en la superficie, cuerpo en forma de C (Buller, 2004), obnubilación sensorial y melanosis. Las fuentes de infección se las suele relacionar con el alimento que reciben y con efectos de actividad humana cercana, sobretodo ganado vacuno cercano. Los estreptococos producen procesos degenerativos y necróticos en los tejidos debido a la producción de toxinas que son responsables de producir exoftalmia y hemorragias petequiales en distintos lugares del organismo. Puede producirse enteritis hemorrágica. Un estreptococo común en canarias es el *Streptococcus iniae*, cuyos signos clínicos pueden variar en función de la especie a la que afecte, bien a la dorada o al bocinegro (*Pagrus pagrus*) (El Aamri *et al.*, 2010). La infección crónica ocurre a 25°C, mientras que la infección aguda

aparece entre los rangos 28-32°C (Yuasa *et al.*, 1999). Existen vacunas efectivas frente a esta enfermedad y los productos más efectivos frente a esta bacteria son penicilina, oxitetraciclina o quinolonas.



***Streptococcus iniae* mediante la tinción de Gram y lesiones que produce esta bacteria (Caso clínico del laboratorio de Enfermedades Infecciosas e Ictiopatología – Instituto Universitario de Sanidad Animal y Seguridad Alimentaria de la Universidad de Las Palmas de Gran Canaria)**

Entre las enfermedades víricas más importantes se encuentran:

- ~ **Nodavirus (Encefalopatía y Retinopatía Viral)**: en los últimos años, es la enfermedad más grave que afecta a la lubina cultivada en jaulas en la Península Ibérica. Es un proceso estacional, con temperaturas de riesgo por encima de 20°C. Este virus afecta al sistema nervioso central, causando lesiones en esos tejidos y provocando alteraciones en la natación. El proceso puede provocar altas mortalidades y los peces que sobreviven pueden quedar como portadores del virus (Skretting, 2007).



Congestión severa del cerebro en una lubina (Skretting, 2007)

~ **Linfocistis**: enfermedad producida por un iridovirus, que ha sido detectada en peces de los cinco continentes y en más de 125 especies. Afecta a gran parte de la población, sin embargo produce una escasa mortalidad, solo en casos extremos, como puede ser agua fría y/o estrés (Torroella y Gilsbert, 1993). Afecta a peces de agua salada, dulce o salobre en un amplio rango de temperaturas. Entre las especies marinas, la dorada es la más afectada. En general comienza a aparecer en primavera, alcanzando su punto máximo en verano y desapareciendo prácticamente en otoño. Los peces afectados presentan nódulos macroscópicos, que no son más que células hipertróficas (Baptista *et al.*, 1999). Al igual que ocurre con otras infecciones virales de peces, no existen medidas profilácticas adecuadas para el control de la enfermedad en dorada, sino que la prevención debe pasar por evitar la introducción del virus en las piscifactorías y por establecer medidas higiénico-sanitarias que permitan su eliminación. Se han identificado portadores del virus en distintas etapas del cultivo de la dorada (reproductores, huevos, larvas, postlarvas y juveniles), habiéndose también detectado en cultivos de rotíferos y artemias utilizado para el alimento de las larvas (Cano *et al.*, 2009a,b).



Dorada afectada por linfocistis
(Caso clínico del laboratorio de Enfermedades Infecciosas e
Ictiopatología – Instituto Universitario de Sanidad Animal y Seguridad
Alimentaria de la Universidad de Las Palmas de Gran Canaria).

Entre las enfermedades parasitarias más importantes nos encontramos:

- ~ **Infestación por *Cryptocaryon irritans***: parásito ciliado de peces marinos que causa la enfermedad del punto blanco en peces de regiones tropicales y subtropicales. En peces salvajes, este parásito produce infecciones de baja intensidad, en cambio, puede causar infecciones severas con alta mortalidad en peces de acuarios y piscifactorías, sobretodo con alta densidad (Luo *et al.*, 2007). Los peces muestran dificultad respiratoria, pueden presentar numerosos puntos blancos sobre la piel, junto con un aumento de la producción de mucosidad y hemorragias en áreas localizadas. La córnea puede presentar señales de opacidad corneal (Colorni y Burgess, 1997). La inmunoprofilaxis es una alternativa a los métodos quimioterapéuticos para controlar esta enfermedad (Luo *et al.*, 2007).

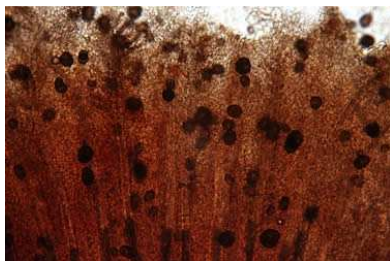


http://www.liveaquaria.com/images/articles/tfh_ich_fish.jpg

Lubina afectada por *Cryptocaryon irritans*
(Skretting, 2007)



- ~ **Infestación por *Amyloodinium ocellatum***: parásito dinoflagelado que afecta a numerosos peces marinos, incluyendo lubina, dorada o sargo picudo. La enfermedad que produce se denomina enfermedad del terciopelo, por la apariencia externa, además de anorexia y cambios en el comportamiento. Se producen brotes en periodos de elevada temperatura. A partir del estadio infectivo se fija a la piel o branquias ocasionando daños que conducen a estrés respiratorio pudiendo causar mortalidad. Una buena medida preventiva es la limpieza (Álvarez-Pellitero *et al.*, 2007), eliminación de materia orgánica del fondo del tanque para evitar el ciclo del parásito, limpieza de tuberías, etc.



<http://www.merckvetmanual.com/mvm/servelet/CVMHighlight?file=htm/bc/exlfh15.htm&word=Amyloodinium,ocellatum>



http://www.fosterandsmithaquatics.com/images/articles/tfh_velvet.jpg

- ~ **Infestación por *Furnestinia echeneis* y *Sparycotyle chryisophrii***: tremátodos monogéneos que parasitan las branquias. Especialmente virulentos en verano. Irritan las laminillas branquiales y el pez responde con un aumento de la mucosidad e hiperplasia epitelial. Los peces afectados boquean en la superficie del agua y se congregan en las zonas

donde el agua contiene más oxígeno. En casos agudos la mortalidad puede ser súbita y en casos de infestación crónica las infecciones bacterianas secundarias suelen ser la causa de mortalidad.



Grave anemia en dorada provocada por el parásito *Sparycotyle chrysophrii* (Skretting, 2007)

- ~ **Infestación por *Enteromyxum leei***: mixosporidio que a altas temperaturas produce una enteritis hemorrágica grave, originando un cuadro crónico donde típicamente se pierde toda la musculatura dorsal. La mortalidad no suele ser alta. No existe tratamiento conocido (Skretting, 2007).



Pérdida de musculatura dorsal de una dorada
http://www.vetcare.gr/pics_myxidiosis_lesions.htm

3. Agente responsable de la Vibriosis

La vibriosis es una enfermedad que está producida por distintas especies del Género *Vibrio*, asociada a condiciones ambientales estresantes como cambios en la temperatura del agua, salinidad, manipulación y baja calidad del agua, incluyendo la disminución en niveles de oxígeno y eutrofización (Austin y Austin, 1987; Sinderman, 1990).

Sinderman (1990) describió la vibriosis como el principal factor de mortalidad de muchos peces de cultivo y salvajes, siendo responsable de grandes pérdidas económicas para la acuicultura. Engloba un conjunto de signos patológicos similares, manifestándose por lo general con septicemia hemorrágica (Hjeltnes y Roberts, 1993). Además, puede ser responsable de mortalidades masivas durante brotes graves (Martínez y Vélez, 2002).

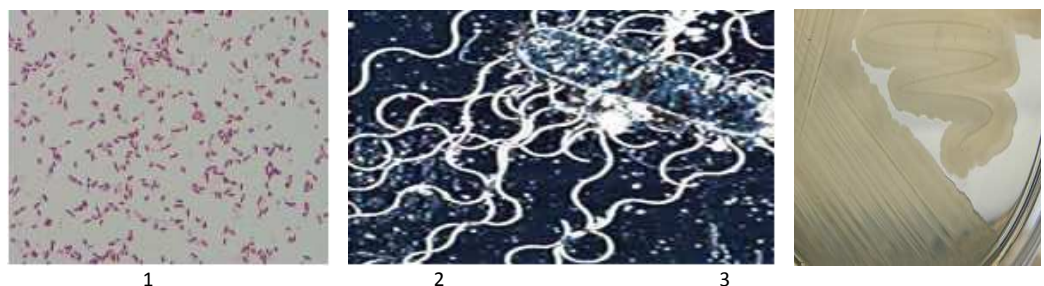
En la Familia *Vibrionaceae* y Género *Vibrio* encontramos el *Vibrio alginolyticus*, bacteria que puede ser aislada de diferentes organismos marinos como parte de la microbiota saprófita (Carli *et al.*, 1993). Sin embargo, se ha sugerido que esta especie es patógena para muchos animales marinos y para la especie humana (Blake *et al.*, 1980; Lee, 1995; Riquelme *et al.*, 1996; Balebona *et al.*, 1998a,b; Gómez-León *et al.*, 2005).

Vibrio alginolyticus es uno de los agentes causales de la vibriosis en los peces, siendo descrito por primera vez por Sakazaki (1968). Ha sido considerado como un patógeno oportunista (Sakazaki, 1968), pero, en muchos casos, aparece en la bibliografía como agente responsable de elevada mortalidad en granjas de peces. Es controvertido el papel preciso del *Vibrio*

alginoliticus como patógeno de peces (Balebona *et al.*, 1998a), por este motivo muchos autores actualmente consideran que debe revisarse su papel como agente “oportunista o secundario”. Recientes estudios sugieren que es un agente patógeno epizootico de muchos animales acuáticos (Balebona *et al.*, 1998b; Chien *et al.*, 2002; Liu, C.H. *et al.*, 2004; Honghong *et al.*, 2011).

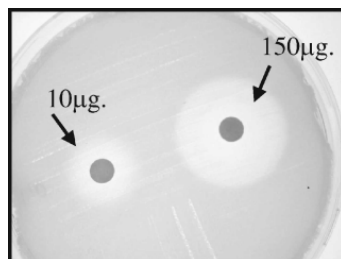
Varios autores han demostrado que esta especie es genéticamente heterogénea y exhibe un gran número de actividades enzimáticas, las cuales permiten a la bacteria colonizar los órganos internos del pez y sobrevivir bajo condiciones de estrés en el agua (Snoussi *et al.*, 2009).

El patógeno *Vibrio alginolyticus* es un bacilo corto o curvo Gram-negativo, móvil por flagelos peritricos y polares, presentando el fenómeno de *swarming*, típica característica de esta especie en la mayoría de sus cepas.



Visualización de *Vibrio alginolyticus*: 1) tinción de Gram (x1000) (Buller, 2004); 2) Ubicación de los flagelos peritricos y polares (<http://www.revista.unam.mx/vol.6/num4/art36/int36.htm>); 3) Crecimiento en BHI mostrando el característico *swarming* a las 24h (Caso clínico del laboratorio de Enfermedades Infecciosas e Ictiopatología – Instituto Universitario de Sanidad Animal y Seguridad Alimentaria de la Universidad de Las Palmas de Gran Canaria)

Presenta oxidasa y catalasa positivo, utiliza como fuente de carbono y energía la D-glucosa. Además, produce ácido a partir de: glucosa, maltosa, manitol y sacarosa, entre otros. Presenta resistencia al agente vibrioestático O/129 de concentración de 10 µg/ml (De Paola, 1991; Elliot *et al.*, 1995) y una elevada sensibilidad a la concentración 150 µg/ml, al igual que a la novobiocina.



<http://www.scielo.org.ve/img/fbpe/rsvm/v23n2/image101.jpg>

Se ha descrito también resistencia a la ampicilina, metilina, lincomicina, penicilina y carbenicilina, así como susceptibilidad a la tetraciclina, cloranfenicol, gentamicina, kanamicina, estreptomina y neomicina (Joseph *et al.*, 1978, 1983; Baumann y Schubert, 1984). Otra característica es que es quimiorganotrófico. Las colonias que se forman son de color grisáceo-transparentes. Dentro del Género *Vibrio*, *Vibrio alginolyticus* es uno de los más halofílicos de todos ya que es capaz de crecer a diferentes concentraciones de NaCl. Como método de distinción entre *Vibrio alginolyticus* y *Vibrio parahaemolyticus*, Molitoris *et al.* (1985) observaron el crecimiento de los vibrios en presencia de 10% de NaCl, producción de acetoina y fermentación de arabinosa, siendo estas pruebas solo positivas para el *Vibrio alginolyticus* (**Tabla II**).

Tabla II.- Características bioquímicas de *Vibrio alginolyticus*

Gram	-	Manosa	+
Movilidad	+	Salicina	+
Oxidasa	+	Trehalosa	+
O/F Glucosa	+	Xylosa	-
β -galactosidasa	-	Glicerol	+
Arginina dehidrolasa	-	Crecimiento en:	
Lisina decarboxilasa	+	Agar Marino	+
Ornitina decarboxilasa	V	Agar BHI + NaCl	+
Citrato	V	Agar sangre + NaCl	+
Sulfhídrico	+	Agar McConkey	V
Indol	+	Agar TSA + NaCl	+
Nitrato	+	Agar TCBS + NaCl	+
Ureasa	-	Crecimiento a:	
Triptófano desaminasa	-	5°C	-
Catalasa	+	10°C	-
Rojo de metilo	+	15°C	+
Voger Proskauer	+	25°C	+
Gelatinasa	+	30°C	+
Producción de ácido a partir de:		37°C	+
Glucosa	+	Crecimiento con:	
Manitol	+	0% de NaCl	-
Inositol	V	1,5% de NaCl	+
Sorbitol	V	7% de NaCl	+
Ramnosa	-	10% de NaCl	+
Sacarosa	V	Resistencia a:	
Melobiosa	-	Agente vibriostático O/129 (150 μ g/ml)	-
Amigdalina	V	Novobiocina	-
Arabinosa	-	Hemólisis	+
Esculina	-	Lipasa	+
Lactosa	-	Chitina	+
Maltosa	+	Amilasa	+

+: Reacción positiva; -: Reacción negativa; V: Reacción variable

En cuanto a la morfología de su colonia, se describe en base a su crecimiento en agar tiosulfato citrato sales biliares sacarosa (TCBS), como colonias convexas de 2 a 6 mm de diámetro, de color amarillo por la fermentación de la sacarosa presente en el medio. En la última década se han descrito varios factores de virulencia de *Vibrio alginolyticus* relacionados con su habilidad de producir hemólisis, hemaglutinación y la presencia de proteasas (Zanetti *et al.*, 2000).

En 1995, algunos autores demostraron que temperaturas bajas favorecen el estado viable pero no cultivable de la bacteria, siendo ésta una estrategia adaptativa de microorganismos frente a estrés medioambiental, donde las bacterias se podrían recuperar una vez fueran restablecidas las condiciones óptimas (Huq y Colwell, 1995; Oliver y Bockian, 1995). Baffone *et al.* (2003) pasaron a este estado dos cepas salvajes, *Vibrio alginolyticus* y *Vibrio parahaemolyticus*, cultivándolas en agua de mar e incubándolas a 5°C. Después, una vez restablecidas sus condiciones óptimas de cultivo, crecieron de nuevo y conservaron sus propiedades virulentas. La temperatura (Oliver *et al.*, 1991), la limitación de nutrientes (Fouz *et al.*, 1998), los niveles de osmolaridad, humedad (Heidelberg *et al.*, 1997) y aireación (Rollins y Colwell, 1986), son factores importantes que contribuyen a la inducción del estado de viable pero no cultivable (VBNC) de la bacteria. Sin embargo, el estrés producido por la ausencia de nutrientes y las bajas temperaturas parecen ser las principales causas de inducción del estado VBNC de algunas de las bacterias patógenas (Oliver, 1993; Colwell y Huq, 1994).

Srinivasan y Kjellberg (1998) encontraron que en las condiciones de limitación de nutrientes e inanición en ambientes naturales, la respuesta de *Vibrio* spp. no es simplemente una detención de todas las actividades metabólicas, sino que se puede argumentar que el ciclo de vida de las bacterias, en general, consta de dos fases principales. La transición entre estas dos fases implica cambios drásticos en la expresión génica, fisiología y morfología. Esta misma idea presentan Rosenberg y Ben-Haim (2002), que postulan que se observan diferencias entre las bacterias VBNC y las bacterias viables cultivables como reducción del tamaño de la célula, aumento del grosor de la pared celular, disminución de la cantidad de ARN, ADN y formación de biofilms.

Vibrio alginolyticus ha desarrollado estrategias que le permiten sobrevivir en agua de mar en ausencia de nutrientes (Ben Kahla-Nakbi *et al.*, 2007). Bajo estas condiciones *Vibrio alginolyticus* puede entrar en el estado de VBNC desde el cual puede resurgir después de la adición de nutrientes, manteniendo su potencial infectivo al pez. La bacteria conserva su perfil bioquímico inicial tras 6 meses incubado en un ambiente marino, debido probablemente, a que el tiempo de incubación fue proporcional a la cantidad de nutrientes que había en dicho ambiente. Estos resultados están en concordancia con los obtenidos por estudios similares realizados sobre otras especies de vibrios autóctonos de ecosistemas acuáticos. Esto significa que *Vibrio alginolyticus* es un patógeno oportunista, cuyo principal reservorio probablemente sea el medio acuático.

Las diferentes alteraciones observadas en los patrones de proteínas de la membrana externa (OMPs) en *Vibrio alginolyticus* y *Vibrio parahaemolyticus* pueden confirmar la existencia de ciertas modificaciones en la resistencia a algunos antibióticos (Ben Abdallah *et al.*, 2009), al igual que se ha descrito con otras bacterias (Chen y Livermore, 1993; Mushtaq *et al.*, 2004). Varios autores (Gauthier *et al.*, 1988; Ben Abdallah *et al.*, 2009) observaron modificaciones enzimáticas, morfológicas, proteómicas en *Vibrio alginolyticus* y *Vibrio parahaemolyticus*, al igual que observaron alteraciones genéticas manifestándose con pérdida de 3 plásmidos. Además, algunas bacterias marinas, al igual que pueden perder plásmidos de ADN en el agua de mar, pueden obtener otros. Esto puede afectar a la estabilidad de los factores de virulencia de la bacteria en el medio marino, al igual que a la transformación de cepas no patógenas en cepas patógenas y viceversa.

Snoussi *et al.* (2009) observaron que la habilidad de tener formas viables pero no cultivables permite a la bacteria persistir en toda la granja, poniendo en serio peligro la salud de los peces y, consecuentemente, causar enormes pérdidas en la productividad, especialmente, en los criaderos de alevines.

El hierro es un elemento esencial para el crecimiento de los microorganismos, pero en los tejidos de los hospedadores se encuentra a concentraciones bajas y normalmente quelado con proteínas. Los microorganismos han desarrollado diversos mecanismos para adquirir el hierro *in vivo*, incluyendo la producción de sideróforos que pueden extraer el hierro de las proteínas quelantes del hospedador, como la transferrina y lactoferrina (Brock *et al.*, 1991; Otto *et al.*, 1992). La presencia de sideróforos

es un factor de virulencia importante para los patógenos de peces, incluyendo *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* (Magariños *et al.*, 1994), *Listonella anguillarum* (Lemos *et al.*, 1988; Gierer *et al.*, 1992), *Vibrio vulnificus* (Biosca y Amaro, 1996) y *Aeromonas* spp. (Esteve y Amaro, 1991).

Balebona *et al.* (1998b) comprobaron que las cepas con las que trabajaron de *Vibrio alginolyticus* mostraban sideróforos sobre el agar CAS (sulfato azulol cromo), indicando que *Vibrio alginolyticus* puede obtener hierro de compuestos de alta afinidad y sugiere que podrían también obtener hierro de proteínas quelantes con hierro del hospedador.

En el trabajo de Balebona *et al.* (1998b) analizaron la actividad hidrolítica de los productos extracelulares de *Vibrio alginolyticus*. Dedujeron que son muy hidrolíticos, puesto que obtuvieron que los productos extracelulares contenían entre 366 y 722 μg de proteína/ml. Todas las cepas fueron positivas a la fosfatasa alcalina y al ácido fosfatasa, pero negativas a la lipasa, α -galactosidasa, β -galactosidasa, β -glucuronidasa, α -glucosidasa, α -manosidasa y α -fucosidasa. El sistema API ZYM ha sido usado en muchos estudios para discriminar microorganismos relacionados, los cuales exhiben niveles altos de homogeneidad en sus perfiles bioquímicos convencionales (Gruner *et al.*, 1992; Biosca y Amaro, 1996). Se ha observado variabilidad fenotípica en cepas de *Vibrio alginolyticus* aisladas de dorada cultivadas (Balebona *et al.*, 1995). Además, fueron detectadas actividades de caseinasa, gelatinasa, amilasa, fosfolipolipasa y colagenasa en todas las cepas. Sin embargo, la actividad de la elastasa no se detectó en los productos extracelulares.

Las actividades hidrolíticas han sido consideradas factores de virulencia porque permiten a la bacteria sobrevivir, proliferar e invadir tejidos de hospedadores (Campbell *et al.*, 1990; Ellis, 1991). Las actividades proteolíticas de los productos extracelulares han sido correlacionados con la patogenicidad de *Listonella anguillarum* (Inamura *et al.*, 1984; Milton *et al.*, 1992) y *Aeromonas salmonicida* (Ellis, 1991).

Balebona *et al.* (1998b,c) demostraron que *Vibrio alginolyticus* tiene la habilidad de adherirse a la piel, agallas y mucus intestinal de la dorada. Sus productos extracelulares pueden degradar el mucus intestinal y son citotóxicos para las líneas celulares de peces.

4. Agente responsable de la Pasterelosis

Esta enfermedad fue descrita por primera vez en una población salvaje de lubina blanca (*Morone americanus*) y lubina estriada (*Morone saxatilis*) en 1963, cuando un brote epidémico ocurrió en la bahía de Chesapeake (EEUU) (Sniezko *et al.*, 1964). El signo más llamativo que apareció fueron unos granulomas en el bazo, por ello se la empezó a denominar pseudotuberculosis.



Granulomas en bazo de lubina por *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* (Caso clínico del laboratorio de Enfermedades Infecciosas e Ictiopatología – Instituto Universitario de Sanidad Animal y Seguridad Alimentaria de la Universidad de Las Palmas de Gran Canaria)

A pesar del hecho de que la pasteurelisis ha sido reconocida hace tiempo como enfermedad de peces, la posición taxonómica de su agente etiológico, *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*, fue objeto de controversia y es en la década de los 90 cuando fue clarificado. Basándose en sus características fisiológicas, como la tinción de Gram, la actividad oxidasa, ausencia de movilidad y la típica forma bacilar bipolar, la bacteria fue inicialmente asignada al Género *Pasteurella* (Sniezko *et al.*, 1964).

Poco después, Janssen y Surgalla (1968) propusieron el nombre de *Pasteurella piscicida* para designar este patógeno, aunque algunos aspectos no coincidían con este género, como por ejemplo la incapacidad de reducir nitrato y la sensibilidad a bajas temperaturas y valores de pH. *Pasteurella piscicida* fue hasta ese tiempo el único miembro halofílico del género. A principios de los años 70 algunos autores japoneses sugirieron diferentes géneros, como *Corynebacterium* (Kimura y Kitao, 1971) y *Arthrobacter* (Simidu y Egusa, 1972) basándose en el metabolismo de carbohidratos, pleomorfismo y sensibilidad a la penicilina. Técnicas inmunológicas mostraron que *Pasteurella piscicida* no presenta antígenos comunes con los dos géneros anteriores (Kusuda *et al.*, 1978). Sin embargo fue observada una relación con un aislado de *Pasteurella plecoglosicida* de ayu (*Plecoglossus altivelis altivelis*), siendo la base para la asignación de la bacteria al Género *Pasteurella*. Se ha descrito que *Pasteurella piscicida* comparte mayores características fenotípicas con otros patógenos de peces como *Listonella anguillarum* y *Aeromonas salmonicida* que con *Pasteurella multocida* y *Pasteurella haemolytica* (Magariños *et al.*, 1992). Esta bacteria se diferencia desde un punto de vista bioquímico del resto de bacterias pertenecientes al Género

Pasteurella por no crecer a 37°C, por ser halófila y por no reducir los nitratos (Magariños *et al.*, 1992).

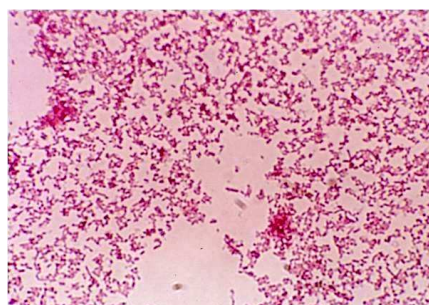
Romalde *et al.* (1995) realizaron un estudio de perfiles de ácidos grasos metilester (FAME) por cromatografía de gases revelando la homogeneidad con diferencias significativas en la mayor cantidad de ácidos grasos en diferentes cepas de *Pasteurella piscicida*. Además, comparando estos resultados con los obtenidos para cepas de origen clínico, como *Listonella anguillarum*, *Aeromonas salmonicida*, sugieren que este agente está más cercano a la *Pasteurella* que a las otras dos especies.

Nicolas *et al.* (1994), basándose en estudios de ARN ribosómico, reclasificaron a esta bacteria como una nueva subespecie de *Vibrio damsela*. Gauthier *et al.* (1994) llevaron a cabo un exhaustivo estudio de la Familia *Vibrionaceae* y organismos afines con las técnicas de secuenciación ARN ribosómico 16S e hibridación ADN-ARN. Un año más tarde, Gauthier *et al.* (1995) propusieron la reasignación de *Pasteurella piscicida* como una nueva subespecie de la recientemente creada *Photobacterium damsela* comb. nov. (formalmente *Vibrio damsela*) (Smith *et al.*, 1991), desde que los dos organismos difieren en un nucleótido en la secuencia ARN ribosómico 16S y muestran una hibridación ADN-ARN de aproximadamente un 80%. Estos resultados fueron después confirmados por otros autores (Osorio *et al.*, 1999), donde fue demostrada la alta similitud en la secuencia de ARN ribosómico de otros miembros de este Género *Photobacterium* (98,1% a *Photobacterium histaminum*). Por lo tanto, el nuevo nombre aprobado para el agente causal de la pseudotuberculosis de peces fue *Photobacterium damsela*

subsp. *piscicida*. Trüper y De'Clari (1997) corrigieron el epíteto específico “damsela” (sustantivo) por “damselae” (genitivo), quedando el nombre final de la bacteria como *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*.

Thyssen *et al.* (2000) caracterizaron cepas de esta bacteria empleando la “Amplified fragment length polimorphism” (AFLP), y demostraron que existe una homología entre *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* y *Photobacterium damsela* subsp. *damsela* de un 77%, lo cual confirma la idea de una proximidad taxonómica.

La bacteria causante de esta enfermedad es un bacilo Gram-negativo inmóvil con tinción bipolar (Austin y Austin, 1999), y no produce esporas. El tamaño y morfología de las células dependerán de las condiciones de cultivo, Koike *et al.* (1975) describieron tamaños desde 0,6-1,2 x 0,8-2,6 μm . Son polimórficas pudiendo ser observados desde micrococcos hasta largos bacilos.



**Tinción de Gram de *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*
(Caso clínico del laboratorio de Enfermedades Infecciosas e
Ictiopatología – Instituto Universitario de Sanidad Animal y Seguridad
Alimentaria de la Universidad de Las Palmas de Gran Canaria)**

Para su cultivo se han usado diferentes medios como son el Agar Infusión Cerebro Corazón (BHIA), Agar Triptona-Neopeptona, Agar Levadura-Peptona, Agar leche y Agar Sangre, enriqueciendo todos los medios de cultivo con un 1,5-2% de NaCl (Egusa, 1992). En estos medios se observan colonias redondas, incoloras, semi-transparentes en forma de “gotas de rocío” y de consistencia pegajosa. En Agar Nutritivo también se cultiva pero su crecimiento no es óptimo, siendo también inadecuado en otros medios líquidos como el Caldo Nutritivo y el Agua de Peptona. Aunque mal, determinadas cepas pueden crecer en Agar MacConkey. No crece en Agar Salmonella-Shigella. *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* presenta un metabolismo anaerobio facultativo (Austin y Austin, 1999).

Sniezko *et al.* (1964), Janssen y Surgalla (1968), Kimura y Kitao (1971), Simidu y Egusa (1972), Kusuda y Yamaoka (1972) describieron las características bioquímicas de *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* coincidiendo de forma general en el comportamiento bioquímico de esta bacteria, exhibiendo unas características típicas como que son inmóviles, oxidasa y catalasa positiva, metabolismo fermentativo, sensible a la acción del agente vibriostático O/129 (Austin y Austin, 1999), no produce gas a partir de la glucosa y es halófila (Janssen y Surgalla, 1968; Magariños *et al.*, 1992). Esta bacteria produce hemólisis de eritrocitos de oveja, salmón y rodaballo, pero no en los eritrocitos de trucha. Sakai *et al.* (1993) encontraron seis aislados que presentaban una superficie hidrofóbica y que eran capaces de aglutinar eritrocitos de oveja.

El agente etiológico de la pasteurelosis en peces muestra arginina dehidrolasa positiva y actividad lipasa y fosfolipasa. Muestra, además, respuesta negativa a indol, reducción de nitrato, ureasa, gelatinasa, amilasa y producción de sulfhídrico (Magariños *et al.*, 1996). En lo que se refiere al uso de carbohidratos, esta bacteria produce ácido solo a partir de glucosa, manosa, galactosa y fructosa. Se encuentran resultados variables con respecto a reacciones de rojo de metilo, Voges-Proskauer, sucrosa y maltosa (Robohm, 1983), como sugieren Koike *et al.* (1975), pudiendo dar origen a esta variabilidad el empleo de diferentes medios basales.

Las características bioquímicas de los diferentes aislados de *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* se muestran en la **Tabla III** (Janssen y Surgalla, 1968; Yasunaga *et al.*, 1983, 1984; Toranzo *et al.*, 1991).

Tabla III.- Características bioquímicas de *Photobacterium damselae* subsp. *piscicida*

Gram	-	Trehalosa	-
Movilidad	-	Xylosa	-
Oxidasa	+	Glicerol	-
O/F Glucosa	+	Galactosa	+
β -galactosidasa	-	Fructosa	+
Arginina dehidrolasa	+	Crecimiento en:	
Lisina decarboxilasa	-	Agar Marino	+
Ornitina decarboxilasa	-	Agar BHI + NaCl	+
Citrato	-	Agar sangre + NaCl	+
Sulfhídrico	-	Agar McConkey	-
Indol	-	Agar TSA + NaCl	+
Nitrato	-	Agar TCBS + NaCl	-
Ureasa	-	Agar/Caldo nutritivo	+
Triptófano desaminasa	-	Agua de peptona	+
Catalasa	+	Crecimiento a:	
Rojo de metilo	+	5°C	-
Voger Proskauer	+	10°C	-
Gelatinasa	-	15°C	+
Producción de ácido a partir de:		25°C	+
Glucosa	+	30°C	+
Manitol	-	37°C	-
Inositol	-	Crecimiento a:	
Sorbitol	-	0% de NaCl	-
Ramnosa	-	1,5% de NaCl	+
Sacarosa	-	7% de NaCl	-
Melibiossa	-	10% de NaCl	-
Amigdalina	-	Resistencia a:	
Arabinosa	-	Agente vibriostático O/129	-
Esculina	-	Novobiocina	-
Lactosa	-	Hemólisis	+
Maltosa	-	Lipasa	+
Manosa	+	Amilasa	-
Salicina	-		

+: Reacción positiva; -: Reacción negativa;

La cápsula parece estar compuesta por un material denso y de finos filamentos proyectados sobre la superficie de la célula. La elaboración de la cápsula por esta bacteria parece depender de la disponibilidad de hierro y la fase de crecimiento de la bacteria, la limitación de hierro en la fase temprana de crecimiento induce una cápsula distinta (do Vale *et al.*, 2001). También depende de la disponibilidad de glucosa en el medio (Acosta *et al.*, 2006). La presencia de la cápsula en la bacteria le confiere resistencia e incrementa la virulencia con respecto a cepas no encapsuladas (Arijo *et al.*, 1998; do Vale *et al.*, 2001).

Jung *et al.* (2008) observaron diferencias en el perfil de glicoproteínas entre bacterias cultivadas *in vitro* e *in vivo*, sugiriendo que la expresión de estas proteínas depende de las condiciones de cultivo de la bacteria. Las bandas de carbohidrato que identificaron en este estudio pueden representar ácidos siálicos (Jung *et al.*, 2001). También encontraron en la bacteria carbohidratos de alto peso molecular, quizá relacionados con la cápsula que aparece cuando la bacteria es cultivada *in vivo*.

Algunas características bioquímicas que diferencian a *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* de algunos patógenos comunes en acuicultura, como *Listonella anguillarum* y *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida*, así como de otras *Pasteurella* spp. se muestran en la **Tabla IV** (Magariños *et al.*, 1992).

Todos los aislados del continente europeo, Japón y Estados Unidos son bioquímicamente y antigénicamente similares (Magariños *et al.*, 1992), a su vez presentan patrones electroforéticos similares en sus lipopolisacáridos y los perfiles de proteínas de las membranas.

Tabla IV.- Diferencias bioquímicas entre diferentes patógenos comunes en la acuicultura

Especies	<i>Ph. damselae</i> subsp. <i>piscicida</i>	<i>L.</i> <i>anguillarum</i>	<i>A. salmonicida</i> subsp. <i>salmonicida</i>	<i>P.</i> <i>multocida</i>	<i>P.</i> <i>haemolítica</i>
Motilidad	-	+	-	-	-
Producción de gas de glucosa	-	-	+	-	-
Arginina dehidrolasa	+	+	+	-	-
Indol	-	+	-	+	-
Reducción de nitrato	-	+	+	+	+
Gelatinasa	-	+	+	-	-
Crecimiento a 37°C	-	V	-	+	+
Requerimiento de sal	+	+	-	-	-
Sensibilidad:					
O/129	S	S	R	S	S
Novobiocina	S	S	R	S	V

+: Reacción positiva; -: Reacción negativa; V: Reacción variable; S: Sensible; R: Resistente

5. Estudio de la Nodaviriosis

Durante las últimas dos décadas se ha descrito frecuentemente un proceso neuropatológico de carácter infeccioso en cultivos marinos de peces, que se ha ido extendiendo geográficamente a nivel mundial, y que representa una fuerte amenaza económica para la industria de la acuicultura (Munday *et al.*, 2002). Recientemente, esta patología, se ha descrito también en peces de agua dulce como *guppy* (*Poicilia reticulata*) (Hedge *et al.*, 2003) y esturión (*Acipenser gueldestaedi*) (Athanasopoulou *et al.*, 2004).

Esta enfermedad, conocida como necrosis nerviosa viral (VNN) o encefalopatía y retinopatía viral (VER), se caracteriza por el desarrollo de encefalopatías y retinopatías vacuolizantes detectadas mediante histología y asociadas a nataciones erráticas que desembocan en mortalidades muy elevadas, pudiendo alcanzar el 100% fundamentalmente en estadíos larvarios y juveniles de las especies afectadas, como lubina (Bellance y Gallet de Saint-Aurin, 1988) y pez loro japonés (*Oplegnathus fasciatus*) (Yoshikoshi e Ioue, 1990), entre otras, mostrando una amplia distribución geográfica.

Los síntomas clínicos más comunes en algunas de las especies que se ha detectado esta enfermedad viral se pueden ver en la **Tabla V**.

Tabla V.- Síntomas clínicos más comunes de la nodaviriosis (O.I.E., 1997)

Especie	Síntomas clínicos
<i>Lates calcarifer</i> (Perca gigante)	Natación rápida y no coordinada Palidez Anorexia Extenuación
<i>Dicentrarchus labrax</i> (Lubina)	Movimientos giratorios Vejiga natatoria muy hinchada anorexia
<i>Oplegnathus fasciatus</i> (Pez loro japonés)	Natación en espiral Color oscuro
<i>Epinephelus akaara</i> (Mero de Hong Kong)	Movimientos giratorios
<i>Pseudocaranx dentex</i> (Jurel dentón)	Natación anormal Vejiga natatoria muy hinchada
<i>Scophthalmus maximus</i> (Rodaballo)	Natación en espiral Descanso "panza arriba"

Recientemente esta enfermedad también fue detectada en invertebrados marinos de la península de Corea, sugiriendo que esta infección subclínica podría constituir una fuente de inóculo causando mortalidades de peces cultivados en esta región (Gómez *et al.*, 2008).

En base a su forma, tamaño y organización genómica, este virus se clasificó como perteneciente a la Familia *Nodaviridae* (Mori *et al.*, 1992). Hasta ese momento la Familia *Nodaviridae* estaba compuesta por un solo género, *Nodavirus*, aislado de insectos (Francki *et al.*, 1991). A pesar de la alta similitud entre los nodavirus aislados de peces y los aislados de insectos en sus propiedades físicas y en la organización de su genoma, los aislados de peces poseen unas características especiales que obligaron a agruparlos dentro de un nuevo género, *Betanodavirus*, perteneciente a la Familia

Nodaviridae (Delsert *et al.*, 1997; Tang *et al.*, 2002). Recientemente se ha descrito un nuevo miembro de esta familia de virus, el *Macrobrachium rosenbergii* nodavirus, que presenta características de la Familia *Nodaviridae* pero presenta diferencias con los miembros de los géneros *Alphanodavirus* y *Betanodavirus* (Bonami *et al.*, 2005) con lo que no se puede incluir en ninguno de los dos; este patógeno es el primer representante de la Familia *Nodaviridae* aislado de invertebrados acuáticos.

El origen de esta enfermedad podrían ser las poblaciones de peces salvajes de las que se obtienen los reproductores a partir de los que se inicia el cultivo ya que se ha detectado la enfermedad en peces procedentes de la pesca (Barker *et al.*, 2002). No se sabe si estas poblaciones son susceptibles o si solo actúan como portadores aparentemente sanos de esta enfermedad.

Se ha demostrado experimentalmente la transmisión horizontal de la Necrosis Nerviosa Viral en muchas ocasiones en la bibliografía, como por ejemplo, Glazebrook *et al.* (1990) demostraron la transmisión de la enfermedad por cohabitación en larvas enfermas y sanas de perca gigante, Arimoto *et al.* (1993) demostraron lo mismo en el caso del jurel dentón. También se ha demostrado la transmisión en juveniles de lubina al ser inyectadas intramuscularmente con homogenados de cerebro de peces infectados (Thiery *et al.*, 1997), al igual que también se ha demostrado la transmisión entre lubinas infectadas y esturiones sanos (Athanasopoulou *et al.*, 2004) y entre juveniles de fletán del Atlántico enfermos a salmones sanos (Korsnes *et al.*, 2005).

La transmisión vertical de esta enfermedad se ha demostrado tanto en el jurel dentón como en la lubina (Breuil *et al.*, 1991; Nishizawa *et al.*, 1996). Mediante la técnica de la PCR se detectó el virus en los tejidos de ovario y consecuentemente en las larvas obtenidas de dichos reproductores.

Además se ha descrito que algunas especies de peces como la dorada pueden ser portadores asintomáticos de esta enfermedad, es decir, que contienen el virus, por lo que lo pueden transmitir, pero no sufren los síntomas producidos por el mismo (Castric *et al.*, 2001).

El diagnóstico de la nodaviriosis se puede realizar mediante la replicación del nodavirus en cultivo celular (Iwamoto *et al.*, 1999; Qin *et al.*, 2006), microscopía óptica (O.I.E., 1995) y electrónica, técnicas inmunológicas (Le Breton *et al.*, 1997, O.I.E., 1997; Huang *et al.*, 2001) o técnicas de biología molecular (Grotmol *et al.*, 2000; Starkey *et al.*, 2004). Este último método es más fiable ya que es capaz de detectar la presencia del virus en estadios de la enfermedad en los que los antígenos virales no son detectados por los otros métodos de diagnóstico.

6. Mecanismos de defensa frente a una infección en los teleósteos

6.1. Sistema inmune. Generalidades

Recientemente, los estudios sobre la respuesta inmune de peces son cada vez mayores en especies económicamente relevantes en la acuicultura y la pesca, principalmente salmónidos, ciprínidos, peces planos, gádidos, ictalúridos, moronidos o espáridos.

La respuesta inmune se ve afectada por numerosos procesos que dependen del hospedador, del medio y del patógeno. Entre los factores que dependen del hospedador se presentan diferencias en la respuesta humoral y celular, que son propios de cada especie y que pueden variar entre los individuos de una misma población (Ruiz *et al.*, 2003). La edad es uno de los factores intrínsecos o inherentes al pez más importantes, existiendo evidencias de aparición de células inmunes entre los 5-28 días posteclosión en varias especies de peces como falso halibut del Japón (*Paralichthys olivaceus*), bacalao del Atlántico (*Gadus morhua*), rodaballo, dorada, lubina, carpa y pez cebra (*Danio rerio*), pero se cree que esas células no son inmunológicamente competentes hasta varias semanas después de la eclosión (Klesius *et al.*, 2004; Mulero *et al.*, 2007). Aunque esto está ligado con la especie, es posible que se establezca tolerancia inmunológica si existe exposición al antígeno en los estadios larvarios (Mulero *et al.*, 2007).

Otro de los factores determinantes en la respuesta inmunológica es el estrés. Se ha descrito en los peces un síndrome de adaptación o de huida similar al de los mamíferos, estimulado en los peces por hipoxia, altas densidades, manipulación, temperatura, tóxicos y modulado en los teleósteos por los niveles de cortisol (Ellis, 1981; Jeney *et al.*, 1992; Wendelaar, 1997).

Los efectos más relevantes sobre el sistema inmune tienen que ver con alteraciones de los tejidos superficiales del pez y depresión de la respuesta leucocitaria algunas de ella son, incremento de la permeabilidad epitelial, incremento en el recambio celular y a su vez desarreglo estructural en la piel y branquias, incremento en los neutrófilos circulantes en contraste con los bajos niveles plasmáticos de linfocitos y macrófagos ocasionado por la exudación de estas células en las branquias, la piel y el intestino (Wendelaar, 1997), disminución de los linfocitos de memoria B y T, aumento en la fagocitosis y la explosión respiratoria de los leucocitos renales (Wendelaar, 1997; Ruiz *et al.*, 2003b), alteración de la migración, fagocitosis y presentación de antígenos por parte de los macrófagos y disminución de la actividad de mieloperoxidasa (MPO) y la producción de trampas extracelulares (NETs) por parte de los neutrófilos (Palic *et al.*, 2007). Todos estos efectos se traducen en la susceptibilidad a enfermedades principalmente de tipo infeccioso y particularmente de origen bacteriano (Ndong *et al.*, 2007).

El estado nutricional también afecta al sistema inmunológico de los peces. Las deficiencias de las vitamina C y E alteran el funcionamiento de los macrófagos y el complemento (Blazer, 1991); los desajustes de ácidos grasos pueden alterar la fagocitosis debido a la modificación de las características de

la membrana celular de leucocitos (Blazer, 1991) y disminuir marcadamente la flora intestinal y a su vez la resistencia a la adhesión y translocación bacteriana (Ringø *et al.*, 2001).

En lo que concierne a los factores extrínsecos, la temperatura es trascendental en los peces cuando deben responder a un agente patógeno (Le Morvan, 1998; Ferguson, 2006). La temperatura del agua afecta a la respuesta inmune en mayor o menor medida según la especie del pez y la adaptación previa a la misma. Los efectos de las bajas temperaturas sobre el sistema inmune son principalmente sobre el componente celular. Se ha documentado la disminución de la respuesta mediada por linfocitos, principalmente sobre el tipo celular T *helper* sin afectar la funciones de procesamiento de antígeno y producción de IL-1 por parte de las células presentadoras de antígeno (Le Morvan, 1998). Además, se ha descrito la alteración de la fagocitosis y de la citotoxicidad (Ellis, 1981; Le Morvan, 1998), el bloqueo de la activación de las células T y B, y la disminución de la respuesta primaria de anticuerpos (Miller y Clem, 1984). Estudios *in vitro* han demostrado que la respuesta linfoproliferativa del pez gato a concanavalina A (ConA) y fitohemaglutinina se reduce en temperaturas inferiores a 22°C. Algunos autores coinciden en que las temperaturas bajas suprimen la respuesta primaria de anticuerpos, pero la respuesta secundaria es adecuada a temperaturas bajas siempre y cuando la memoria inmunológica se establezca en temperaturas confortables para la especie (Miller y Clem, 1984; Le Morvan, 1998). Por otro lado, las temperaturas bajas cambian la relación entre ácido oleico y esteárico a favor del primero y de este modo aumenta la rigidez de la membrana celular y disminuye o se impide la fagocitosis, la migración transepitelial y otras

funciones de leucocitos (Le Morvan, 1998, Montero *et al.*, 2008). Además, la activación de la proteína quinasa C y la síntesis de otros componentes de la membrana plasmática tales como proteínas y glúcidos (principalmente ácido siálico) son afectados *in vitro* por las temperaturas bajas (Le Morvan, 1998).

Las fluctuaciones de temperatura tienen un efecto doble en relación con la presentación de enfermedades infecciosas, por un lado altera los mecanismos de respuesta del pez y por otro, presiona el crecimiento de los patógenos en el ambiente (Le Morvan, 1998). Los principales problemas se presentan cuando se producen fluctuaciones súbitas de temperatura, y casi siempre en estos casos, la enfermedad y la mortalidad se asocian a procesos de origen bacteriano (Ferguson, 2006; Ndong *et al.*, 2007).

Algunos metales pesados como mercurio, cadmio y cobre, insecticidas como los organoclorados y organofosforados, y el amoníaco, nitritos y cianuro en dosis subletales, tienen efecto sobre componentes celulares y humorales del sistema inmune, ya sea en forma directa, o como consecuencia de su efecto estresante, pero los mecanismos involucrados en esas reacciones no han sido clarificados (Zapata *et al.*, 1992).

Por otra parte, los factores que dependen del patógeno son diversos, dependen de las características biológicas de cada agente, de las particularidades de sus antígenos y de sus interacciones con el sistema inmune.

Una característica del sistema inmune de los peces es la presencia en riñón, hígado, gónadas, tiroides y timo, pero sobre todo en el bazo, de los centros melanomacrofágicos (CMMs) (Ferguson, 2006), que están constituidos por macrófagos, células reticulares, linfocitos y células plasmáticas. De forma especulativa se dice que su papel en infecciones bacterianas intracelulares resistentes a fagocitosis como *Streptococcus*, *Mycobacterium* y *Renibacterium*, en infecciones por *Myxobolus* spp. y en infecciones por *Nodavirus*, aumentan en número y sus macrófagos atrapan grandes cantidades de antígeno o de bacterias completas (Agius y Roberts, 2003; Ferguson, 2006; Hernández *et al.*, 2008). Press *et al.* (1996) demostraron que algunos elementos vacunales de *Aeromonas salmonicida* se acumulan en CMMs después de la inoculación intraperitoneal.

6.2. Sistema inmune. División

El sistema inmune se divide en dos, inespecífico y adaptado. Generalmente el sistema innato o inespecífico precede al sistema adaptativo o específico, activa y determina la naturaleza de la respuesta adaptativa y coopera en el mantenimiento de la homeostasis (Fearon y Locksley, 1996; Fearon, 1997). En este trabajo nos vamos a centrar en el sistema inmune inespecífico.

Como en otros vertebrados, el sistema inmune inespecífico en peces es la primera línea de defensa. Esto es debido a la ineficiencia intrínseca de la respuesta inmune adquirida del pez por su posición evolutiva y su naturaleza poiquiloterma. Esto se traduce en que la respuesta de anticuerpos es limitada,

la afinidad y la memoria de la respuesta inmune adquirida va madurando poco a poco y la proliferación de linfocitos es lenta. La respuesta inmune adquirida del pez es lenta (más de 12 semanas) y relativamente independiente de la temperatura (Du Pasquier, 1982; Alexander e Ingram, 1992; Ellis, 2001).

El sistema inmune adaptativo se basa en la generación aleatoria de diversos receptores de linfocitos T y B codificados por los genes de activación recombinante (RAGs) y contribuye a una mayor respuesta específica y eficiente frente a infecciones (McGuinness *et al.*, 2003; Medzhitov, 2007). Hay, sin embargo, cada vez más pruebas de la integración de los mecanismos inmunológicos diferentes en una red de múltiples niveles, que cuestiona la dicotomía artificial entre el sistema inespecífico y adaptativo (Flajnik y Du Pasquier, 2004).

Según Newman (1993), el sistema inmune de los peces es comparable al de los mamíferos, pero no es igual, ya que los primeros carecen de médula ósea y ganglios linfáticos, lo que hace que no se pueda diferenciar claramente entre órganos hematopoyéticos y linfoides primarios y secundarios. Por ello se habla solo de órganos linfoides primarios y secundarios (Fernández *et al.*, 2002b).

~ Órganos linfoides primarios:

Riñón anterior

El riñón cefálico o pronefros es el principal órgano hematopoyético de los peces y el principal lugar de diferenciación de eritrocitos, granulocitos, linfocitos B y monocitos. Es el principal órgano productor de anticuerpos (Ellis, 1989). Es un órgano de filtración conteniendo macrófagos que fagocitan los diferentes antígenos, contiene componentes linfomieloideos, renales y endocrinos suplementados por la sangre de las arterias y de la vena porta caudal. Sirve como un análogo de la médula ósea, de los ganglios y en parte de la glándula adrenal de los vertebrados superiores (Fänge, 1992). El riñón cumple también con funciones de equilibrio hidrosalino.

Timo

El timo es un órgano par, bilateral, situado debajo del epitelio faríngeo, dorso lateral y alojado en la parte superior interna de las cámaras branquiales. El principal componente celular es el timocito (linfocitos en maduración). En él se produce el conjunto de linfocitos inmaduros que luego migran para juntarse con los linfocitos periféricos en la circulación y otros órganos linfoides. No participa en la producción de anticuerpos o en la captura de antígeno. También pueden estar presentes macrófagos y eosinófilos (Ferguson, 1989). Como en los mamíferos, la involución de este órgano se observa en ejemplares de mayor edad. En salmónidos jóvenes, el timo está totalmente diferenciado y separado del medio externo por una capa de células epiteliales simples, que, por ejemplo, en la trucha arcoíris poseen

poros de 20 µm de diámetro, en los ejemplares más viejos estos poros se cierran y se engrosa el epitelio. Su localización superficial sugiere una cierta vulnerabilidad a severas infecciones micóticas y bacterianas.

~ Órganos linfoides secundarios:

Bazo

El bazo contiene menor número de células hematopoyéticas y linfoides en comparación con el riñón y está compuesto principalmente por sangre alojada en cavidades. Está formado por capilares de paredes gruesas, compuestos por una trama de fibras reticulares y macrófagos. Las fibras se especializan en atrapar complejos inmunes y antígenos particulados (Vallejo *et al.*, 1992), mientras que los macrófagos son altamente fagocíticos (Ellis, 1980).

Un rasgo particular del bazo de los teleósteos es la presencia de macrófagos que contienen pigmentos de color oscuro, principalmente melanina, denominándose melanomacrófagos. Éstos se agrupan y forman agregados llamados centros melanomacrofágicos (CMM). Su número y tamaño aumenta en peces crónicamente enfermos, cuando el catabolismo ha sido excesivo (Ferguson, 1989). Sirven como depósito de los productos finales del metabolismo (ej. los fosfolípidos) y también de antígenos y material particulado (Herraez y Zapata, 1986). Además, se sabe que la melanina tiene la habilidad de atrapar los radicales libres de oxidación y eso protege a los tejidos contra estos productos liberados por las células fagocíticas como son

los neutrófilos. Se les encuentra también en el riñón e hígado y ocasionalmente en las gónadas y el tiroides (Ferguson, 1989).

Tejido linfoide asociado al intestino

El tejido linfoide asociado al intestino también denominado GALT o MALT no es un órgano linfoide como tal, pero es un tejido con importantes funciones defensivas. Al igual que en el mucus de piel y branquias, en el mucus intestinal se ha demostrado la presencia de leucocitos capaces de producir anticuerpos tras la inmunización del pez (Georgopoulou y Vernier, 1986).

Davidson *et al.* (1991) demuestran las distintas funciones de los leucocitos aislados a partir de este tejido en trucha arcoíris. Estos leucocitos son capaces de producir factores de activación de macrófagos (MAF), función asignada a los linfocitos T (Graham y Secombes, 1990), y liberan sustancias quimiotácticas para la migración de los leucocitos de riñón. Por otra parte, existen fagocitos con capacidad de liberación de radicales libres de oxígeno.

6.3. Sistema inmune inespecífico

Los peces se encuentran en íntimo contacto con su medio ambiente, el cual contiene bacterias y virus. Muchas de ellas son saprofitas, algunas son patógenas y ambas son muy capaces de digerir y degradar los tejidos del pez. Sin embargo, en condiciones normales los peces se mantienen en estado saludable defendiéndose frente a estos potenciales invasores mediante un complejo mecanismo de defensa innato. Este mecanismo de defensa es

constitutivo y sensible, proporcionando una protección no específica e independiente del reconocimiento de la estructura molecular identificativa de la especie invasora. Además actúa con rapidez, incluso las defensas inducibles, como la inflamación, responden en 1-2 días, haciendo que los patógenos tengan poco tiempo de establecerse.

El sistema inmune inespecífico de todos los organismos pluricelulares atiende a una variedad de receptores de reconocimiento de patrones codificados (PRR) o proteínas de reconocimiento de patrones (PRP) (Janeway, 1989; Kaisho y Akira, 2001; Elward y Gasque, 2003). A diferencia de las moléculas de reconocimiento de la resistencia adquirida, los receptores de reconocimiento del sistema innato son relativamente pocos y de transmisión vertical, lo que refleja las luchas de defensa evolutivo de la especie y su adaptación a condiciones ambientales específicas.

Se cree que hay dos categorías de patrones moleculares para inducir la respuesta inmune: patrones moleculares asociados a patógenos y patrones moleculares expuestos mediante el daño de los tejidos propios del hospedador debido a una infección, cambios necróticos y muerte celular natural, indicando peligro para el sistema inmunológico (Magnadóttir, 2006).

Los patrones moleculares que son reconocidos por estos parámetros son por ejemplo, peptidoglucanos y LPS de las paredes celulares de las bacterias, β -1,3-glucano fúngico, doble cadena viral de ARN y ADN bacteriano. El patrón molecular asociado a patógenos es el término colectivo empleado para estas moléculas altamente conservadas que en general no se expresa en los organismos pluricelulares (Elward y Gasque, 2003).

Los componentes del sistema inmune inespecífico se dividen en tres grupos:

❖ Barreras físicas.

Las escamas de los peces, las superficies mucosas de la piel y branquias y la epidermis actúan como la primera barrera contra la infección (Ingram 1980; Shephard, 1994; Ellis, 2001).

Al sistema inmune inespecífico pertenecen las mucosas desde los primeros estadios de vida de los peces (Olafsen y Hansen, 1992). Sumado al pH gástrico y a la acción de las enzimas digestivas de la bilis y del mucus, el sistema inmune de mucosas en los peces incluye propiedades defensivas como la activación y aumento del número y tamaño de las células de mucus branquial e intestinal en respuesta a infecciones bacterianas o irritantes presentes en el agua (Stoskopf, 1993; Lodemel *et al.*, 2001), la migración de células productoras de anticuerpos a las mucosas branquial e intestinal (St. Louis-Cormier *et al.*, 1984; Davidson *et al.*, 1993; Lin *et al.*, 2000; Fernández *et al.*, 2002a), la existencia de poblaciones bacterianas nativas asociadas al epitelio intestinal y pilórico que interfieren en la adhesión y posiblemente en el ingreso de bacterias patógenas a los tejidos del pez (Lodemel *et al.*, 2001; Ringø *et al.*, 2001), y por último la facultad por parte de los enterocitos de hacer endocitosis de partículas intactas, macromoléculas (Dalmo *et al.*, 1997), y bacterias y sus antígenos, tanto de la flora nativa (Lodemel *et al.*, 2001; Ringø *et al.*, 2001, 2006) como de patógenos (Olafsen y Hansen, 1992; Lodemel *et al.*, 2001) en todos los segmentos intestinales de larvas y adultos.

A parte de la eficiente captura y desprendimiento de los patógenos, el mucus del pez contiene parámetros inmunes como lectinas, pentraxinas, lisozimas, proteínas complemento, aglutininas, péptidos antibacterianos e inmunoglobulinas IgM (Fletcher, 1981; Alexander e Ingram, 1992; Rombout *et al.*, 1993; Aranishi y Nakane, 1997).

Las variaciones en la resistencia a las enfermedades entre las especies de peces pueden, en algunos casos, ser atribuidas a diferencias genéticas en el elemento protector de la mucosa. Esto se demuestra en las diferencias en la susceptibilidad de, por ejemplo, los salmónidos a una inoculación intraperitoneal de un patógeno en particular, y a un desafío por inmersión (Secombes y Olivier, 1997).

❖ Células del sistema inmune inespecífico.

Las células clave del sistema inmune inespecífico son las células fagocíticas (monocitos/macrófagos, granulocitos y neutrófilos) y las células citotóxicas no específicas (Frøystad *et al.*, 1998; Evans *et al.*, 2001; Neumann *et al.*, 2001). También participan células epiteliales y dendríticas en la defensa innata del pez (Press *et al.*, 1994; Dalmo *et al.*, 1996; Ganassin y Bols, 1996).

El principal componente celular en este tipo de respuesta son los macrófagos, que son presentadores primarios de antígenos en el sistema inmune adquirido, además de ser los principales fagocitos de los peces que liberan citoquinas proinflamatorias (Blazer, 1991; Dalmo *et al.*, 1997). Asimismo, aparecen en los eventos tempranos de inflamación en diferentes enfermedades y juegan un papel importante en la patogénesis de algunas

entidades particulares como la estreptococosis y la aeromoniasis, en las cuales son usados por los patógenos como vehículo para llegar a múltiples órganos y evitar ser destruidos (Zlotkin *et al.*, 2003; Pulido *et al.*, 2004; Ewart *et al.*, 2008).

Por otra parte existen leucocitos granulares, denominados neutrófilos, eosinófilos y basófilos. Los primeros tienen funciones fagocíticas, quimiotácticas y bactericidas, actividad de mieloperoxidasa, explosión respiratoria y poseen capacidad de degranulación de gránulos primarios (Hine, 1992; Fernández *et al.*, 2002a,b; Palic *et al.*, 2007). Los neutrófilos tienen también la habilidad de sintetizar trampas extracelulares (NETs) compuestas por gránulos de proteína y componentes nucleares que atrapan y destruyen bacterias (Palic *et al.*, 2007). Las funciones fagocíticas y bactericidas son reducidas en algunas especies y su participación en procesos agudos es menor a la de los mamíferos, lo que explicaría la tendencia de los peces a manifestar inflamaciones necroticohemorrágicas más que de licuefacción (Ellis, 1981; Ferguson, 2006).

Los eosinófilos granulares homogéneos (EGHs) o células granulares eosinofílicas (CGEs) se encuentran asociados al tejido conectivo, sobre todo en el tracto intestinal y las branquias (Noya y Lamas, 1996; Ferguson, 2006). Se encuentran en procesos inflamatorios, donde liberan su contenido granular (Ferguson, 2006). Asimismo, no poseen actividad de mieloperoxidasa ni de fosfatasa ácida, pero se movilizan en sangre y llegan al peritoneo y otros tejidos en respuesta a infecciones bacterianas (Noya y Lamas, 1996). Parece que su actividad principal es pinocítica y excretora y su función es la de

modular la respuesta inmune de superficies (Mainwaring y Rowley, 1985; Noya y Lamas, 1996).

Los basófilos son células con citoplasma ligeramente basófilo y grandes gránulos redondeados que a menudo ocultan el núcleo. Según estudios ultraestructurales y citoquímicos se pueden confundir con eosinófilos y no se pueden hacer analogías con las células de mamíferos. Se les considera ausentes en la circulación de la mayoría de especies salmónidas (Ellis, 1977; Campbell y Murru, 1990; Hine, 1992).

❖ Parámetros humorales.

La clasificación de los parámetros humorales se basa en sus características de reconocimiento de patrones o funciones efectoras:

- ~ Inhibidores de crecimiento de bacterias, como la transferrina o el interferón (Dalmo *et al.*, 1997; Sakai, 1999; Heppell y Davis, 2000; Fernández *et al.*, 2002a).
- ~ Inhibidores de proteasas, presentes en el suero y otros fluidos corporales del pez (Hjelmeland, 1983; Dabrowski y Cieroszko, 1994; Bowden *et al.*, 1997; Aranishi, 1999). La función principal de estos inhibidores se encuentra en la homeostasis de los líquidos corporales. También están implicados en las reacciones de fase aguda (Bayne y Gerwick, 2001) y en la defensa contra agentes patógenos, que secretan enzimas proteolíticas (Ellis, 1987; Salte *et al.*, 1993; Zuo y Woo, 1997).
- ~ Hidrolasas como la lisozima y quitinasa, catepsinas, vía lítica del sistema del complemento u otros bacteriolíticos o enzimas hemolíticas que se

encuentran en tejidos y fluidos corporales de los peces, actúan de forma individual o en cascada contra las bacterias (Alexander e Ingram, 1992).

6.3.1. El sistema interferón (IFN)

Los IFNs son glicoproteínas pH resistentes producidas por macrófagos, linfocitos, fibroblastos y células *natural killer* (NK) en respuesta a una infección viral, una estimulación inmune o diferentes estimuladores químicos (Dorson *et al.*, 1975; Graham y Secombes, 1990). La mayoría de los virus producen ARN de doble cadena en el momento de su replicación (Jacobs y Langland, 1996) y parece que los animales han desarrollado una habilidad de reconocer este tipo de moléculas y responder a ellas por este mecanismo inespecífico.

En mamíferos se han encontrado tres tipos de IFN, α , β y γ , de los cuales los dos primeros son muy similares y constituyen el IFN tipo I, mientras que el IFN γ , que no está relacionado con ellos, constituye el IFN tipo II. El tipo I puede ser producido por cualquier tipo celular y es inducido por una infección viral. Se le atribuyen funciones antivirales. Sin embargo, el tipo II lo producen principalmente los linfocitos T y es inducido tras la estimulación de los mismos con un antígeno o un mitógeno. Es sensible a altas temperaturas y pH ácido, y sus funciones se relacionan con la regulación, diferenciación y comunicación celular (Graham y Secombes, 1990).

El sistema IFN-I es un mecanismo de defensa antiviral rápido y potente en vertebrados (Samuel, 1991). Los IFNs son inducidos en las células en respuesta a los productos intermediarios de la replicación viral (ARNds)

(Jacobs y Langland, 1996; Goodbourn *et al.*, 2000). Una vez en el torrente circulatorio se unen al receptor de IFN α/β de las células nucleadas (Der *et al.*, 1998; Biron y Sen, 2001; de Veer *et al.*, 2001) y desencadenan a través de la vía JAK-STAT la transcripción de cientos de genes, que pueden ser clasificados en diferentes categorías funcionales como antiviral, antiproliferativa, modulación inmune, procesamiento de antígenos, presentación de antígenos, señalización y muchas otras funciones (de Veer *et al.*, 2001).

Las proteínas antivirales inducidas por IFN más estudiadas son PKR (proteína kinasa R), OAS (2',5'-oligoadenilato sintetasa) y proteínas Mx (Secombes *et al.*, 1996; Leong *et al.*, 1998; Stark *et al.*, 1998; Samuel, 2001; Ellis, 2001).

En los peces, se ha demostrado la actividad de moléculas tipo IFN frente a infecciones víricas en el suero de trucha arcoíris (de Kinkelin *et al.*, 1982). Las características fisicoquímicas de esta molécula y la forma de inducir su producción mediante infección vírica, hacen pensar que se trata de una molécula similar al IFN-I de mamíferos.

El IFN fue descubierto por primera vez como una sustancia antiviral liberada por células de pollo bajo un tratamiento de virus de influenza inactivado por calor (Isaacs y Lindenmann, 1957). El primer IFN clonado fue en 1980 en humanos (Taniguchi *et al.*, 1980a,b), y en peces, la actividad IFN fue detectada por primera vez en 1965 en células y órganos de numerosas especies de peces tras infecciones virales o ARN de doble cadena sintético (Gravell y Malsberger, 1965; Kelly y Loh, 1973; de Kinkelin y Dorson, 1973; de Sena y Rio, 1975; de Kinkelin *et al.*, 1982; Graham y Secombes, 1990; Eaton,

1990; Renault *et al.*, 1991; Dorson *et al.*, 1975, 1992; Pinto *et al.*, 1993; Snegaroff, 1993; Rogel-Gaillard *et al.*, 1993; Nygaard *et al.*, 2000). Hasta 2003 no se clonaron los primeros genes de IFN de peces (Altmann *et al.* 2003; Luftalla *et al.*, 2003; Robertsen *et al.*, 2003). Aunque los IFNs de peces tienen secuencias de aminoácidos similares al IFN- α de los mamíferos, los genes de IFN de peces tienen una estructura génica similar al IFN- γ . Estos descubrimientos han inspirado la hipótesis que tanto el IFN de los peces como el IFN- γ de los mamíferos poseen la estructura génica de IFN ancestral, mientras que el IFN- α/β de los mamíferos, se piensa que surgieron por una inserción retrotransposición de un ADN cíclico IFN ancestral en el genoma durante la evolución de los tetrápodos (Luftalla *et al.*, 2003).

La producción de IFN ocurre muy rápido tras una infección vírica, y así, por ejemplo, en trucha arcoíris infectada con el virus de Septicemia Hemorrágica Viral (VHS) (Dorson *et al.*, 1994) y en alevines se produce 2 días postinfección (Boudinot *et al.*, 1998). En aislados de macrófagos de salmón del Atlántico estimulados con poly I:C, la máxima producción de IFN la encontramos a las 24 horas (Nygaard *et al.*, 2000).

6.3.2. Proteína antiviral Mx

En el sistema IFN son regulados más de 300 genes, siendo uno de los más estudiados el gen Mx. El Mx es una proteína antiviral inducida por IFN (Robertsen, 2006) y, a día de hoy, es el gen estimulado por IFN (ISG) más estudiado que confiere resistencia al virus de influenza en ratones y determina la susceptibilidad al virus de la hepatitis C, hepatitis B y sarampión

en humanos (Lau y Horvath, 2002; Haller *et al.*, 2007; Sadler y Williams, 2008). Se ha demostrado que la proteína Mx de salmón del Atlántico posee actividad antiviral frente a infecciones como Necrosis Pancreática Infecciosa Viral (IPN) (Larsen *et al.*, 2004), Anemia Infecciosa del Salmón (ISA) (Kibenge *et al.*, 2005) y rhabdovirus (Caipang *et al.*, 2003). Aún más recientemente se ha demostrado actividad antiviral de Mx frente a nodavirus y birnavirus en meros (*Epinephelus malabaricus*) (Lin *et al.*, 2006) y perca gigante (Wu y Chi, 2007). Esta protección la realiza interfiriendo con la replicación viral mediante la inhibición de las polimerasas virales en el núcleo y vinculando componentes virales en el citoplasma (Haller y Kochs, 2002; Turan *et al.*, 2004). Se ha confirmado que el Mx es un gen estimulado por IFN en salmón del Atlántico y trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) (Nygaard *et al.*, 2000; Robertsen *et al.*, 2003; Zou *et al.*, 2007). Además, recientemente se ha demostrado que el IFN recombinante de salmón es capaz de inducir la activación del promotor Mx de trucha en función de la dosis (Jørgensen *et al.*, 2007).

La expresión de los genes Mx e IFN ocurren inmediatamente después de la infección viral (Lockhart *et al.*, 2007; McBeath *et al.*, 2007) o de la estimulación con ARN de doble cadena sintético, poly I:C (Lockhart *et al.*, 2004), y otros inmunoestimulantes como CpG (Jorgensen *et al.*, 2003) y LPS o ADN de *Vibrio* spp. (Acosta *et al.*, 2004). Recientemente también se ha descubierto que la expresión de estos genes se produce en la fase de pre-adaptación a la vida marina del salmón del Atlántico (Das *et al.*, 2007) en ausencia de cualquier estímulo, suscitando la posibilidad de que los factores medioambientales como el fotoperiodo, que actuando a través del sistema endocrino, pueda también inducir respuestas de IFN.

Han sido clonados los genes que codifican la proteína Mx de numerosas especies de peces, incluyendo trucha arcoíris (Trobridge y Leong, 1995; Trobridge *et al.*, 1997a,b), salmón del Atlántico (Robertsen *et al.*, 1997), halibut (Jensen y Robertsen, 2002), pez cebra (Altmann *et al.*, 2004), falso halibut del Japón (Lee *et al.*, 2000), pez gato (*Ictalurus punctatus*) (Plant y Thune, 2004), dorada (Tafalla *et al.*, 2004), perca (*Perca fluviatilis*) (Staehele *et al.*, 1989) y lenguado (Fernández-Trujillo *et al.*, 2006).

La detección del gen ARN mensajero Mx por RT-PCR (Robertsen *et al.*, 1997) o la detección de la proteína Mx utilizando anticuerpos marcados (Trobridge *et al.*, 1997a,b; Nygaard *et al.*, 2000) son técnicas que han sido usadas como métodos sensitivos a la respuesta de IFN en peces.

Existe poca información sobre la persistencia de la proteína Mx en peces. Algunos artículos hablan de niveles basales, como si el gen Mx fuera un gen constitutivo, que según la FAO (2004), es un gen que se expresa continuamente en todas las células de un organismo.

Nygaard *et al.* (2000) observaron que el máximo de producción de la proteína Mx se encontraba pasadas 48 horas en aislados de macrófagos de salmón del Atlántico estimulados con poly I:C. Años antes, Robertsen *et al.* (1997) trabajando con la misma especie y con el mismo inmunoestimulante, observaron la proteína Mx en varios tejidos después de 2 días hasta los 14 días tras la inoculación.

Recientemente, Das *et al.* (2007) encontraron que en salmones del Atlántico sanos que se encontraban en la fase marina, mediante el uso de la técnica de inmunohistoquímica, la proteína Mx era abundante en tejidos como riñón, hígado y agallas a las 4-5 semanas después del paso al agua de mar, disminuyendo después a niveles basales a las 8 semanas. Esto implica que la transcripción del gen Mx en el periodo de pre-adaptación a la vida marina trae como consecuencia la persistencia de la proteína Mx en los tejidos de los peces que se encuentran en la fase marina durante 6-8 semanas. Salinas *et al.* (2004) describieron en juveniles sanos de salmón del Atlántico que se encontraban todavía en la fase de agua dulce no expresaban transcritores de Mx constitutivamente, pero que se inducían rápidamente con una inoculación de poly I:C, con un alto nivel de expresión desde las 24 horas hasta el día 3, descendiendo hasta niveles indetectables en el día 9. Sin embargo, Jensen *et al.* (2002) describieron en juveniles sanos de salmón del Atlántico en fase de agua dulce, que la expresión de la proteína Mx se encontraba a bajos niveles, sugiriendo que puede reflejar niveles basales de IFN o que el medio ambiente con virus puede inducir respuestas a niveles bajos de IFN. Se han descrito también niveles basales de la proteína Mx que es producida constitutivamente por monocitos de humanos (Ronni *et al.*, 1993).

Das *et al.* (2009) indicaron que en salmones del Atlántico juveniles que se encuentran todavía en la fase de agua dulce, la proteína Mx se expresa en tejidos como riñón, hígado y agallas más de 5 semanas tras la inoculación de poly I:C, para después disminuir a niveles basales, detectándolo por inmunohistoquímica. El hecho de que en esta experiencia todas las muestras de peces inoculados con poly I:C y control mostraran bajos niveles o nulas

expresiones de la proteína Mx a las semanas 6 y 7, sugiere que la producción constitutiva en tejidos es poco probable y que la estimulación ambiental puede ser posible. Estos resultados fueron corroborados con la técnica de qRT-PCR en el mismo trabajo, ya que en la primera semana los niveles de transcripción en los tejidos de peces inoculados con poly I:C fueron mucho más elevados que en los controles. Sin embargo, los niveles de transcripción en los tejidos de los peces control fueron relativamente mayores en la primera semana que en las semanas 2, 3, 5, 6 y 7. Además, los niveles de transcripción en los peces inoculados con poly I:C presentaron bajos niveles basales en la semana 2, como describieron previamente Salinas *et al.* (2004).

En el trabajo de Das *et al.* (2009) en los monocitos de las muestras de sangre recogidas se observó el gen Mx en todos los peces, control e inoculados con poly I:C, sugiriendo que existe expresión constitutiva de este gen en este tipo de células. Posiblemente, se puede producir un bloqueo por parte de la proteína Mx, y puede hacer que el virus IPN sea capaz de infectar los macrófagos de salmón, pero no replicarse en ellos (Munro *et al.*, 2006). A la primera semana se observaron solo monocitos, pero en las semanas 2-4 lo que predominan son linfocitos y granulocitos en ambos grupos de peces. Estos resultados sugieren que la producción de proteína Mx por linfocitos y granulocitos puede ser inducida por respuestas IFN.

En el estudio que hicieron Fernández-Trujillo *et al.* (2008) cuantificaron las cantidades absolutas de moléculas de Mx en lenguados después de tratamientos con poly I:C o desafíos frente a soleivirus (aquavirnavirus aislado de lenguado). Los perfiles de expresión fueron diferentes, mientras que

encontraron una rápida e intensa respuesta (12 horas) después de la inoculación de poly I:C, de la inoculación de solevirus observaron una respuesta tardía y moderada. Estas respuestas fueron similares en otras especies (Plant *et al.*, 2005). Por el contrario, la producción del gen Mx fue retrasada en respuesta al virus del bagre del canal (CCV) con niveles elevados a los 3 días después de la inoculación (Plant *et al.*, 2005). Resultados similares se observaron en salmón del Atlántico y en trucha con un retraso en la respuesta a IPN e IHN, respectivamente, y con poly I:C (Purcell *et al.*, 2004; Lockhart *et al.* 2007). Aunque las diferencias en las respuestas de expresión del gen Mx frente al poly I:C y algunos virus parece ser común en los peces, hay otros factores como la especie, edad, escenario ambiental o condiciones ambientales, como la temperatura, que pueden modular esta respuesta (Salinas *et al.*, 2004). Por esto debe ser la diferencia que se encuentra entre este estudio de Fernández-Trujillo *et al.* (2008) y otro estudio anterior del mismo autor (2006), que hicieron en la misma especie pero con diferencias en el sistema de producción (extensivo vs intensivo), en las dosis (15 vs 10 mg/Kg) y en las temperaturas (20-22°C vs 18°C).

En el pez gato, Milev-Milovanovic *et al.* (2009) observaron una regulación de Mx en las líneas celulares CCO (fibroblastos ováricos del pez gato), 3B11 (línea celular clonada) y 42TA (macrófagos), 6 horas después de la estimulación con poly I:C. De modo interesante, aunque la expresión del gen Mx fue inducida a las 6 horas en las células 3B11, los mayores niveles de expresión fueron a las 12 horas disminuyendo después.

Se ha encontrado que la infección con Septicemia Hemorrágica Viral (VHS) induce Mx en aislados de leucocitos de trucha arcoíris por el método de hibridación sustractiva por supresión, que consiste en identificar los genes que se expresan diferencialmente sin necesidad de clonar previamente el ADNc (O'Farrell *et al.*, 2002). El VHS indujo transcripciones de las tres isoformas de Mx en las células RTG-2, leucocitos de trucha arcoíris y en la línea celular macrofágica RTS-11 (Tafalla *et al.*, 2007a,b). Se detectó un retraso en la expresión de Mx en la línea celular RTG-2, sugiriendo efectos antagónicos del virus sobre la inducción de Mx. Sin embargo, la exposición previa de RTS-11 a VHS no impidió al poly I:C inducir los transcritores de Mx (Tafalla *et al.*, 2007a).

Los primeros estudios mostraron que la infección con Necrosis Hematopoyética Infecciosa Viral (IHN) induce la expresión de los transcritores de Mx en órganos de trucha arcoíris, pero los resultados indican que el virus no es un buen inductor de proteínas Mx en la línea celular RTG-2 (Trobridge *et al.*, 1997b). Estudios realizados con la RT-PCR a tiempo real han confirmado que el IHN induce Mx1 en el bazo de la trucha arcoíris (Purcell *et al.*, 2004).

La alta capacidad del virus de la Anemia Infecciosa del Salmón (ISA) de inducir Mx ha sido demostrado a niveles de transcripción y proteína en cultivos celulares y peces vivos (Jensen y Robertsen, 2002; Kileng *et al.*, 2007). El virus ISA induce Mx muy rápidamente a altos niveles en la línea celular TO, en cambio, el IFN es inducido más tarde (Kileng *et al.*, 2007). McBeath *et al.* (2006) propusieron al ISA como inhibidor de la inducción de Mx a través de

una proteína, pero la inhibición de la producción de Mx no se ha observado durante una infección viral en líneas celulares (Jensen y Robertsen, 2002; Kileng *et al.*, 2007).

El que el virus ISA induzca más rápidamente el gen Mx que el IFN se podría explicar por la presencia de diferentes elementos responsables de la estimulación de IFN en los promotores del gen Mx, que indican su conexión en la típica vía de IFN; sin embargo, como se ha descrito en ratón, el poly I:C y el Virus de Estomatitis Vesicular (VSV) inducen directamente la expresión de Mx sin la síntesis de proteína, sugiriendo que el correspondiente control transcripcional puede ser más complejo. Las diferencias temporales y espaciales entre el gen Mx y otros genes estimulados por IFN, como el *ISG17*, también podrían explicar una regulación transcripcional “dual” especial para los genes de Mx (Collet *et al.*, 2004).

El IPN induce tanto el IFN como el Mx en salmón del Atlántico *in vivo* (McBeath *et al.*, 2007). Sin embargo, el IPN no induce ni IFN ni Mx durante la infección de líneas celulares como TO y CHSE-214 (Kileng *et al.*, 2007; Rokenes *et al.*, 2007). Se ha comprobado que el IPN suprime la activación del promotor Mx en la línea celular RTG-2 (Collet *et al.*, 2007).

Varios autores han localizado los elementos responsables de la estimulación del IFN en la región promotora de los genes Mx en trucha arcoíris y pez cebra. Además, demostraron que el IFN y el poly I:C inducen la expresión de luciferasa junto a los promotores (Collet y Secombes, 2001; Altmann *et al.*, 2004; Johansen *et al.*, 2004). Las proteínas de Mx en peces, al igual que en mamíferos, se expresan tanto en el citoplasma como en el núcleo

(Trobridge *et al.*, 1997a; Nygaard *et al.*, 2000; Bergan y Robertsen, 2004; Larsen *et al.*, 2004).

Ingerslev *et al.* (2009) desarrollaron una experiencia para intentar explicar las diferencias de las respuestas inmunes entre salmones del Atlántico que se encuentran en la fase pre-adaptativa a la vida marina inoculados intraperitonealmente con IPN y salmones que fueron infectados por cohabitación. En el citado estudio comprobaron que la expresión de Mx presentaba un pico en la última muestra (día 37 después de la inoculación) de los cohabitantes, pudiendo ser resultado de la activación del IFN- α e IFN- γ en el momento de la segunda muestra (día 24 después de la inoculación). Además, la expresión de Mx fue mayor en el hígado de la última muestra, pudiendo ser debido a una producción local de Mx en el hígado y sugiriendo que este órgano es importante en la respuesta antiviral. También observaron grandes diferencias en la expresión de Mx entre los cohabitantes y los inoculados, pudiendo ser debido a la elevada replicación viral en los cohabitantes en los últimos puntos de muestreo.

Las proteínas Mx han sido usadas como marcadores de la producción de IFN e infección de virus en mamíferos y peces (Trobridge *et al.*, 1997a; Chieux *et al.*, 1998; Bergan y Robertsen, 2004). En los peces, la expresión de las proteínas Mx podría también servir como un marcador para la producción *in vivo* de IFN y la infección por virus. Esto sería particularmente útil, ya que los patógenos virales son un problema importante en la industria de la acuicultura (Jensen *et al.*, 1998).

Además, han sido identificadas las vías de inhibición antivirales mediadas por Mx, en una de las cuales implica la estructura intrínseca de Mx del pez, que contribuye a la localización intracelular de las proteínas Mx con una diferencia en el espectro antiviral de estas proteínas (Lee y Vidal, 2002). Varios factores celulares que dependen del tipo de célula en la que se expresa el factor podrían explicar los diferentes resultados de la actividad antiviral (Schneider-Schaulies *et al.*, 1994). Entre esta actividad antiviral Lin *et al.* (2006) encontraron que las proteínas de Mx del mero podían inhibir la propagación del nodavirus.

7. Importancia del control de las enfermedades

La acuicultura debe hacer frente, una vez superadas las primeras expectativas de producción, a nuevos retos relacionados con la sanidad y seguridad de los productos. Uno de ellos son las enfermedades de los peces, que se han convertido en un principal obstáculo para el crecimiento de la acuicultura y es responsable de graves repercusiones tanto, en el desarrollo económico como en el socioeconómico de muchos países del mundo. Cada vez llegan más noticias de la existencia de importantes problemas sanitarios en diferentes áreas, como Noruega, Chile o el Sudeste asiático, al igual que en nuestro país.

A diferencia de lo que ocurre en las granjas de animales terrestres, donde todos los parámetros están controlados, en el cultivo de peces las condiciones son altamente variables. Aparte de la calidad del alevín y el

manejo, existen interacciones medioambientales (oxígeno, temperatura, salinidad, calidad del agua, disponibilidad de hierro, pH) y biológicas (depredadores, peces salvajes, agentes patógenos) que pueden estresar al pez, causando una reducción de crecimiento y una depresión inmunológica, haciendo al pez más susceptible a enfermarse (Hansen y Olafsen, 1999; Verschuer *et al.*, 2000; Winton, 2001).

Varios factores han contribuido a los problemas de salud que actualmente se enfrenta la acuicultura:

- Durante las tres últimas décadas, la acuicultura se ha expandido, intensificado y diversificado, basándose en gran medida en los movimientos de animales y sus productos, tales como reproductores, huevos y piensos. Estos movimientos están reconocidos como factores fundamentales en la introducción y propagación de agentes patógenos y enfermedades en el sector de la acuicultura. Además, aumenta el periodo de permanencia de una instalación en un lugar determinado, lo que hace que el tiempo de residencia de los patógenos sea mayor y se “asienten”.
- La intensificación de la acuicultura ha implicado un aumento de la carga de población, induciendo ambientes desfavorables para la salud de los peces, como una alta densidad de población, problemas de estrés, manipulación y perturbaciones físicas (Bullock y McLaughlin, 1970; Tarazona y Muñoz, 1995). La superpoblación acarrea una deficiente calidad del agua debido a la disminución del nivel de oxígeno, a productos metabólicos y acumulación de excrementos, a un rápido crecimiento y transmisión de parásitos nocivos, hongos, bacterias y virus (Zhao, 2001).

Hasta un 10% de los animales acuáticos cultivados mueren exclusivamente a causa de patógenos (Leong y Fryer, 1993).

El avance en el desarrollo de la acuicultura a escala comercial e industrial ha llevado a los principales países productores y consumidores a normalizar y reglamentar el sector para asegurar la calidad e inocuidad del producto acuícola y reducir al máximo las consecuencias sociales y ambientales de la producción. Además, se ha incrementado el interés en las enfermedades propias de las especies de cultivo por la importancia económica en las pérdidas de producción. Así, el Acuerdo sobre la Aplicación de Medidas Sanitarias y Fitosanitarias de la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO, 1999), estableció una serie de normas mínimas de calidad e inocuidad para los organismos acuáticos comercializados y establece, entre otros puntos, una lista de enfermedades infecciosas de notificación obligatoria que se va actualizando periódicamente (**Tabla VI**). Dentro de las enfermedades infecciosas que afectan a los peces cultivados, los virus constituyen uno de los problemas más importantes, debido a las altas mortalidades que producen, así como al hecho de que no existen medidas de control eficaces.

La producción de peces tiene que ser sostenible, lo cual significa que deben utilizarse medidas preventivas aceptables desde un punto de vista biológico y ambiental para mantener los problemas sanitarios en la acuicultura a un nivel tolerable.

Tabla VI.- Lista de enfermedades infecciosas de notificación obligatoria de peces de la OIE 2011.

Enfermedad	Virus
Anemia infecciosa del salmón	Virus cuya especie pertenece al género <i>Isavirus</i> y a la familia de los Orthomyxoviridos.
Girodactilosis (<i>Gyrodactylus salaris</i>)	Ectoparásito vivíparo de agua dulce <i>Gyrodactylus salaris</i> (platelminto monogenético).
Herpesvirosis de la carpa koi	Virus de la especie herpesvirus koi, clasificado provisionalmente en la subfamilia de herpesvirus de los ciprínidos de la familia de los Herpesvirus.
Iridovirosis de la dorada japonesa	Virus cuya especie pertenece a la familia de los Iridoviridos.
Necrosis hematopoyética epizoótica	Virus cuya especie pertenece al género <i>Ranavirus</i> y a la familia de los Iridoviridos.
Necrosis hematopoyética infecciosa	Virus cuya especie pertenece al género <i>Novirhabdovirus</i> y a la familia de los Rhabdoviridos.
Septicemia hemorrágica viral	Virus Egtved, virus cuya especie pertenece al género <i>Novirhabdovirus</i> y a la familia de los Rhabdoviridos.
Síndrome ulcerante epizoótico	Hongo oomiceto <i>Aphanomyces invadans</i> .
Viremia primaveral de la carpa	Virus cuya especie pertenece probablemente al género <i>Vesiculovirus</i> y a la familia de los Rhabdoviridos.

Debido a que pocas enfermedades ícticas tienen un potencial zoonótico, el aspecto de la seguridad alimentaria de las enfermedades en los animales acuáticos es menor que en los animales terrestres. Con el fin de controlar la proliferación de bacterias oportunistas, se han utilizado comúnmente agentes quimioterapéuticos en la acuicultura intensiva durante años. Sin embargo, el uso de antibióticos de amplio espectro ha dado como resultado un

incremento de residuos y de la resistencia microbiana a éstos (Ruo-Yun *et al.*, 2009). Se han descrito resistencias a uno o dos antibióticos usados en acuicultura en todos los patógenos bacterianos de peces (Holmström *et al.*, 2003). Por tanto, el manejo eficaz de los riesgos es crucial para reducir los costes económicos, sociales y ambientales derivados de las enfermedades graves en la acuicultura (Håstein *et al.*, 1999; Woo *et al.*, 2002).

Los antibióticos son un remedio a muy corto plazo, debido a que se produce resistencia bacteriana mediada por la presión selectiva ejercida por los propios antibióticos y por la presencia de genes de resistencia (Dixon, 1994; Levy, 1994; Mazel y Davies, 1999; Sköld, 2000; Uhland y Higgins, 2006), aparte de la acumulación del producto en el músculo del pez y contaminación de los ambientes acuáticos (Dixon, 1994; Heppell y Davis, 2000; Shao, 2001; Furushita *et al.*, 2003). Además, desde que los productos de acuicultura son consumidos por los humanos y desde que determinadas resistencias a antibióticos han sido decodificadas por plásmidos transferibles, los peces cultivados pueden servir como un vehículo de transmisión de resistencia a antibióticos de bacterias que son comensales o patógenas para los humanos (Rhodes *et al.*, 2000). Al mismo tiempo, en ciertos países se están limitando las opciones de tratamiento de las enfermedades ícticas bacterianas con antibióticos (Uhland y Higgins, 2006). El uso de antibióticos tampoco es rentable por los costos de implementación y el hecho de que estas sustancias se administran en el alimento que los peces enfermos no comen o casi no comen por tener apetito reducido o nulo (Dixon, 1994; Heppell y Davis, 2000; Shao, 2001; Furushita *et al.*, 2003).

Por esto, la profilaxis mediante el diagnóstico y la utilización de medios alternativos para la prevención de las patologías, como las vacunas, son una alternativa real y una necesidad irremediablemente ligada al desarrollo de la acuicultura (Evelyn, 1997; Shoemaker y Klesius, 1997; Gudding *et al.*, 1999; Shao, 2001; Bowden *et al.*, 2003a; FAO, 2006).

Actualmente, la vacunación es una de las medidas más importantes para prevenir enfermedades bacterianas en los peces cultivados. El mejor indicador del efecto de la vacunación como medida profiláctica es la reducción del uso de antibióticos en el cultivo de peces.

Aunque las vacunas son muy eficientes en la prevención de infecciones en humanos y animales, su papel en la protección de la salud humana, en el progreso de la acuicultura y en alimentación animal, es limitada debido a que las vacunas disponibles actualmente son, generalmente, serotipo específicas o propias de cada especie (Maione *et al.*, 2005). La eficacia de las vacunas serotipo específicas suele estar reducida por el estrecho margen de los serotipos bacterianos que epidémicamente causan varias enfermedades en una distribución geográfica. Cualquier vacuna propia de cada especie puede prevenir las infecciones causadas por el patógeno específico, pero no la de otras especies bacterianas. Sin embargo, los patógenos tienen una variedad de serotipos que pertenecen a géneros y familias distintas clasificándose en primarios o patógenos oportunistas. Por lo tanto, el desarrollo de vacunas de protección cruzada y antisuero pueden luchar frente a tantos patógenos como sea posible en caso de necesidad (Li *et al.*, 2010).

A pesar de encontrarse algunas similitudes en la respuesta a la vacunación, por ejemplo entre especies que crecen en el mismo rango de temperatura, es imposible extrapolar los resultados de la inmunización de una especie a otra. Los niveles de respuesta y/o protección dependerán de los factores intrínsecos y extrínsecos de la especie, de las particularidades del agente patógeno, del tipo de vacuna y del método de vacunación utilizado (Penagos *et al.*, 2009).

Se ha concluido que la edad mínima en la que el pez gato inicia la inmunocompetencia es a los 28 días posteclosión, pues en esta edad se consiguió la mejor respuesta inmune humoral en peces vacunados parenteralmente con bacterinas. Sin embargo, varios autores demostraron que 7 días posteclosión es la edad mínima para obtener una inmunización exitosa con vacunas administradas por inmersión en el pez gato (Klesius *et al.*, 2004).

En tilapias vacunadas contra *Streptococcus iniae* se producen altos niveles de anticuerpos sin importar la vía de administración vacunal (Klesius *et al.*, 2000) y el pico de respuesta de anticuerpos contra *Streptococcus iniae* y *Streptococcus agalactiae* se da entre los 30-65 días. Debido a esto, los desafíos bacterianos en experimentos de inmunización se hacen en ese periodo (Klesius *et al.*, 2000; Evans *et al.*, 2004; Pasnik *et al.*, 2005). A pesar de esto, se han encontrado diferencias marcadas entre el nivel de anticuerpos postvacunales y la protección frente a algunos patógenos como *Streptococcus agalactiae* o *Edwardsiella tarda* (Swain *et al.*, 2002), debido a su permanencia intracelular y su capacidad de transportarse viables dentro de los macrófagos

bloqueando los procesos de fagocitosis, presentación de antígenos y memoria inmunológica (Zlotkin *et al.*, 2003; Pulido *et al.*, 2004; Ewart *et al.*, 2008), y en la protección frente a algunos patógenos, con cierta deficiencia en la producción de anticuerpos por parte de las larvas y pequeños alevines. Este hecho hace pensar en la necesidad de evaluar la protección frente a determinados microorganismos a través de pruebas distintas a las serológicas o en zonas orgánicas diferentes a la sangre como el mucus o la bilis (St. Louis-Cormier *et al.*, 1984; Davidson *et al.*, 1993; Lin *et al.*, 2000; Ruiz *et al.*, 2003).

En relación con el peso, a pesar de que algunas investigaciones muestran resultados aceptables de protección contra *Edwardsiella tarda* en larvas, alevines y juveniles de carpa (Swain *et al.*, 2002), la protección contra *Streptococcus agalactiae* en tilapias de 5 g es notablemente menor que en peces de 30 g, sin importar la vía de inmunización (inmersión o intraperitoneal) (Evans *et al.*, 2004).

La inducción de la respuesta inmune es más rápida en especies de aguas templadas o cálidas. Por ejemplo, la lubina inicia la producción de anticuerpos a la semana postinmunización y alcanza el pico hacia las 2 semanas, mientras que el salmón del Atlántico, especie de agua fría, invierte 6 semanas para iniciar la producción de anticuerpos y alcanza el pico a las 10 semanas postvacunación. De esta forma, si es necesario movilizar peces a un área endémica, deben ser vacunados previamente teniendo en cuenta estas diferencias marcadas entre especies y entre temperaturas de cultivo (Bowden *et al.*, 2003a).

La ruta de inmunización es fundamental a la hora de estimular la protección contra bacterias y virus. Es necesario conocer específicamente los tejidos por los que ingresa el patógeno para asegurar la estimulación del sistema inmune en esos puntos (Midtlyng, 2005). La mayoría de las bacterias que causan enfermedad en los peces, ingresan principalmente por el tracto gastrointestinal (*Aeromonas* spp., *Vibrio* spp., *Edwardsiella* spp., *Lactococcus* spp., y varios *Streptococcus* spp., entre otras) y para actuar contra ellas sería indicada la vacunación oral, pero algunas como las flavobacterias y varios *Streptococcus* spp., entre ellos el *Streptococcus iniae*, y *Aeromonas* spp. en la forma cutánea de la enfermedad, penetran fácilmente por la piel y/o las branquias en cuyo caso adquiere peso el método de vacunación por inmersión.

Como vemos, algunos patógenos tendrían potencial para estimular la respuesta inmune por las dos vías (oral e inmersión) y la elección de la vía se determinará entonces por la viabilidad técnica y económica del proceso; por ejemplo la vacuna contra vibriosis y pasterelosis es altamente efectiva cuando se administra por inmersión, y esta ruta es la más utilizada en la mayoría de las especies marinas (Bowden *et al.*, 2003a). Sin embargo, se le debe prestar especial atención a la vacunación contra algunos patógenos, por ejemplo contra el *Streptococcus agalactiae*. En experimentos de vacunación por inmersión, los peces desafiados con esta bacteria no presentan el más leve signo clínico (Saeed y Plumb, 1986) y las tilapias del Nilo vacunadas por inmersión presentan niveles de protección dos veces menor que los obtenidos por la vía intraperitoneal (Evans *et al.*, 2004). Adicionalmente, se tienen evidencias de que *Streptococcus agalactiae* ingresaría en los peces a través

del estómago y el intestino (Comas e Iregui, 2005). Teniendo en cuenta estas particularidades, la única vía plausible de vacunación contra este patógeno sería la oral.

A pesar de que algunos autores consideran que en acuicultura una única vacunación es suficiente para inducir protección hasta que los peces son capturados (Heppell y Davis, 2000; Bowden *et al.*, 2003a), y esto puede tener validez en inmunizaciones vía intraperitoneal, la vacunación de poblaciones de cientos de miles de individuos requiere de métodos masivos de inmunización (inmersión y oral) los cuales requieren, en la mayoría de los casos, revacunación (Romalde *et al.*, 2004; Vandenberg, 2004). En algunos peces se alcanzan niveles adecuados de protección solo cuando se emplean vacunas vivas modificadas, como en el caso de la vacuna contra *Edwardsiella ictaluri* en cultivos de pez gato de los Estados Unidos (Shoemaker *et al.*, 2002).

A pesar de la aparente seguridad de las bacterinas, el uso de estos productos para la vacunación de los peces informó de un incidente en el 2001, cuando en una explotación de trucha arcoíris en Israel, la utilización de una bacterina contra la estreptococosis indujo la aparición de un isotipo de mayor virulencia, con modificaciones en las proteínas de membrana, capaz de hacer enfermar y matar a los peces vacunados (Bachrach *et al.*, 2001).

El uso de vacunas en acuicultura, si se compara con los adelantos en humanos y en animales de granja, está aún en sus inicios. Con todo, en los últimos años se han hecho grandes avances en vacunación de peces, especialmente de salmónidos (Penagos *et al.*, 2009). La primera vacuna comercial fue producida en Colorado, EEUU, en 1976, después del

descubrimiento de que cultivos de *Yersinia ruckeri* y *Listonella anguillarum* inactivados con formalina podían ser efectivos para proteger a los peces de la enfermedad entérica de la boca roja (ERM) y contra la vibriosis a través de una simple inmersión (Bowden *et al.*, 2003a). En el cultivo de salmón del Atlántico, la vacunación ha sido muy exitosa para controlar enfermedades bacterianas (Gudding *et al.*, 1999). En contraste, la vacunación de especies de aguas cálidas, particularmente de tilapias es aún reducida y casi todas las vacunas producidas son experimentales (Klesius *et al.*, 2000; Swain *et al.*, 2002; Evans *et al.*, 2004).

La mayoría de las vacunas utilizadas en acuicultura han sido vacunas inactivadas (Gudding *et al.*, 1999). Se dispone comercialmente de bacterinas inactivadas con formalina contra las bacterias Gram-negativas *Listonella anguillarum*, *Vibrio ordalii*, *Vibrio salmonicida*, *Yersinia ruckeri*, *Aeromonas hydrophila*, entre otras, y contra las Gram-positivas *Lactococcus garvieae*, *Streptococcus iniae* y *Streptococcus agalactiae* (Klesius *et al.*, 2000; Evans *et al.*, 2004; Pasnik *et al.*, 2005). La única vacuna viva modificada permitida es la desarrollada contra *Edwardsiella ictaluri* para la inmunización del pez gato de cultivo en Norteamérica (Shoemaker *et al.*, 2002; Klesius *et al.*, 2004).

A veces, algunos productos extracelulares (EPCs) de las bacterias se prueban con discutibles resultados en la vacunación de peces contra *Streptococcus* spp. Klesius *et al.* (2000), Evans *et al.* (2004) y Pasnik *et al.* (2005), compararon en tilapias (*Oreochromis niloticus*) el efecto protector de bacterinas convencionales y bacterinas enriquecidas con EPCs contra *Streptococcus iniae* y *Streptococcus agalactiae* y encontraron niveles de

protección adecuados únicamente cuando las vacunas eran adicionadas con los EPCs concentrados.

Podemos citar, entre otros, tres métodos de control de enfermedades: quimioterapia, vacunación e inmunoestimulación. Las dos últimos son empleados para prevenir enfermedades infecciosas. Sin embargo, no se puede esperar que los efectos marcados o de largo plazo observados con las vacunas se produzcan con los inmunoestimulantes. A pesar de que los inmunoestimulantes pueden utilizarse para combatir enfermedades infecciosas, no son tan efectivos como muchos tratamientos quimioterapéuticos.

La membrana externa de las bacterias patógenas Gram-negativas juega un importante papel en el establecimiento de la infección y los mecanismos de patogenicidad sobre el hospedador (Tsolis, 2002). Se compone básicamente de proteínas, lípidos y azúcares, los cuales pueden ser reconocidos fácilmente como sustancias extrañas por los sistemas de defensa inmunológica del hospedador. De estos componentes, las proteínas de membrana (OMPs) juegan un papel crucial en muchos procesos celulares y fisiológicos, y son especialmente atractivas para el desarrollo de vacunas y métodos de diagnóstico (Ding *et al.*, 1996; Pizza *et al.*, 2000).

OmpW pertenece a una pequeña familia de OMPs que es común en las bacterias Gram-negativas. Forma una estructura de ocho cadenas de tipo β -barril con un canal hidrofóbico largo y estrecho (Baldermann *et al.*, 1998; Hong *et al.*, 2006), participa en la osmorregulación (Xu *et al.*, 2004, 2005) y el transporte de pequeñas moléculas hidrofóbicas a través de la membrana

externa bacteriana (Albrecht *et al.*, 2006). OmpW es un antígeno importante en las infecciones bacterianas y ha demostrado ser inmunogénica en *Vibrio cholerae* (Nandi *et al.*, 2000; Kurupati *et al.*, 2006).

Aunque la vacunación es el método más fiable para controlar algunas enfermedades, hasta hoy no hay vacunas eficaces frente a la mayoría de las enfermedades víricas, por lo que los inmunoestimulantes pueden ser capaces de compensar la limitación de la quimioterapia y las vacunas. Se cree que los inmunoestimulantes son más seguros que los agentes quimioterapéuticos y su rango de cobertura mayor que las vacunas. La combinación de la vacunación y la administración de inmunoestimulantes podría aumentar la eficacia de las vacunas (Sakai, 1999).

El control de enfermedades víricas cuya transmisión es tanto horizontal como vertical, es complicado. Un ejemplo es el intento que se ha hecho a lo largo de los últimos años de controlar la enfermedad producida por nodavirus cuando se ha instalado en una piscifactoría. La manera más simple es evitar la enfermedad testando stocks y eliminando los que estén infectados, pero este procedimiento no descarta por completo la posibilidad de que algún pez infectado pueda no ser detectado. Así que, una vez presente la enfermedad en la piscifactoría se ha intentado controlar con tratamientos físicos y químicos con mayor o menor éxito (Arimoto *et al.*, 1996; Frerichs *et al.*, 2000).

Se ha probado un tratamiento térmico contra nodavirus en lubina reduciendo el título viral un 99,9%. El problema es que a efectos prácticos en una piscifactoría, ese 0,1% del título viral no inactivado puede ser suficiente para producir una infección *in vivo* (Frerichs *et al.*, 2000). También se han

experimentado cambios de pH, pero se ha visto que estos virus son muy resistentes a dichos cambios (Arimoto *et al.*, 1996; Frerichs *et al.*, 2000).

Como tratamiento químico para combatir el nodavirus se ha probado el formol, pero resultó ineficaz en dos estudios realizados con lubina y jurel dentón (Arimoto *et al.*, 1996; Frerichs *et al.*, 2000), al contrario de lo que ocurrió con otros virus donde sí se detectó actividad antiviral producida por esta sustancia. (Jørgensen, 1973; Frerichs, 1990). También se han empleado cloro y yodo en lubina, pero su efectividad se ve disminuida en presencia de materia orgánica (Frerichs *et al.*, 2000). Un buen desinfectante ha resultado ser el ozono, debido a su eficacia y al bajo impacto ambiental que supone su uso (Honn y Chavin, 1976; Arimoto *et al.*, 1996).

Se ha intentado desarrollar una vacuna eficaz contra el nodavirus con resultados preliminarmente positivos. Tanaka *et al.* (2001) inyectaron peces intramuscularmente con la proteína recombinante de la cápside del nodavirus y consiguieron una reducción significativa de la mortalidad en meros. Husgard *et al.* (2001) desarrollaron una vacuna con la proteína T2 recombinante, obteniendo resultados satisfactorios para rodaballo y halibut, con un posible efecto a largo plazo de la vacuna. Sommerset *et al.* (2003) demostraron que una vacuna producida con ADN de una glicoproteína de un rhabdovirus producía protección a corto plazo contra nodavirus en rodaballo. Más recientemente, Sommerset *et al.* (2005) probaron, en juveniles de rodaballo, una vacuna consistente en una proteína recombinante de la cápside del nodavirus de halibut y otra del fragmento de ADN de la misma región que

codifica para la proteína anterior; la eficacia fue demostrada con la primera vacuna, no así con la segunda.

8. Uso de inmunoestimulantes

Numerosos estudios han mostrado que los inmunostimulantes pueden proteger a los peces frente a patógenos bacterianos, y se ha empleado un amplio rango de inmunoestimulantes en acuicultura para mejorar el crecimiento y la resistencia frente a patógenos durante las condiciones de estrés en las granjas (Kunttu *et al.*, 2009).

Los inmunoestimulantes son aditivos que aumentan las respuestas de los sistemas inmune inespecífico y adaptativo y son considerados como una promesa en el suplemento a la vacunación y en el cultivo selectivo, el cual persigue las estrategias de prevención de enfermedades en peces de acuicultura (Djordjevic *et al.*, 2009).

El desarrollo de inmunoestimulantes es complicado debido al conocimiento limitado que se tiene en sus mecanismos de acción. Una evaluación definitiva de la eficiencia de los inmunoestimulantes requiere un desafío con patógenos activos, pero estos experimentos ofrecen altos costes y conciernen asuntos éticos. Un desafío debe ser precedido con una exploración de candidatos a inmunoestimulantes, la cual evalúa sus impactos en la inmunidad y predice la eficiencia bajo diferentes condiciones, como por ejemplo, infecciones con bacterias y virus con diferentes medios de acción y patogénesis. Es necesaria la evaluación precisa de las respuestas adecuadas a

patógenos para escoger entre distintos procesos inmunológicos. Por tanto, los inmunoestimulantes deben mejorar los beneficios y disminuir las respuestas adversas más que activar o suprimir la inmunidad en general (Djordjevic *et al.*, 2009).

Muchos estudios, mediante el uso de inmunoestimulantes, han buscado la modulación de la respuesta inmune con el objeto de prevenir a los peces de las enfermedades de origen bacteriano (Sakai, 1999; Sealey y Gatlin, 2001). Han sido desarrollados como inmunoestimulantes efectivos en peces varias sustancias (Anderson, 1992; Raa *et al.*, 1992; Sealey y Gatlin, 2001; Galindo-Villegas y Hosokawa, 2005; Kunttu *et al.*, 2009), y entre ellas encontramos agentes químicos sintéticos como el levamisol (Kajita *et al.*, 1990; Siwiki *et al.*, 1990), componentes de origen microbiano como polímeros de glucano (Jørgensen *et al.*, 1993; Thompson *et al.*, 1995) y LPS (MacArthur *et al.*, 1985; Neumann *et al.*, 1995), derivados de animales, extractos de plantas (Davis y Hayasaka, 1984; Noya *et al.*, 1995), factores nutricionales como las vitaminas C y E (Thompson *et al.*, 1993; Wise *et al.*, 1993), hormonas como la prolactina y la hormona de crecimiento (Kajita *et al.*, 1992; Sakai *et al.*, 1996) y citoquinas como el IFN y la IL-2 (Tamai *et al.*, 1992, 1993).

El uso de sustancias inmunoestimulantes en acuicultura está muy extendido. Aunque se han demostrado sus efectos beneficiosos para la salud y bienestar de los peces cultivados, también es preciso conocer en qué condiciones (dosis, tiempo de administración, etc.) se consiguen los mejores resultados. Además, la incorporación de nuevos inmunoestimulantes ayudará al desarrollo de la acuicultura al poder emplear más y mejores sustancias.

En esta búsqueda de inmunoestimulantes, el uso de sustancias naturales no perjudiciales ni para el medio ambiente ni para los peces ni, por supuesto, para los consumidores está haciendo avanzar este campo. En este sentido, a las conocidas y probadas vitaminas, quitina y glucanos se están añadiendo el uso de probióticos, prebióticos y productos bacterianos (Sakai, 1999).

Los peces tratados con inmunoestimulantes normalmente muestran un aumento de las actividades celulares fagocíticas, como ocurre por ejemplo con sustancias como glucanos (Yano *et al.*, 1989; Chen y Ainsworth, 1992; Jørgensen *et al.*, 1993), lactoferrina (Sakai *et al.*, 1993), levamisol (Kajita *et al.*, 1990), FK-565 (Kitao y Yoshida, 1986), quitina (Sakai *et al.*, 1992) y EF203 (Yoshida *et al.*, 1993).

El uso de inmunoestimulantes puede proteger al pez de ciertas enfermedades infecciosas y disminuir las tasas de mortalidad; sin embargo, los peces no pueden ser protegidos de todas las enfermedades infecciosas por los estimulantes del sistema inmune. Los peces que reciben inmunoestimulantes muestran un aumento de la resistencia frente a infecciones bacterianas como *Listonella anguillarum*, *Vibrio salmonicida*, *Aeromonas salmonicida* y *Streptococcus* spp., infecciones víricas como IHN y baculovirus, e infecciones parasitarias como la enfermedad del punto blanco (Sakai, 1999).

Los inmunoestimulantes no aumentan la resistencia frente a enfermedades provocadas por *Renibacterium salmoninarum*, *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* o *Edwardsiella ictaluri*. Estas bacterias son

resistentes a la fagocitosis y pueden sobrevivir en macrófagos (Nelson *et al.*, 1989; Baldwin y Newton, 1996; Gutenberger *et al.*, 1997).

Tanto una bacterina de la bacteria Gram-negativa *Listonella anguillarum* y una vacuna polivalente con adyuvante oleoso resultaron ser potentes inductores de las transcripciones de Mx (Salinas *et al.*, 2004; Haugland *et al.*, 2005). Las moléculas activas pueden ser a la vez LPS y ADN de la bacteria, dado que estos componentes también indujeron una fuerte respuesta Mx por sí mismos (Acosta *et al.*, 2004). No se han encontrado LPS de *Escherichia coli* capaces de inducir la transcripción de Mx en el salmón, lo que sugiere que el LPS de *Listonella anguillarum* tiene propiedades únicas a este respecto (Salinas *et al.*, 2004).

8.1. ADN

Entre las estructuras químicas típicas de los microorganismos potencialmente peligrosos se encuentran elementos estructurales (como los glucanos, LPS, etc.) y, más recientemente ácidos nucleicos (ARN viral de doble cadena y ADN bacteriano) ricos en secuencias CpG (regiones de ADN que responden a la estructura citosina-fosfato-guanina) (Lipford, 1998; Krieg, 2002). Todas estas sustancias tienen en común su conservación a través de la evolución de los microorganismos, pero que no son constituyentes habituales de los organismos superiores. Se cree que la razón por la que esos polímeros poseen efecto inmunomodulador es porque el sistema inmunitario inespecífico se ha desarrollado hacia el reconocimiento de estructuras conservadas en los microorganismos.

Durante décadas se pensó que el ADN bacteriano era inmunológicamente inerte, pero por el contrario, hoy en día se sabe que hay receptores del sistema inmunitario (PRRs) que reconocen el ADN de microorganismos como peligroso. En concreto, detectan dinucleótidos CpG no metilados, en un contexto de bases particular.

La vacuna de ADN se define como la transferencia intencionada de material genético a las células somáticas con el fin de influir en el sistema inmunológico (Foss, 2003). La expresión a corto plazo es suficiente para evocar una respuesta inmune con la vacunación de ADN.

Tras la vacunación de ADN, el sistema inmune se activa por las células presentadoras de antígeno (APC), como las células dendríticas (DCs) (Restifo *et al.*, 2000). Se ha demostrado que las APCs, como los macrófagos, y DCs contienen ADN plasmídico después de la vacunación intramuscular.

En los últimos años, se ha estudiado la inoculación directa de plásmidos de ADN que codifican inmunogenes para la producción de vacunas efectivas frente a enfermedades virales en acuicultura, un proceso que está aún al comienzo de su desarrollo (Kurath, 2005; Tonheim *et al.*, 2008). Mientras que la mayoría de los experimentos en este campo han sido realizados en trucha arcoíris usando vacunas de ADN frente a rhabdovirus, y a la infección por Necrosis Hematopoyética Infecciosa Viral (IHN) o Septicemia Hemorrágica Viral (VHS) (Anderson *et al.*, 1996; Heppell *et al.*, 1998; Lorenzen *et al.*, 1998), recientemente se han usado otras especies no salmónidas (Yasuike *et al.*, 2007).

Se han investigado vacunas de ADN contra una amplia gama de patógenos en varias especies de peces y se han desarrollado vacunas convencionales o vacunas de subunidades para muchos de estos patógenos con éxito limitado (Leong y Fryer, 1993; Newman, 1993; Anderson *et al.*, 1996; Lorenzen y Olesen, 1997; Traxler *et al.*, 1999; Corbeil *et al.*, 1999, 2000; Kim *et al.*, 2000; LaPatra *et al.*, 2000, 2001; Lorenzen *et al.*, 1998, 1999, 2000, 2001, 2002a,b; McLauchlan *et al.*, 2003; Nusbaum *et al.*, 2002; Sommerset *et al.*, 2003; Mikalsen *et al.*, 2004, 2005; Garver *et al.*, 2005; Vazquez-Juarez *et al.*, 2005; Caipang *et al.*, 2006; Kanellos *et al.*, 2006; Kurath *et al.*, 2006; Seo *et al.*, 2006; Zheng *et al.*, 2006; Kumar *et al.*, 2007) (**Tabla VII**).

Por su parte, las vacunas de ADN se consideran las más eficaces para inducir protección y respuesta del sistema inmune en los peces por disparar mecanismos inmunológicos inespecíficos (activación de genes de leucocitos) y adaptativos (expresión del antígeno intacto) que aseguran respuestas efectivas tanto humorales como celulares (Heppell y Davis, 2000).

La transcripción eucariótica y la producción de plásmidos de ADN que codifican una proteína no glicosilada es altamente factible, pero no la transcripción y la producción de carbohidratos y proteínas altamente glicosiladas. Esto sugiere que la vacuna de ADN no puede ser un sustituto para las vacunas más tradicionales que contienen polisacáridos, que evocan la respuesta inmune contra los microbios que tienen una membrana externa hecha de, por ejemplo, LPS (Minor, 1995). A raíz de que el ADN plasmídico contiene CpGs, pueden actuar como adyuvantes (Krieg *et al.*, 1995; Pisetsky *et al.*, 1995; Klinman *et al.*, 1996).

Tabla VII.- Resumen de patógenos frente a los que se han utilizado vacunas de ADN.

Patógeno		Hospedador	
AHNV	Nodavirus del halibut del Atlántico	Rodaballo	<i>Scophthalmus maximus</i>
CCV	Virus bagre del canal	Bagre del canal	<i>Channel catfish</i>
HIRRV	Hirame Rhabdovirus	Halibut del Japón	<i>Paralichthys olivaceus</i>
IHNV	Necrosis Hematopoyética Infecciosa Viral	Trucha arcoíris	<i>Oncorhynchus mykiss</i>
		Salmón del Atlántico	<i>Salmo salar</i>
		Salmón real	<i>Oncorhynchus tshawytscha</i>
		Salmón rojo	<i>Oncorhynchus nerka</i>
IPNV	Necrosis Pancreática Infecciosa Viral	Salmón del Atlántico	<i>Salmo salar</i>
ISAV	Anemia Infecciosa Viral del salmón	Salmón del Atlántico	<i>Salmo salar</i>
LCDV	Enfermedad Viral de Linfocistis	Halibut del Japón	<i>Paralichthys olivaceus</i>
RSIV	Iridovirus	Dorada del Japón	<i>Pagrus major</i>
SVCV	Virus de la Viremia Primavera de la Carpa	Carpa común	<i>Cyprinus carpio</i>
VHSV	Virus de Septicemia Hemorrágica Viral	Trucha arcoíris	<i>Oncorhynchus mykiss</i>
<i>Listonella anguillarum</i>		Perca gigante	<i>Lates calcarifer</i>
<i>Aeromonas veronii</i>		Cabrilla arenera	<i>Paralabrax maculatofasciatus</i>

La tolerancia parece ser un problema en los individuos neonatos, ya que un sistema inmunológico inmaduro podría reconocer la vacuna de ADN codificando la proteína como una proteína libre (Mor *et al.*, 1996; Mor, 1998; Bot, 2000; Smith y Klinman, 2001). Sin embargo, durante la vacunación con ADN neonatal, la tolerancia es la excepción y no la regla (Bot, 2000). La susceptibilidad a la inducción de la tolerancia disminuye en el plazo de una semana después del nacimiento en ratones y aumenta al aumentar la dosis de

ADN plasmídico (Ichino *et al.*, 1999). Aunque probablemente no se produzca, cabe la posibilidad de que la integración del ADN plasmídico en el ADN cromosómico podría dar lugar a mutaciones, inestabilidad genómica y anormalidades (Taubes, 1997; Gregoriadis, 1998; Smith y Klinman, 2001).

Algunos estudios con vacunas de ADN frente a IHN han mostrado que no solo estimulan la producción de anticuerpos y protegen, sino que también inducen la expresión del gen Mx en tejidos musculares de trucha arcoíris en el punto de la inyección y en órganos internos durante los primeros 3-7 días tras la inoculación (Boudinot *et al.*, 1998; Purcell *et al.*, 2004, 2006). La vacuna de ADN frente a VHS induce intensamente la regulación de Mx en el hígado de salmón del Atlántico y trucha arcoíris con máximas respuestas a los días 12 y 14 tras la inoculación, respectivamente (Acosta *et al.*, 2005). Además, se puede apreciar protección frente a VHS a la semana post-vacunación con ADN, tiempo en el que el gen Mx ya se ha expresado y los anticuerpos frente a VHS aún no se detectan hasta las semanas 4-8 tras la vacunación (Boudinot *et al.*, 1998).

Se han investigado varios parámetros para optimizar la eficacia de las vacunas de ADN contra IHN y VHS, como la dosis, el tamaño del pez (Corbeil *et al.*, 2000; LaPatra *et al.*, 2000; Lorenzen *et al.*, 2000, 2002a,b) y la vía de administración óptima (Corbeil *et al.*, 2000; Fernández-Alonso *et al.*, 2001; McLauchlan *et al.*, 2003). Parece ser que la vía de administración óptima de estas vacunas ADN es intramuscular y da buenos resultados para vacunar a los peces cuando son pequeños, ya que los peces más grandes requieren una dosis más alta de la vacuna (LaPatra *et al.*, 2000; Lorenzen *et al.*, 2001). Al

principio la protección implica corta duración y mecanismos de defensa inespecíficos antivirales, como la inducción de los IFNs y las proteínas Mx (Kim *et al.*, 2000; LaPatra *et al.*, 2001; Lorenzen *et al.*, 2002a,b; McLauchlan *et al.*, 2003), que pueden ser importantes en la protección contra virus heterogéneos (Lorenzen *et al.*, 2002a,b; Sommerset *et al.*, 2003). Sin embargo, la protección específica puede durar hasta 2 años después de la administración intramuscular (Kurath *et al.*, 2006).

Los trabajos realizados en peces en este campo, demuestran el efecto estimulante de los CpG ODNs (oligodeoxinucleóticos CpG, cadenas sintéticas cortas de ADN que contienen secuencias de CpG) sobre diversas respuestas inmunitarias de varias especies de peces teleósteos (Carrington y Secombes, 2006) *in vitro* y/o *in vivo*. Sin embargo, estos estudios muestran datos contradictorios y no definitivos.

8.2. LPS

El grupo de los lipopolisacáridos (LPS) engloba a un conjunto relativamente homogéneo de sustancias tóxicas formadas por complejos polisacárido-lípido-fósforo, que se encuentran en bacterias Gram-negativas (Thomas, 1954).

Por lo general los LPS son sustancias de gran peso molecular con una única estructura química, compuesta por tres regiones: una región polisacárida más externa denominada antígeno-O (componente lineal o ramificado de residuos de oligosacáridos), una región base de polisacáridos (azúcares cortos en cadena) y una región nuclear rica en ácidos grasos

denominada lípido A, que está unida covalentemente a la región anterior, anclando así toda la molécula de LPS a la membrana externa bacteriana (Raetz, 1990; Rietschel y Brade, 1992; Morrison y *et al.*, 1999; Seydel *et al.*, 2000; Gronow y Brade, 2001; Erridge *et al.*, 2002). El lípido A está formado por dos glucosaminas sustituidas con fosfatos y un número variable de ácidos grasos. Está presente en todas las bacterias independientemente de la cepa y su patogenicidad, pero es pobremente reconocida por el sistema inmune (Robertsen, 1999; Iliev *et al.*, 2005a,b; Akira *et al.*, 2006) (**Figura V**). Se ha demostrado que el lípido A es responsable de la mayoría de los efectos inmunomodulatorios del LPS (Robertsen, 1999; Iliev *et al.*, 2005a,b). La mayoría de los LPS estudiados en bacterias Gram-negativas tienen regiones O-polisacáridicas de distinta longitud y se denominan LPS lisos, mientras que algunas bacterias y muchos mutantes han perdido la cadena O-polisacáridica total o parcialmente, por lo que se les denomina LPS rugosos (Preston *et al.*, 1996).

Biológicamente, el LPS es una endotoxina que causa una gran variedad de efectos patofisiológicos (Thomas, 1954; Rietschel *et al.*, 1994). Los animales superiores son extremadamente sensibles a las endotoxinas aunque se encuentren a bajas dosis. Sin embargo, los vertebrados inferiores como las ranas o peces se caracterizan por ser resistentes al shock de endotoxinas (Berczi *et al.*, 1966). Además, se ha visto en algunas ocasiones que las endotoxinas/LPS son responsables de la patogenicidad de numerosos agentes bacterianos, especialmente las bacterias Gram-negativas, en peces (Rodkhum *et al.*, 2006).

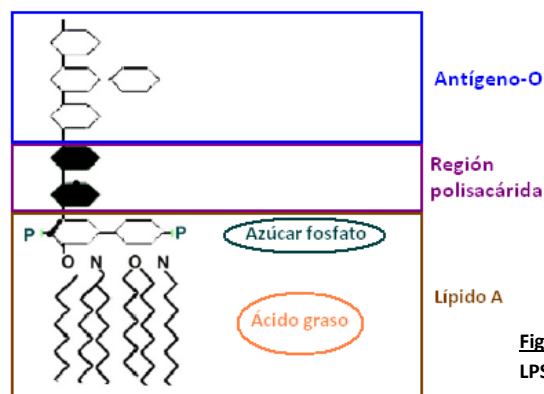


Figura V.- Componentes moleculares de un LPS (Swain *et al.*, 2008).

En mamíferos, la respuesta inmune al LPS y el fenómeno de shock endotóxico son mediados por la proteína de unión de LPS (LBP), la transferencia del complejo LBP-LPS a CD₁₄, la activación del sistema de reconocimiento *toll-like receptor* 4 (TLR₄) en leucocitos y la liberación en cascada de sustancias como citoquinas proinflamatorias (factor de necrosis tumoral, TNF- α , interleuquinas, IL-1 β , IL-12, los IFNs antivirales, IFN-I) (Iliev *et al.*, 2005a). En los peces, las proteínas homólogas a la LBP no transfieren proteínas al CD₁₄, lo cual conduce a la neutralización del LPS e interfiere en la activación del TLR₄.

Se han empezado a tener en cuenta en la búsqueda de mejores respuestas vacunales en peces algunos componentes estructurales esenciales para la supervivencia de los microorganismos denominados genéricamente patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs), así como la interacción de éstos con el sistema inmune inespecífico a través de los receptores de reconocimiento de patrón del sistema inmune (PRRs) (Robertsen, 1999; Iliev *et al.*, 2005a).

Después de la estimulación por diferentes PAMPs incluyendo zimosan, muramil dipéptido (MDP), β -glucanos y ARN de doble cadena (ARNds), los monocitos de truchas modularon la producción de citoquinas proinflamatorias con la misma sensibilidad que la observada en células de mamíferos, pero en el caso de los LPS, la producción del TNF₂ solo se dio cuando las células se expusieron a 1.000 veces la concentración usada en monocitos de mamíferos (Iliev *et al.*, 2005b).

En el trabajo de Djordjevic *et al.* (2009) aplicaron una inyección de LPS de *Escherichia coli* como un modelo de inflamación. El LPS es el mayor constituyente de la capa externa de las bacterias Gram-negativas y un prototipo inductor de inflamación en varias especies. Los LPS estimulan la producción de quimiocinas y citoquinas proinflamatorias, las cuales activan el reclutamiento y la diferenciación de las células inmunes y activan los mecanismos antibacterianos incluyendo el complemento, las proteasas extracelulares y las especies reactivas del oxígeno (ROS). En mamíferos, los LPS causan septicemias y fallos orgánicos. A pesar de la tolerancia notablemente mayor en comparación con los vertebrados superiores (MacKenzie *et al.*, 2004), los peces desarrollan respuestas inflamatorias a gran escala hacia los LPS.

A pesar de que los LPS en los peces tienen poco potencial proinflamatorio, las células y componentes del sistema inmune tanto sistémicos como de superficie (intestinal y branquial) se activan y movilizan en respuesta a los LPS (Cahill, 1990; Dalmo y Bogwald, 1996; Press *et al.*, 1996).

Los estudios de los autores anteriores consistieron en administrar LPS por vía intravenosa e intraperitoneal en bacalaos y los LPS se detectaron en corazón, bazo y riñón durante 7 días. Algunos autores también emplearon la inoculación oral y se encontraron LPS en gran cantidad en intestino y en menor cantidad en órganos internos. En el rodaballo, después de la inoculación intravenosa, se encontraron LPS en bazo, hígado y riñón, y en el bazo e hígado cuando se administraron vía oral. En varias especies marinas, los macrófagos de riñón y bazo y los elipsoides esplénicos acumulan grandes cantidades de LPS. También se detectaron LPS en tejido conectivo intestinal y branquial y en células del epitelio intestinal y lámina propia después de la inoculación intraperitoneal y oral, respectivamente (Dalmo *et al.*, 1998).

Sumado a la movilización hacia diferentes tejidos, los extractos de LPS purificados o incluidos en vacunas, son recogidos por células linfoides y sistema reticuloendotelial y estimulan la activación y movilización de los macrófagos, neutrófilos y CMMs (Dalmo y Bogwald, 1996; Press *et al.*, 1996; Dalmo *et al.*, 1997; Agius y Roberts, 2003), además, activan los linfocitos B aún estando a bajas temperaturas (Le Morvan *et al.*, 1998).

La inoculación de extractos purificados de LPS o bacterinas que incluyen LPS, inducen elevadas respuestas de anticuerpos que protegen y estimulan la protección en inmunizaciones contra diversos patógenos y en diferentes especies acuícolas de agua dulce y salada, como por ejemplo: *Vibrio salmonicida* y *Listonella anguillarum* en salmones (Bøgwald *et al.*, 1991), *Edwardsiella ictaluri* en pez gato (Saeed y Plumb, 1986) y *Aeromonas hydrophila* en carpa (Selvaraj *et al.*, 2004) por lo que se sigue utilizando como

inmunoestimulante o como componente de vacuna (Shao, 2001; Bowden *et al.*, 2003b)

Como los LPS son un fuerte estimulador de macrófagos, activan varias vías de transducción de señales para producir una variedad de citoquinas inflamatorias en los seres humanos y animales, incluidos los peces (Secombes y Fletcher, 1992; Fujihara *et al.*, 2003). Sin embargo, la producción excesiva de citoquinas en respuesta a LPS es a menudo mortal y considerada como la causa del shock séptico (Callery *et al.*, 1990). Por otra parte, los macrófagos cuando son expuestos a dosis por debajo de la tolerancia de LPS se hacen tolerantes a su posterior exposición y manifiestan una respuesta alterada (Fujihara *et al.*, 2003). También pueden causar pronunciada expansión de la membrana y aumento del contenido en orgánulos en los macrófagos de los peces (Dalmo y Seljelid, 1995). Algunos efectos *in vitro* que han encontrado varios autores en dorada, trucha arcoíris, lubina, carpa común, salmón del Atlántico y carpa dorada son: estimulación de la producción de IL y TNF, aumento de la expresión del ARNm de CD83, los niveles amiloide sérico A, inducción de la producción de óxido nítrico, prostaglandina, lisozima y cortisol, aumento de la producción de anión superóxido, la actividad respiratoria y fagocitosis (Jang *et al.*, 1995; Neumann *et al.*, 1995; Rowley *et al.*, 1995; Neumann y Belosevic, 1996; Campos-Pérez *et al.*, 1997; Verburg-Van *et al.*, 1999; Zou *et al.*, 1999, 2002; Engelsma *et al.*, 2001; Qin *et al.*, 2001; Fujihara *et al.*, 2003; Paulsen *et al.*, 2003; Saeij *et al.*, 2003; Goetz *et al.*, 2004; Sarmiento *et al.*, 2004; Donate *et al.*, 2007).

Neumann y Belosevic (1996) documentaron un incremento gradual en los macrófagos de la carpa dorada inducido por LPS, pero la mayor actividad registrada fue cuando fueron coestimulados con los factores de activación de macrófagos. Por otro lado, Sarmento *et al.* (2004) encontraron un incremento inicial en la reacción intermedia de oxígeno por la estimulación de macrófagos con LPS seguido de un descenso de regulación a las 24 horas de incubación.

Los LPS estimulan en peces la proliferación de linfocitos B tanto en condiciones *in vivo* como *in vitro* (Salati *et al.*, 1987; Kodama *et al.*, 1994; Dalmo y Seljelid, 1995, Verburg-Van *et al.*, 1999). Se ha visto que los LPS estimulan los linfocitos *in vitro* en peces como halibut del Japón, pez cebra y carpa común (Hirono *et al.*, 2000; Park *et al.*, 2003; Selvaraj *et al.*, 2004; Bei *et al.*, 2006; Igawa *et al.*, 2006).

La concentración de LPS varía dependiendo de si son condiciones *in vivo* o *in vitro*. Para el halibut japonés se necesitó una dosis alta de 500 µg/ml de LPS para estimular los leucocitos periféricos (Hirono *et al.*, 2000; Park *et al.*, 2003). Selvaraj *et al.* (2004) observaron un aumento de leucocitos en la carpa común cuando se le administraron LPS de *Aeromonas hydrophila* obtenidos por el método de fenol-cloroformo. Aunque hubo un aumento significativo de neutrófilos y monocitos, incluso con la dosis 10 µg/pez en el grupo de los inoculados con LPS, no hubo cambios significativos en la cantidad de linfocitos con respecto a las dosis (10, 50 y 100 µg/pez) hasta el final del experimento que fue al día 17 tras la inoculación.

En estudios *in vitro*, se necesitaron dosis extremadamente altas (µg/ml) de LPS para estimular la respuesta de leucocitos y concentraciones de LPS

1.000 veces superiores que las requeridas en mamíferos para inducir en los fagocitos mononucleares la regulación de la producción de TNF (Zou *et al.*, 2003; Hirono *et al.*, 2004). Estos hallazgos han llevado a afirmar que los peces son resistentes o insensibles al LPS (Cahill, 1990; Dalmo y Bogwald, 1996; Iliev *et al.*, 2005a).

Los leucocitos son activados solo en altas concentraciones de LPS, posiblemente a través de agregados de LPS con un mecanismo dependiente de las β -2 integrinas (Iliev *et al.*, 2005a).

Zapata *et al.* (1997) hipotetizaron que la tolerancia al LPS en peces jóvenes puede ser únicamente a antígenos T-dependientes y solo a inyectados, pero no a aquellos administrados por inmersión. Algunos autores sostienen que las células B de la trucha arco iris pueden ser estimuladas por antígenos T-independientes, como los LPS cuando los alevines tienen 4 semanas de edad (0,13 g; Zapata *et al.*, 1997). Cuando las truchas tienen 8 semanas (0,26 g), desarrollan memoria inmunológica y memoria a largo plazo solo cuando superan los 4 g de peso.

Hay varios artículos que describen la inmunización con LPS y bacterias completas de alevines, juveniles (Dalmo y Bogwald, 1996; Press *et al.*, 1996; Dalmo *et al.*, 1998; Selvaraj *et al.*, 2004) o incluso de larvas (Dalmo *et al.*, 2000). En esos estudios los antígenos fueron administrados intraperitonealmente o por inmersión e indujeron respuestas inmunes específicas o en algunos casos, aumento en la protección frente al desafío con el microorganismo, que descartan la posibilidad de respuestas de inmunotolerancia. En contraste, Penagos *et al.* (2009), hicieron referencia a

que algunos autores encontraron altas mortalidades en alevines de salmón del Atlántico (*Salmo salar*) alimentados desde los 2 g con una dieta que incluía LPS, tras el desafío con *Aeromonas salmonicida* y *Listonella anguillarum*. Estos autores creen que las mortalidades pudieron presentarse por tolerancia al LPS, por delección de componentes del complemento causado por la repetida exposición a la sustancia o por los niveles excesivos de LPS administrados.

En relación con el efecto biológico en especies de consumo (salmón, carpa, trucha, pez gato) la inoculación de dosis de LPS que serían letales para cualquier mamífero, en la mayoría de los casos no induce cuadros clínicos (Cahill, 1990; Dalmo y Bøggwald, 1996; Iliev *et al.*, 2005a). En el salmón del Atlántico se inocularon dosis de LPS de 2 mg/kg y 50 mg/kg por las vías intraperitoneal e intragástrica, respectivamente, pero no se evidenciaron ningún tipo de signos clínicos, lesiones histopatológicas o mortalidad (Dalmo y Bøggwald, 1996). En este trabajo también se menciona que la inoculación de 200 mg/kg de LPS en carpas no produjo muerte ni signos clínicos y que el salmón coho (*Oncorhynchus kisutch*) y la trucha arcoíris son insensibles al LPS de *Escherichia coli* y *Aeromonas salmonicida*.

De acuerdo con lo que se ha publicado en mamíferos (Koyama *et al.*, 2000), los LPS de *Pseudomonas aeruginosa* son más letales que los LPS de *Escherichia coli*. Se ha comprobado que el pretratamiento de larvas de pez cebra con diferentes concentraciones de LPS de *Pseudomonas aeruginosa* no protege frente a una exposición posterior de una concentración letal con el mismo LPS. Por el contrario, el pretratamiento con una dosis no letal de LPS de *Escherichia coli* protegió cuando los peces fueron expuestos a los LPS de

Pseudomonas aeruginosa. Esto indica una diferencia en los mecanismos moleculares (Novoa *et al.*, 2009).

La IL-1 ha sido propuesta como mediador de tolerancia *in vivo* en mamíferos (Henricson *et al.*, 1991). Los resultados de Novoa *et al.* (2009) muestran que la expresión de IL-1 incrementa cuando los peces son tratados con altas concentraciones de LPS, los cuales podrían imitar la sobreproducción de citoquinas proinflamatorias que se producen en los casos de septicemia. Sin embargo, la IL-1 decrece en el estado de baja tolerancia inducida por las bajas concentraciones de LPS, lo cual está en concordancia con lo documentado sobre la inhibición de la expresión de varias citoquinas, como por ejemplo, TNF α , IL-1 β , IL-6 e IL-12 en los casos de tolerancia de LPS (Medvedev *et al.*, 2000).

A pesar de su bajo potencial proinflamatorio, los LPS tienen excelentes propiedades inmunógenas (Dalmo *et al.*, 1998) que validan su empleo como adyuvante o antígeno para la inmunización de peces (Shao, 2001; Bowden *et al.*, 2003a).

En *Aeromonas hydrophila* así como en otros patógenos de peces se ha demostrado que el LPS juega un papel importante en la toxicidad, actuando directamente sobre los eritrocitos del pez (Lee y Ellis, 1991; Huntly *et al.*, 1992) o en relación con distintas características como la adherencia, la hidrofobicidad y la resistencia al suero, que son importantes para el establecimiento de la infección en peces (Merino *et al.*, 1992, 1998; Jacques, 1996; Linnerborg *et al.*, 1996; Aguilar *et al.*, 1997; Boesen *et al.*, 1999).

A pesar de que la inclusión de LPS o sus componentes en vacunas no es una práctica común en sistemas de producción piscícola (Shao, 2001; Bowden *et al.*, 2003a), se recomienda determinar para cada especie de interés productivo las dosis de LPS que tendrían efecto inmunoestimulante y la fase de desarrollo del pez a la cual se debe iniciar la inmunización con esta molécula, particularmente los estadios de larva y de alevinaje temprano que suponen deficiencias en las funciones inmunes (Penagos *et al.*, 2009).

Las vacunas (bacterinas) contra vibriosis (*Listonella anguillarum* y *Vibrio salmonicida*) y contra yersiniosis (*Yersinia ruckeri*) contienen como antígeno inmunógeno al LPS y han dado muy buenos resultados en la acuicultura marina del salmón, lubina, rodaballo, dorada y halibut. De forma similar, el LPS en conjunto con la proteína de capa A de la *Aeromonas salmonicida* induce niveles protectores contra la furunculosis del salmón (Shao, 2001; Bowden *et al.*, 2003a). El peptidoglucano demostró que puede amplificar la resistencia de la trucha arcoíris contra *Listonella anguillarum* y la del medregal del Japón contra *Enterococcus seriolicida* aun cuando se administraron en el alimento de los peces. El componente activo muramil dipéptido administrado por vía intraperitoneal aumentó la resistencia del salmón coho y de la trucha arcoíris contra la infección por *Aeromonas salmonicida* (Robertsen, 1999).

Se ha demostrado que los LPS inoculados a dorada del Japón (*Pagrus major*) pueden estimular la proliferación de células B y aumentar la actividad fagocítica de los macrófagos (Salati *et al.*, 1987). MacArthur *et al.* (1985) vieron que los LPS inoculados a la platija (*Pleuronectes platessa*) aumentan la actividad migratoria de los macrófagos. *In vitro*, los LPS estimulan la

fagocitosis y la producción de aniones superóxido en macrófagos de salmón del Atlántico (Solem *et al.* 1995). Además, de la producción de factores de activación de macrófagos en los linfocitos de carpa dorada (Neumann *et al.*, 1995) y la producción de IL-1 en monocitos del pez gato (Clem *et al.*, 1985).

Acerete *et al.* (2007) corroboraron que los LPS pueden inducir transcripciones de Mx en dorada, con altos niveles de expresión en riñón anterior, bazo e intestino. Estos resultados se encuentran en contraposición a los realizados en salmón del Atlántico, en el cual, los LPS inducen respuestas muy bajas en hígado los días 2-3 después de la administración de LPS. Los resultados de Acerete *et al.* sugieren que la proteína Mx puede también contribuir a la defensa antibacteriana en el pez además de la función antiviral descrita en otros casos.



Material y Métodos
Material y Métodos

1. Primera fase: Intensidad y duración *in vivo* de la respuesta inmune inducida por productos bacterianos

I. Instalaciones y peces de experimentación

Para realizar esta fase del trabajo se han empleado peces de la especie Dorada (*Sparus aurata* L.), de diferentes orígenes, en función de la época del año en que se realizó la experiencia. Unos se obtuvieron de la empresa de acuicultura PROCRIA, S.A., situada en mar abierto en Castillo del Romeral, al Sureste de la isla de Gran Canaria, con un peso medio de 45 g. Esta explotación recibe alevines de 5-11 g sin vacunar de Tinamenor, empresa de acuicultura encargada de la producción de alevines asociada a la anteriormente mencionada, que se encuentra situada en Pesués (Cantabria).

Otros ejemplares se obtuvieron de la Planta Experimental de Cultivos Marinos del Instituto Canario de Ciencias Marinas (ICCM), perteneciente a la Agencia Canaria de Investigación, Innovación y Sociedad de la Información (ACIISI), situada en el muelle de Taliarte, municipio de Telde, al este de la isla de Gran Canaria. Estos peces sin vacunar tenían un peso medio de 60 g.

Los peces se transportaron en tanques con oxígeno a nuestro módulo experimental situado en el Instituto Canario de Ciencias Marinas de Taliarte. Fueron organizados en lotes de 12 individuos, en tanques de 500 l, con flujo continuo de agua a 20°C, mantenidos bajo un fotoperiodo de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad y alimentados con pienso comercial (Skretting).

Durante las 2 semanas previas a la realización de la experiencia los peces se aclimataron bajo las condiciones antes mencionadas, comprobándose la ausencia de cualquier signo que hiciera sospechar el desarrollo de alguna enfermedad y se sometieron a un chequeo para verificar que su estado de salud era el óptimo y que no eran portadores de ningún agente infectocontagioso.

Este chequeo se basó en el cultivo a partir de diferentes órganos internos de algunos ejemplares tomados al azar de cada lote, en Agar Sangre y Agar Infusión Cerebro Corazón (BHIA) (Pronadisa) suplementado con un 1,5% de NaCl (Panreac Química, S.A.), los cuales se prepararon según las instrucciones del fabricante. Para enriquecer el medio de Agar Sangre se empleó sangre desfibrinada de oveja (Oxoid) en un porcentaje del 5%.

Para la manipulación de los peces se empleó el anestésico 2-fenoxietanol (Panreac Química, S.A.) con una dosis de 300 µl/l de agua.

II. Cepas bacterianas empleadas

En esta primera fase se utilizaron dos patógenos muy comunes en las aguas canarias, *Vibrio alginolyticus* y *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* (94/99), el primero de la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT) (Miyamoto *et al.*, cuyo año de aislamiento es desconocido) y la segunda perteneciente a nuestra colección de cepas clínicas (Real *et al.*, 1999, aislada de dorada).

III. Extracción de ADN y LPS de las cepas de estudio

Los inmunoestimulantes empleados en esta fase son ácido desoxirribonucleico (ADN) y lipopolisacáridos (LPS) de la pared bacteriana de los patógenos *Vibrio alginolyticus* y *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*.

III.a. Extracción de ADN bacteriano

Para la extracción de ADN bacteriano se empleó el kit de extracción Wizard® Genomic (Promega). La metodología es la siguiente:

Cada patógeno se cultivó en 500 ml de medio de cultivo Caldo Infusión Cerebro Corazón (BHIB) (Pronadisa), suplementado con un 1,5% de cloruro de sodio, preparado según las instrucciones del fabricante. Se incubó en agitación durante 24 horas a 25°C cuando trabajamos con *Vibrio alginolyticus* y durante 48 horas a 25°C con *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*.

Transcurrido ese tiempo se centrifugó a 10.000 rpm durante 15 minutos a 4°C, se retiró el sobrenadante, para posteriormente lavar el precipitado con tampón fosfato salino estéril (PBS), centrifugando nuevamente a 10.000 rpm durante 15 minutos a 4°C.

Se retiró el sobrenadante y el precipitado se resuspendió en 10 ml de *Nuclei Lysis Solution* (Promega). La muestra se incubó a 80°C durante 5 minutos para lisar las células, y se enfrió hasta alcanzar temperatura ambiente.

Posteriormente se añadió 1 ml de *RNAse A Solution* (USB Corporation) y se mezcló la muestra invirtiendo el tubo 25 veces. Después se incubó a 37°C durante 45 minutos y se añadieron 3 ml de *Protein Precipitation Solution* (Promega). Para mezclar se agitó fuertemente durante 20 segundos y se pasó a incubar en hielo durante 5 minutos.

Se centrifugó a 10.000 rpm durante 5 minutos a 4°C y se pasó el sobrenadante a un tubo limpio. Colocamos el mismo volumen de isopropanol (Sigma), mezclamos suavemente y centrifugamos a 10.000 rpm durante 10 minutos a 4°C. Se retira el sobrenadante y se añaden 5 ml de etanol frío al 75%. Invertimos el tubo varias veces para lavar el precipitado y centrifugamos a 10.000 rpm durante 5 minutos a 4°C. Retiramos el sobrenadante y secamos la muestra a 37°C durante 15 minutos.

Finalmente se añaden 3 ml de agua destilada estéril y se incuba la muestra a 65°C durante 10 minutos. Para mezclar la muestra agitamos durante 5 segundos.

La muestra es cuantificada utilizando un espectrofotómetro *Genesys 10UV* (Thermo), con una cubeta (trUView™ Cuvette, Biorad), a la absorbancia de 260 nm (teniendo en cuenta que a esta longitud de onda, $1 A_{260} = 50 \text{ ng}/\mu\text{l}$) y almacenada a -20°C.

III.b. Extracción de LPS bacteriano

Para la extracción de lipopolisacárido bacteriano se empleó el método de Westphal y Jann (1963) modificado:

La cepa empleada se sembró en 4 litros para *Vibrio alginolyticus* y 12 litros para *Photobacterium damselae* subsp. *piscicida* de medio de cultivo Caldo Infusión Cerebro Corazón (BHIB) (Pronadisa), suplementado con un 1,5% de cloruro de sodio (Panreac Química, S.A.), preparado según las instrucciones del fabricante. Se incubó bajo las mismas condiciones que en el apartado anterior.

Transcurrido dicho tiempo se centrifugó a 10.000 rpm durante 10 minutos a 4°C, se retiró el sobrenadante y el precipitado se resuspendió con 25 ml de PBS. El producto resultante es liofilizado para eliminar la humedad y pesar el extracto seco de bacteria.

La cantidad de 3 g de extracto seco fueron mezclados con 35 ml de agua destilada estéril a 65°C y se añadieron 35 ml de fenol a 68°C, mezclando fuertemente. La muestra es tratada a 65°C durante 15 minutos y enfriada en hielo. Posteriormente, centrifugamos a 3.000 rpm durante 45 minutos y obtenemos tres fases: una acuosa, otra de fenol y una última de residuos insolubles.

Recogemos la fase acuosa y la dializamos, empleando una membrana porosa. Esta membrana la dejamos suspendida y agitándose en un litro de agua destilada estéril, para retirar el fenol y pequeñas cantidades de sustancias bacterianas de bajo peso molecular. El producto dializado, que

contiene lipopolisacáridos y ácido ribonucleico, lo retiramos a las 48 horas y lo liofilizamos, obteniendo unos 200 µg de muestra.

Para eliminar el ácido nucleico, el producto liofilizado se disolvió en agua destilada estéril para obtener una solución al 3% y se mezcló con 1 ml de RNAsa por cada 10 ml de solución al 3%. Incubamos a 37°C durante 1 hora y centrifugamos a 105.000 xg durante 4 horas. Retiramos el sobrenadante y resuspendemos en 1 ml de agua destilada estéril. Esta suspensión se liofilizó y se obtuvo un producto de lipopolisacárido bacteriano con un 3% de ácido nucleico.

IV. Extracción de ARN

La extracción de ARN se realizó siguiendo el protocolo modificado de extracción del reactivo empleado para este proceso, TRIPURE (Roche):

Se añaden 500 µl de TRIPURE a 50 mg de tejido y se incuban las muestras durante 5-10 minutos para disociar los complejos nucleoproteicos.

Añadimos 100 µl de cloroformo (Sigma) y mezclamos con vórtex durante 15 segundos. Centrifugamos a 12.000 rpm a 4°C durante 15 minutos. Después de este paso se nos quedan 3 fases, la primera que nos encontramos es una fase acuosa incolora, donde se encuentra el ARN, la segunda es la interfase, de color blanquecino, donde se encuentra el ADN y la última fase es la fase orgánica, de color rojo, donde podemos encontrar las proteínas.

Recogemos la fase acuosa y la colocamos en un microtubo nuevo, donde precipitamos el ARN con 300 μ l de isopropanol (Sigma). Mezclamos invirtiendo los microtubos y centrifugamos a 12.000 rpm a 4°C durante 10 minutos y retiramos el sobrenadante.

Lavamos el precipitado con 1 ml de etanol (EtOH) al 75%, centrifugamos a 12.000 rpm a 4°C durante 5 minutos. Retiramos el sobrenadante y secamos el precipitado. Resuspendemos el precipitado en 75 ml de agua libre de RNAsas (agua DEPC). Mantenemos las muestras de ARN a -80°C.

Para medir la concentración del ARN extraído se utilizó un espectrofotómetro *Genesys 10UV* (Thermo), con una cubeta (trUView™ Cuvette, Biorad). La concentración se calculó en base a la absorbancia medida a una longitud de onda de 260 nm (teniendo en cuenta que a esta longitud de onda, $1 A_{260} = 40 \text{ ng}/\mu\text{l}$). Por otro lado, la relación entre las absorbancias a 260 y 280 nm representa una estimación de la pureza del ARN; así el ARN puro presenta un ratio de 2 entre ambas absorbancias y se consideran medidas aceptables que corresponden a ARN altamente puro a los valores del ratio entre 1,7 y 2 (Ausubel *et al.*, 1995).

V. Transcripción inversa (RT-PCR)

Este paso consiste en convertir el ARN extraído en ADNc, debido a que el ARN es mucho más frágil y menos estable en el tiempo que el ADNc, para ello es necesaria la enzima transcriptasa inversa, la cual se encarga de construir la cadena complementaria de ácidos nucleicos de la cadena de ARN molde. La cadena iniciadora hibridará en el extremo 3' de la cadena molde.

En este paso tomamos 2 µg de ARN, 5 µl tampón 10X y 12 µl de agua DEPC, incubamos 10 minutos a 70°C y ponemos las muestras en frío mientras añadimos 1 µl de enzima transcriptasa inversa (iScript-Biorad) y 5 µl de agua DEPC. Posteriormente la mezcla se incubó 10 minutos a 25°C, 50 minutos a 42°C y 15 minutos a 70°C, el ciclo acabó en 4°C o hielo.

VI. Amplificación del gen Mx mediante la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

Para la amplificación del gen Mx se empleó la técnica PCR, con el termociclador *RoboCycler Gradient 96* (Stratagene) y los cebadores de la **Tabla VIII**. Todos los cebadores fueron empleados a una concentración de 0,5 µg/µl (Roche), y se diseñaron con el programa de diseño de cebadores *AlleleID 6.0*. Como control de la técnica se empleó el gen que amplifica la proteína β-actina, que es constitutiva de los tejidos de todo ser vivo.

Tabla VIII.- Cebadores utilizados para amplificar los genes β-actina y Mx en el presente estudio. (pb = pares de bases)

Cebadores	Secuencia (5'-3')	Tamaño fragmento
β-actina forward	GGGATGGGCCAGAAAGACA	302 pb
β-actina reverse	CCAGAGGCGTATAGGGACAACA	
Mx forward	AATCAGGCTTGGTGGTTGTT	435 pb
Mx reverse	TCTGTATGAATCCGTGCTA	

La amplificación fue realizada en 25 µl de volumen, conteniendo 1,5 µl de ADNc, 2,5 µl de tampón 10X, 0,5 µl de mezcla de dinucleótidos-fosfato (20mM) (Bioron), 0,75 µl de MgCl₂, 1 µl de cada cebador, 0,125 µl de Taq

polimerasa (Bioline) y el resto de agua DEPC hasta completar un volumen total de 25 μ l, por cada reacción.

El protocolo se describe en la **Tabla IX**.

Tabla IX.- Protocolo de ciclos de PCR empleados para la primera fase del presente estudio

Temperatura (°C)	Tiempo	Nº de ciclos
95	4'30''	1
95	30''	} 35
58 (β -actina) / 54 (Mx)	30''	
70	30''	
70	10'	1

Los productos de PCR se almacenaron a 4°C o -20°C hasta su visualización mediante electroforesis en geles de agarosa al 2%.

VII. Electroforesis en geles de agarosa


Los productos de PCR se visualizaron mediante electroforesis en geles de agarosa. Para ello, se mezcló un volumen de 4 μ l de producto de amplificación, 4 μ l de agua DEPC con 2 μ l de tampón de carga (*Gel Loading Solution*, Sigma) y la mezcla se cargó en un gel de 2% de agarosa (Pronadisa) con una concentración de bromuro de etidio de 0,5 μ g/ml en tampón TBE 1X (Tris base 45 mM; ácido bórico 45 mM; EDTA 1 mM, pH 8,0). La electroforesis se llevó a cabo a 140 V durante 30-40 minutos en la fuente de energía *Power Pac 300* (Biorad); a continuación las bandas se visualizaron en un transiluminador de luz U.V. (Biorad) con ayuda del sistema de fotodocumentación *Quantity OneTM* (Biorad).




El tamaño de los productos de amplificación se determinó mediante comparación con el marcador de pesos moleculares (*AmpliSize™ Molecular Rules*, 50-2000 pb, Biorad).

1.1. Experiencia I.- Efecto de los inmunoestimulantes obtenidos de la cepa CECT 521 de *Vibrio alginolyticus* sobre la expresión del gen Mx en dorada (*Sparus aurata*, L.)

Esta experiencia consistió en inocular a los peces los inmunoestimulantes ADN y LPS de la cepa *Vibrio alginolyticus* CECT 521, con la finalidad de establecer la intensidad y la duración de la respuesta inmune inducida por los mismos.

Para el desarrollo de esta primera experiencia se emplearon los peces provenientes de la empresa de acuicultura PROCRIA, S.A. y se aclimataron en las instalaciones del muelle de Taliarte durante las 2 semanas previas a la realización de la experiencia. Se repartieron en 16 tanques de 500 l cada uno, conteniendo 15 peces cada tanque. Por cada inmunoestimulante analizado había 4 tanques, con el fin de obtener resultados por cuadruplicado. Los diferentes grupos inoculados y sus dosis se diseñaron en base a la metodología descrita por Acosta *et al.* (2004):

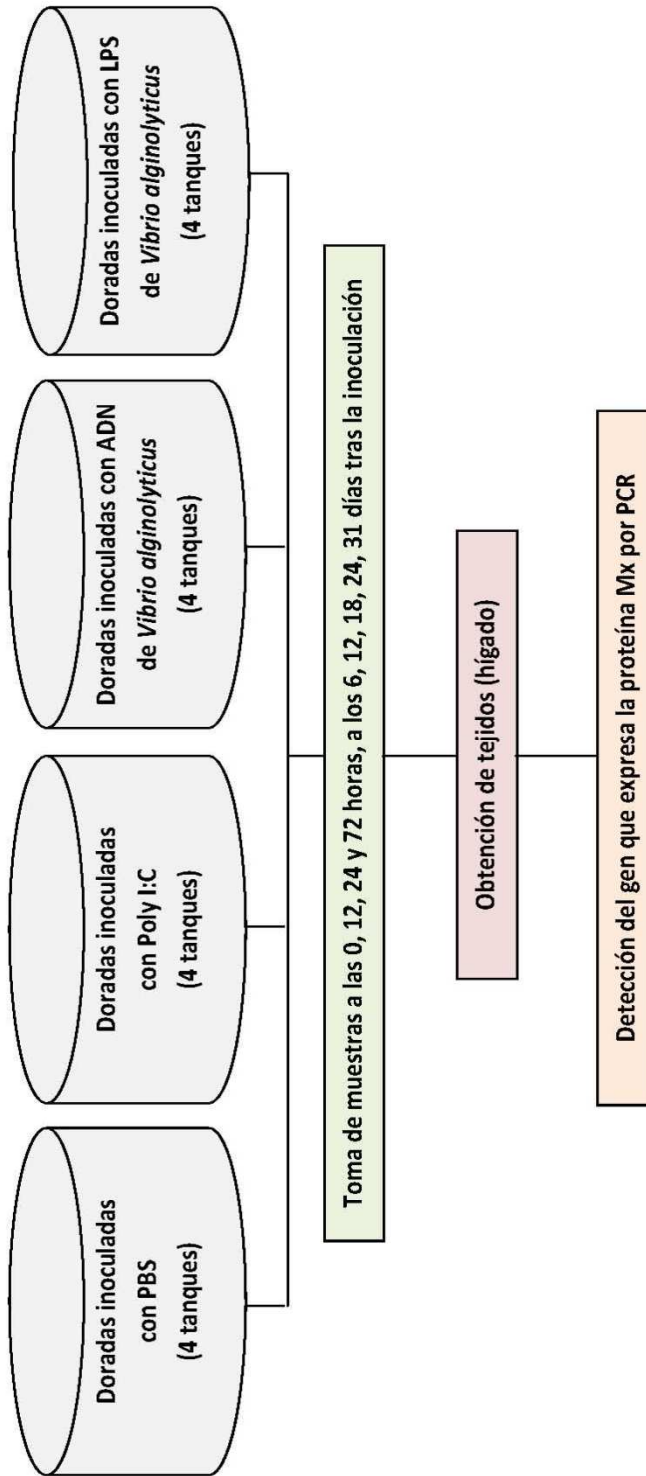
 Grupo control de animales inoculados con 100 µl por pez de tampón fosfato salino estéril (PBS). Este grupo fue nuestro control negativo de estimulación.

-  Grupo control de animales inoculados con 500 µg por pez de Ácido poliinosínico-policitidinico (Poly I:C) (Sigma), doble cadena sintética de ARN con efecto conocido como inmunoestimulante (Lockhart *et al.*, 2004). Por ello, se empleó como control positivo de estimulación.
-  Grupo inoculado con ADN de *Vibrio alginolyticus*, con una dosis de 100 µg por pez.
-  Grupo inoculado con LPS de *Vibrio alginolyticus*, con una dosis de 100 µg por pez.

Como una de las finalidades era establecer la duración de la respuesta inmune inducida por los inmunoestimulantes, los peces se fueron sacrificando a las 0, 12, 24 y 72 horas, a los 6, 12, 18, 24 y 31 días post inoculación, extrayéndoles a cada uno alrededor de 50 mg de tejido hepático por individuo, conservándolos en TRIPURE y manteniéndolos congelados a -80°C para su posterior procesamiento (**Esquema I**).

El procesamiento de estas muestras consistió en la extracción de ARN, transcripción inversa y PCR siguiendo los protocolos anteriormente descritos.

Los productos de la PCR se analizaron a través de geles de agarosa al 2% teñidos con bromuro de etidio (0,5 µg/ml), empleando como marcador de peso molecular el de 50–2000 pares de bases (Biorad). Para poder ver la variación de la calidad de RNA y la eficiencia de la transcripción inversa entre muestras, la intensidad de los productos de PCR fueron cuantificados por el sistema de análisis *Quantity One*TM (Biorad).







Esquema I.- Esquema de la experiencia I

1.2. Experiencia II.- Efecto de los inmunoestimulantes obtenidos de la cepa *Photobacterium damselae* subsp. *piscicida* 94/99 sobre la expresión del gen Mx en dorada (*Sparus aurata* L.)

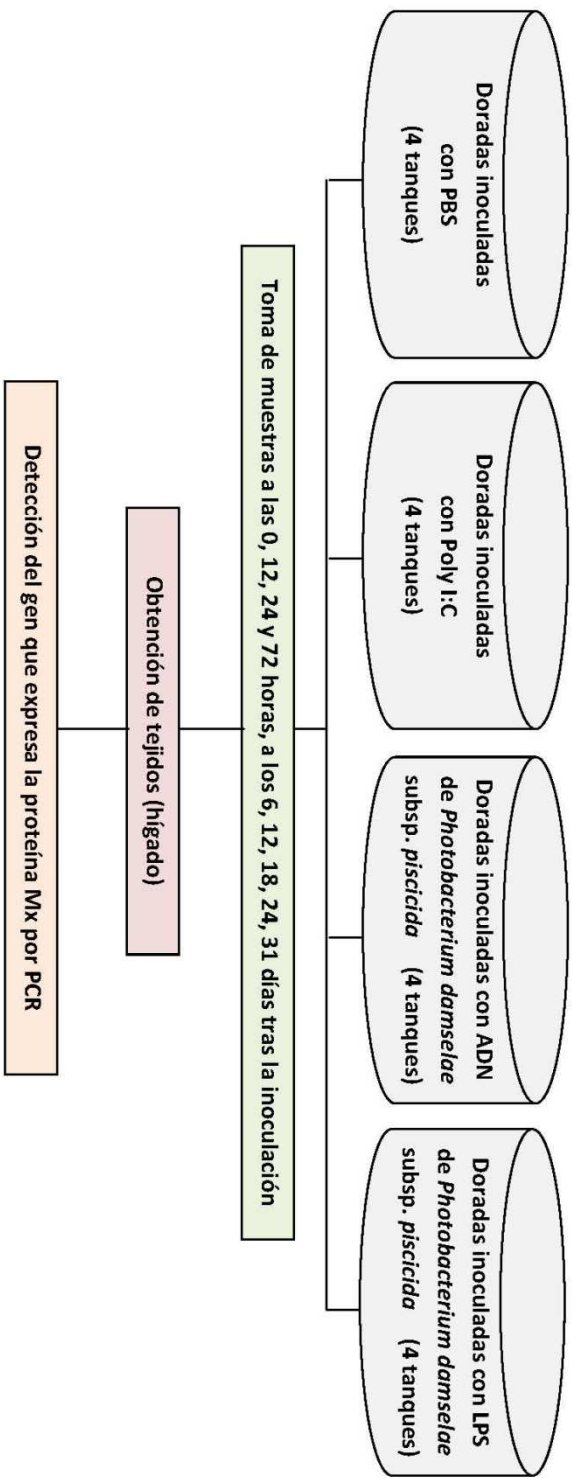
Esta experiencia consistió en inocular a los peces los inmunoestimulantes ADN y LPS de la cepa *Photobacterium damselae* subsp. *piscicida* (94/99), con la finalidad de establecer la intensidad y la duración de la respuesta inmune inducida por los mismos.

Para el desarrollo de esta segunda experiencia se emplearon los peces provenientes de la Planta Experimental de Cultivos Marinos del Instituto Canario de Ciencias Marinas, en Taliarte y se aclimataron en otras instalaciones de Taliarte durante las 2 semanas previas a la realización de la experiencia. Se repartieron en 16 tanques de 500 l cada uno, conteniendo 15 peces cada tanque. Por cada inmunoestimulante había 4 tanques, con el fin de obtener resultados por cuadruplicado. Los diferentes grupos inoculados y sus dosis se diseñaron en base a la metodología descrita por Acosta *et al.* (2004):

-  Grupo control de animales inoculados con 100 µl por pez de tampón fosfato salino estéril (PBS). Este grupo fue nuestro control negativo de estimulación.
-  Grupo control de animales inoculados con 500 µg por pez Ácido poliinosínico-policitidinico (Poly I:C) (Sigma).
-  Grupo inoculado con ADN de *Photobacterium damselae* subsp. *piscicida*, con una dosis de 100 µg por pez.

 Grupo inoculado con LPS de *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*, con una dosis de 100 µg por pez.

Como una de las finalidades era establecer la duración de la respuesta inmune inducida por los inmunoestimulantes, al igual que en la experiencia anterior en los mismos puntos de muestreo, las muestras se recogieron y se procesaron de igual forma (**Esquema II**).



Esquema II.- Esquema de la experiencia II

2. Segunda fase: Respuesta inmune a infecciones víricas inducida por la activación del sistema interferón

I. Instalaciones y peces de experimentación

Para realizar esta fase de este trabajo se han empleado doradas (*Sparus aurata*), con origen en de la empresa hatchery de Tinamenor, con un peso medio de 8 g.

Estos peces fueron transportados en tanques con oxígeno al laboratorio de investigación localizado en el Instituto Universitario de Sanidad Animal (IUSA) en el municipio de Arucas, Gran Canaria, que tiene el grupo de investigación “Enfermedades infecciosas e Ictiopatología”. Para esta experiencia se adecuó una zona del laboratorio donde los peces fueron organizados en 3 lotes, distribuidos en tanques de 80 l, con circuito cerrado de agua a 22°C. Se mantuvieron bajo un fotoperiodo natural y alimentados con pienso comercial (Skretting).

Durante la semana previa a la realización de la experiencia los peces se aclimataron bajo las condiciones mencionadas anteriormente y fueron sometidos a los mismos controles que los descritos en las experiencias I y II, además de emplear la técnica de PCR para comprobar que los peces que se iban a utilizar para esta experiencia no estaban pasando la enfermedad de nodaviriosis o no eran portadores de dicha enfermedad.

Para la manipulación de los peces se empleó el anestésico 2-fenoxietanol (Panreac Química, S.A.) con una dosis de 300 µl/l de agua.

II. Patógeno vírico empleado

En el presente trabajo se utilizó el patógeno *Nodavirus*. La cepa empleada es *Nodavirus SGWak97*, perteneciente a la colección de la Unidad de Virología del Instituto de Acuicultura de la Universidad de Santiago de Compostela y cedida gentilmente por dicho laboratorio para la realización de esta fase de la tesis doctoral.

Para el cultivo de esta cepa viral se empleó la línea celular E-11 con medio L-15 *medium* (Leibovitz) suplementado con suero fetal bovino (SFB) al 5%. Una vez que los frascos de cultivo celular tuvieron tapices semiconfluentes, se procedió a la inoculación de 100 µl de virus a una multiplicidad de infección (MOI) de 0,1-0,01. La incubación se realizó a 25°C hasta la visualización de un efecto citopático (ECP) avanzado, momento en el que se recogieron los restos del tapiz en suspensión (virus crudo), conservándose a -80 °C hasta su utilización.

La titulación vírica se realizó en placas de cultivo celular de 24 pocillos con monocapas confluentes de células, mediante el método de dosis infectiva 50 (TCID₅₀). Para ello se realizaron diluciones decimales seriadas de la suspensión vírica, preparadas en medio L-15 suplementado con SFB al 2%, y se inocularon, por triplicado, alícuotas de 100 µl por pocillo de cada dilución. La visualización de los pocillos con ECP se llevó a cabo transcurridos 8 días de incubación. Los títulos se calcularon siguiendo el método descrito por Reed y Muench (1938) y se expresaron como la dilución del virus que produjo ECP en la mitad de los pocillos inoculados (TCID₅₀/ml).

III. Diagnóstico de *Nodavirus* mediante PCR

Para la detección de *Nodavirus* por PCR se emplearon los cebadores de la **Tabla X** a una concentración 10 μ M (Invitrogen).

Tabla X.- Cebadores para detectar *Nodavirus* en el presente estudio. (pb = pares de bases)

Cebadores	Secuencia (5'-3')	Tamaño fragmento
NODA 1 reverse	CGAGTCAACACGGGTGAAGA	427 pb
NODA 2 forward	CGTGTCAGTCATGTGTCGCT	

La amplificación fue realizada en 25 μ l de volumen, conteniendo 5 μ l de ADNc, 2,5 μ l de tampón 10X, 0,5 μ l de mezcla de dinucleótidos-fosfato (20mM) (Bioron), 0,75 μ l de MgCl₂, 1 μ l de cada primer, 0,125 μ l de Taq polimerasa (Bioline) y el resto de agua DEPC hasta completar un volumen total de 25 μ l, por cada reacción. Para ello se utilizó el termociclador *MyCycler™ ThermalCycler* (Biorad).

El protocolo se describe en la **Tabla XI**.

Tabla XI.- Protocolo de ciclos de PCR utilizados para la segunda fase de este trabajo

Temperatura (°C)	Tiempo	Nº de ciclos
94	4'30''	1
94	30''	} 35
58	30''	
68	30''	
68	10'	1

Los productos de PCR se guardaron a 4°C o -20°C hasta su visualización en electroforesis en gel de agarosa al 2%.

Al producto de PCR anterior se le aplicó una *Nested*-PCR para este virus. Para ello se empleó la pareja de cebadores internos que amplifican el producto de PCR obtenido de los cebadores de la **Tabla X** y que generan un producto de amplificación de 159 pb (**Tabla XII**).

Tabla XII.- Cebadores utilizados para realizar una *Nested*-PCR para detectar *Nodavirus* en este estudio. (pb = pares de bases)

Cebadores	Secuencia (5'-3')	Tamaño fragmento
R31 reverse	AGTGTCTCCAGCTTTCTTCT	159 pb
F21 forward	GATTCGTTCCATTCTCTTG	

Los cebadores fueron empleados a una concentración de 50 μ M (Invitrogen).

La amplificación fue realizada en 25 μ l de volumen, conteniendo 3 μ l de producto de PCR de Nodavirus, 2,5 μ l de tampón 10X, 0,5 μ l de mezcla de dinucleótidos-fosfato (20mM) (Bioron), 0,75 μ l de MgCl₂, 1 μ l de cada primer, 0,125 μ l de Taq polimerasa (Bioline) y el resto de agua DEPC hasta completar un volumen total de 25 μ l, por cada reacción. Empleándose el mismo termociclador *MyCycler*TM *ThermalCycler* (Biorad).

El protocolo es el mismo descrito en la **Tabla XI**.

IV. Electroforesis en geles de agarosa

Los productos de PCR y de la *Nested-PCR* se visualizaron mediante electroforesis en geles de agarosa. Para ello, se empleó la misma metodología descrita en la primera fase de este estudio. En el caso de la *Nested-PCR* se empleó el marcador de peso molecular *Simply Load(R) 100 bp DNA Ladder* (Lonza).

2.1. **Experiencia III.- Protección del inmunoestimulante frente a una infección por *Nodavirus***

Esta experiencia consistió en inocular a los peces el mejor inmunoestimulante obtenido de las experiencias anteriores, con el fin de analizar cómo responden los peces inmunoestimulados frente a un desafío vírico, frente a *Nodavirus*.

Para el desarrollo de esta experiencia se emplearon los peces provenientes de la hatchery de Tinamenor descritos en el punto I de esta fase y se trasladaron al laboratorio en el IUSA. Allí se aclimataron 1 semana, repartidos en 6 tanques de 80 l cada uno, conteniendo 36 peces cada tanque. Los grupos con los que se trabajó fueron los siguientes:

- 🐟 Grupo control de animales inoculados con 100 µl por pez de tampón fosfato salino estéril (PBS). Serán nuestro control negativo.
- 🐟 Grupo control de animales inoculados con una dosis de 100 µl de virus por pez ($10^{7.5}$ TCID₅₀/ml). Con este grupo se observa la evolución de la enfermedad. Serán nuestro control positivo.

- 🐟 Grupo inoculado con 100 µg por pez de LPS de *Vibrio alginolyticus* y días más tarde inoculado con 100 µl de virus por pez ($10^{7,5}$ TCID₅₀/ml). Será nuestro grupo prueba.

En esta experiencia los peces fueron inoculados con el inmunoestimulante correspondiente y en los primeros 6 días se recogieron muestras de hígado, para el posterior análisis de la expresión de Mx con la técnica de PCR (**Esquema III**).

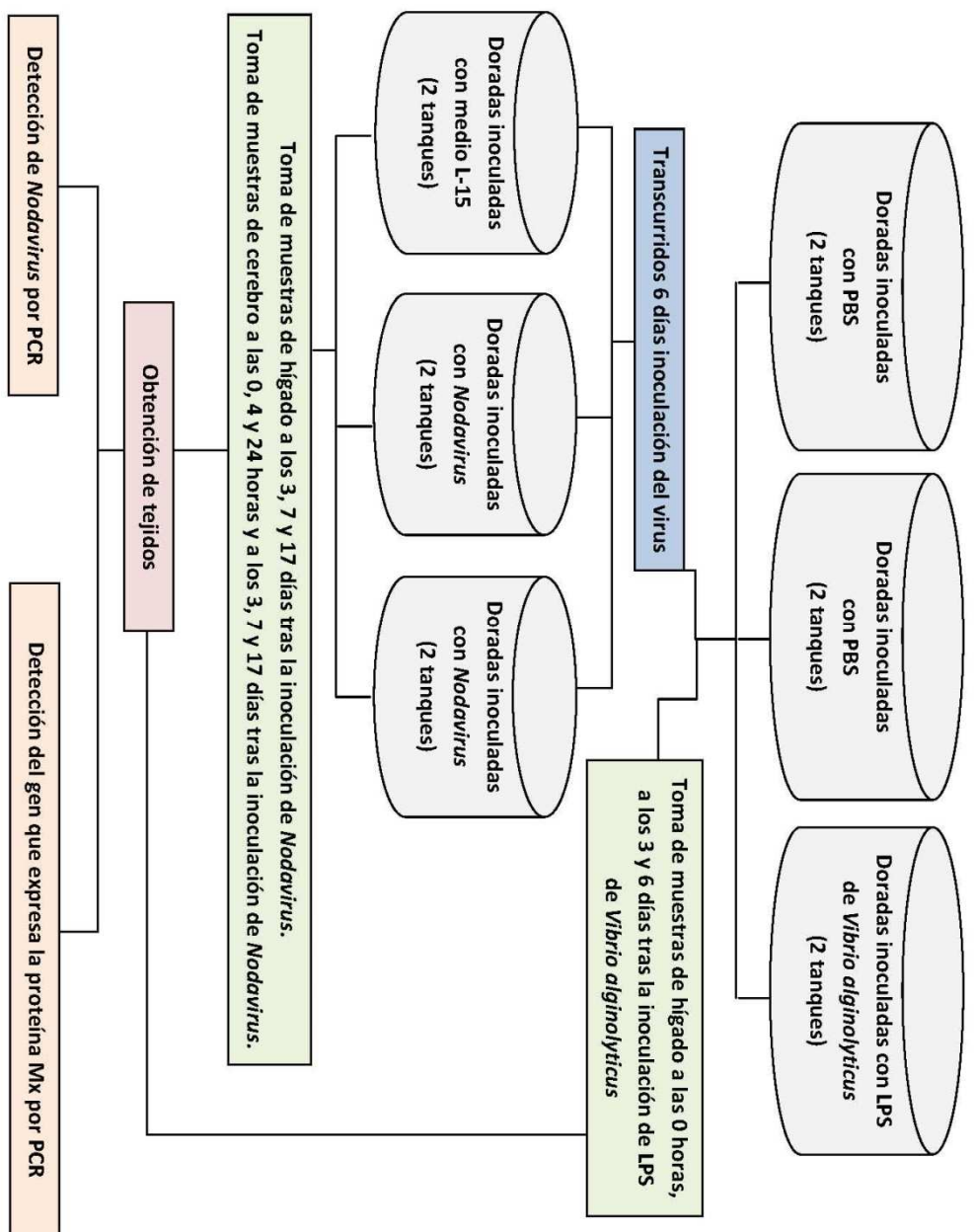
Pasados los 6 días, a los grupos control positivo y prueba, se les inoculó el virus, al grupo control negativo se les inoculó medio L-15 estéril. A partir de este día se recogieron muestras de cerebro para detectar el virus con la misma técnica anterior (**Esquema III**).

La toma de muestras de hígado se realizó de 4 peces por grupo a las 0 horas, 3, 6, 9, 13 y 23 días post inoculación. Las muestras de cerebro se recogieron de 4 peces por grupo a las 0, 4, 24 horas, 3, 7 y 17 días después de la inoculación del virus. (**Esquema III**). Siendo el procesado de estas muestras de igual forma que en las experiencias anteriores.

Para la cuantificación de la carga vírica que encontramos en cada muestra de cerebro se empleó la *Real Time-PCR (CFX96™ Real-Time PCR Detection System, Biorad)*. El protocolo empleado lo encontramos en la **Tabla XIII**.

Tabla XIII.- Protocolo de ciclos para *Real Time*-PCR utilizado para cuantificar la carga vírica por *Nodavirus* en los peces de este estudio

Temperatura (°C)	Tiempo	Nº de ciclos
95	2'	1
95	15''	} 50
58	15''	
82	15''	
95	1'	1
60	1'	1



Esquema III.- Esquema de la experiencia III



Resultados
Resultados

1. Experiencia I.- Efecto de los inmunoestimulantes obtenidos de la cepa CECT 521 de *Vibrio alginolyticus* sobre la expresión del gen Mx en dorada (*Sparus aurata*, L.)

1.1. Experimento preliminar

Esta experiencia consistió en inocular a los peces los inmunoestimulantes ADN y LPS de la cepa bacteriana CECT 521 de *Vibrio alginolyticus*, con la finalidad de establecer la intensidad y la duración de la respuesta inmune inducida por los mismos. Para ello empleamos la técnica de PCR para amplificar el gen Mx, el cual se expresa en condiciones de inmunoestimulación.

A mitad de la experiencia se produjo la infección natural de los peces por linfocistis, por este motivo se planteó este experimento como preliminar, permitiéndonos comprobar el estado de la PCR y aprovechar estos resultados de extraordinario valor. El experimento se repitió posteriormente como “definitivo”.

Los resultados se encuentran representados en la **Tabla XIV - Figura VIII**.

El gen constitutivo β -actina se expresó en todas las muestras recogidas, con lo que se puede confirmar que las muestras estaban en buenas condiciones y que la transcripción inversa y la PCR se realizaron correctamente (**Figura VI**).

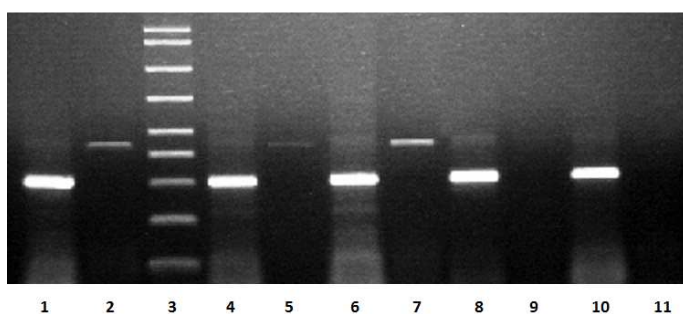


Figura VI.- Electroforesis en agarosa 2% de la primera fase del presente estudio, donde se observa: 3) Marcador de peso molecular 50-2000 pb (el peso de las bandas son: 2000 pb, 1500 pb, 1000 pb, 700 pb, 500 pb, 400 pb, 300 pb, 200 pb y 100 pb). 1,4,6,8 y 10) Expresión del gen β -actina en muestras de hígado. 2,5,7) Expresión del gen Mx en muestras de hígado. 9 y 11) Ausencia del gen Mx en muestras de hígado.

Como observamos en la **Figura VIII**, encontramos diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) con respecto a los controles en el grupo de peces estimulados con Poly I:C desde el día 1 post-inoculación hasta el día 9. Este mismo inmunestimulante presenta diferencias significativas ($p < 0,05$) los días 1 y 12 con respecto al estimulante de LPS. Los días 1, 9 y 12 también existen diferencias significativas ($p < 0,05$) entre el grupo de peces estimulados con Poly I:C y el grupo inmunestimulado con ADN.

A nivel cuantitativo, la máxima estimulación de la expresión del gen Mx entre todos los inmunestimulantes la obtenemos el día 1 post inoculación (0,74 en relación a la β -actina) con el inmunestimulante de Poly I:C. A partir de esta máxima expresión, va descendiendo lentamente hasta el día 18 que se encuentra a niveles basales (0,14 en relación a la β -actina).

Se puede apreciar en la **Figura VIII**, que el ADN de *Vibrio alginolyticus* CECT 521 estimula la expresión del gen Mx con diferencias significativas ($p < 0,05$) con respecto a los inmunoestimulantes Poly I:C y LPS los días 1, 9 y 12 post-inoculación. Con respecto al grupo control, las diferencias las encontramos los días 3 y 12. La máxima expresión del gen Mx que observamos con este inmunoestimulante lo encontramos el día 3, con un valor de 0,45 en relación a la β -actina, descendiendo a niveles basales el día 12 (0,15 en relación a la β -actina).

En los resultados obtenidos en el grupo de peces inmunoestimulados con LPS de *Vibrio alginolyticus* CECT 521 podemos observar que no es con el que se obtiene una máxima estimulación (0,54 en relación a la β -actina) pero sí es con el que dura más tiempo dicha estimulación, desde el día 3 al día 12 se muestra un valor medio de 0,50 en relación a la β -actina, descendiendo hasta niveles basales (0,14 en relación a la β -actina) el día 24. Este grupo presenta diferencias significativas ($p < 0,05$) los días 1 y 12 con respecto al grupo control, al grupo inoculado con ADN bacteriano y al grupo inoculado con Poly I:C. Los días 3, 6 y 9 presentan diferencias significativas ($p < 0,05$) únicamente con respecto al grupo control.

Durante el tiempo que duró la experiencia, cada día se realizaba una inspección detallada del comportamiento y aspecto de los peces, y entre los días 9 y 12 empezamos a observar en distintos tanques individuos con nódulos algodonosos en la piel (**Figura VII**). Se realizaron las pruebas oportunas y se comprobó que los peces estaban afectados por linfocistis. Aun así, se siguieron tomando las muestras programadas y se puede apreciar en la

Figura VIII que, ante esta infección, la mayor expresión del gen Mx la obtenemos con el inmunoestimulante LPS el día 31 post infección, con un valor de 0,56 en relación a la β -actina, y con el Poly I:C, 0,55 en relación a la β -actina. Los peces inoculados con ADN bacteriano presentaron una respuesta menor ante la infección (0,35 en relación a la β -actina) que con los dos inmunoestimulantes anteriores, incluso menor que con el grupo control (0,37 en relación a la β -actina).



Figura VII.- Nódulos algodonosos encontrados en los peces experimentales afectados por linfocistis

Tabla XIV.- Valores de los niveles de expresión del gen Mx de la experiencia preliminar obtenidos en el presente trabajo. Datos representados en la Figura VII.

Tiempo ⁽¹⁾	Grupo control ⁽²⁾ $\bar{x} \pm s$	Grupo inoculado con Poly I:C ⁽³⁾ $\bar{x} \pm s$	Grupo inoculado con ADN ⁽⁴⁾ $\bar{x} \pm s$	Grupo inoculado con LPS ⁽⁵⁾ $\bar{x} \pm s$
0 h	0	0	0	0
1d	0	0,74 ± 0,15	0	0,17 ± 0,05
3d	0	0,42 ± 0,23	0,45 ± 0,10	0,51 ± 0,03
6d	0,02 ± 0,04	0,31 ± 0,05	0,34 ± 0,48	0,53 ± 0,12
9d	0	0,36 ± 0,24	0	0,54 ± 0,16
12d	0,22 ± 0,01	0,25 ± 0,03	0,13 ± 0,06	0,43 ± 0,05
18d	0,23 ± 0,18	0,12 ± 0,02	0,27 ± 0,19	0,30 ± 0,25
24d	0,16 ± 0,08	0,11 ± 0,04	0,12 ± 0,11	0,14 ± 0,02
31d	0,37 ± 0,47	0,55 ± 0,10	0,35 ± 0,13	0,56 ± 0,08

(1) Tiempo transcurrido después de la inoculación de los inmunoestimulantes.

(2) Grupo de peces control (recibió PBS).

(3) Grupo de peces que recibió el inmunoestimulante Poly I:C.

(4) Grupo de peces que recibió el inmunoestimulante ADN.

(5) Grupo de peces que recibió el inmunoestimulante LPS.

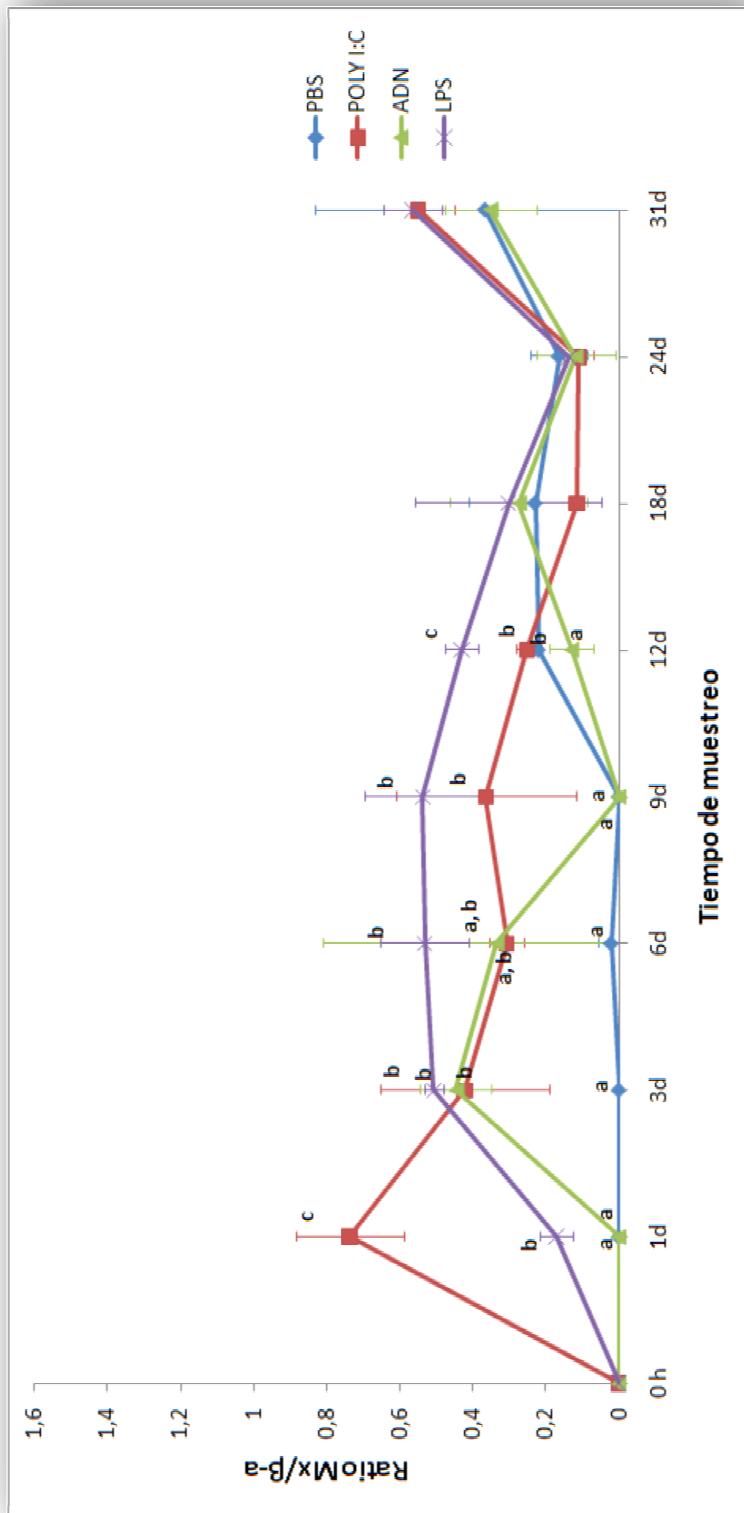


Figura VIII.- Análisis de los niveles de expresión del gen Mx en hígado con los inmunoestimulantes de *Vibrio alginolyticus* inoculados (Experimento preliminar) de este trabajo. Las letras marcan diferencias significativas entre las muestras ($p < 0,05$).

1.2. Experimento definitivo

Como el objetivo de esta primera experiencia era conocer la respuesta a los inmunoestimulantes en los 31 primeros días post inoculación, y no se pudo observar dicha evolución por la enfermedad que sufrieron los peces, se volvió a repetir dicho experimento.

Se repitió la inoculación con los inmunoestimulantes anteriores y se tomaron las muestras a las 0 y 12 horas, y los días 1, 3, 6, 9, 12, 18, 24 y 31. Los resultados de esta experiencia se encuentran representados en la **Tabla XV - Figura IX**.

Los peces inoculados con PBS muestran una ligera expresión del gen Mx, la cual es similar a la que encontramos en las muestras recogidas a las 0 horas tras la inoculación, por ello, estos niveles son considerados como expresión constitutiva (0,15 de media en relación a la β -actina).

El Poly I:C induce una fuerte y continua expresión del gen Mx en el grupo de peces de esta experiencia. La máxima estimulación de la expresión del gen Mx la obtenemos a las 12 horas tras la inoculación con un valor de 1,19 en relación a la β -actina, con el inmunoestimulante de Poly I:C. Tras esta sobre-expresión va descendiendo hasta niveles basales en el día 18 (0,14 en relación a la β -actina).

Con el inmunoestimulante de Poly I:C se encuentran diferencias significativas ($p < 0,05$) con respecto al grupo control desde las 12 horas hasta el día 6 (0,56 en relación a la β -actina). Con respecto a los grupos de peces

inoculados con ADN y LPS de *Vibrio alginolyticus* se encuentran diferencias significativas ($p < 0,05$) a las 12 horas y al día 1 tras la inoculación (0,97 en relación a la β -actina).

Los peces inoculados con ADN bacteriano presentan diferencias significativas ($p < 0,05$) con respecto al grupo control desde el día 1 (0,44 en relación a la β -actina) hasta el día 6 (0,69 en relación a la β -actina). La máxima expresión del gen Mx la encontramos en el día 3 con un valor de 0,89 en relación a la β -actina, tras la inoculación de este inmunoestimulante, descendiendo a niveles casi basales el día 24 (0,23 en relación a la β -actina).

El grupo de peces que fueron inoculados con LPS bacteriano presentan diferencias significativas ($p < 0,05$) en la expresión del gen Mx desde el día 1 (0,47 en relación a la β -actina) hasta el día 12 (0,58 en relación a la β -actina) con respecto al grupo control. En la **Figura IX** podemos observar cómo la curva de LPS muestra una meseta entre el día 3, con un valor de 0,9 en relación a la β -actina y el día 9, siendo este último día donde encontramos la máxima expresión del gen Mx en este grupo de peces (0,97 en relación a la β -actina). A partir del día 9, disminuye hasta niveles basales el día 31 (0,25 en relación a la β -actina). Además, este grupo presenta diferencias significativas ($p < 0,05$) con respecto al grupo inoculado con ADN bacteriano el día 9 y con el grupo inoculado con Poly I:C los días 6 (0,88 en relación a la β -actina) y 9.

Tabla XV.- Valores de los niveles de expresión del gen Mx del experimento definitivo obtenidos en este estudio. Datos representados en la Figura IX.

Tiempo ⁽¹⁾	Grupo control ⁽²⁾ $\bar{x} \pm s$	Grupo inoculado con Poly I:C ⁽³⁾ $\bar{x} \pm s$	Grupo inoculado con ADN ⁽⁴⁾ $\bar{x} \pm s$	Grupo inoculado con LPS ⁽⁵⁾ $\bar{x} \pm s$
0 h	0	0,05 ± 0,10	0	0,06 ± 0,13
12 h	0,06 ± 0,12	1,19 ± 0,30	0,36 ± 0,19	0,24 ± 0,10
1d	0,06 ± 0,12	0,97 ± 0,31	0,44 ± 0,13	0,47 ± 0,21
3d	0,25 ± 0,04	0,81 ± 0,22	0,89 ± 0,30	0,90 ± 0,12
6d	0,27 ± 0,06	0,56 ± 0,07	0,69 ± 0,13	0,88 ± 0,14
9d	0,26 ± 0,32	0,45 ± 0,09	0,46 ± 0,30	0,97 ± 0,17
12d	0,21 ± 0,18	0,30 ± 0,12	0,43 ± 0,16	0,58 ± 0,16
18d	0,10 ± 0,20	0,14 ± 0,24	0,38 ± 0,02	0,34 ± 0,09
24d	0,19 ± 0,27	0,13 ± 0,01	0,23 ± 0,18	0,32 ± 0,06
31d	0,13 ± 0,11	0,19 ± 0,07	0,11 ± 0,13	0,25 ± 0,03

(1) Tiempo transcurrido después de la inoculación de los inmunoestimulantes.

(2) Grupo de peces control (recibió PBS).

(3) Grupo de peces que recibió el inmunoestimulante Poly I:C.

(4) Grupo de peces que recibió el inmunoestimulante ADN.

(5) Grupo de peces que recibió el inmunoestimulante LPS.

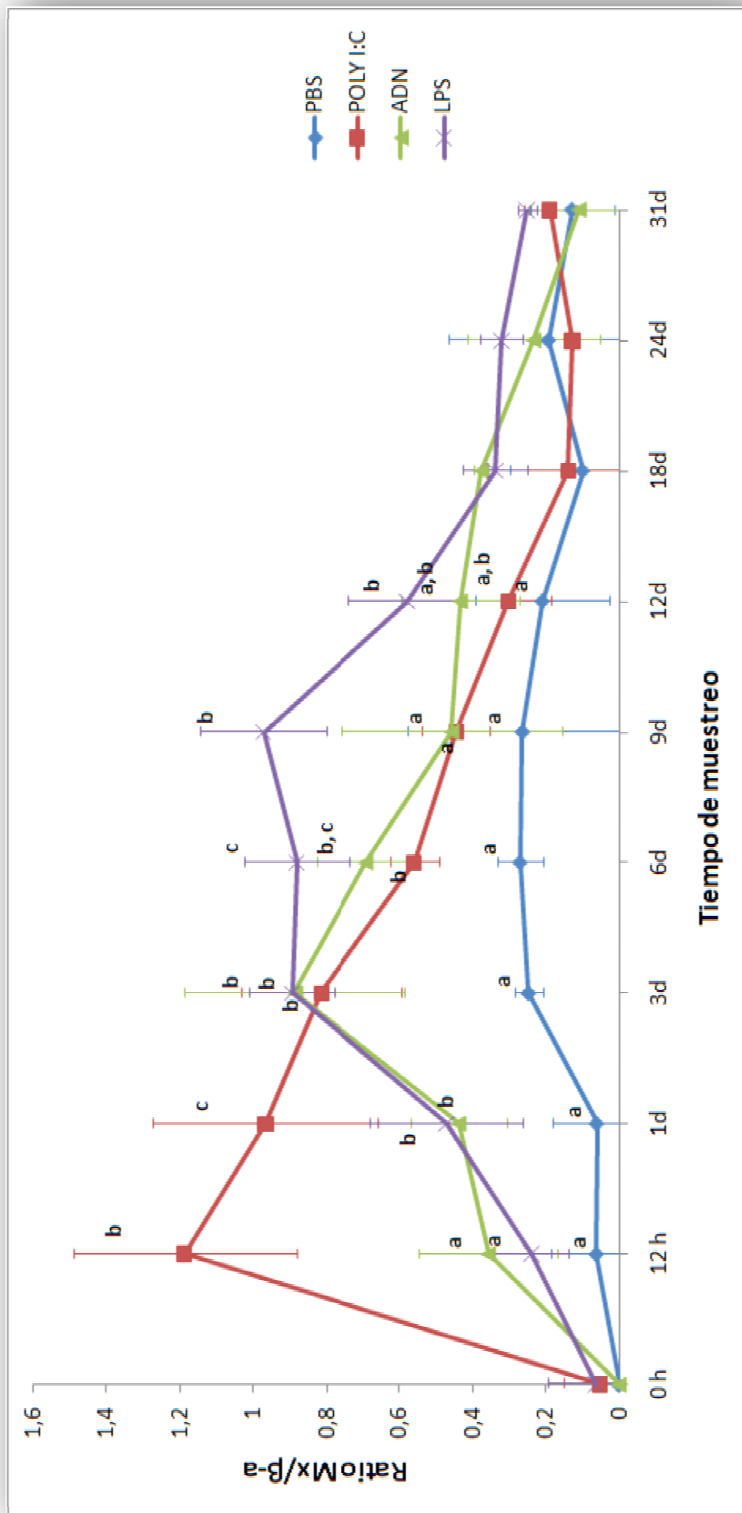


Figura IX.- Análisis de los niveles de expresión del gen Mx en hígado con los inmunoestimulantes de *Vibrio alginolyticus* inoculados (Experimento definitivo) del presente estudio. Las letras marcan diferencias significativas entre las muestras ($p < 0,05$)

2. Experiencia II.- Efecto de los inmunoestimulantes obtenidos de la cepa *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* 94/99 sobre la expresión del gen Mx en dorada (*Sparus aurata*, L.)

Esta experiencia consistió en inocular a los peces los inmunoestimulantes ADN y LPS de la cepa *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* 94/99, con la finalidad de establecer la intensidad y la duración de la respuesta inmune inducida por los mismos.

Los resultados se encuentran representados en la **Tabla XVI - Figura X**.

Como observamos en dicha figura, los peces inoculados con PBS muestran una ligera expresión de Mx (media del ratio $Mx/\beta\text{-a} = 0,15$), lo que, como en el caso anterior, consideramos que es constitutivo, por tanto, representa una respuesta basal al estímulo.

La curva del inmunoestimulante Poly I:C vuelve a ser muy similar a la experiencia anterior, presentando la máxima expresión de Mx a las 12 horas (ratio $Mx/\beta\text{-a} = 1,28$) y disminuyendo hasta casi un tercio, pero sin alcanzar lo que se consideran niveles basales (media del ratio $Mx/\beta\text{-a} = 0,31$). Este estimulante presenta diferencias significativas ($p < 0,05$) a las 12 horas y a los días 6 y 18 con respecto al grupo control y a los grupos estimulados con los inmunoestimulantes naturales de ADN y LPS bacterianos. A los días 1, 3 y 31 presenta diferencias significativas ($p < 0,05$) con respecto al grupo control.

El inmunoestimulante de ADN de *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* induce una fuerte expresión a las 24 primeras horas tras su inoculación (ratio $Mx/\beta\text{-a} = 1,00$). Posteriormente desciende, pero al igual que

con el inmunoestimulante anterior, no desciende hasta niveles considerados basales (media del ratio Mx/β -a = 0,30).

A las 12 horas y el día 18 tras la inoculación con el inmunoestimulante ADN encontramos diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) con respecto a los grupos control y Poly I:C. Al día 1 solo encontramos diferencias significativas ($p < 0,05$) con respecto al grupo control y al día 6 con respecto al grupo estimulado con el inmunoestimulante Poly I:C.

Encontramos una expresión con el LPS de *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* muy similar a la producida por el inmunoestimulante ADN, siendo la expresión máxima del grupo inmunoestimulado con LPS menor que en el grupo inmunoestimulado con ADN (ratio Mx/β -a = 0,84). Tras esta expresión desciende, manteniéndose desde el día 6 hasta el día 24 (media del ratio Mx/β -a = 0,30), y descendiendo hasta niveles basales el día 31 (ratio Mx/β -a = 0,13) tras la inoculación.

Tabla XVI.- Valores de los niveles de expresión del gen Mx de la experiencia II del presente estudio. Datos representados en la Figura X.

Tiempo ⁽¹⁾	Grupo control ⁽²⁾ $\bar{x} \pm s$	Grupo inoculado con Poly I:C ⁽³⁾ $\bar{x} \pm s$	Grupo inoculado con ADN ⁽⁴⁾ $\bar{x} \pm s$	Grupo inoculado con LPS ⁽⁵⁾ $\bar{x} \pm s$
0 h	0,14 ± 0,19	0,22 ± 0,19	0,06 ± 0,11	0,29 ± 0,05
12 h	0,21 ± 0,07	1,28 ± 0,25	0,76 ± 0,00	0,80 ± 0,11
1d	0,25 ± 0,04	1,02 ± 0,19	1,00 ± 0,24	0,84 ± 0,17
3d	0,11 ± 0,20	0,81 ± 0,22	0,50 ± 0,21	0,47 ± 0,07
6d	0,15 ± 0,22	0,56 ± 0,07	0,27 ± 0,05	0,32 ± 0,02
9d	0,18 ± 0,16	0,31 ± 0,04	0,35 ± 0,17	0,28 ± 0,04
12d	0,18 ± 0,06	0,30 ± 0,10	0,33 ± 0,10	0,35 ± 0,01
18d	0,09 ± 0,18	0,32 ± 0,05	0,32 ± 0,05	0,28 ± 0,05
24d	0,06 ± 0,13	0,29 ± 0,10	0,29 ± 0,10	0,26 ± 0,02
31d	0,09 ± 0,13	0,32 ± 0,04	0,25 ± 0,05	0,13 ± 0,15

(1) Tiempo transcurrido después de la inoculación de los inmunoestimulantes.

(2) Grupo de peces control (recibió PBS).

(3) Grupo de peces que recibió el inmunoestimulante Poly I:C.

(4) Grupo de peces que recibió el inmunoestimulante ADN.

(5) Grupo de peces que recibió el inmunoestimulante LPS.

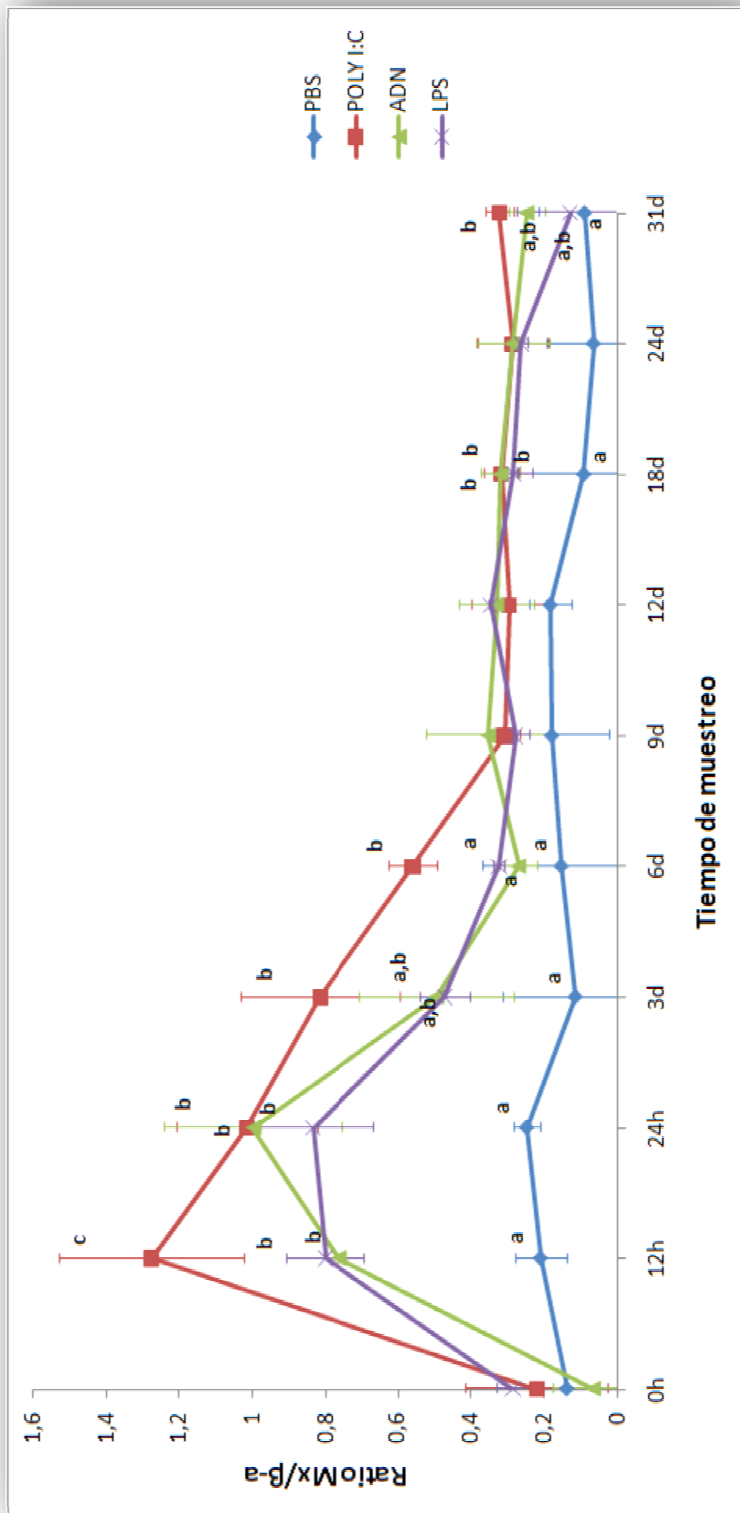


Figura X.- Análisis de los niveles de expresión del gen Mx en hígado con los inmunoestimulantes de *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* inoculados en este estudio. Las letras marcan diferencias significativas entre las muestras ($p < 0,05$)

3. Experiencia III.- Protección del inmunoestimulante frente a una infección por *Nodavirus*

Esta experiencia consistió en inocular a la dorada el inmunoestimulante que produjo mejores resultados obtenido de las dos experiencias anteriores, con el fin de ver cómo responden los peces inmunoestimulados frente a una infección vírica posterior con *Nodavirus*.

Los ensayos realizados previamente a la infección experimental confirmaron que los peces empleados estaban libres de *Nodavirus*. Los peces empleados como control permanecieron vivos durante todo el experimento y no mostraron síntomas externos e internos de enfermedad. Al final del ensayo los peces control sobrantes fueron sacrificados, no detectándose presencia de *Nodavirus* en ninguno de los individuos, mediante *Nested-PCR*.

En esta experiencia nos hemos centrado en la observación de la expresión del gen Mx en un grupo de peces inoculado con el *Nodavirus* y en cómo este agente patógeno afecta a la dorada (**Figuras XI-XII**). Además, hemos analizado la protección que puede ejercer el inmunoestimulante de LPS de *Vibrio alginolyticus* a la dorada frente al patógeno *Nodavirus*.

Los resultados obtenidos mediante la técnica de *Nested-PCR* de las muestras de cerebro procesadas de los tres lotes implicados en esta experiencia los encontramos en la **Figura XI**.

Resultados

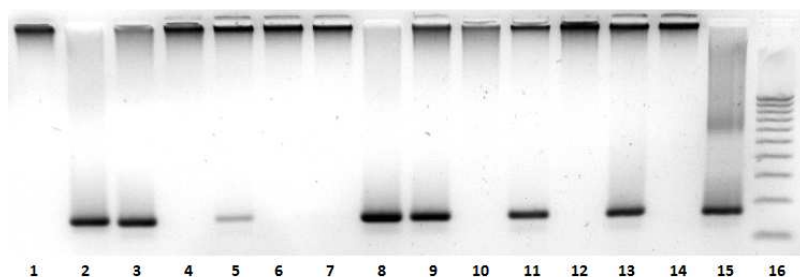


Figura XI.- Electroforesis en agarosa 2% de la *Nested-PCR* realizada en este estudio, donde se observa: 1,4,6,12 y 14) Muestras de cerebro negativas. 7 y 10) Controles negativos. 2,3,5,8,9,11 y 13) Muestras de cerebro positivas. 15) Muestra control positiva. 16) Marcador de peso molecular 100 pb.

Para cuantificar estos resultados empleamos la *Real Time-PCR* (**Tabla XVII - Figura XII**), donde podemos observar que en el grupo de peces control no se detecta la presencia del agente patógeno de estudio. Además se pueden observar diferencias significativas ($p < 0,05$) entre el lote de peces que han sido inoculados inicialmente con el inmunoestimulante y posteriormente con el agente patógeno y el lote de peces infectado solamente con el *Nodavirus*. En el grupo inoculado con LPS se puede apreciar que la mayor titulación de virus detectada se observa en el último punto de muestreo ($TCID_{50}/ml = 37,91$).

A partir de las 4 horas post inoculación del agente patógeno, en el lote de peces inoculados solo con el agente, se observa un aumento progresivo de la titulación encontrada en las muestras, hasta el último día de muestreo con un valor de $TCID_{50}/ml = 62,40$.

La **Figura XIII** nos muestra la expresión del gen Mx a lo largo de la experiencia en el grupo control (peces no inoculados con el inmunoestimulante ni con el *Nodavirus*), en el grupo de peces inoculados con

inmunoestimulante y con el agente patógeno y en el grupo inoculado únicamente con el agente patógeno.

El gen constitutivo β -actina se expresó en todas las muestras de hígado recogidas, con lo que se puede confirmar que las muestras estaban en buenas condiciones y que la transcripción inversa y la PCR se realizaron correctamente (**Figura XII**).

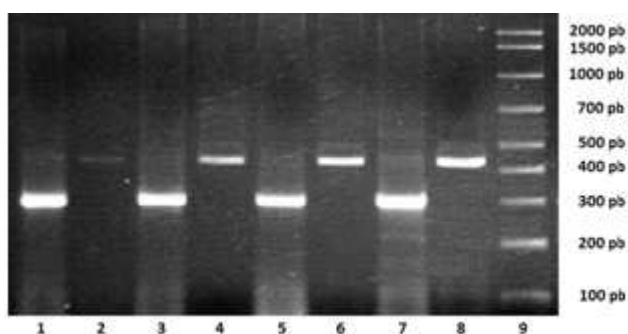


Figura XII.- Electroforesis en agarosa 2%, donde se observa: 9) Marcador de peso molecular 50-2000 pb. 1,3,5 y 7) Expresión del gen β -actina. 2,4,6 y 8) Expresión del gen Mx.

Tabla XVII.- Valores de titulación vírica de *Nodavirus* en dorada de la experiencia III obtenidos en este trabajo. Datos representados en la Figura XIII.

Tiempo ⁽¹⁾	Grupo control ⁽²⁾	Grupo inoculado con el patógeno ⁽³⁾ $\bar{X} \pm s$	Grupo inoculado con inmunoestimulante ⁽⁴⁾ $\bar{X} \pm s$
0 h	0	0	0
4 h	0	2,90 ± 1,30	3,61 ± 0,82
1d	0	8,42 ± 1,23	5,18 ± 1,76
3d	0	43,07 ± 0,89	8,54 ± 1,41
7d	0	54,66 ± 0,76	15,22 ± 0,18
17d	0	62,40 ± 0,57	37,91 ± 0,94

- (1) Tiempo transcurrido después de la inoculación con el agente patógeno.
- (2) Grupo de peces control (recibió PBS y posteriormente L15).
- (3) Grupo de peces que fue infectado con el agente patógeno (*Nodavirus*).
- (4) Grupo de peces que recibió el inmunoestimulante (LPS) y posteriormente fue inoculado con el agente patógeno (*Nodavirus*).

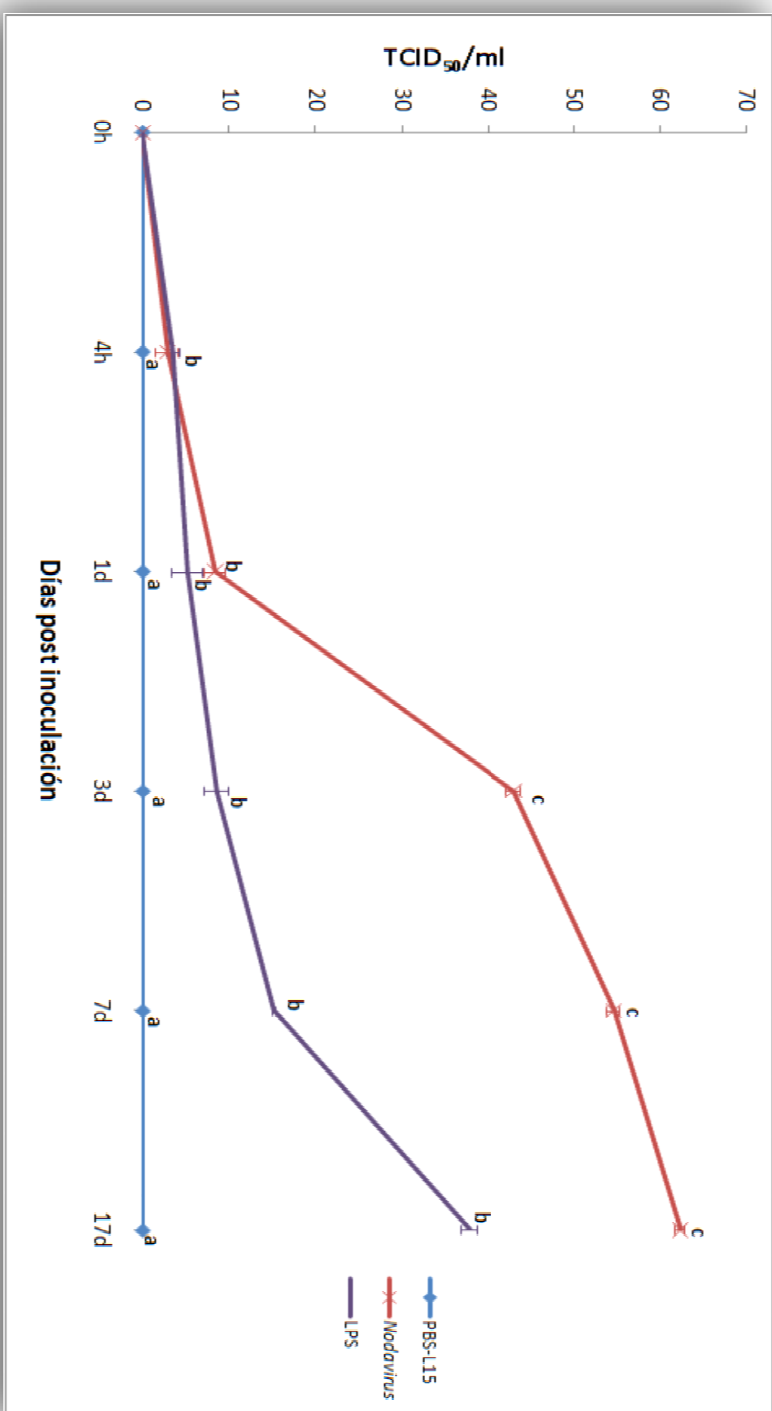


Figura XIII.- Titulación vírica de *Nodavirus* en dorada después de la infección en los siguientes grupos: PBS-L15 (grupo control negativo que solo ha sido inoculado con PBS y posteriormente inoculado con medio L-15), *Nodavirus* (grupo que inicialmente fue inoculado con PBS y posteriormente infectado con *Nodavirus*) y LPS (grupo que inicialmente fue inoculado con LPS de *Vibrio alginolyticus* y posteriormente infectado con *Nodavirus*). Las letras marcan diferencias significativas entre las muestras ($p < 0,05$)

En la **Tabla XVIII - Figura XIV** se puede observar que en el grupo de peces control este gen se expresa en las muestras de hígado desde el primer punto de muestreo hasta el último (media ratio $Mx/\beta\text{-a} = 0,26$), siendo bastante uniforme a lo largo de la experiencia.

El grupo de peces inoculados con el inmunoestimulante de LPS de *Vibrio alginolyticus* CECT 521 y posteriormente con el agente patógeno, presentó una curva similar a la que se obtuvo en la primera experiencia, comenzando la meseta el día 3 (ratio $Mx/\beta\text{-a} = 1,15$) y finalizando, con un pico máximo el día 13 tras la inoculación con un valor de ratio $Mx/\beta\text{-a} = 1,26$. El último día de muestreo va descendiendo hasta valores de ratio $Mx/\beta\text{-a} = 0,96$. Este grupo de peces inoculados con LPS mostró durante toda la experiencia unos valores más elevados de la respuesta a la expresión de Mx en el hígado, y a partir del día 13 los datos son estadísticamente significativos ($p < 0,05$) con respecto al grupo control y al grupo inoculado únicamente con el patógeno. Los días previos presentan valores estadísticamente significativos solo con respecto al grupo control.

El lote de peces inoculado solo con el agente patógeno no presenta casi diferencia en la expresión del gen Mx frente al grupo control durante los 6 primeros días. Después se observa cómo se produce un aumento de la expresión hasta el día 9 post infección (ratio $Mx/\beta\text{-a} = 1,05$), siendo este punto estadísticamente significativo ($p < 0,05$) con respecto al lote control, y posteriormente, un descenso gradual hasta alcanzar el valor de ratio $Mx/\beta\text{-a} = 0,55$, con valores estadísticamente significativos ($p < 0,05$) con respecto a los otros dos grupos.

Tabla XVIII.- Valores de los niveles de expresión del gen Mx de la experiencia III que se obtuvieron en este estudio. Datos representados en la Figura XIV.

Tiempo ⁽¹⁾	Grupo control ⁽²⁾	Grupo inoculado con el patógeno ⁽³⁾ $\bar{x} \pm s$	Grupo inoculado con inmunoestimulante ⁽⁴⁾ $\bar{x} \pm s$
0 h	0,22 ± 0,05	0,23 ± 0,05	0,23 ± 0,09
3d	0,26 ± 0,08	0,27 ± 0,04	1,15 ± 0,12
6d^(*)	0,26 ± 0,09	0,25 ± 0,03	0,97 ± 0,03
9d^(**)	0,33 ± 0,05	1,05 ± 0,12	1,04 ± 0,12
13d^(***)	0,25 ± 0,05	0,83 ± 0,05	1,26 ± 0,12
23d^(****)	0,23 ± 0,04	0,55 ± 0,11	0,96 ± 0,08

(1) Tiempo transcurrido después de la inoculación con el agente patógeno.

(2) Grupo de peces control (recibió PBS y posteriormente L15).

(3) Grupo de peces que fue infectado con el agente patógeno (*Nodavirus*).

(4) Grupo de peces que recibió el inmunoestimulante (LPS) y posteriormente fue inoculado con el agente patógeno (*Nodavirus*).

(*) Momento en el que se inocula el agente patógeno (*Nodavirus*).

(**) Momento que coincide con los 3 días transcurridos desde la inoculación del agente patógeno (*Nodavirus*).

(***) Momento que coincide con los 7 días transcurridos desde la inoculación del agente patógeno (*Nodavirus*).

(****) Momento que coincide con los 17 días transcurridos desde la inoculación del agente patógeno (*Nodavirus*).

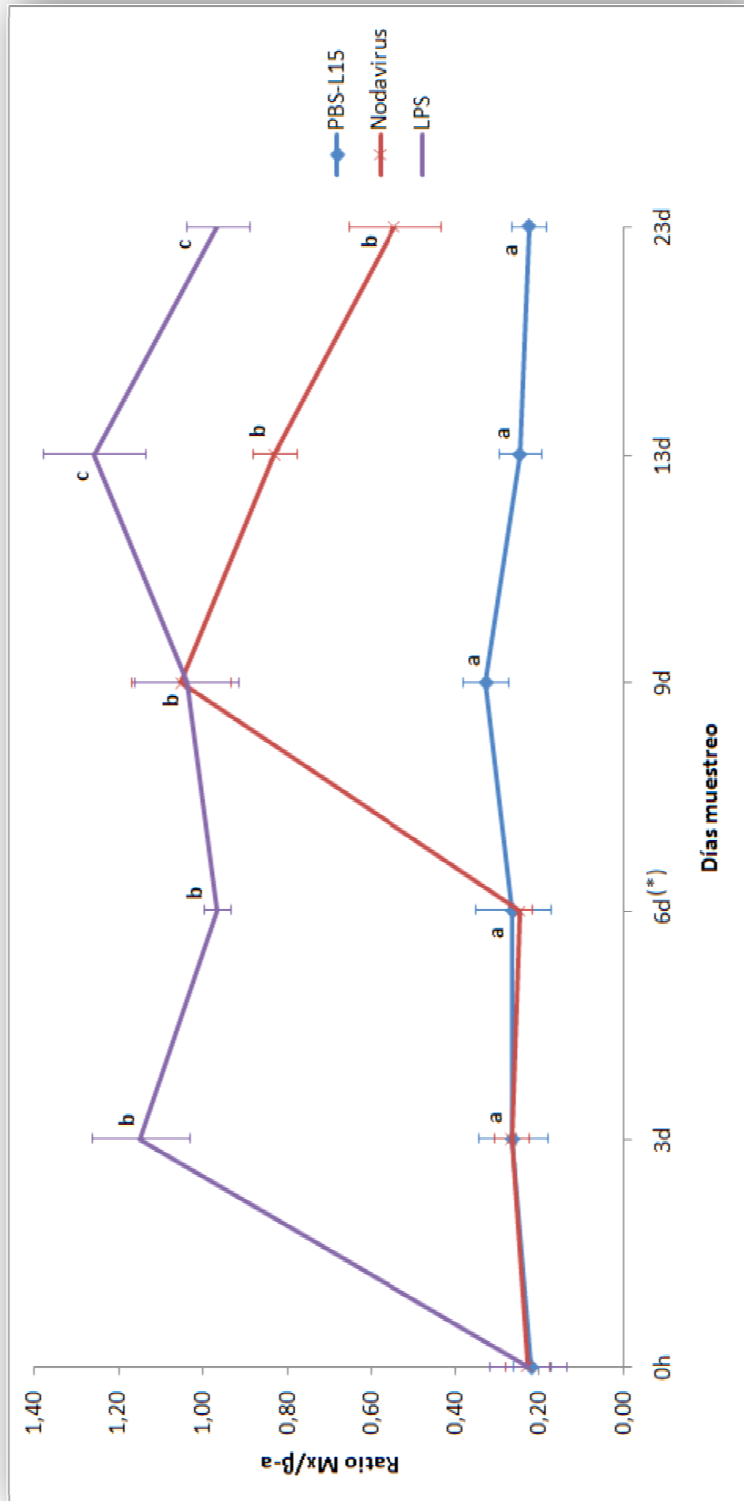


Figura XIV.- Análisis de los niveles de expresión del gen Mx en hígado con el inmunoadyuvante de LPS de *Vibrio alginolyticus* y el agente patógeno, *Nodavirus*, inoculados. Los diferentes grupos son: PBS-L15 (grupo control negativo que solo ha sido inoculado con PBS y posteriormente inoculado con medio L-15), *Nodavirus* (grupo que inicialmente fue inoculado con PBS y posteriormente infectado con *Nodavirus*) y LPS (grupo que inicialmente fue inoculado con LPS de *Vibrio alginolyticus* y posteriormente infectado con *Nodavirus*). Las letras marcan diferencias significativas entre las muestras ($p < 0,05$)

(*) Momento en que se inocula el agente patógeno (*Nodavirus*).



Discusión
Discusión

Los peces están expuestos a una amplia variedad de agentes patógenos, provocando problemas en la producción y comercialización. Entre estos patógenos, los virus representan una seria amenaza debido a que infectan a los peces en casi todas las fases de crecimiento. Una infección vírica a nivel celular desencadena la producción de interferón, dando lugar a la creación de un estado antivírico (Caipang *et al.*, 2009). En la actualidad, se carece de tratamientos eficaces para combatir las enfermedades víricas de los peces de interés en acuicultura, por eso una gran cantidad de estudios han sido dirigidos a conocer el mecanismo de actuación del interferón en los mismos.

El sistema interferón es uno de los más importantes mecanismos de defensa antivírico y las proteínas Mx uno de sus efectores moleculares mejor conocidos (Meier *et al.*, 1990; Staeheli *et al.*, 1993; Arnheiter *et al.*, 1996; Robertsen *et al.*, 1997; Haller *et al.*, 1998; Jensen y Robertsen, 2000; Haller y Kochs, 2002; Caipang *et al.*, 2003; Plant y Thune, 2004; Chen *et al.*, 2006; Wu y Chi, 2007). El interferón se trata de un factor celular inducido después del establecimiento de la infección y aparece antes que cualquier otro mecanismo de defensa. La expresión del interferón también puede ocurrir durante la etapa de la migración al mar en salmón del Atlántico (Das *et al.*, 2007), en ausencia de estímulos como virus, Poly I:C, ADN y LPS bacteriano, valorándose la posibilidad de que señales ambientales como el fotoperiodo, actuando a través del sistema endocrino, pueda inducir respuestas vía interferón (Das *et al.*, 2009).

Debido a la falta de estudios sobre los genes que codifican para el interferón en la mayoría de las especies de peces, a que la vida media del transcrito de interferón es muy corta (Johansen *et al.*, 2004; Zenke y Kim, 2009) y a la elevada conservación de las proteínas Mx a través de la evolución de los vertebrados, éstas han sido empleadas como marcadores para medir la respuesta de interferón tipo I inducida por virus ARN de doble cadena en peces (Lockhart *et al.*, 2007; McBeath *et al.*, 2007), cadenas de ARN de doble cadena sintéticas como el Poly I:C (Eaton, 1990; Trobridge *et al.*, 1997b; Nygaard *et al.*, 2000; Jørgensen *et al.*, 2001; Tafalla *et al.*, 2004; Plant *et al.*, 2005; Wu y Chi, 2007; Fernandez-Trujillo *et al.*, 2008), LPS o ADN bacteriano (Acosta *et al.*, 2004) y otros componentes bacterianos (Ortega y Enríquez, 2007).

En el grupo control de las experiencias que se han realizado en el presente trabajo donde han sido evaluados los inmunoestimulantes a través del estudio de la expresión del gen de la proteína Mx, se ha obtenido una leve expresión de este gen, corroborando que éste es constitutivo en el tejido hepático, al igual que se describe en el trabajo de Tafalla *et al.* (2004), donde clonaron el ADN cíclico de la proteína Mx de dorada y además evidenciaron que la expresión de dicha proteína era constitutiva en hígado, riñón anterior, cerebro y bazo. También existen otros trabajos donde se ha demostrado la expresión constitutiva de Mx en diferentes órganos de varias especies de peces empleando RT-PCR (Lee *et al.*, 2000) o inmunoblot (Jensen *et al.*, 2002).

En nuestro trabajo se observó en mayor o menor medida un incremento de la expresión del gen que codifica esta proteína Mx en hígado en todos los grupos inmunoestimulados con Poly I:C, ADN y LPS de *Vibrio alginolyticus* y ADN y LPS de *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*. Con este dato se podría asumir la participación de las proteínas Mx en la respuesta antivírica de la dorada, como ha sido descrita previamente en numerosas especies como en la carpa japonesa (*Carassius auratus*) (Caipang *et al.*, 2003), salmón del Atlántico (*Salmo salar*) (Larsen *et al.*, 2004), perca gigante (*Lates calcarifer*) (Wu y Chi, 2007) y mero (*Epinephelus malabaricus*) (Chen *et al.*, 2008), documentando que la actividad antivírica es virus específica siendo mayor frente a *Nodavirus* que frente a *Iridovirus*. Esta actividad consiste en impedir la entrada de las nucleocápidas víricas, que sean transportadas al núcleo, que se ensamblen y que se formen nuevas partículas víricas (Fernández-Trujillo *et al.*, 2008).

En las últimas décadas, el abuso de antibióticos para controlar las enfermedades de estos animales ha inducido resistencias bacterianas mediadas por las presiones selectivas por los antibióticos y la presencia de genes de resistencia (Dixon, 1994; Mazel y Davies, 1999; Sköld, 2000; Ekman, 2003; Miranda y Rojas, 2007). Numerosos estudios han mostrado que los inmunoestimulantes pueden proteger a los peces de patógenos bacterianos, y muchas de estas sustancias han sido empleadas para aumentar el crecimiento y resistencia a patógenos durante condiciones de estrés en acuicultura (Kunttu *et al.*, 2009). Los inmunoestimulantes son sustancias capaces de aumentar la respuesta inmune innata y complementar la vacunación, lo que puede ser una herramienta para la prevención de la enfermedad en los peces

que se producen en la acuicultura (Djordjevic *et al.*, 2009). Los estimuladores del sistema inmune incrementan la actividad de los macrófagos (Solem *et al.*, 1995), incluyendo la fagocitosis, la producción de radicales libres y oxígeno, la actividad enzimática, la producción de citoquinas (Clem *et al.*, 1985; Zou *et al.*, 2002), óxido nítrico y la acción bactericida del suero, entre otros. Pueden ser aplicados fácilmente a alevines y pueden ser utilizados para prevenir determinados brotes de enfermedades previsibles (Kunttu *et al.*, 2009). Aún no ha sido descrito el desarrollo de resistencia de patógenos frente a los inmunoestimulantes.

En el presente trabajo, con el inmunoestimulante Poly I:C, se obtuvo la máxima expresión del gen Mx a las 12 horas tras la inoculación (**Figuras IX-X**), al igual que sucede en el trabajo de Fernández-Trujillo *et al.* (2008), quien trabajó con el lenguado senegalés y en el trabajo de Zenke y Kim (2009) con el pez loro japonés, pero difiere con el trabajo de Acosta *et al.* (2004), quienes trabajaron con el salmón del Atlántico y obtuvieron sobre-expresión a los días 6 y 9 post-inoculación en función de la temperatura. Lockhart *et al.* (2004) encontraron, también en salmón del Atlántico sobre-expresión a los 2 días, al igual que Ellis (2001), y Salinas *et al.* (2004) la encontraron a los 3 y 7 días post-inoculación, dependiendo también de la temperatura. A las 24 horas se aprecia la máxima expresión en los trabajos de Plant *et al.* (2005), en bagre del canal y Das *et al.* (2009), también en salmón del Atlántico.

Además, la fuerte inducción del gen Mx que se produjo en nuestras experiencias con el inmunoestimulante Poly I:C, nos permite confirmar que es un potente inductor de interferón, como han demostrado numerosos trabajos

previos (Eaton, 1990; Trobridge *et al.*, 1997b; Jensen y Robertsen, 2000; Jørgensen *et al.*, 2001; Lockhart *et al.*, 2004; Plant *et al.*, 2005; Wu y Chi, 2007; Fernandez-Trujillo *et al.*, 2008).

En nuestro estudio los niveles basales de expresión de este inmunoestimulante los encontramos a partir del día 12 tras su inoculación (**Figuras VIII-IX-X**), similar a los datos obtenidos en el trabajo de Lockhart *et al.* (2004), pero un poco más duradero que en el trabajo de Salinas *et al.* (2004) donde este inmunoestimulante desciende a niveles casi indetectables el día 9 post-inoculación. Estas diferencias en el momento que se produce la máxima inducción y la duración de la estimulación del inmunoestimulante Poly I:C pueden ser debidas a la temperatura a la que se realizan los diferentes trabajos. Aun así, podría servir como un buen inmunoestimulante a corto plazo o para la prevención de los brotes de enfermedades previsibles.

Con este inmunoestimulante, nosotros no hemos sufrido mortalidad alguna, al igual que se describe en el trabajo de Tafalla *et al.* (2004) donde trabajan también con doradas. A diferencia de otros estudios con la misma dosis de inmunoestimulante, que sufrieron una mortalidad después de 24 horas (Lockhart *et al.*, 2004; Salinas *et al.*, 2004). La disparidad entre los trabajos es la especie con la que se trabaja, pero ello, el salmón del Atlántico podría ser una especie susceptible al inmunoestimulante, aunque Acosta *et al.* (2004) no encontraron ninguna mortalidad en los peces inoculados trabajando con la misma especie, con peso/tamaño de peces semejante al de los dos trabajos anteriores, y con la misma dosis de inmunoestimulante.

En nuestro estudio se puede observar que la expresión del gen de la proteína Mx inducida por la inoculación de ADN y LPS de *Vibrio alginolyticus* en dorada (**Figura VIII-IX**) es similar a los hallazgos anteriores que muestran la expresión del gen de la proteína Mx inducida por la vacuna de ADN con un gen de la glicoproteína vírica (administración de Poly I:C, infecciones por virus e inoculación de IRF-1 durante los primeros estadíos) (Caipang *et al.*, 2009). Esto sugiere la posibilidad de emplear ADN y LPS bacteriano como inmunoestimulantes en la regulación de la expresión de algunos genes, como el de la proteína Mx, para activar la defensa temprana contra la infección del virus, como IPNV (Ortega y Enríquez, 2007), o nodavirus (Chen *et al.*, 2008), ambos muy frecuentes en acuicultura continental y marina, respectivamente. También Acosta *et al.* (2004) demostraron que LPS y ADN de *Listonella anguillarum* son capaces de inducir una fuerte respuesta de Mx, no ocurre así con LPS de *Escherichia coli*, que parece que no induce la transcripción de Mx en salmón (Salinas *et al.*, 2004). En cambio, endotoxinas procedentes de *Escherichia coli* producen un aumento de la producción de las citoquinas TNF- α e IL-1 β en pez cebra y en dorada, aumentan la protección frente a *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* (Swain *et al.*, 2008).

El gen de la proteína Mx todavía se expresa 24 días después de la inoculación en el caso de LPS de *Vibrio alginolyticus* (**Figura IX**), como ocurre también con IRF-1 (Caipang *et al.*, 2009). El comportamiento de los LPS de *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* es similar al del Poly I:C, presentando la máxima expresión a las 12 h tras su inoculación (**Figura X**), pero dando una respuesta de menor intensidad, y descendiendo a niveles basales a los 12 días tras la inoculación. Sin embargo, la inmunoestimulación

con LPS de *Vibrio alginolyticus* continúa al menos 31 días después de la inoculación (**Figura IX**), como se muestra también en el trabajo de Bergan *et al.* (2004), quienes demostraron que la expresión del gen de la proteína Mx persistió durante al menos 35 días en el halibut del Atlántico (*Hippoglossus hippoglossus*) frente a la infección por el virus IPN, lo que sugiere que la persistencia de Mx es debido a la estabilidad molecular en lugar de la inducción continua.

Los LPSs de *Vibrio alginolyticus* son el mejor producto empleado en estas experiencias como estimulador del sistema inmunológico, aunque se necesitan tres días para llegar a valores máximos (0,9 en relación a la β -actina, **Tabla XV-Figura IX**), se mantiene a estos niveles seis días, no alcanzando el nivel basal hasta los 31 días post-inoculación. Teniendo en consideración estos datos, este inmunoestimulante podría ser empleado en el caso de brotes de infecciones previsibles o en caso de sospechas de enfermedad, puesto que, aunque la máxima acción antivírica de Mx no la obtenemos hasta el día 3, a partir de las 24 horas tras su inoculación, esta acción ya está en marcha y su duración es de casi 24 días, representando este periodo un amplio margen de actuación del sistema inmune frente al patógeno. Este inmunoestimulante se puede comparar con el Poly I:C que, aunque alcanza niveles mayores de expresión, su duración es solo de 12 días, disminuyendo el tiempo de acción.

En el caso de ADN de *Vibrio alginolyticus* su intensidad y su tiempo de acción, de 18 días, son menores que los de LPS de la misma cepa bacteriana (**Figura IX**). En nuestro caso la sobre-regulación de los niveles de transcripción

de Mx con este inmunoestimulante se produce hasta el día 3, posteriormente va descendiendo hasta niveles basales. No ocurre lo mismo en el caso de las vacunas de ADN de virus de la septicemia viral hemorrágica (VHSV) inoculadas en ovarios de trucha arcoíris ya que la sobre-regulación se presenta hasta el día 7 post-inoculación, coincidiendo con los máximos niveles de IFN. En el caso de vacunas de ADN del virus de la necrosis pancreática infecciosa (IPNV) inoculadas en ovarios de trucha arcoíris solo una isoforma del gen Mx presenta una fuerte inducción el día 14 post-inoculación (Chaves-Pozo *et al.*, 2010). También el día 15 post-inoculación encontramos una expresión máxima, disminuyendo a niveles basales en el trabajo realizado por De las Heras *et al.* (2010) con vacunas de ADN IPNV-VP2. Estos datos siguen corroborándose en el trabajo de Cuesta *et al.* (2010), donde la vacuna de IPNV presenta sobre-regulación en riñón anterior los días 2 y 7 post-vacunación y en el bazo al día 2 post-vacunación. Por otro lado, en este mismo trabajo, una vacuna de ADN frente a VHSV provoca la máxima expresión del gen Mx en el músculo, riñón anterior y bazo los días 7 y 14 post-vacunación. En otro trabajo de De las Heras *et al.* (2009), vacunaron trucha marrón (*Salmo trutta*) con ADN IPNV VP2 y obtuvieron una sobre-regulación de Mx en hígado los días 2 y 7 en peces de 2 g, mientras que en riñón anterior de peces de 7,5 g obtuvieron la máxima expresión el día 15 post-vacunación. Los perfiles de expresión son similares a los descritos para Poly I:C en peces infectados con IPNV, donde el incremento de la expresión del gen Mx comienza a las 24 h (Rodríguez Saint-Jean y Pérez-Prieto, 2007). Con todo esto podemos observar que en la vacunación con ADN la intensidad y duración de la expresión del gen de la proteína Mx depende del tejido donde se evalúe y el tamaño del pez,

además de la especie con la que se trabaje. En este mismo ámbito, otro ejemplo se ve representado en la **Figura X** de nuestro estudio, donde el ADN de *Photobacterium damsela* subsp. *piscida* presenta su máxima expresión a las 24 horas tras su inoculación, siendo ya elevada su intensidad desde las 12 horas y presentando una pequeña meseta de 12 horas. Desciende a niveles basales transcurridos 18 días, por lo que éste tampoco tendría un mal efecto como inmunoestimulante, puesto que la intensidad es alta y su durabilidad puede dar la posibilidad de actuar contra el patógeno.

El inmunoestimulante menos efectivo probado en este trabajo es el LPS de *Photobacterium damsela* subsp. *piscida* (**Figura X**), cuya intensidad es la más baja de los cinco inmunoestimulantes probados y su durabilidad es también la menor de todas, puesto que descende a niveles basales el noveno día tras su inoculación. Esta diferencia con respecto al *Vibrio alginolyticus* podría ser debida a que ambas paredes celulares difieran en su composición, pero en la actualidad no hay ningún estudio que corrobore esta hipótesis.

Al comienzo de este trabajo, en la primera experiencia que se realizó, que se trabajaba con la cepa 521 de *Vibrio alginolyticus*, se produjo una infección natural leve del *Iridovirus* linfocistis en los peces, probablemente entre los días 9 y 12 post-inoculación de los diferentes inmunoestimulantes. Gracias a esta infección pudimos observar la respuesta a nivel de expresión del gen de la proteína Mx de los diferentes grupos de peces y la enorme sensibilidad del sistema interferón para responder produciendo esta proteína ante una infección vírica. Apreciamos que en el grupo de los peces inoculados con ADN de *Vibrio alginolyticus* la respuesta a este patógeno es muy baja,

rozando los niveles basales, casi la misma que se produce en el grupo control, en cambio, los grupos de peces inoculados con los inmunoestimulantes Poly I:C y LPS de *Vibrio alginolyticus* se produce una respuesta antivírica del gen de la proteína Mx al día 31 de nuestra experiencia. Probablemente este retraso en la respuesta se produzca porque la carga inicial del virus era muy baja y a medida que fueron pasando los días se fue replicando en el hospedador, activándose así la respuesta del sistema interferón de los peces, o bien han podido ocurrir reinfecciones del virus en los animales experimentales considerando las limitaciones estructurales del diseño de la nave. Aprovechando este incidente se podría hacer un estudio de cómo protege nuestro inmunoestimulante, LPS de *Vibrio alginolyticus*, a la dorada frente a este patógeno, que aunque no le produce elevadas mortalidades sí puede favorecer la acción de otros patógenos que sí provocan grandes pérdidas económicas en la acuicultura, como pueden ser *Photobacterium damsela* subsp. *pisicida* o ciertos parásitos.

Con el fin de estudiar si las consecuencias de la infección experimental de dorada frente a otro desafío vírico, en este caso frente a *Nodavirus*, podrían verse influenciadas por la inmunoestimulación previa con LPS de *Vibrio alginolyticus*, se inoculó a los peces el inmunoestimulante y se comparó en cada caso la expresión de la proteína inducida Mx.

La encefalopatía y retinopatía vírica (VER) o necrosis nerviosa vírica (VNN), es una enfermedad emergente causada por un *Betanodavirus*, miembro de la Familia *Nodaviridae* (Delsert *et al.*, 1997; Tang *et al.*, 2002), que provocan elevadas mortalidades en peces marinos infectados, sobretodo

en el estadio larvario y juvenil debido a un proceso degenerativo en cerebro, retina y médula espinal. *Nodavirus* es un importante patógeno para varias especies de peces marinos cuya incidencia ha aumentado en los últimos años por su supervivencia bajo condiciones extremas ambientales (Frerichs *et al.*, 2000). A pesar de que muchas especies están siendo afectadas por esta enfermedad, incluyendo la dorada, a nivel experimental, y lubina (especies importantes en la acuicultura marina española) la patogénesis y la respuesta inmune frente a la nodavirrosis no está bien caracterizada.

Inicialmente, la dorada había sido catalogada como un portador asintomático de la encefalopatía y retinopatía vírica (Castric *et al.*, 2001). Sin embargo, Aranguren *et al.* (2002) demostraron que la dorada podía ser experimentalmente susceptible a *Nodavirus*, dependiendo de la temperatura y la ruta de infección. Además, la dorada es a menudo cultivada junto con la lubina y otras especies susceptibles, lo que incrementa la posibilidad de infección cruzada.

En el trabajo realizado por Poisa-Beiro *et al.* (2008) se observa una sobre-expresión de la proteína Mx en cerebro de dorada con respecto al observado en lubina pudiendo estar relacionado con la eficacia para hacer frente a la infección y, así, podría explicar porqué la dorada se comporta como portadora “asintomática” en esta enfermedad.

El origen de esta enfermedad podrían ser las poblaciones salvajes de peces en estado natural de las que se obtienen los reproductores a partir de los que se inicia el cultivo, ya que se ha detectado el agente patógeno en peces procedentes de la pesca (Barker *et al.*, 2002).

Los riesgos de infección recíproca entre peces salvajes y cultivados dependen de los mecanismos de transmisión. Se ha demostrado experimentalmente la transmisión horizontal de VNN (Glazebrook *et al.*, 1990; Mori *et al.*, 1991; Arimoto *et al.*, 1993; Nguyen *et al.*, 1994; Thiery *et al.*, 1997; Athanassopoulou *et al.*, 2004; Korsnes *et al.*, 2005) y la transmisión vertical (Breuil *et al.*, 1991; Arimoto *et al.*, 1992; Mushiake *et al.*, 1994; Nishizawa *et al.*, 1996).

Numerosos estudios exponen la posibilidad de inhibir la transmisión vertical y horizontal de NNV con varias sustancias químicas, vacunas, detectores en reproductores y esterilización con ozono de agua y huevos (Wang *et al.*, 2010b). Sin embargo, la mayoría de los tratamientos antivíricos disponibles producen resistencias de estos agentes, que se complican con otras infecciones secundarias, recurrencia y el fenómeno de latencia vírica. En el presente, existen numerosos tipos de vacunas experimentales frente a NNV las cuales se han desarrollado incluyendo proteínas recombinantes, péptidos sintéticos, virus inactivados, vacunas de ADN y partículas que simulan el virus. Estas vacunas han sido administradas vía intramuscular, intraperitoneal o por baño (Wang *et al.*, 2010a). Sin embargo, en la mayoría de los casos es difícil vacunar cuando se trata con juveniles y larvas debido a que esta enfermedad normalmente aparece en esos primeros estadios. Por ello es importante desarrollar tratamientos de prevención.

Todo esto nos hizo plantearnos la posibilidad de probar frente a esta infección el inmunoestimulante de nuestro estudio que ofrecía mejores resultados experimentales, frente a *Nodavirus* en dorada, a pesar de que esta

especie en Canarias se podría comportar como portadora, puesto que las temperaturas del agua no son lo suficientemente elevadas como para que sea susceptible a este patógeno, $26 \pm 1^\circ\text{C}$ (Aranguren *et al.*, 2002), sí convive en los mismos recintos acuícolas que la lubina, que sí está considerada una especie muy susceptible a este patógeno (Scapigliati *et al.*, 2010), pudiendo producirse una infección cruzada.

En nuestro trabajo no se produjo ninguna mortalidad, no así ocurrió en el trabajo de Montes *et al.* (2010) con el rodaballo, que obtuvieron mortalidades a partir del séptimo día, o en el trabajo de Aranguren *et al.* (2002), aunque la vía de administración del patógeno fuese la misma que se empleó en nuestro trabajo, la vía intrmuscular. Esta diferencia puede ser debida principalmente a la temperatura del agua, puesto que Aranguren *et al.* mantuvieron sus peces a 26°C , y en nuestra experiencia la temperatura del agua fue de 22°C , no siendo ésta propicia para el desarrollo de la enfermedad, pero común en nuestras aguas canarias (oscilando entre 19°C y 23°C a lo largo del año 2010 en la Isla de Gran Canaria). El motivo de porqué no empleamos calentadores de agua para simular una temperatura propicia para el desarrollo de esta enfermedad en esta especie, fue el de introducir mínimas modificaciones que simularan el ambiente en el que se encuentra la dorada en aguas canarias y además, habría que probar antes cómo actúa el inmunoestimulante en esta especie a otras temperaturas, puesto que, quizás, podría variar su intensidad o duración.

Asimismo, nuestras doradas eran de un tamaño mayor, 8 g, que con las que experimentaron Aranguren *et al.* (2002) en su trabajo, 0,7 g, 2 g y 4 g. Por ello, el desarrollo del sistema inmune de las doradas de nuestra experiencia era mayor.

En este trabajo se puede observar que el grupo de peces inoculados inicialmente con el inmunoestimulante LPS de *Vibrio alginolyticus* presenta a las 24 h postinoculación una titulación casi tres veces menor que el grupo inoculado solamente con *Nodavirus* (**Figura XIII**), quedando así demostrada la capacidad que tiene este inmunoestimulante de inhibir el crecimiento de este patógeno por la activación del sistema interferón y la expresión del gen de la proteína antivírica Mx, que interfiere con la replicación del patógeno *Nodavirus*. Como ocurre, por ejemplo, en el trabajo de Lin *et al.* (2006), donde existe una titulación menor en las células que han sido estimuladas con genes recombinantes de Mx, que las que han sido infectadas únicamente con *Nodavirus*.

A medida que avanza la infección, la titulación vírica es mayor, tanto en nuestro trabajo, como en trabajos anteriores (Trobridge *et al.*, 1997a; Caipang *et al.*, 2003; Lin *et al.*, 2006), la protección antivírica de las proteínas Mx disminuye.

En nuestro trabajo se puede observar cómo existe mayor expresión del gen Mx en el grupo inoculado inicialmente con el inmunoestimulante LPS de *Vibrio alginolyticus* (**Figura XV**), que justifica una titulación del virus menor. A los 13 días post-inoculación del inmunoestimulante, que corresponden con el tercer día post-infección con el patógeno, se encuentra la máxima expresión,

viéndose retrasada esta máxima respuesta con respecto a los peces inoculados únicamente con el inmunoestimulante, como se puede comprobar en la **Figura IX**. Este efecto se puede observar también en los trabajos elaborados por Purcell *et al.* (2004), con la trucha arcoíris e IHNV, Plant *et al.* (2005), con el bagre del canal y *Herpesvirus*, Lockhart *et al.* (2007), con el salmón del Atlántico e IPNV, y Fernández-Trujillo *et al.* (2008), con el lenguado y *Aquabirnavirus*. Al finalizar esta experiencia el día 23 post-inoculación del inmunoestimulante, día 17 post-infección de *Nodavirus*, el grupo de peces que fue inoculado con el inmunoestimulante presenta aún niveles altos de expresión del gen Mx, pudiendo ser debido al efecto combinado de la infección vírica y los efectos inmunoestimulantes del LPS.

La expresión del gen Mx en hígado del grupo inoculado únicamente con *Nodavirus* se ve fuertemente aumentada el día 9 post-inoculación del inmunoestimulante, día 3 post-infección con el patógeno. Sin embargo, la expresión de Mx en cerebro es máxima a los 7 días post-infección en el trabajo de Montes *et al.* (2010). Con esto podemos asegurar que *Nodavirus* induce la expresión del gen de la proteína Mx, como ocurre en el trabajo de Poisa-Beiro *et al.* (2008). La participación de Mx y el sistema interferón ha sido recientemente documentada en peces infectados con *Nodavirus* (Montes *et al.*, 2010).

La expresión del gen de la proteína Mx también es inducida por otros virus, como el virus que provoca la enfermedad de Necrosis Pancreática Infecciosa (IPNV) y el virus que provoca la Anemia Infecciosa de Salmón (ISAV) en salmón del Atlántico, el virus que provoca la Necrosis Hematopoyética

Infecciosa (IHNV) en trucha de arcoíris, el virus del bagre del canal (CCV) y el IPNV en halibut del Atlántico, son capaces de inducir la expresión de Mx (Jensen y Robertsen, 2000).

Con estos resultados podemos concluir que la dorada puede ser una especie portadora de nodavirus, como sugiere Castric *et al.* (2001), pudiendo ser un transmisor de la enfermedad a la lubina u otras especies susceptibles.

Los LPSs de *Vibrio alginolyticus* pueden ser buenos candidatos para prevenir esta enfermedad en acuicultura, aunque para ello habría que realizar más estudios sobre cómo interactúan el inmunoestimulante y el hospedador, variando también las condiciones naturales de temperatura y oxígeno, entre otras.

También sería interesante hacer este mismo estudio en lubina, puesto que normalmente comparten recinto en las empresas de acuicultura, probar otras vías de administración, puesto que la vía de administración de los inmunoestimulantes es importante ya que la intensidad de la respuesta de los parámetros inmunes puede verse afectada (Kunttu *et al.*, 2009), y otras tallas de peces. Si con la administración oral pudiera funcionar la inmunoestimulación sería un método más económico de administración y a nivel del pez, como se ha sugerido que la piel y el epitelio intestinal pueden ser los lugares donde se produce la primera replicación vírica (Aranguren *et al.*, 2002), pudiendo producirse la infección a través del epitelio intestinal y branquial. Así sería interesante estudiar cómo responden dichas células intestinales frente a *Nodavirus* sin estimular e inmunoestimuladas.

Además, como numerosos estudios han demostrado que los inmunoestimulantes pueden proteger a los peces frente a patógenos bacterianos, y han sido empleados un amplio rango de inmunoestimulantes en acuicultura para mejorar el crecimiento y resistencia frente a patógenos durante condiciones estresante en las granjas (Kunttu *et al.*, 2009), otro estudio que se podría hacer con este inmunoestimulante (LPS de *Vibrio alginolyticus*) es valorar el comportamiento de la especie dorada inmunoestimulada frente a patógenos, como *Vibrio alginolyticus* y *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*.



Conclusiones
Conclusiones

1. Los productos ADN y LPS obtenidos a partir de *Vibrio alginolyticus* y *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* al ser suministrados a la dorada ejercen un claro efecto inmunoestimulante sobre la expresión del gen Mx.
2. El LPS de *Vibrio alginolyticus* es mejor estimulador del sistema inmunológico en la inducción del gen Mx que el ADN de *Vibrio alginolyticus* y el LPS de *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*, ya que presenta una respuesta de fuerte intensidad y larga duración.
3. El ADN de *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* también podría ser empleado como inmunoestimulante, puesto que su intensidad es alta y su durabilidad puede dar posibilidad a la acción contra un patógeno.
4. *Nodavirus* induce fuertemente la expresión del gen que codifica la proteína Mx.
5. El inmunoestimulante LPS de *Vibrio alginolyticus* aplicado en la dorada disminuye casi tres veces la titulación vírica con respecto a los peces no inmunoestimulados e infectados con *Nodavirus*.



Conclusions
Conclusions

1. Products obtained from *Vibrio alginolyticus* and *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* supplied to the gilthead sea bream produce a clear effect on the immunostimulatory Mx gene expression.
2. LPS of *Vibrio alginolyticus* is better stimulator of the immune system than *Vibrio alginolyticus* DNA and LPS of *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* because it shows a strong response in intensity and length of Mx gene induction.
3. DNA of *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* could also be used as an immunostimulant, since its high intensity durability make possible to act against pathogen.
4. *Nodavirus* strongly induces Mx gene expression.
5. The immunostimulant LPS of *Vibrio alginolyticus* decreased almost three times the virus titration with respect to no-immunized or infected with *Nodavirus* group of fish.



Bibliografía
Bibliografía

- A**cerete, L., Balasch, J.C., Castellana, B., Redruello, B., Roher, N., Canario, A.V., Planas, J.V., MacKenzie, S. y Tort, L. (2007). **Cloning of the glucocorticoid receptor (GR) in gilthead seabream (*Sparus aurata*). Differential expression of GR and immune genes in gilthead seabream after an immune challenge.** Comparative Biochemistry & Physiology. B. 148: 32-43.
- Acosta, F., Lockhart, K., Gahlawat, S.K., Real, F. y Ellis, A.E. (2004). **Mx expression in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) parr in response to *Listonella anguillarum* bacterin, lipopolysaccharide and chromosomal DNA.** Fish & Shellfish Immunology 17: 255-263.
- Acosta, F., Petrie, A., Lockhart, K., Lorenzen, N. y Ellis, A.E. (2005). **Kinetics of Mx expression in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) parr in response to VHS e DNA vaccination.** Fish & Shellfish Immunology 18: 81-89.
- Acosta, F., Ellis, A.E., Vivas, J., Padilla, D., Acosta, B., Deniz, S., Bravo, J. y Real, F. (2006). **Complement consumption by *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* in seabream, red porgy and seabass normal and immune serum. Effect of the capsule on the bactericidal effect.** Fish & Shellfish Immunology 20: 709-717.
- Agius, C. y Roberts, R. (2003). **Melano-macrophage centres and their role in fish pathology.** Journal of Fish Diseases 26: 499-509.
- Aguilar, A., Merino, S., Rubires, X. y Tomás, J.M. (1997). **Influence of osmolarity on lipopolysaccharides and virulence of *Aeromonas hydrophila* serotype O:34 strains grown at 37 degrees C.** Infection & Immunity 65: 1245-1250.
- Akira, S., Uematsu, S. y Takeuchi, O. (2006). **Pathogen recognition and innate immunity.** Cell 124: 783-801.

- Albrecht, R., Zeth, K., Soding, J., Lupas, A. y Linke, D. (2006). **Expression crystallization and preliminary X-ray crystallographic studies of the outer membrane protein OmpW from *Escherichia coli***. Acta Crystallographica Section F Structural Biology and Crystallization Communications 62: 415-418.
- Alexander, J.B. e Ingram, G.A. (1992). **Noncellular nonspecific defense mechanisms of fish**. Annual Review of Fish Diseases 2: 249-279.
- Altmann, S.M., Mellon, M.T, Distel, D.L. y Kim, C.H. (2003). **Molecular and functional analysis of an interferon gene from the zebrafish, *Danio rerio***. Journal of Virology 77: 1992-2002.
- Altmann, S.M., Mellon, M.T., Johnson, M.C., Paw, B.H., Trede, N.S. y Zon, L.I. (2004). **Cloning and characterization of an Mx gene and its corresponding promoter from the zebrafish, *Danio rerio***. Development & Comparative Immunology 28: 295-306.
- Álvarez-Pellitero, P., Sitjà-Bobadilla, A. y Palenzuela, O. (2007). **Parásitos: un nuevo reto para la piscicultura española**. XI Congreso Nacional de Acuicultura. Sesión temática: Salud y bienestar animal. Ponencia: 969-973.
- Anderson, D.P. (1992). **Immunostimulants, adjuvants and vaccine carriers in fish: Applications to aquaculture**. Annual Review of Fish Diseases 2: 281-307
- Anderson, E.D., Mourich, D.V., Fahrenkrug, S.C., LaPatra, S.E., Shepherd, J. y Leong, J.A. (1996). **Genetic immunization of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) against infectious hematopoietic necrosis virus**. Molecular Marine Biology & Biotechnology 5: 114-122.
- APROMAR. (2010). <http://www.apromar.es/Informes/Informe-APROMAR-2010.pdf>
- Aranguren, R., Tafalla, C., Novoa, B. y Figueras, A. (2002). **Experimental transmission of encephalopathy and retinopathy induced by nodavirus to sea bream (*Sparus aurata* L.) using different infection models**. Journal of Fish Diseases 25: 317-324.

- Aranishi, F y Nakane, M. (1997). **Epidermal proteases of the Japanese eel**. *Fish Physiology & Biochemistry* 16: 471-478.
- Aranishi, F. (1999). **Purification and characterization of alpha (1)-proteinase inhibitor from carp (*Cyprinus carpio*) serum**. *Marine Biotechnology* 1: 33-43.
- Arijo, S., Borrego, J.J., Zorrilla, I., Balebona, M.C. y Morifiño, M.A. (1998). **Comparison of the immune response of gilthead seabream (*Sparus aurata* L.) to capsulated and uncapsulated strains of *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida***. *Fish & Shellfish Immunology* 8: 63-72.
- Arimoto, M., Mushiake, K., Mizuta, Y., Nakai, T., Muroga, K. y Furusawa, I. (1992). **Detection of striped jack nervous necrosis virus (SJNNV) by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)**. *Gyobyo Kenkyu* 27: 191-195.
- Arimoto, M., Mori, K., Nakai, T., Muroga, K. y Furusawa, I. (1993). **Pathogenicity of the causative agent of viral nervous necrosis disease in striped jack, *Pseudocaranx dentex* (Bloch & Schneider)**. *Journal of Fish Diseases* 16: 461-469.
- Arimoto, M., Sato, J., Maruyama, K., Mimura, G. y Furusawa, I. (1996). **Effect of chemical and physical treatments on the inactivation of striped jack nervous necrosis virus (SJNNV)**. *Aquaculture* 143: 15-22.
- Arnheiter, H., Frese, M., Kambadur, R., Meier, E. y Haller, O. (1996). **Mx transgenic mice-animal models of health**. *Current Topics in Microbiology and Immunology* 206: 119-147.
- Athanassopoulou, F., Billinis, C. y Prapas, Th. (2004). **Important disease conditions of newly cultured species in intensive freshwater farms in Greece: first incidence of nodavirus infection in *Acipenser* sp.** *Diseases of Aquatic Organisms* 60: 247-252.
- Austin, B. y Austin, D.A. (1987). **Bacterial fish pathogens: Disease in farmed and wild fish**. En: L. Laird y S. Stead (Eds). *Gram negative bacteria: Vibrionaceae* representatives. Ellis Horwood Books Aquacult. Fish Support., Chischester (UK), pp: 237-240.

Austin, B. y Austin, D.A. (1999). **Bacterial Fish Pathogen**. En: Disease of Farmed and Wild Fish. Laird, L. y Stead, S., (Eds). Springer-Praxis, United Kingdom. pp: 176-276.

Bachrach, G., Zlotkin, A., Hurvitz, A., Evans, D. y Eldar, A. (2001). **Recovery of *Streptococcus iniae* from Diseased Fish Previously Vaccinated with a *Streptococcus* Vaccine**. Applied & Environmental Microbiology 67: 3756-3758.

Baffone, W., Citterio, B., Vittoria, E., Casarli, A., Campana, R., Falzano, L. y Donelli, G. (2003). **Retention of virulence in viable but non-culturable halophilic *Vibrio* spp.** International Journal of Food & Microbiology 89: 31-39.

Baldermann, C., Lupas, A., Lubieniecki, J. y Engelhardt, H. (1998). **The regulated outer membrane protein Omp21 from *Comamonas acidovorans* is identified as a member of a new family of eight-stranded β -sheet proteins by its sequence and properties**. Journal of Bacteriology 180: 3741-3749.

Baldwin, T.J. y Newton, J.C. (1996). **Pathogenesis of enteric septicemia of channel catfish, caused by *Edwardsiella ictaluri*: bacteriological and light and electron microscope findings**. Journal of Aquatic Animal Health 5: 189-198.

Balebona, M.C., Moriñigo, M.A. y Borrego, J.J. (1995). **Role of extracellular products in the pathogenicity of *Vibrio* strains on cultured gilt-head seabream (*Sparus aurata*)**. Microbiology SEM 11: 439-446.

Balebona, M.C., Zorrilla, I., Moriñigo, M.A. y Borrego, J.J. (1998a). **Survey of bacterial pathogens affecting farmed gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.) in southwestern Spain from 1990 to 1996**. Aquaculture 166: 19-35.

Balebona, M.C., Andreu, M.J., Bordas, M.A., Zorrilla, I., Moriñigo, M.A. y Borrego, J.J. (1998b). **Pathogenicity of *Vibrio alginolyticus* for cultured gilt-head sea bream (*Sparus aurata* L.)**. Applied & Environmental Microbiology 64: 4269-4275.

- Balebona, M.C., Krovacek, K., Moriñogo, M.A., Mansson, I., Faris, A. y Borrego, J.J. (1998c). **Neurotoxic effect on two fish species and a PC12 cell line of the supemate of *Vibrio alginolyticus* and *Vibrio anguillarum***. *Veterinary Microbiology* 63: 61-69.
- Baptista, T., Costa, J. y Soares, F. (1999). **Patologías más comunes en Dorada (*Sparus aurata*) y Lubina (*Dicentrarchus labrax*) registradas en las piscifactorías al sur del Río Tajo durante 1998**. *Revista AquaTIC*, 7, junio.
<http://www.revistaaquatic.com/aquatic/art.asp?t=h&c=97>
- Barker, D.E., MacKinnon, A.M., Boston, L., Burt, M.D.B., Cone, D.K., Speare, D.J., Griffiths, S., Cook, M., Ritchie, R. y Olivier, G. (2002). **First report of piscine nodavirus infecting wild winter flounder *Pleuronectes americanus* in Passamaquoddy Bay, New Brunswick, Canada**. *Diseases of Aquatic Organisms* 49: 99-105.
- Baumann, P. y Schubert, R.H.W. (1984). ***Vibrionaceae***. En: N.R. Krieg y J.G Holt (ed.), *Bergey's manual of systematic bacteriology*, vol.1. The Williams y Wilkins Co., Baltimore. pp: 516-538.
- Bayne, C.J. y Gerwick, L. (2001). **The acute phase response and innate immunity of fish**. *Development & Comparative Immunology* 25: 725-743.
- Bei, J.X., Suetake, H., Araki, K., Kikuchi, K., Yoshiura, Y. y Lin, H.R. (2006). **Two interleukin (IL)-15 homologs in fish from two distinct origins**. *Molecular Immunology* 43: 860-869.
- Bellance, R. y Gallet de Saint-Aurin, D. (1988). **L'encephalite virale du loup de mer**. *Caraibes Medical* 2: 105-114.
- Ben Abdallah, F., Kallel, H y Bakhrouf, A. (2009). **Enzymatic, outer membrane proteins and plasmid alterations of starved *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio alginolyticus* cells in seawater**. *Archives of Microbiology* 191: 493-500.
- Ben Kahla-Nakbi, A., Besbes, A., Chaieb, K., Rouabhia, M. y Bakhrouf, A. (2007). **Survival of *Vibrio alginolyticus* in sea-water and retention of virulence of its starved cells**. *Marine Environmental Research* 64: 469-478.

- Berczi, I., Bertok, I. y Berezna, T. (1966). **Comparative studies on the toxicity of bacterial endotoxins**. Annual Review of Microbiology 1070-1091.
- Bergan, V. y Robertsen, B. (2004). **Characterization of Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*) Mx protein expression**. Development & Comparative Immunology 28: 1037-1047.
- Biosca, E.G. y Amaro, C. (1996). **Toxic and enzymatic activities of *Vibrio vulnificus* biotype 2 with respect to host specificity**. Applied & Environmental Microbiology 62: 2331-2337.
- Biron, C.A. y Sen, G.C. (2001). **Interferons and other cytokines**, pp. 321-351. En: Fields virology. Editado por Knipe DM, Howley PM, Griffin DE, Lamb RA, Martin MA, Roizman B, Straus SE. Lippincott-Raven, Philadelphia.
- Blake, P., Weaver, R.E. y Hollis, D.G. (1980). **Diseases of humans (other than cholera) caused by vibrios**. Annual Review of Microbiology 34: 341-367.
- Blazer, V.S. (1991). **Piscine macrophage function and nutritional influences: A review**. Journal of Aquatic Animal Health 3: 77-86.
- Boesen, H.T., Pedersen, K., Larsen, J.L., Koch, C. y Ellis, A.E. (1999). ***Vibrio anguillarum* resistance to rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) serum: role of O-antigen structure of lipopolysaccharide**. Infection & Immunity 67: 294-301.
- Bøggwald, J., Stensvag, K., Hoffman, J. y Jørgensen, T. (1991). **Antibody specificities in Atlantic salmon, *Salmo salar* L., against the fish pathogens *Vibrio salmonicida* and *Vibrio anguillarum***. Journal of Fish Diseases 14: 79-87.
- Bonami, J.R., Shi, Z., Qian, D. y Sri Widada, J. (2005). **White tail disease of the giant freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii*: separation of the associated virions and characterization of MrNV as a new type of nodavirus**. Journal of Fish Diseases 28: 23-31.

- Bot, A. (2000). DNA vaccination and the immune responsiveness of neonates. *International Reviews of Immunology* 19: 221-245.
- Boudinot, P., Blanco, M., de Kinkelin, P. y Benmansour, A. (1998). **Combined DNA immunization with the glycoprotein gene of viral hemorrhagic septicaemia virus and infectious hematopoietic necrosis virus induces double-specific protective immunity and non specific responses in rainbow trout.** *Virology* 249: 297-306.
- Bowden, T.J., Butler, R., Bricknell, I.R. y Ellis, A.E. (1997). **Serum trypsin-inhibitory activity in five species of farmed fish.** *Fish & Shellfish Immunology* 7: 377-385.
- Bowden, T.J, Bricknell, I. y Ellis, A.E. (2003a). **Fish Vaccination, an overview.** Industry Report IntraFish: 5-20. <http://www.intrafish.no/global/industryreports/article65256.ece>
- Bowden, T.J, Adamson, K., Maclachlan, P., Pert, C. y Bricknell, I. (2003b). **Long term study of antibody response and injection-site effects of oil adjuvants in Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus* L.).** *Fish & Shellfish Immunology* 14: 363-369.
- Breuil, G., Bonami, J.R., Pepin, J.F. y Pichot, Y. (1991). **Viral infection (picorna-like virus) associated with mass mortalities in hatchery-reared sea-bass (*Dicentrarchus labrax*) larvae and juveniles.** *Aquaculture* 97: 109-116.
- Brock, J.H., Williams, P.H., Liceaga, J. y Wooldridge, K.G. (1991). **Relative availability of transferrin-bound iron and cell-derived iron to aerobactin-producing and enterochelin-producing strains of *Escherichia coli* and to other microorganisms.** *Infection & Immunity* 59: 3185-3190.
- Buller, N.B., (2004). **Bacteria from fish and other aquatic animals: a practical identification manual.** CABI Publisher. pp: 361.
- Bullock, G.L. y McLaughlin, J.J.A. (1970). **Advances in knowledge concerning bacteria pathogenic to fishes (1954-1968).** En: Symposium on diseases of fishes and shellfishes. Snieszko, S.F. (Ed). American Fisheries Society, Washington.USA. pp: 231-242.

- Caill, M. (1990). **Virulence factors in motile *Aeromonas* species.** Journal of Applied Bacteriology 69: 1-16.
- Caipang, C.M., Hirono, I. y Aoki, T. (2003). **In vitro inhibition of fish rhabdoviruses by Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus*, Mx.** Virology 317: 373-382.
- Caipang, C.M.A., Takano, T., Hirono, I. y Aoki, T. (2006). **Genetic vaccines protect red seabream, *Pagrus major*, upon challenge with red seabream iridovirus (RSIV).** Fish & Shellfish Immunology 21: 130-138.
- Caipang, C.M.A., Hirono, I. y Aoki, T. (2009). **Modulation of the early immune response against viruses by a teleostean interferon regulatory factor-1 (IRF-1).** Comparative Biochemistry & Physiology - Part A: Molecular & Integrative Physiology 152: 440-446.
- Callery, M.P., Kamei, T. y Flye, M.W. (1990). **Kupffer cell blockade increases mortality during intra-abdominal sepsis despite improving systemic immunity.** Archives of Surgery 125: 36-40.
- Campbell, C.M., Duncan, D., Preece, N.C. y Stevens, L. (1990). **The secretion of amylase, phospholipase and protease from *Aeromonas salmonicida*, and the correlation with membrane-associated ribosomes.** Journal of Fish Diseases 13: 463-474.
- Campbell, T. y Murru, F. (1990). **An introduction to fish hematology.** The compendium-Small Animal 12: 525-533.
- Campos-Pérez, J.J., Ellis, A.E. y Secombes, C.J. (1997). **Investigation of factors influencing the ability of *Renibacterium salmoninarum* to stimulate rainbow trout macrophage respiratory burst activity.** Fish & Shellfish Immunology 7: 555-566.

- Cano, I., García-Rosado, E., Alonso, M.C., López-Jimena, B., Ortiz-Delgado, J.B., Borrego, J.J., Castro, D. y Sarasquete, C. (2009a). **Transmission of lymphocystis disease virus (LCDV) in cultured gilthead seabream (*Sparus aurata*)**. 14th International Conference "Disease of Fish and Shellfish", EAAP. Praga (República Checa). p. 196.
- Cano, I., López-Jimena, B., García-Rosado, E., Ortiz-Delgado, J.B., Alonso, M.C., Borrego, J.J., Sarasquete, C. y Castro, D. (2009b). **Detection and persistence of Lymphocystis disease virus (LCDV) in *Artemia* sp.** Aquaculture 291: 230-236.
- Carli, A., Pane, L., Casareto, L., Bertone, S. y Pruzzo, C. (1993). **Ocurrence of *V. alginolyticus* in Ligurian coas rock pools (Tyrrhenias Sea, Italy) and its association with the copepod *Tigriopus fulvus* (Fisher 1860)**. Applied & Environmental Microbiology 59: 1960-1962.
- Carrington, A.C. y Secombes, C.J. (2006). **A review of CpGs and their relevance to aquaculture**. Veterinary Immunology & Immunopathology 112: 87-101.
- Castric, J., Thiery, R., Jeffroy, J., de Kinkelin, P., Raymond, J.C. (2001). **Sea bream, *Sparus aurata*, an asymptomatic contagious fish host for nodavirus**. Diseases of Aquatic Organisms 47: 33-38.
- Chaves-Pozo, E., Cuesta, A. y Tafalla, C. (2010). **Antiviral DNA vaccination in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) affects the immune response in the ovary and partially blocks its capacity to support viral replication in vitro**. Fish & Shellfish Immunology 29: 579-586.
- Chen, D. y Ainsworth, A.J. (1992). **Glucan administration potentiates immune defense mechanisms of channel catfish, *Ictalurus punctatus* Rafineque**. Journal of Fish Diseases 15: 295-304.
- Chen, H.Y. y Livermore, D.M. (1993). **Activity of cefepime and other betalactam antibiotics against permeability mutants of *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae***. Journal of Antimicrobial & Chemotherapy 32: 63-74.

- Chen, Y.M., Su, Y.L., Lin, J.H.Y., Yang, H.L. y Chen T.Y. (2006). **Cloning of an orange-spotted grouper (*Epinephelus coioides*) Mx cDNA and characterization of its expression in response to nodavirus**. *Fish & Shellfish Immunology* 20: 58-71.
- Chen, Y.M., Su, Y.L., Shie, P.S., Huang, S.L., Yang, H.L. y Chen, T.Y. (2008). **Grouper Mx confers resistance to nodavirus and interacts with coat protein**. *Developmental & Comparative Immunology* 32: 825-836.
- Chien, J.Y., Shih, J.T. y Hsueh, P.R. (2002). ***Vibrio alginolyticus* as the cause of pleural empyema and bacteremia in an immunocompromised patient**. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases* 21: 401-403.
- Chieux, V., Hober, D., Harvey, J., Lion, G., Lucidarme, D. y Forzy, G. (1998). **The MxA protein levels in whole blood lysates of patients with various viral infections**. *Journal of Virology Methods* 70: 183-191.
- Clem, L.W., Sizemore, R.C., Ellsaesser, C.F. y Miller, N.W. (1985). **Monocytes as accessory cells in fish immune responses**. *Development & Comparative Immunology* 9: 803-809.
- Collet, B. y Secombes, C.J. (2001). **The rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) Mx1 promoter. Structural and functional characterization**. *European Journal of Biochemistry* 268: 1577-1584.
- Collet, B., Boudinot, P., Benmansour, A. y Secombes, C.J. (2004). **An Mx1 promoter-reporter system to study interferon pathways in rainbow trout**. *Development & Comparative Immunology* 28: 793-801.
- Collet, B., Munro, E.S., Gahlawat, S., Acosta, F., Garcia, J. y Roemelt, C. (2007). **Infectious pancreatic necrosis virus suppresses type I interferon signalling in rainbow trout gonad cell line but not in Atlantic salmon macrophages**. *Fish & Shellfish Immunology* 22: 44-56.
- Colorni, A. y Burgess, P. (1997). ***Cryptocaryon irritans* Brown 1951, the cause of "White Spot disease" in marine fish: an update**. *Aquarium Sciences and Conservation* 1: 217-238.

- Colwell, R.R. y Huq, A. (1994). **Vibrios in the environment: viable but nonculturable *Vibrio cholera***. En: Wachsmuth, I.K., Bake, P.A., Olsvik, Ø. (Eds.), *Vibrio cholera* and Cholera: Molecular to Global Perspectives. ASM Press, Washington, D.C., pp: 117-133.
- Comas, J. e Iregui, C. (2005). **Replicación de la estreptococcosis en tilapias y su evaluación a través de microbiología e inmunoperoxidasa indirecta (IPI)**. Memorias V seminario Internacional de Acuicultura. II Congreso de Investigaciones Acuícolas. Universidad Nacional de Colombia. Bogotá D.C.
- Corbeil, S., Lapatra, S.E., Anderson, E.D., Jones, J., Vincent, B. y Hsu, Y.L. (1999). **Evaluation of the protective immunogenicity of the N, P, M, NV and G proteins of infectious hematopoietic necrosis virus in rainbow trout *oncorhynchus mykiss* using DNA vaccines**. *Diseases of Aquatic Organisms* 39: 29-36.
- Corbeil, S., Kurath, G. y Lapatra, S.E. (2000). **Fish DNA vaccine against infectious hematopoietic necrosis virus: efficacy of various DNA vaccines in fish 13 routes of immunisation**. *Fish & Shellfish Immunology* 10: 711-723.
- Cuesta, A., Chaves-Pozo, E., de las Heras, A.I., Rodríguez Saint-Jean, S., Pérez-Prieto, Se y Tafalla, C. (2010). **An active DNA vaccine against infectious pancreatic necrosis virus (IPNV) with a different mode of action tan fish rhabdovirus DNA vaccines**. *Vaccines* 28: 3291-3300.
- Curtis, P.A., Drawbridge, M., Iwamoto, T., Nakai, T., Hedrick, R.P. y Gendron, A.P. (2001). **Nodavirus infection of juvenile white seabass, *Atractoscion nobilis*, cultured in southern California: first record of viral nervous necrosis (VNN) in North America**. *Journal of Fish Diseases* 24: 263-271.
- D**abrowski, K. y Cieroszko, A. (1994). **Proteinase inhibitor(s) in seminal plasma of teleost fish**. *Journal of Fish Biology* 45: 801-809.

- Dalmo, R.A. y Seljelid, R. (1995). **The immunomodulatory effect of LPS, laminaran and sulphated laminaran (b-(1,3)-D-glucan) on Atlantic salmon, *Salmo salar* L., macrophages *in vitro*.** Journal of Fish Diseases 18: 175-185.
- Dalmo, R.A. y Bogwald, J. (1996). **Distribution of intravenously and perorally administered *Aeromonas salmonicida* lipopolysaccharide in Atlantic salmon, *Salmo salar*.** Fish & Shellfish Immunology 6: 427-441.
- Dalmo, R.A., Ingebrigsten, K., Sveinbjornsson, B. y Seljelid, R. (1996). **Accumulation of immunomodulatory laminaran (beta (1,3)-D-glucan) in the heart, spleen and kidney of Atlantic cod, *Gadus morhua*.** Journal of Fish Diseases 19: 129-136.
- Dalmo, R.A., Ingebrigtsen, K. y Bogwald, J. (1997). **Non-specific defenses mechanisms in fish, with particular reference to reticuloendothelial system (RES).** Journal of Fish Diseases 20: 241-273.
- Dalmo, R.A., Seternes, T., Arnesen, S.M., Joergensen, T.O. y Bogwald, J. (1998). **Tissue distribution and cellular uptake of *Aeromonas salmonicida* lipopolysaccharide (LPS) in some marine fish species.** Journal of Fish Diseases 21: 321-334.
- Dalmo, R.A., Kjerstad, A., Arnesen, S., Tobias, P. y Bøgwald, J. (2000). **Bath exposure of Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus* L.) yolk sac larvae to bacterial lipopolysaccharide (LPS): Absorption and distribution of the LPS and effect on fish survival.** Fish & Shellfish Immunology 10: 107-128.
- Daly, J.G. (1999). **Other Bacterial Pathogen.** En: Fish Disease and Disorders, Vol. 3. Woo, P.T.K. and Bruno, D.W. eds. CAB International, New York. pp: 577-598.
- Das, B.K., Collet, B., Snow, M. y Ellis, A.E. (2007). **Expression of Interferon type I and II, Mx and gIP genes in the kidney of Atlantic salmon, *Salmo salar*, is induced during smolting.** Fish & Shellfish Immunology 23: 514-520.

- Das, B.K., Ellis, A.E. y Collet, B. (2009). **Induction and persistence of Mx protein in tissues, blood and plasma of Atlantic salmon parr, *Salmo salar*, injected with poly I:C.** Fish & Shellfish Immunology 26: 40-48.
- Davidson, G.A., Ellis, A.E. y Secombes, C.J. (1991). **Cellular responses of leucocytes isolated from the gut of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum).** Journal of Fish Diseases 14: 651-659.
- Davidson, G., Ellis, A. y Secombes, C. (1993). **Route of immunization influences the generation of antibody secreting cells in the gut of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*).** Development & Comparative Immunology 17: 373-376.
- Davis, J.F. y Hayasaka, S.S. (1984). **The enhancement of resistance of the American eel, *Anguilla rostrata* Le Sueur, to a pathogenic bacterium *Aeromonas hydrophila*, by an extract of the tunicate *Ecteinascidia turbinata*.** Journal of Fish Diseases 7: 311-316.
- de Kinkelin, P. y Dorson, M. (1973). **Interferon production in rainbow trout (*Salmo gairdneri*) experimentally infected with Egtved virus.** Journal of General Virology 19: 125-127.
- de Kinkelin, P., Dorson, M. y Hattenberger-Baudouy, A. (1982). **Interferon-synthesis in trout and carp after viral infection.** Development & Comparative Immunology 2: 167-174.
- de las Heras, A.I., Pérez-Prieto, S.I. y Rodríguez Saint-Jean, S. (2009). **In vitro and in vivo immune responses induced by a DNA vaccine encoding the VP2 gene of the infectious pancreatic necrosis virus.** Fish & Shellfish Immunology 27: 120-129.
- de las Heras, A.I., Rodríguez Saint-Jean, S. y Pérez-Prieto, S.I. (2010). **Immunogenic and protective effects of an oral DNA vaccine against infectious pancreatic necrosis virus in fish.** Fish & Shellfish Immunology 289: 562-570.
- de Paola, A., Kayner, C. y McPherarson, R. (1991). **Elevated temperature method for recovery of *Vibrio cholerae* form oysters (*Crassostrea gigas*).** Applied & Environmental Microbiology 53: 1181-1182.

- de Sena, J. y Rio, G.J. (1975). **Partial purification and characterization of RTG-2 fish cell interferon**. *Infection & Immunity* 11: 815-822.
- de Veer, M.J., Holko, M., Frevel, M., Walker, E., Der, S. y Paranjape, J.M. (2001). **Functional classification of interferon-stimulated genes identified using microarrays**. *Journal of Leukocyte Biology* 69: 912-920.
- Delsert, C., Morin, N. y Comps, M. (1997). **A fish encephalitis virus that differs from other nodaviruses by its capsid protein processing**. *Archives of Virology* 142: 2359-2371.
- Der, S.D., Zhou, A., Williams, B.R. y Silverman, R.H. (1998). **Identification of genes differentially regulated by interferon alpha, beta, or gamma using oligonucleotide arrays**. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95: 15623-15628.
- Ding, X.Z., Smallridge, R.C., Galloway, R.J. y Kiang, J.G. (1996). **Rapid assay of HSF1 and HSF2 gene expression by RT-PCR**. *Molecular & Cellular Biochemistry* 158:189-192.
- Dixon, B.A. (1994). **Antibiotic resistance of bacterial fish pathogens**. *Journal of World Aquaculture Society* 25: 60-63.
- Djordjevic, B., Skugor, S., Jørgensen, S.M., Øverland, M., Mydland, L.T. y Krasnov, A. (2009). **Modulation of splenic immune responses to bacterial lipopolysaccharide in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fed lentinan, a beta-glucan from mushroom *Lentinula edodes***. *Fish & Shellfish Immunology* 26: 201-209.
- do Vale, A., Ellis, A.E. y Silva, M.T. (2001). **Electron microscopic evidence that expression of capsular polysaccharide by *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* is dependent on iron availability and growth phase**. *Diseases Aquatic Organisms* 44: 237-240.
- Donate, C., Roher, N., Balasch, J.C., Ribas, L., Goetz, F.W. y Planas, J.V. (2007). **CD83 expression in sea bream macrophages is a marker for the LPS-induced inflammatory response**. *Fish & Shellfish Immunology* 23: 877-885.

- Dorson, M., Barde, A. y de Kinkelin, P. (1975). **Egtved virus induced rainbow trout serum interferon: some physicochemical properties**. Annual Microbiology 126: 485-489.
- Dorson, M., de Kinkelin, P. y Torchy, C. (1992). **Interferon synthesis in rainbow trout fry following infection with infectious pancreatic necrosis virus**. Fish & Shellfish Immunology 2: 311-313.
- Dorson, M., Torchy, C. y De Kinkelin, P. (1994). **Viral haemorrhagic septicaemia virus multiplication and interferon production in rainbow trout and in rainbow trout X brook trout hybrids**. Fish & Shellfish Immunology 4: 369-381.
- Du Pasquier, L. (1982). **Antibody diversity in lower vertebrates – why is it so restricted?**. Nature 296: 311-313.
- Eaton, W.D. (1990). **Antiviral activity in 4 species of salmonids following exposure to polyinosinic polycytidylic acid**. Diseases Aquatic Organisms 9: 193-198.
- Egusa, S. (1992). **Bacterial pseudotuberculosis in *Seriola lalandi***. En: Infectious diseases of fish. Kothekar, V.S. ed. A.A Balkema publishers, Brookfield (USA). pp. 219-230.
- Ekman, E. (2003). **Natural and experimental infections with *Flavobacterium psychrophilum* in salmonid fish**. Tesis Doctoral, Swedish University of Agricultural Sciences, Uppsala.
- El Aamri, F., Padilla, D., Arbelo, F., Caballero, M.J., Bravo, J., Vivas, J. y Real, F. (2010). **First report of *Streptococcus iniae* in red porgy (*Pagrus pagrus*, L)**. Journal of Fish Diseases 33: 901-905.
- Elliot, E.L., Kaysner, A., Jackson, C.L. y Taplin, M.L. (1995). ***Vibrio cholerae*, *V. parahaemolyticus*, *V. vulnificus*, and other *Vibrio* spp.** En: Bacteriol Analyt Man. 8th Edition, Revision A. Chapter 9. Food and Drug Administration (FDA). Association of Analytical Chemist, Arlington, Virginia, USA. pp: 9.01-9.27.

Bibliografía

- Ellis, A.E. (1977). **The leucocytes of fish: A review**. Journal of Fish Biology 11:453-491.
- Ellis, A.E. (1980). **Antigen trapping in the spleen and kidney of the plaice, *Pleuronectes platessa***. Journal of Fish Diseases 3: 413-426.
- Ellis, A.E. (1981). **Stress and the modulation of defense mechanisms in fish**. En: Stress and Fish Pickering, A.D. ed. pp: 147-169.
- Ellis, A.E. (1987). **Inhibition of the *Aeromonas salmonicida* extracellular protease by α 2-macroglobulin in the serum of rainbow trout**. Microbiological Pathology 3: 167-177.
- Ellis, A.E. (1988). **Optimizing factors for fish vaccination**. En: Fish Vaccination. Ellis, A.E. (Ed.). Academic Press, New York. USA. pp: 32-46.
- Ellis, A.E. (1989). **The Immunology of Teleost**. En: Fish Pathology. Roberts R.J. ed. pp: 135-152.
- Ellis, A.E. (1991). **An appraisal of the extracellular toxins of *Aeromonas salmonicida* spp. *salmonicida***. Journal of Fish Diseases 14: 265-277.
- Ellis, A.E. (2001). **Innate host defence mechanism of fish against viruses and bacteria**. Development & Comparative Immunology 25: 827-839.
- Elward, K. y Gasque, P. (2003). **"Eat me" and "don't eat me" signals govern the innate immune response and tissue repair in the CNS: emphasis on the crucial role of the complement system**. Molecular Immunology 40: 85-94.
- Engelsma, M.Y., Stet, R.J.M., Schipper, H. y Verburgvankemenade, B.M.L. (2001). **Regulation of interleukin 1 beta RNA expression in common carp, *Cyprinus carpio* L.** Development & Comparative Immunology 25: 195-203.
- Erridge, C., Bennett-Guerrero, E. y Poxton, I.R. (2002). **Structure and function of lipopolysaccharide**. Microbes & Infections 4: 837-841.

Esteve, C. y Amaro, C. (1991) **Siderophore production in *Aeromonas* spp. isolated from European eel, *Anguilla Anguilla* L.** Journal of Fish Diseases 14: 423-427

Evans, D.L., Leary, J.H. y Jaso-Friedmann, L. (2001). **Nonspecific cytotoxic cells and innate immunity: regulation by programmed cell death.** Development & Comparative Immunology 25: 791-805.

Evans, J.J., Klesius, P.H. y Shoemaker, C.A. (2004). **Efficacy of *Streptococcus agalactiae* (group B) vaccine in tilapia (*Oreochromis niloticus*) by intraperitoneal and bath immersion administration.** Vaccine 22: 3769-3773.

Evelyn, T.P.T. (1997). **A historical review of fish vaccinology.** En: Vaccinology. Gudding, R., Lillehaug, A., Midtlyng, P.J. y Brown, F. (Eds). Developments in Biological Standardization, Karger, Basel, Switzerland. pp: 3-12.

Ewart, K.V., Williams, J., Richards, R.C., Gallant, J.W., Melville, K. y Douglas S.E. (2008). **The early response of Atlantic salmon (*Salmo salar*) macrophages exposed *in vitro* to *Aeromonas salmonicida* cultured in broth and in fish.** Development & Comparative Immunology 32: 380-390.

Fange, R. (1992). **Fish Blood Cells.** En: Hoar, W.S., Randall, D.J. y Farrell, A.P. (Eds.). Fish Physiology Acad. Press, Inc USA. XII Parte B: 1-50.

FAO. (1999). <http://www.fao.org/docrep/003/x7351s/x7351s02.htm>

FAO. (2000). **Informe de la conferencia sobre la Acuicultura en el Tercer Milenio.** Informe de Pesca nº 661. Tailandia, febrero 2000.
<http://www.fao.org/docrep/005/y2815s/y2815s00.htm>

FAO. (2004). **Glosario de biotecnología para la agricultura y la alimentación.**
<http://www.fao.org/docrep/004/y2775s/y2775s0a.htm>

Bibliografía

- FAO. (2006). **State of world aquaculture: FAO Fisheries Technical paper.** <ftp://ftp.fao.org/docrep/fao/009/a0699e/a0699e.pdf>
- FAO. (2008). **El estado mundial de la pesca y la acuicultura 2008.** Departamento de Pesca y Acuicultura de la FAO. ORGANIZACIÓN DE LAS NACIONES UNIDAS PARA LA AGRICULTURA Y LA ALIMENTACIÓN Roma, 2009.
- <http://www.fao.org/docrep/011/i0250s/i0250s00.htm>
- FAO. (2010). **El estado mundial de la pesca y la acuicultura 2010.** Departamento de Pesca y Acuicultura de la FAO. ORGANIZACIÓN DE LAS NACIONES UNIDAS PARA LA AGRICULTURA Y LA ALIMENTACIÓN Roma, 2009.
- <http://www.fao.org/docrep/013/i1820s/i1820s00.htm>
- FEAP. **Federación Europea de Productores de acuicultura.** <http://www.feap.info/feap/>
- Fearon, D.T. y Locksley, R.M. (1996). **The instructive role of innate immunity in the acquired immune response.** Science 272: 50-54.
- Fearon, D.T. (1997). **Seeking wisdom in innate immunity.** Nature 388: 323-324.
- Ferguson, H.W. (1989). **Systemic pathology of fish. A text and atlas of comparative tissue responses in diseases of Teleosts.** Iowa State Univ Press/Ames. 64-103.
- Ferguson, H.W. (2006). **General pathology of fish.** En: Ferguson HW Ed. Systemic pathology of fish. A text and atlas of normal tissues and their responses in disease, Second Edition Scotian Press: London 14-9.
- Fernández, A.B., Ruiz, I. y de Blas, I. (2002a). **El sistema inmune de los teleósteos (II): Respuesta inmune inespecífica.** Revista AquaTIC nº17 [serial online], URL: <http://www.revistaaquatic.com/aquatic/art.asp?t=h&c=154>

- Fernández, A.B., de Blas, I. y Ruiz, I. (2002b). **El sistema inmune de los teleósteos (I): Células y órganos**. Revista AquaTIC nº16 [serial online], URL:
<http://www.revistaaquatic.com/aquatic/art.asp?t=h&c=146>
- Fernandez-Alonso, M., Rocha, A. y Coll, J.M. (2001). **DNA vaccination by immersion and ultrasound to trout viral haemorrhagic septicaemia virus**. Vaccine 19: 3067-3075.
- Fernández-Trujillo, M.A., Porta, J., Borrego, J.J., Alonso, M.C., Alvarez, M.C. y Béjar, J. (2006). **Cloning and expression analysis of Mx cDNA from Senegalese sole (*Solea senegalensis*)**. Fish & Shellfish Immunology 21: 577-582.
- Fernández-Trujillo, A., Ferro, P., Garcia-Rosado, E., Infante, C., Alonso, M.C., Bejar, J., Borrego, J.J. y Manchado, M. (2008). **Poly I:C induces Mx transcription and promotes an antiviral state against sole aquabirnavirus in the flatfish Senegalese sole (*Solea senegalensis* Kaup)**. Fish & Shellfish Immunology 24: 279-285.
- Flajnik, M.F. y Du Pasquier, L. (2004). **Evolution of innate and adaptive immunity: can we draw a line?**. Trends in Immunology 25: 640-644.
- Fletcher, T.C. (1981). **Non-antibody molecules and the defence mechanisms of fish**. En: Pickering, A.D. (Ed.). Stress and Fish, Academic Press, London 171-183.
- Foss, G.S. (2003). Regulation of DNA vaccines and gene therapy on animals. The Norwegian Biotechnology Advisory Board,
http://www.bion.no/publikasjoner/regulation_of_DNA_vaccines.pdf
- Fouz, B., Toranzo, A.E., Marco-Noales, E. y Amaro, C. (1998). **Survival of fish-virulent strains of *Photobacterium damsela* subsp. *damsela* in seawater under starvation conditions**. FEMS Microbiology Letters 168: 181-186.
- Francki, R.I.B., Fauquet, C.M., Knudson, D.L. y Brown, F. (1991). **Classification and Nomenclature of Viruses. Fifth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses**. Archives of Virology 2: 372-374.

- Frerichs, G.N. (1990). **Efficacy of chemical disinfectants against snakehead rhabdovirus.** Journal of Applied Ichthyology 6: 117-123.
- Frerichs, G.N., Tweedie, A., Starkey, W.G. y Richards, R.H. (2000). **Temperature, pH and electrolyte sensitivity, and heat, UV and disinfectant inactivation of sea bass (*Dicentrarchus labrax*) neuropathy nodavirus.** Aquaculture 185: 13-24.
- Frøystad, M.K., Rode, M., Berg, T. y Gjøen, T. (1998). **A role for scavenger receptors in phagocytosis of protein-coated particles in rainbow trout head kidney macrophages.** Development & Comparative Immunology 22: 533-549.
- Fujihara, M., Muroi, M., Tanomoto, K., Suzuki, T., Azuma, H. e Ikeda, H. (2003). **Molecular mechanisms of macrophage activation and deactivation by lipopolysaccharide. Roles of the receptor complex.** Pharmacology & Therapeutics 100: 171-194.
- Furushita, M., Shiba, T., Maeda, T., Yahata, M., Kaneoka, A. y Takahashi, Y. (2003). **Similarity of Tetracycline resistance genes isolated from fish farm bacteria to those from clinical isolates.** Applied & Environmental Microbiology 69: 5336-5342.
- G**alindo-Villegas, J. y Hosokawa, H. (2005). **Immunostimulants in marine fish diets.** International Aqua Feed 8: 30-39.
- Ganassin, R.C. y Bols, N.C. (1996). **Development of long-term rainbow trout spleen cultures that are haemopoietic and produce dendritic cells.** Fish & Shellfish Immunology 6: 17-34.
- Garver, K.A., LaPatra, S.E. y Kurath, G. (2005). **Efficacy of an infectious hematopoietic necrosis (IHN) virus DNA vaccine in Chinook *Oncorhynchus tshawytscha* and *O. nerka* salmon.** Diseases of Aquatic Organisms 64: 13-22.

- Gauthier, G., Lafay, B., Ruimy, R., Breittmayer, V., Nicolas, J.L., Gauthier, M. y Christen, R. (1994). **Phylogenetic analysis and assessment of the genera *Vibrio*, *Photobacterium*, *Aeromonas*, and *Plesiomonas* deduced from small-subunit rRNA sequences.** International Journal of Systematic Bacteriology 44: 416-426.
- Gauthier, G., Lafay, B., Ruimy, R., Breittmayer, V., Nicolas, J.L., Gauthier, M. y Christen, R. (1995). **Small-subunit rRNA sequences and whole DNA relatedness concurs for the reassignment of *Pasteurella piscicida* (Sniezko *et al.*) Janssen and Surgalla to the genus *Photobacterium* as *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* comb. nov.** International Journal of Systematic Bacteriology 45: 139-144.
- Gauthier, M.J., Munro, P.M. y Breittmayer, V.A. (1988). **Damage to surface colonisation factors of enteric adhesive *Escherichia coli* for starvation in seawater.** Microbios Letter 38: 37-45.
- Gierer, W., Rabsch, W. y Reissbrodt, R. (1992). **Siderophore pattern of fish-pathogenic *Vibrio anguillarum*, *Aeromonas* spp. and *Pseudomonas* spp. from the German Baltic coast.** Journal of Fish Diseases 15: 417-423.
- Georgopoulou, U. y Vernier, J.M. (1986). **Local immunological response in the posterior intestinal segment of the rainbow trout after oral administration of macromolecules.** Development & Comparative Immunology 10: 529-537.
- Glazebrook, J.S., Heasman, M.P. y de Beer, S.W. (1990). **Picorna-like virus particles associated with mass mortalities in larval barramundi, *Lates calcarifer* Bloch.** Journal of Fish Diseases 13: 245-249.
- Goetz, F.W., Iliev, D.B., McCauley, L.A.R., Liarte, C.Q., Tort, L.B. y Planas, J.V. (2004). **Analysis of genes isolated from lipopolysaccharide- stimulated rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) macrophages.** Molecular Immunology 41: 1199-1210.

- Gómez, D.K., Baeck, G.W., Kim, J.H., Choresca, C.H. y Park, S.C. (2008). **Molecular detection of betanodavirus from apparently healthy wild marine invertebrates.** Journal of Invertebrate Pathology 97: 197-202.
- Gómez-León, J., Vilamil, L., Lemos, M.L., Novoa, B. y Figeras, A. (2005). **Isolation of *Vibrio alginolyticus* and *Vibrio splendidus* from aquacultured carpet Shell clam (*Ruditapes decussates*) larvae associated with mass mortalities.** Applied & Environment Microbiology 71: 98-104.
- Goodbourn, S., Didcock, L. y Randall, R.E. (2000). **Interferons: cell signaling, immune modulation, antiviral response and virus countermeasures.** Journal of General Virology 81: 2341-2364.
- Graham, S. y Secombes, C.J. (1990). **Do fish lymphocytes secrete interferon-gamma?.** Journal of Fish Biology 36: 563-573.
- Gravell, M. y Malsberger, R.G. (1965). **A permanent cell line from the Fathead Minnow (*Pimephales promelas*).** Annals of the New York Academy of Sciences 126: 555-565.
- Gregoriadis, G. (1998). **Genetic vaccines: strategies for optimization.** Pharmaceutical Research 15: 661-670.
- Gronow, S. y Brade, H. (2001). **Lipopolysaccharide biosynthesis: which steps do bacteria need to survive?.** Journal of Endotoxin Research 7: 3-23.
- Grotmol, S., Nerland, A.H., Biering, E., Totland, G.K. y Nishizawa, T. (2000). **Characterization of the capsid protein gene from a nodavirus strain affecting the Atlantic halibut *Hippoglossus hippoglossus* and design of an optimal reverse-transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR) detection assay.** Diseases of Aquatic Organisms 39: 79-88.
- Gruner, E., von Graevenitz, A. y Altwegg, A. (1992). **The APY ZYM system: a tabulated review from 1977 to date.** Journal of Microbiology Methods 16: 101-118.

Gudding, R., Lillehaug, A. y Evensen, Ø. (1999). **Recent developments in fish vaccinology.** Veterinary of Immunology & Immunopathology 72: 203-212.

Gutenberger, S.K., Duimstra, J.R., Rohovec, J.S. y Fryer, J.L. (1997). **Intracellular survival of *Renibacterium salmoninarum* in trout mononuclear phagocytes.** Diseases of Aquatic Organisms 28: 93-106.

Haller, O., Frese, M. y Kochs, G. (1998). **Mx proteins: mediators of innate resistance to RNA viruses.** Revue Scientifique et Technique de L'office International des Epizooties 17 : 220-230.

Haller, O. y Kochs, G. (2002). **Interferon-induced Mx proteins: dynamin-like GTPases with antiviral activity.** Traffic 3: 710-717.

Haller, O., Stertz, S. y Kochs, G. (2007). **The Mx GTPase family of interferon-induced antiviral proteins.** Microbes & Infection 9: 1636-1643.

Hansen, G.H. y Olafsen, J.A. (1999). **Bacterial interactions in early life stages of marine cold water fish.** Microbial Ecology 38: 1-26.

Håstein, T., Hill, B.J. y Winton, J. (1999). **Successful aquatic animal disease emergencies program.** Scientific and Technical Review of the Office International des Epizooties 18: 214-227.

Haugland, O., Torgersen, J., Syed M. y Evensen, O. (2005). **Expression profiles of inflammatory and immune-related genes in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) at early time post vaccination.** Vaccine 23: 5488-5499.

Hedge, A., Teh, H.C., Lam, T.J. y Sin, Y.M. (2003). **Nodavirus infection in freshwater ornamental fish, guppy, *Poecilia reticulata*, comparative characterization and pathogenicity studies.** Archives of Virology 148: 575-586.

Bibliografía

- Heidelberg, J.F., Shahamat, M., Levin, M., Rahman, I., Stelma, G., Grim, C. y Colwell, R.R. (1997). **Effect of aerosolization on culturability and viability of gram-negative bacteria.** *Applied & Environment Microbiology* 63: 3585-3588.
- Henricson, B.E., Neta, R. y Vogel, S.N. (1991). **An interleukin-1 receptor antagonist blocks lipopolysaccharide-induced colony-stimulating factor production and early endotoxin tolerance.** *Infection & Immunity* 59: 1188-1191.
- Heppell, J., Lorenzen, N., Armstrong, N.K., Wu, T., Lorenzen, E. y Einer-Jensen, K. (1998). **Development of DNA vaccines for fish: vector design, intramuscular injection and antigen expression using viral haemorrhagic septicaemia virus.** *Fish & Shellfish Immunology* 8: 271-286.
- Heppell, J. y Davis, H.L. (2000). **Application of DNA vaccine technology to aquaculture.** *Advances in Drug Delivery Review* 43: 29-43.
- Hernández, E., Figueroa, J. e Iregui, C. (2008). **Streptococcosis on a red tilapia (*Oreochromis spp.*) fish-farm: Case study.** *Journal of Fish Diseases* 32: 247-252.
- Herraez, M.P. y Zapata, A.G. (1986). **Structure and function of the melanomacrophage centres of the goldfish *Carassius auratus*.** *Veterinary of Immunology & Immunopathology* 12: 117-126.
- Hine, P.M. (1992). **The granulocytes of fish.** *Fish & Shellfish Immunology* 2: 79-98.
- Hirono, I., Nam, B.H., Kurobe, T. y Aoki, T. (2000). **Molecular cloning, characterization, and expression of TNF cDNA and gene from Japanese flounder *Paralichthys olivaceus*.** *Journal of Immunology* 165: 4423-4427.
- Hirono, I., Takami, M., Miyata, M., Miyazaki, T., Han, H.J. y Takano, T. (2004). **Characterization of gene structure and expression of two toll-like receptors from Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus*.** *Immunogenetics* 56: 38-46.

- Hjelmeland, K. (1983). **Proteinase inhibitors in the muscle and serum of cod (*Gadus morhua*). Isolation and characterization.** Comparative Biochemistry & Physiology B 76: 365-372.
- Hjeltnes B. y Roberts R.J. (1993). **Vibriosis.** En: Roberts R.J. y Bromage N.R. (Eds) Bacterial Diseases of Fish. Halsted Press, New York. pp: 109-121.
- Holmström, K., Gräslund, D., Wahlström, A., Pongshompoo, S., Bengtsson, B-E. y Kautsky, N. (2003). **Antibiotic use in shrimp farming and implications for environmental impacts and human health.** International Journal of Food Science and Technology 38: 255-266.
- Hong, H., Patel, D.R., Tamm, L.K. y van den Berg, B. (2006). **The outer membrane protein OmpW forms an eight-stranded β -barrel with a hydrophobic channel.** Journal of Biological Chemistry 281: 7568-7577.
- Honn, K.V. y Chavin, W. (1976). **Utility of ozone treatment in the maintenance of water quality in a closed marine system.** Marine Biology 34: 201-209.
- Honghong, H., Qiyao, W., Lili, S., Qin, L. y Yuanxing, Z. (2011). **Functional characterization of *Vibrio alginolyticus* twin-arginine translocation system: its roles in biofilm formation, extracellular protease activity and virulence towards fish.** Current Microbiology (in press). DOI 10.1007/s00284-010-9844-6.
- Hou, J-H., Zhang, W-W. y Sun, L. (2009). **Immunoprotective analysis of two *Edwardsiella tarda* antigens.** Journal of General & Applied Microbiology 55: 57-61.
- http://www.fosterandsmithaquatics.com/images/articles/tfh_velvet.jpg
- http://www.liveaquaria.com/images/articles/tfh_ich_fish.jpg
- <http://www.lsc.usgs.gov/FHB/leaflets/FHB66.pdf>
- <http://www.merckvetmanual.com/mvm/servlet/CVMHighLight?file=htm/bc/exlfh15.htm&word=Amyloodinium,ocellatum>

Bibliografía

<http://www.revista.unam.mx/vol.6/num4/art36/int36.htm>

<http://www.scielo.org.ve/img/fbpe/rsvm/v23n2/image101.jpg>

http://www.vetcare.gr/pics_myxidiosis_lesions.htm

http://www.vetcare.gr/pics_vibriosis_lesions.htm

http://www.vetcare.gr/SIPI_presentation.htm#Important

Huang, B., Tan, C., Chang, S.F., Munday, B., Mathew, J.A., Ngoh, G.H. y Kwang, J. (2001). **Detection of nodavirus in barramundi, *Lates calcarifer* (Bloch), using recombinant coat proteinbased ELISA and RT-PCR.** Journal of Fish Diseases 24: 135-141.

Huntly, P.J., Coleman, G. y Munro, A.L.S. (1992). **The nature of the lethal effect on Atlantic salmon, *Salmo salar* L., of a lipopolysaccharide-free phospholipase activity isolated from the extracellular products of *Aeromonas salmonicida*.** Journal of Fish Diseases 15: 99-102.

Huq, A. y Colwell, R.R. (1995). **A microbiological paradox: viable but non-culturable bacteria with special reference to *Vibrio cholerae*.** Journal of Food Protection 59: 96-101.

Husgard, S., Grotmol, S., Hjeltnes, B.K., Rodseth, O.M. y Biering, E. (2001). **Immune response to a recombinant capsid protein of striped jack nervous necrosis virus (SJNNV) in turbot, *Scophthalmus maximus*, and Atlantic halibut, *Hippoglossus hippoglossus*, an evaluation of a vaccine against SJNNV.** Diseases of Aquatic Organisms 45: 33-44.

Chino, M., Mor, G., Conover, J., Weiss, W.R., Takeno, M. e Ishii, K.J. (1999). **Factors associated with the development of neonatal tolerance after the administration of a plasmid DNA vaccine.** Journal of Immunology 162: 3814-3818.

- Iliev, D., Liarte, C., Mackenzie S. y Goetz, F. (2005a). **Activation of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) mononuclear phagocytes by different pathogen associated molecular pattern (PAMP) bearing agents.** *Molecular Immunology* 42: 1215-1223.
- Iliev, D., Roachb, J.C., Mackenziec, S., Planasd, J. y Frederick, W. (2005b). **Endotoxin recognition: In fish or not in fish?** *FEBS Letter.* 579: 6519-6528.
- Igawa, D., Sakai, M. y Savan, R. (2006). **An unexpected discovery of two interferon gamma-like genes along with interleukin (IL)-22 and -26 from teleost: IL-22 and -26 genes have been described for the first time outside mammals.** *Molecular Immunology* 43: 999-1009.
- Inamura, H., Muroga, K. y Nakai, T. (1984). **Toxicity of extracellular products of *Vibrio anguillarum*.** *Fish Pathology* 19: 89-96.
- Ingerslev, H.C., Rønneseth, A., Pettersen, E.F. y Wergeland, H.I. (2009). **Differential expression of immune genes in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) challenged intraperitoneally or by cohabitation with IPNV.** *Scandinavian Journal of Immunology* 69: 90-98.
- Ingram, G.A. (1980). **Substances involved in the natural resistance of fish to infection – a review.** *Journal of Fish Biology* 16: 23-60.
- Isaacs, A. y Lindenmann, J. (1957). **Virus interference I. The interferon.** *Proceedings of the Royal Society of Lond* 147: 258-267.
- Iwamoto, T., Mori, K., Arimoto, M. y Nakai, T. (1999). **High permissivity of the fish cell line SSN-1 for piscine nodaviruses.** *Diseases of Aquatic Organisms* 39: 37-47.
- Jacobs, B.L. y Langland, J.O. (1996). **When two stands are better than one: the mediators and modulators of the cellular responses to double-stranded RNA.** *Virology* 219: 339-349.

- Jacques, M. (1996). **Role of lipo-oligosaccharides and lipopolysaccharides in bacterial adherence.** Trends in Microbiology 4: 408-410.
- JACUMAR. http://www.mapa.es/es/pesca/pags/jacumar/presentacion/acuicultura_es.htm
- Janeway, C. (1989). **Immunogenicity signals 1, 2, 3, ... and 0.** Immunology Today 10: 283-286.
- Jang, S.I., Hardie, L.J. y Secombes, C.J. (1995). **Elevation of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* macrophage respiratory burst activity with macrophage-derived supernatants.** Journal of Leukocyte Biology 57: 943-947.
- Janssen, W.A. y Surgalla, M.J. (1968). **Morphology, physiology, and serology of a Pasteurella species pathogenic for white perch (*Roccus americanus*).** Journal of Bacteriology 96: 1606-1610.
- Jeney, Z., Jeney, G. y Maule, A.G. (1992). **Cortisol measurements in Fish.** En: Stolen, J.S., Fletcher, T.C., Anderson, D.P., Kaatari, S.L. y Rowley, A.F. (Eds.). Techniques in Fish Immunol, SOS Publications, N.J. USA. 2: 157-166.
- Jensen, B.S., Strobaek, D., Christophersen, P., Jorgensen, T.D., Hansen, C., Silaharoglu, A., Olesen, S.P. y Ahring, P.K. (1998). **Characterization of the cloned human intermediate-conductance Ca^{2+} -activated K^+ channel.** American Journal of Physiology & Cell Physiology 44, pp. C848-C856.
- Jensen, I. y Robertsen, B. (2002). **Effect of double-stranded RNA and interferon on the antiviral activity of Atlantic salmon cells against infectious salmon anemia virus and infectious pancreatic necrosis virus.** Fish & Shellfish Immunology 13: 221-241.
- Jensen, I., Albuquerque, A., Sommer, A.-I. y, Robertsen, B. (2002). **Effect of poly I:C on the expression of Mx proteins and resistance against infection by infectious salmon anaemia virus in Atlantic salmon.** Fish & Shellfish Immunology 13: 311-326.

- Jensen, V y Robertsen, B. (2000). **Cloning of a Mx cDNA from Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*) and characterization of Mx mRNA expression after treatment of halibut with double-stranded RNA or infectious pancreatic necrosis virus.** Journal of Interferon Cytokine Research 20: 701-710.
- Johansen, A., Collet, B., Sandaker, E., Secombes, C.J. y Jørgensen, J.B. (2004). **Quantification of Atlantic salmon type-I interferon using an Mx1 promoter reporter gene assay.** Fish & Shellfish Immunology 16: 173-184.
- Jørgensen, J.B., Lunde, H. y Robertsen, B. (1993). **Peritoneal and head kidney cell response to intraperitoneally injected yeast glucan in Atlantic salmon, *Salmo salar* L.** Journal of Fish Diseases 16: 313-325.
- Jørgensen, J.B., Johansen, A., Stenersen, B. y Sommer, A.I. (2001). **CpG oligodeoxynucleotides and plasmid DNA stimulate Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) leucocytes to produce supernatants with antiviral activity.** Developmental & Comparative Immunology 25: 313-321.
- Jørgensen, J.B., Johansen, A., Hegseth, M.N., Zou, J., Robertsen, B. y Collet, B. (2007). **A recombinant CHSE-214 cell line expressing an Mx1 promoter reporter system responds to both interferon type I and type II from salmonids and represents a versatile tool to study the IFN-system in teleost fish.** Fish & Shellfish Immunology 23: 1294-1303.
- Jørgensen, P.E.V. (1973). **Inactivation of IPN and Egtved virus.** Revista Italiana di Piscicoltura e Ittioppawhgia 8: 107-108.
- Joseph, S.W., DeBell, R.M. y Brown, P. (1978). **In vitro response to chloramphenicol, tetracycline, ampicillin, gentamicin, an beta-lactamase production by halophilic vibrios from human and environmental sources.** Antimicrobial Agents & Chemotherapy 13: 244-248.

- Joseph, S.W., Colwell, R.R. y Kaper, J.B. (1983). ***Vibrio parahaemolyticus* and related halophilic vibrios**. Critical Reviews in Microbiology 10: 77-124.
- Jung, T.S., Thompson, K.D. y Adams, A. (2001). **A comparison of sialic acid between different isolates of *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida***. Fish Pathology 36: 217-224.
- Jung, T.S., Thompson, K.D., Volpatti, D., Galeotti, M. y Adams A. (2008). **In vivo morphological and antigenic characteristics of *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida***. Journal of Veterinary Science 9: 169-175.
- Kaisho, T y Akira, S. (2001). **Bug detectors**. Nature 414: 701-702.
- Kajita, Y., Sakai, M., Atsuta, S. y Kobayashi, M. (1990). **The immunomodulatory effects of levamisole on rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss***. Fish Pathology 25: 93-98.
- Kajita, Y., Sakai, M., Kobayashi, M. y Kawauchi, H. (1992). **Enhancement of non-specific cytotoxic activity of leucocytes in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* injected with growth hormone**. Fish & Shellfish Immunology 2: 155-157.
- Kanellos, T., Sylvester, I.D., D’Mello, F., Howard, C.R., Mackie, A. y Dixon, P.F. (2006). **DNA vaccination can protect *Cyprinus carpio* against spring viraemia of carp virus**. Vaccine 24: 4927-4933.
- Kawai, K., Liu, Y., Ohnishi, K. y Oshima, S. (2004). **A conserved 37 kDa outer membrane protein of *Edwardsiella tarda* is an effective vaccine candidate**. Vaccine 22: 3411-3418.
- Kelly, R.K. y Loh, P.C. (1973). **Some properties of an established fish cell line from *Xiphophorus helleri* (red swordtail)**. In Vitro 9:73-80.
- Kibenge, M., Munir, K. y Kibenge, S.B. (2005). **Constitutive expression of Atlantic salmon Mx1 protein in CHSE-214 cells confers resistance to infectious salmon anaemia virus**. Virology Journal 2: 75-81.

- Kileng, O., Brundtland, M.I. y Robertsen, B. (2007). **Infectious salmon anemia virus is a powerful inducer of key genes of the type I interferon system of Atlantic salmon, but is not inhibited by interferon.** *Fish & Shellfish Immunology* 23: 378-389.
- Kim, C.H., Johnson, M.C., Drennan, J.D., Simon, B.E., Thomann, E. y Leong, J.A. (2000). **DNA vaccines encoding viral glycoproteins induce nonspecific immunity and Mx protein synthesis in fish.** *Journal of Virology* 74: 7048-7054.
- Kim, Y., Okuda, J., Matsumoto, C., Takahashi, N., Hashimoto, S. y Nishibuchi, M. (1999). **Identification of *Vibrio parahaemolyticus* strains at the species level by PCR targeted to the *toxR* gene.** *Journal of Clinical Microbiology* 37: 1173-1177.
- Kimura, M. y Kitao. T. (1971). **On the etiological agent of "bacterial tuberculosis" of *Seriola*.** *Fish Pathology* 6: 8-14.
- Kitao, T. y Yoshida, T. (1986). **Effect of an immunopotentiator on *Aeromonas salmonicida* infection in rainbow trout *Salmo gairdneri*.** *Veterinary of Immunology & Immunopathology* 12: 287-291.
- Klesius, P., Shoemaker, A. y Evans, J. (2000). **Efficacy of single and combined *Streptococcus iniae* isolate vaccine administered by intraperitoneal and intramuscular routes in tilapia (*Oreochromis niloticus*).** *Aquaculture* 188: 237-246.
- Klesius, P., Evans, J. y Shoemaker, C. (2004). **Warmwater fish vaccinology in catfish production.** *Animal Health Research Review* 5: 305-311.
- Klinman, D.M., Yi, A.K., Beaucage, S.L., Conover, J. y Krieg, A.M. (1996). **CpG motifs present in bacterial DNA rapidly induce lymphocytes to secrete interleukin 6, interleukin 12, and interferon gamma.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93: 2879-2883.
- Kodama, H., Mukamoto, M., Baba, T. y Mule, D.M. (1994). **Macrophage stimulating activity in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) serum.** En: Stolen, J. y Fletcher, T.C., editors. *Modulation of fish immune response.* Fair Haven NJ: SOS publication. pp: 59-66.

- Koike, Y., Kuwahara, A. y Fujiwara, H. (1975). **Characterization of *Pasteurella piscicida* isolated from white perch and cultivated yellowtail.** Japan Journal of Microbiology 19: 241-247.
- Korsnes, K., Devold, M., Nerland, A.H. y Nylund, A. (2005). **Viral encephalopathy and retinopathy (VER) in Atlantic salmon, *Salmo salar*, after intraperitoneal challenge with a nodavirus from Atlantic halibut, *Hippoglossus hippoglossus*.** Diseases of Aquatic Organisms 68: 7-15.
- Koyama, S., Sato, E., Nomura, H., Kubo, K., Miura, M. y Yamashita, T. (2000). **The potential of various lipopolysaccharides to release IL-8 and G-CSF.** American Journal of Physiology Lung Cell Molecular Physiology 278: 658-666.
- Krieg, A.M., Yi, A.K., Matson, S., Waldschmidt, T.J., Bishop, G.A. y Teasdale, R. (1995). **CpG motifs in bacterial DNA trigger direct B-cell activation.** Nature 374: 546-549.
- Krieg, A.M. (2002). **CpG motifs in bacterial DNA and their immune effects.** Annual Review of Immunology 20: 709-760
- Kumar, S.R., Parameswaran, V., Ahmed, V.P., Musthaq, S.S. y Hameed, A.S. (2007). **Protective efficiency of DNA vaccination in Asian Seabass (*Lates calcarifer*) against *Vibrio anguillarum*.** Fish & Shellfish Immunology 23: 316-326.
- Kunttu, H.M.T., Valtonen, E.T., Suomalainen, L-R., Vielma, J. y Jokinen, I. (2009). **The efficacy of two immunostimulants against *Flavobacterium columnare* infection in juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*).** Fish & Shellfish Immunology 26: 850-857.
- Kurath, G. (2005). **Overview of recent DNA vaccine development for fish.** Developmental Biology (Basel) 121: 201-213.
- Kurath, G., Garver, K.A., Corbeil, S., Elliott, D.G., Anderson, E.D. y LaPatra, S.E. (2006). **Protective immunity and lack of histopathological damage two years after DNA vaccination against infectious hematopoietic necrosis virus in trout.** Vaccine 24: 345-354.

- Kurupati, P., The, B.K., Kumarasinghe, G. y Poh, C.L. (2006). **Identification of vaccine candidate antigens of an ESBL producing *Klebsiella pneumoniae* clinical strain by immunoproteome analysis.** *Proteomics* 6: 836-844.
- Kusuda, R. y Yamaoka, M. (1972). **Etiological studies on pseudotuberculosis in cultured yellowtail with *Pasteurella piscicida* as the causative agent. I. On the morphological and biochemical properties.** *Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries* 38: 1325-1332.
- Kusuda, R., Kawai, K. y Matsui, M. (1978). **Etiological studies on bacterial pseudotuberculosis in cultured yellowtail with *Pasteurella piscicida* as the causative agent. II. On the serological properties.** *Fish Pathology* 13: 79-83.
- Kwon, S.R., Nam, Y.K., Kim, S.K. y Kim, K.H. (2006). **Protection of tilapia (*Oreochromis mosambicus*) from edwardsiellosis by vaccination with *Edwardsiella tarda* ghosts.** *Fish & Shellfish Immunology* 20: 621-626.
- LaPatra, S.E., Corbeil, S., Jones, G.R., Shewmaker, W.D. y Kurath, G. (2000). **The dose-dependent effect on protection and humoral response to a DNA vaccine against Infectious Hematopoietic Necrosis (IHN) Virus in subyearling rainbow trout.** *Journal of Aquatic Animal Health* 12: 181-188.
- LaPatra, S.E., Corbeil, S., Jones, G.R., Shewmaker, W.D., Lorenzen, N. y Anderson, E.D. (2001). **Protection of rainbow trout against infectious hematopoietic necrosis virus four days after specific or semi-specific DNA vaccination.** *Vaccine* 19: 4011-4019.
- Larsen, R., Rokenes, T.P. y Robertsen, B. (2004). **Inhibition of infectious pancreatic necrosis virus replication by Atlantic salmon Mx1 protein.** *Journal of Virology* 78: 7938-7944.
- Lau, J.F. y Horvath, C.M. (2002). **Mechanisms of type 1 interferon cell signaling and STATmediated transcriptional responses.** *Mount Sinai Journal of Medicine* 69: 156-168.

- Le Breton, A., Grisez, L., Sweetman, J. y Ollevier, F. (1997). **Viral nervous necrosis (VNN) associated with mass mortalities in cage-reared sea bass, *Dicentrarchus labrax***. Journal of Fish Diseases 20: 145-151.
- Le Morvan, C., Troutaud, D. y Deschaux, P. (1998). **Differential effects of temperature on specific and nonspecific immune defences in fish**. Journal of Experimental Biology 201: 165-168.
- Lee, J.Y., Hirono, I. y Aoki, T. (2000). **Cloning and analysis of expression of Mx cDNA in Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus***. Development & Comparative Immunology 24: 407-415.
- Lee, K.K. y Ellis, A.E. (1991). **Susceptibility of salmonid erythrocytes to lysis by bacterial lipopolysaccharides**. Journal of Fish Diseases 14: 461-465.
- Lee, K.K. (1995). **Pathogenesis studies on *Vibrio alginolyticus* in the grouper, *Epinephelus malabaricus* Bloch et Scheider**. Microbial Pathogenesis 19: 39-48.
- Lee, S.H. y Vidal, S.M. (2002). **Functional diversity of Mx proteins: variations on a theme of host resistance to infection**. Genome Research 12: 527-530.
- Lemos, M.L., Salinas, P., Toranzo, A.E., Barja, J.L. y Crosa, J.H. (1988). **Chromosome-mediated iron uptake system in pathogenic strains of *Vibrio anguillarum***. Journal of Bacteriology 170: 1920-1925.
- Leong, J.C. y Fryer, J.L. (1993). **Viral vaccines for Aquaculture**. Annual Review of Fish Diseases 3: 225-240.
- Leong, J.C., Trobridge, G.D., Kim, C.H.Y., Johnson, M. y Simon, B. (1998). **Interferon-inducible Mx proteins in fish**. Immunology Review 166: 349-363.
- Levy, S.B. (1994). **Balancing the drug-resistance equation**. Trends in Microbiology. 2: 341-342.

- Li, H., Ye, M.Z., Peng, B., Wu, H.K., Xu, C.X., Xiong, X.P., Wang, C., Wang, S.Y. y Peng, X.X. (2010). **Immunoproteomic identification of polyvalent vaccine candidates from *Vibrio parahaemolyticus* outer membrane proteins.** Journal of Proteome Research 9: 2573-2583.
- Lin, C.H., John, J.A.C., Lin, C.H. y Chang, C.Y. (2006). **Inhibition of nervous necrosis virus propagation by fish Mx proteins.** Biochemical & Biophysical Research Communications 351: 534-549.
- Lin, S., Davidson, G., Secombes, C. y Ellis, A. (2000). **Use of an emulsion lipid emulsion carrier for the immunization of dab (*Limanda limanda*) by bath and oral routes: an assessment of systemic and mucosal antibody responses.** Aquaculture 181: 11-24.
- Linnerborg, M., Widmalm, G., Mahbubur-Rahman, M., Jansson, P.E., Holme, T., Qadri, F. y Albert, J.M. (1996). **Structural studies of the O-antigenic polysaccharide from an *Aeromonas caviae* strain.** Carbohydrate Research 291: 165-174.
- Lipford, G.B., Heeg, K. y Wagner, H. (1998). **Bacterial DNA as immune cell activator.** Trends in Immunology 6: 496-500.
- Liu, C.H., Cheng, W. y Hsu, J.P. (2004). ***Vibrio alginolyticus* infection in the white shrimp *Litopenaeus vannamei* confirmed by polymerase chain reaction and 16S rDNA sequencing.** Diseases of Aquatic Organism 61: 169-174.
- Liu, P.C., Lin, J.Y., Hsiao, P.T. y Lee, K.K. (2004). **Isolation and characterization of pathogenic *Vibrio alginolyticus* from diseased cobia *Rachycentron canadum*.** Journal of Basic Microbiology 44: 23-28.
- Lockhart, K., Bowden, T.J. y Ellis, A.E. (2004). **Poly I:C induced Mx responses in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) parr, post-smolts and growers.** Fish & Shellfish Immunology 17: 245-254.

- Lockhart, K., McBeath, A.J.A., Collet, B., Snow, M. y Ellis, A.E. (2007). **Expression of Mx mRNA following infection with IPNV is greater in IPN-susceptible Atlantic salmon post-smolts than in IPN-resistant Atlantic salmon parr.** *Fish & Shellfish Immunology* 22: 151-156.
- Lodemel, J., Mayhew, T., Myklebust, R., Olsen, R., Espelid, S. y Ringø, E. (2001). **Effect of three dietary oils on disease susceptibility in Arctic charr (*Salvelinus alpinus* L.) during cohabitant challenge with *Aeromonas salmonicida* spp. salmonicida.** *Aquaculture Research* 32: 935-945.
- Lorenzen, E., Einer-Jensen, K., Martinussen, T., LaPatra, S.E. y Lorenzen, N. (2000). **DNA vaccination of rainbow trout against viral hemorrhagic septicaemia virus: A dose-response and time-course study.** *Journal of Aquatic Animal Health* 12: 167-180.
- Lorenzen, N. y Olesen, N.J. (1997). **Immunization with viral antigens: Viral haemorrhagic septicaemia.** *Developments in Biological Standardization* 90: 201-209.
- Lorenzen, N., Lorenzen, E., Einer-Jensen, K., Heppell, J., Wu, T. y Davis, H. (1998). **Protective immunity to VHS in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) following DNA vaccination.** *Fish & Shellfish Immunology* 8: 261-270.
- Lorenzen, N., Lorenzen, E., Einer-Jensen, K., Heppell, J. y Davis, H.L. (1999). **Genetic vaccination of rainbow trout against viral haemorrhagic septicaemia virus: small amounts of plasmid DNA protect against a heterologous serotype.** *Virus Research* 63: 19-25.
- Lorenzen, N., Lorenzen, E. y Einer-Jensen, K. (2001). **Immunity to viral haemorrhagic septicaemia (VHS) following DNA vaccination of rainbow trout at an early life-stage.** *Fish & Shellfish Immunology* 11: 585-591.
- Lorenzen, N., Lorenzen, E., Einer-Jensen, K. y Lapatra, S.E. (2002a). **DNA vaccines as a tool for analysing the protective immune response against rhabdoviruses in rainbow trout.** *Fish & Shellfish Immunology* 12: 439-453.

- Lorenzen, N., Lorenzen, E., Einer-Jensen, K. y LaPatra, S.E. (2002b). **Immunity induced shortly after DNA vaccination of rainbow trout against rhabdoviruses protects against heterologous virus but not against bacterial pathogens.** *Developmental & Comparative Immunology* 26: 173-179.
- Luo, X.C.; Xie, M.Q., Zhu, X.Q. y Li A.X. (2007). **Protective immunity in grouper (*Epinephelus coioides*) following exposure to or infection with *Cryptocaryon irritans*.** *Fish & Shellfish Immunology* 22: 427-432.
- Lutfalla, G., Crollius, H.R., Stange-Thomann, N., Jaillon, O., Mogensen, K. y Monneron, D. (2003). **Comparative genomic analysis reveals independent expansion of a lineage-specific gene family in vertebrates: the class II cytokine receptors and their ligands in mammals and fish.** *BMC Genomics* 4: 29.
- MacArthur, J.L., Thomson, A.W. y Fletcher, T.C. (1985). **Aspects of leucocyte migration in the plaice, *Pleuronectes platessa* L.** *Journal of Fish Biology* 27: 667-676.
- MacKenzie, S., Liarte, C., Iliev, D., Planas, J.V., Tort, L. y Goetz, F.W. (2004). **Characterization of a highly inducible novel CC chemokine from differentiated rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) macrophages.** *Immunogenetics* 56: 611-615.
- Magariños, B., Romalde, J., Byin, I., Fouz, B. y Toranzo, A.E. (1992). **Phenotypic, antigenic, and molecular characterization of *Pasteurella piscicida* strains isolated from fish.** *Applied & Environmental Microbiology* 58: 3316-3322.
- Magariños, B., Romalde, J.L., Lemos, M.L., Barja, J.L. y Toranzo, A.E. (1994). **Iron uptake by *Pasteurella piscicida* and its role in pathogenicity for fish.** *Applied & Environmental Microbiology* 60:2990-2998.
- Magariños, B., Toranzo, A.E. y Romalde, J.L. (1996). **Phenotypic and pathobiological characteristics of *Pasteurella piscicida*.** *Annual Review of Fish Diseases* 6: 41-64.

- Magnadóttir, B. (2006). **Innate immunity of fish (overview)**. Fish & Shellfish Immunology 20: 137-151.
- Mainwaring, G. y Rowley, A. (1985). **Studies on granulocytic heterogeneity in elasmobranchs**. En: Manning, M.J. y Tatner, M.F. Editors. Fish Immunology. Academic press London. pp: 57-69.
- Maione, D., Margarit, I., Rinaudo, C. D., Masignani, V. y Mora, M. (2005). **Identification of a universal group B *Streptococcus* vaccine by multiple genome screen**. Science 309: 148-150.
- MARM. (2008).
http://www.marm.es/app/JACUMAR%5C/datos_produccion/Documentos/produccion_engorde_2008.pdf
- Martínez, S.F., y Vélez, B.A. (2002). **Incidence of *Vibrio* during dermal and systemic infections of the spotted sand bass (*Paralabrax maculatofasciatus steindachneri*: 1068) in captivity**. Ciencias Marinas 28: 347-356.
- Martínez-Manzanares, E., Tapia-Paniagua, S.T., Díaz-Rosales, P., Chabrillón, M. y Moriñigo, M.A. (2008). **Susceptibility of *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* strains isolated from Senegalese sole, *Solea senegalensis* Kaup, and gilthead seabream, *Sparus aurata* L., to several antibacterial agents**. Journal of Fish Diseases 31: 73-76.
- Mazel, D. y Davies, J. (1999). **Antibiotic resistance in microbes**. Cellular and Molecular Life Sciences 56: 742-754.
- McBeath, A.J.A., Collet, B., Paley, R., Duraffour, S., Aspehaug, V. y Biering, E. (2006). **Identification of an interferon antagonist protein encoded by segment 7 of infectious salmon anaemia virus**. Virus Research 115: 176-184.

- McBeath, A.J.A., Snow, M., Secombes, C.J., Ellis, A.E. y Collet, B. (2007). **Expression kinetics of interferon and interferon-induced genes in Atlantic salmon (*Salmo salar*) following infection with infectious pancreatic necrosis virus and infectious salmon anaemia virus.** *Fish & Shellfish Immunology* 22: 230-241.
- McGuinness, D.H., Dehal, P.K. y Pleass, R.J. (2003). **Pattern recognition molecules and innate immunity to parasites.** *Trends in Parasitology* 15: 312-319.
- McLauchlan, P.E., Collet, B., Ingerslev, E., Secombes, C.J., Lorenzen, N. y Ellis, A.E. (2003). **DNA vaccination against viral haemorrhagic septicaemia (VHS) in rainbow trout: size, dose, route of injection and duration of protection** **dearly protection correlates with Mx expression.** *Fish & Shellfish Immunology* 15: 39-50.
- Medvedev, A.E., Kopydlowski, K.M. y Vogel, S.N. (2000). **Inhibition of lipopolysaccharide induced signal transduction in endotoxin-tolerized mouse macrophages: dysregulation of cytokine, chemokine, and toll-like receptor 2 and 4 gene expression.** *Journal of Immunology* 164: 5564-5574.
- Medzhitov, J.R. (2007). **Recognition of microorganisms and activation of the immune response.** *Nature* 449: 819-826.
- Meier, E., Kunz, G., Haller, O. y Arnheiter, H. (1990). **Activity of rat Mx proteins against a rhabdovirus.** *Journal of Virology* 64: 6263-6269.
- Merino, S., Camprubí, S. y Tomás, J. M. (1992). **Effect of growth temperature on outer membrane components and virulence of *Aeromonas hydrophila* strains of serotype O.34.** *Infection & Immunity* 60: 4343-4349.
- Merino, S., Aguilar, A., Rubires, X. y Tomás, J. M. (1998). **Mesophilic *Aeromonas* strains from different serogroups: the influence of growth temperature and osmolarity on lipopolysaccharide and virulence.** *Research in Microbiology* 149: 407-416.
- Midtlyng, P.J. (2005). **Critical assessment of regulatory standards and tests for fish vaccines.** *Developmental Biology Basel*. 121: 219-226.

- Mikalsen, A.B., Torgersen, J., Aleström, P., Hellemann, A.L., Koppang, E.O. y Rimstad, E. (2004). **Protection of Atlantic salmon *Salmo salar* against infectious pancreatic necrosis after DNA vaccination.** Diseases of Aquatic Organisms 60: 11-20.
- Mikalsen, A.B., Sindre, H., Torgersen, J. y Rimstad, E. (2005). **Protective effects of a DNA vaccine expressing the infectious salmon anemia virus hemagglutinin-esterase in Atlantic salmon.** Vaccine 23: 4895-4905.
- Milev-Milovanovic, I., Majji, S., Thodima, V., Deng, Y., Hanson, L., Arnizaut, A., Waldbieser, G. y Chinchar, V.G. (2009). **Identification and expression analyses of poly [I:C]-stimulated genes in channel catfish (*Ictalurus punctatus*).** Fish & Shellfish Immunology 26: 811-820.
- Miller, N.W. y Clem, L.W. (1984). **Temperature mediated processes in teleost immunity: differential effects of temperature on catfish *in vitro* antibody responses to thymusdependent and thymus-independent antigens.** Journal of Immunology 133: 2356-2359.
- Milton, D.L., Norqvist, A. y Wolf-Watz, H. (1992). **Cloning of a metalloprotease gene involved in the virulence mechanism of *Vibrio anguillarum*.** Journal of Bacteriology 174: 7235-7244.
- Minor, P.D. (1995). **Regulatory issues in the use of DNA vaccines.** Annals of the New York Academy of Sciences 772: 170-177.
- Miranda, C.D. y Rojas, R. (2007). **Occurrence of florfenicol resistance in bacteria associated with two Chilean salmon farms with different history of antibacterial usage.** Aquaculture 266: 39-46.
- Molitoris, E., Joseph, S.W., Krichevsky, M.I., Sindhuhardja, W. y Colwell, R.R. (1985). **Characterization and distribution of *Vibrio alginolyticus* and *Vibrio parahaemolyticus* isolated in Indonesia.** Applied and Environmental Microbiology 50: 1388-1394.

- Montero, D., Grasso, V., Izquierdo, M.S., Ganga, R., Real, F., Tort, L., Caballero, M.J. y Acosta, F. (2008). **Total substitution of fish oil by vegetable oils in gilthead sea bream (*Sparus aurata*) diets: Effects on hepatic Mx expression and some immune parameters.** Fish & Shellfish Immunology 24: 147-155.
- Montes, A., Figueras, A. y Novoa, B. (2010). **Nodavirus encephalopathy in turbot (*Scophthalmus maximus*): Inflammation, nitric oxide production and effect of anti-inflammatory compounds.** Fish & Shellfish Immunology 28: 281-288.
- Mor, G., Yamshchikov, G., Sedegah, M., Takeno, M., Wang, R. y Houghten, R.A. (1996). **Induction of neonatal tolerance by plasmid DNA vaccination of mice.** Journal of Clinical Investigation 98: 2700-2705.
- Mor, G. (1998). **Plasmid DNA: A new era in vaccinology.** Biochemical Pharmacology 55: 1151-1153.
- Mori, K., Nakai, T., Nagahara, M., Muroga, K., Mekuchi, T. y Kanno, T. (1991). **A viral disease in hatchery-reared larvae and juveniles of redspotted grouper.** Gyoby Kenkyu 26: 209-210.
- Mori, K., Nakai, T., Muroga, K., Arimoto, M., Mushiake, K. y Furusawa, I. (1992). **Properties of a new virus belonging to Nodaviridae found in larval striped jack (*Pseudocaranx dentex*) with nervous necrosis.** Virology 187: 368-371.
- Morrison, D. C., Silverstein, R., Luchi, M. y Shnyra, A. (1999). **Structure-function relationships of bacterial endotoxins. Contribution to microbial sepsis.** Infectious Diseases Clinics of North America 13: 313-340.
- Mulero, I., García-Ayala, A., Meseguer, J. y Mulero, V. (2007). **Maternal transfer of immunity and ontogeny of autologous immunocompetence of fish: A minireview.** Aquaculture 268: 244-250.
- Munday, B.L., Kwang, J. y Moody, N. (2002). **Betanodavirus infections of teleost fish: a review.** Journal of Fish Diseases 25: 127-142.

Munro, E.S., Gahlawat, S.K., Acosta, F. y Ellis, A.E. (2006). **In IPNV carrier Atlantic salmon post-smolts, almost all kidney macrophages ex vivo contain a low level of non-replicating virus.** Journal of Fish Diseases 29: 43-48.

Mushiake, K., Nishizawa, T., Nakai, T., Furusawa, I. y Muroga, K. (1994). **Control of VNN in striped jack: selection of spawners based on the detection of SJNNV gene by polymerase chain reaction (PCR).** Fish Pathology 29: 177-182.

Mushtaq, S., Ge, Y. y Livermore, D.M. (2004). **Doripenem versus *Pseudomonas aeruginosa* in vitro: activity against characterized isolates, mutants, and transconjugants and resistance selection potential.** Antimicrobial Agents & Chemotherapy 8: 3086-3092.

Nandi, B., Nandy, R.K., Mukhopadhyay, S., Nair, G.B., Shimada, T. y Ghose, A.C. (2000).

Rapid method for species-specific identification of *Vibrio cholerae* using primers targeted to the gene of outer membrane protein OmpW. Journal of Clinical Microbiology 38: 4145-4151.

Ndong, D., Chen, Y., Lin, Y., Vaseeharan, B. y Chen, J. (2007). **The immune response of tilapia *Oreochromis mossambicus* and its susceptibility to *Streptococcus iniae* under stress in low and high temperatures.** Fish & Shellfish immunology 22: 686-694.

Nelson, J.S., Kawahara, E., Kawai, K. y Kusuda, R. (1989). **Macrophage infiltration in pseudotuberculosis of yellowtail *Seriola quinqueradiata*.** Bulletin of Marine Science of Fish Kochi University 11: 17-22.

Neumann, N.F., Fagan, D. y Belosevic, M. (1995). **Macrophage activating factor(s) secreted by mitogen stimulated goldfish kidney leukocytes synergize with bacterial lipopolysaccharide to induce nitric oxide production in teleost macrophages.** Developmental & Comparative Immunology 19: 473-482.

- Neumann, N.F. y Belosevic, M. (1996). **Deactivation of primed respiratory burst response of gold fish macrophages by leukocyte derived macrophage activating factor(s).** *Developmental & Comparative Immunology* 20: 427-439.
- Neumann, N.F., Stafford, J.L., Barreda, D., Ainsworth, A.J. y Belosevic, M. (2001). **Antimicrobial mechanisms of fish phagocytes and their role in host defense.** *Developmental & Comparative Immunology* 25: 807-825.
- Newman, S.G. (1993). **Bacterial vaccines for fish.** *Annual Review of Fish Diseases* 3: 145-185.
- Nguyen, H.D., Mekuchi, T., Imura, K., Nakai, T., Nishisawa, T. y Muroga, K. (1994). **Occurrence of viral nervous necrosis (VNN) in hatchery-reared juvenile Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus*.** *Fisheries Science* 60: 551-554.
- Nicolas, J.L., Gauthier, G., Orsini, L. y Corre, S. (1994). **Use of 16S rRNA sequences for taxonomy and detection of pathogenic bacteria.** 6th International Colloquium on Pathology in Marine Aquaculture. Montpellier, France, p. 54.
- Nishizawa, T., Muroga, K. y Arimoto, M. (1996). **Failure of the polymerase chain reaction (PCR) method to detect striped jack nervous necrosis virus (SJNNV) in striped jack, *Pseudocaranx dentex*, selected as spawners.** *Journal of Aquatic Animal Health* 8: 332-334.
- Novoa, B., Bowman, T.V., Zon, L. y Figueras, A. (2009). **LPS response and tolerance in the zebrafish (*Danio rerio*).** *Fish & Shellfish Immunology* 26: 326-331.
- Noya, M., Magariños, B. y Lamas, J. (1995). **Interactions between peritoneal exudate cells (PECs) of gilthead seabream (*Sparus aurata*) and *Pasteurella piscicida*. A morphological study.** *Aquaculture* 131: 11-21.
- Noya, M. y Lamas, J. (1996). **Response of eosinophilic granule cells of gilthead seabream (*Sparus aurata*, Teleostei) to bacteria and bacterial products.** *Cell Tissue Resew* 287: 223-230.

- Nusbaum, K.E., Smith, B.F., DeInnocentes, P. y Bird, R.C. (2002). **Protective immunity induced by DNA vaccination of channel catfish with early and late transcripts of the channel catfish herpesvirus (IHV-1)**. *Veterinary of Immunology & Immunopathology* 84: 151-168.
- Nygaard, R., Husgardm S., Sommer, A-I., Leong, J.C. y Robertsen, B. (2000). **Inducción of Mx protein by interferon and double-stranded RNA in salmonids cells**. *Fish & Shellfish Immunology* 10: 435-450.
- O.I.E. (Office International des Epizooties). (1995). **Viral encephalopathy and retinopathy or viral nervous necrosis**. En: O.I.E. *Diagnostic manual for aquatic animal diseases*. Paris. pp: 85-90.
- O.I.E. (Office International des Epizooties). (1997). **Viral encephalopathy and retinopathy or viral nervous necrosis**. En: O.I.E. *Diagnostic manual for aquatic animal diseases*. Paris. pp: 99-107.
- O'Farrell, C., Vaghefi, N., Cantonnet, M., Buteau, B., Boudinot, P. y Benmansour, A. (2002). **Survey of transcript expression in rainbow trout leukocytes reveals a major contribution of interferon responsive genes in the early response to a rhabdovirus infection**. *Journal of Virology* 76: 8040-8049.
- Olafsen, J.A. y Hansen, G.H. (1992). **Intact antigen uptake in intestinal epithelial cells of marine fish larvae**. *Journal of Fish Biology* 40: 141-156.
- Oliver, J.D., Nilsson, L. y Kjelleberg, S. (1991). **Formation of nonculturable *Vibrio vulnificus* cells and its relationships to the starvation state**. *Applied & Environmental Microbiology* 57: 2640-2644.
- Oliver, J.D. (1993). **Formation of viable but nonculturable cells**. En: Kjelleberg, S. (Ed.), *Starvation in Bacteria*. Plenum Press, New York. pp: 239-272.

Oliver, J.D. y Bockian, R. (1995) **In vivo resuscitation, and virulence towards mice, of viable but nonculturable cells of *Vibrio vulnificus***. Applied & Environmental Microbiology 61: 2620-2623.

Ortega, C. y Enríquez, R. (2007). **Factores asociados a la infección celular por el virus de la necrosis pancreática infecciosa (IPNV)**. Archivos de Medicina Veterinaria 39: 7-18.

Osorio, C.R., Collins, M.D., Toranzo, A.E., Barja, J.L. y Romalde, J.L. (1999). **16S rRNA gene sequence analysis of *Photobacterium damsela* and nested PCR method for rapid detection of the causative agent of fish pasteurellosis**. Applied & Environmental Microbiology 65: 2942-2946.

Otto, B.R., Verweij-van, A.M.J.J. y MacLaren, D.M. (1992). **Transferrins and heme-compounds as iron for pathogenic bacteria**. Critical Reviews in Microbiology 18: 217-233.

Palic, D., Ostoji, J., Andreasen, C. y Roth, J. (2007). **Fish cast NETs: Neutrophil extracellular traps are released from fish neutrophils**. Developmental & Comparative Immunology 31: 805-816.

Park, C.I., Kurobe, T., Hirono, I. y Aoki, T. (2003). **Cloning and characterization of cDNAs for two distinct tumor necrosis factor receptor superfamily genes from Japanese flounder *Paralichthys olivaceus***. Developmental & Comparative Immunology 27: 365-375.

Pasnik, D., Evans, J.J., Panangala, V.S., Klasius, P.H., Shelby, R.A. y Shoemaker, C.A. (2005). **Antigenicity of *Streptococcus agalactiae* extracellular products and vaccine efficacy**. Journal of Fish Diseases 28: 205-212.

Paulsen, S.M., Lunde, H., Engstad, R.E. y Robertsen, B. (2003). **In vivo effects of beta-glucan and LPS on regulation of lysozyme activity and mRNA expression in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.)**. Fish & Shellfish Immunology 14: 39-54.

Bibliografía

- Penagos, G., Barato, P. e Iregui, C. (2009). **Sistema inmune y vacunación de peces**. Acta Biológica Colombiana 14: 3-24.
- Pinto, R., Jofre, J. y Bosch, A. (1993). **Interferon-like activity in sea bass affected by viral erythrocytic infection**. Fish & Shellfish Immunology 3: 89-96.
- Pisetsky, D.S., Reich, C., Crowley, S.D. y Halpern, M.D. (1995). **Immunological properties of bacterial DNA**. Annals of the New York Academy of Sciences 772: 152-163.
- Pizza, M., Scarlato, V., Massignani, V., Giuliani, M.M., Arico, B., Comanducci, M. y Jennings, G.T. (2000). **Identification of vaccine candidates against serogroup B meningococcus by whole-genome sequencing**. Science 287: 1816-1820.
- Plant, K.P. y Thune, R.L. (2004). **Cloning and characterisation of a channel catfish (*Ictalurus punctatus*) Mx gene**. Fish & Shellfish Immunology 16: 391-405.
- Plant, K.P., Harbottle, H. y Thune, R.L. (2005). **Poly I:C induces an antiviral state against Ictalurid Herpesvirus 1 and Mx1 transcription in the channel catfish (*Ictalurus punctatus*)**. Developmental & Comparative Immunology 29: 627-635.
- Press, McL., Dannevig, B.H. y Lysverk, T. (1994). **Immune and enzyme histochemical phenotypes of lymphoid and nonlymphoid cells within the spleen and head kidney of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.)**. Fish & Shellfish Immunology 4: 79-93.
- Press C., Evensen, O., Reitan, L.J. y Landsverk, T. (1996). **Retention of furunculosis vaccine components in Atlantic salmon, *Salmo salar* L., following different routes of administration**. Journal of Fish Diseases 19: 215-224.
- Preston, A., Mandrell, R. E., Gibson, B. W. y Apicella, M. A. (1996). **The lipooligosaccharides of pathogenic gram-negative bacteria**. Critical Reviews in Microbiology 22: 139-180.
- Pulido, E., Iregui, C., Figueroa, J. y Klesius, P. (2004). **Estreptococosis en tilapias (*Oreochromis spp.*) cultivadas en Colombia**. Revista AquaTIC 20: 97-106.

Purcell, M.K., Kurath, G., Garver, K.A., Herwig, R.P. y Winton, J.R. (2004). **Quantitative expression profiling of immune response genes in rainbow trout following infectious haematopoietic necrosis virus (IHNV) infection or DNA vaccination.** *Fish & Shellfish Immunology* 17: 447-462.

Purcell, M.K., Nichols, K.M., Winton, J.R., Kurath, G., Thorgaard, G.H. y Wheeler, P. (2006). **Comprehensive gene expression profiling following DNA vaccination of rainbow trout against infectious hematopoietic necrosis virus.** *Molecular Immunology* 43: 2089-2106.

Qin, Q.W., Ototake, M., Noguchi, K., Soma, G-I., Yokomizo, Y. y Nakanishi, T. (2001). **Tumor necrosis factor alpha (TNF α)-like factor produced by macrophages in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*.** *Fish & Shellfish Immunology* 11: 245-256.

Qin, Q.W., Wu, T.H., Jia, T.L., Hedge, A. y Zhang, R.Q. (2006). **Development and characterization of a new tropical marine fish cell line from grouper, *Epinephelus coioides* susceptible to iridovirus and nodavirus.** *Journal of Virological Methods* 131: 58-64.

Raa, R., Rørstad, G., Engstad, R. y Robertsen, B (1992). **The use of immunostimulants to increase resistance of aquatic organisms to microbial infections.** En: Shariff, M., Subasighe, R.P., & Arthur, J.R. (Eds). *Diseases in Asian Aquaculture*. Volume 1. Manila: Fish Health Section, Asian Fisheries Society, pp: 39-50.

Raetz, C.R. (1990). **Biochemistry of endotoxins.** *Annual Review of Biochemistry* 59: 129-170.

Renault, T., Torchy, C. y De Kinkelin, P. (1991). **Spectrophotometric method for titration of trout interferon, and its application to rainbow trout fry experimentally infected with viral hemorrhagic septicemia virus.** *Diseases of Aquatic Organisms* 10: 23-29.

- Restifo, N.P., Ying, H., Hwang, L. y Leitner, W.W. (2000). **The promise of nucleic acid vaccines.** Gene Therapy 7: 89-92.
- Rhodes, G., Huys, G., Swins, J., McGann, P., Hiney, M., Smith, P. y Pickup, R.W. (2000). **Distribution of oxytetracycline resistance plasmids between aeromonads in hospital and aquaculture environments: implication of Tn/72/ in dissemination of tetracycline resistance determinant tetA.** Applied & Environmental Microbiology 66: 3883-3890.
- Rietschel, E.T. y Brade, H. (1992). **Bacterial endotoxins.** Scientific American 267: 54-61.
- Rietschel, E.T., Kirikae, T., Schade, F.U., Mamat, U., Schmidt, G., Loppnow, H., Ulmer, J.A., Zähringer, U., Seydel, U., Di Padova, F., Schreier, M. y Brade, H. (1994). **Bacterial endotoxin: molecular relationships of structure to activity and function.** FASEB Journal 8: 217-225.
- Ringø, E., Lødemel, J.E., Myklebust, R., Kaino, T., Mayhew, T.M. y Olsen, R.E. (2001). **Epithelium-associated bacteria in the gastrointestinal tract of Arctic charr (*Salvelinus alpinus* L.). An electron microscopical study.** Journal of Applied Microbiology 90: 294-300.
- Ringø, E., Mikkelsen, H., Kaino, T., Olsen, R.E., Mayhew, T.M. y Mikkelsen, R. (2006). **Endocytosis of indigenous bacteria and cell damage caused by *Vibrio anguillarum* in the foregut and hindgut of spotted wolffish (*Anarhichas minor* Olafsen) fry: an electron microscopical study.** Aquaculture Research 37: 647-651.
- Riquelme, C.A., Toranzo, C.P., Barja, J.L., Vergara, N. y Araya, R. (1996). **Association of *Aeromonas hydrophila* and *Vibrio alginolyticus* with larval mortalities of scallop (*Argopecten purpuratus*).** Journal of Invertebrate Pathology 67: 213-218.
- Robertsen, B., Trobridge, G. y Leong, J. (1997). **Molecular cloning of the double-stranded RNA infective Mx genes of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.).** Developmental & Comparative Immunology 21: 397-412.

- Robertsen, B. (1999). **Modulation of the non-specific defence of fish by structurally conserved microbial polymers.** *Fish & Shellfish Immunology* 9: 269-290.
- Robertsen, B., Bergan, V., Roekenes, T., Larsen, R. y Albuquerque, A. (2003). **Atlantic salmon interferon genes: cloning, sequence analysis, expression, and biological activity.** *Journal of Interferon Cytokine Research* 23: 601-612.
- Robertsen B. (2006). **The interferon system of teleost fish.** *Fish & Shellfish Immunology* 20: 172-191.
- Robohm, R.A. (1983). ***Pasteurella piscicida*.** En: Anderson, D.P., Dorsonand, M, y Dubourget, P, (eds) *Antigens of fishpathogens.* Collection Foundation Marcel Merieux, Lyon, France. pp: 161-175.
- Rodkhum, C., Hirono, I., Stork, M., Di Lorenzo, M., Crosa, J.H. y Aoki, T. (2006). **Putative virulence-related genes in *Vibrio anguillarum* identified by random genome sequencing.** *Journal of Fish Diseases* 29: 157-166.
- Rodríguez Sain-Jean, S. y Pérez-Prieto, S.I. (2007). **Effects of salmonid fish viruses on Mx gene expression and resistance to single or dual viral infections.** *Fish & Shellfish Immunology* 23: 390-400.
- Rogel-Gaillard, C., Chilmonczyk, S. y de Kinkelin, P. (1993). ***In vitro* induction of interferon-like activity from rainbow trout leucocytes stimulated by Egtvedt virus.** *Fish & Shellfish Immunology* 3: 383-394.
- Rokenes, T.P., Larsen, R. y Robertsen, B. (2007). **Atlantic salmon ISG15: expression and conjugation to cellular proteins in response to interferon, double-stranded RNA and virus infections.** *Molecular Immunology* 44: 950-959.
- Rollins, D.M. y Colwell, R.R. (1986). **Viable but nonculturable stage of *Campylobacter jejuni* and its role in survival in the natural aquatic environment.** *Applied & Environmental Microbiology* 52: 531-538.

- Romalde, J.L., Magariños, B., Turnbull, K.D., Baya, A.N., Barja, J.M. y Toranzo, A.E. (1995). **Fatty acid profiles of Pasteurella piscicida: comparison with other fish pathogenic gram-negative bacteria.** Archives of Microbiology 163: 211-216.
- Romalde, J.L., Magariños, B., Lores, F., Osorio, C.R. y Toranzo, A.E. (1999). **Assessment of a magnetic bead-EIA based kit for rapid diagnosis of fish pasteurellosis.** Journal of Microbiology Methods 38: 147-154.
- Romalde, J.L. (2002). **Photobacterium damsela subsp. piscicida: an integrated view of a bacterial fish pathogen.** International Microbiology 5: 3-9.
- Romalde, J.L., Luzardo-Álvarez, A., Ravelo, C., Toranzo, A.E. y Blancoméndez, J. (2004). **Oral immunization using alginate microparticles as a useful strategy for booster vaccination against fish lactococcosis.** Aquaculture 236: 119-129.
- Rombout, J.W., Taverne, N., van de Kamp M y Taverne-Thiele, A.J. (1993). **Differences in mucus and serum immunoglobulin of carp (Cyprinus carpio L.).** Developmental & Comparative Immunology 17: 309-317.
- Ronni, T., Melen, K., Malygin, A. y Julkunen, I. (1993). **Control of IFN-inducible MxA gene expression in human cells.** Journal of Immunology 150: 1715-1726.
- Rosenberg, E. y Ben-Haim, Y. (2002). **Microbial diseases of corals and global warming.** Environment Microbiology 4: 318-326.
- Rowley, A.F., Knight, J., Lloyd-Evans, P., Holland, J.W. y Vickers, P.J. (1995). **Eicosanoids and their role in immune modulation in fish: a brief overview.** Fish & Shellfish Immunology 5: 549-567.
- Ruiz, I., Fernández, A.B. y De Blas, I. (2003). **El sistema inmune de los teleósteos (IV): Factores que afectan la respuesta inmune.** Revista AquaTIC 19: 1-7.

Ruo-Yun, Y., Ya-Li, S., Shu-Chiu, S., Sheng-chi, C., Sung-Yan, H., Jiunn-Cheng, L. y Chun-Hung, L. (2009). **Evaluation of the antibacterial activity of leaf and twig extracts of stout camphor tree, *Cinnamomum kanehirae*, and the effects on immunity and disease resistance of white shrimp, *Litopenaeus vannamei*.** Fish & Shellfish Immunology 27: 26-32.

Sadler, A.J. y Williams, B.R.G. (2008). **Interferon-inducible antiviral effectors.** Nature Reviews Immunology 8: 559-568.

Saeed, M.O. y Plumb, J.A. (1986). **Immune response of channel catfish to lipopolysaccharide and whole cell *Edwardsiella ictaluri* vaccines.** Diseases of Aquatic Organisms 2: 21-25.

Saeij, J.P., Stret, R.J., de Vries, B.J., Van Muiswinkel, W.B. y Weigertjes, G.F. (2003). **Molecular characterization of carp TNF: a link between TNF polymorphism and trypano tolerance.** Developmental & Comparative Immunology 27: 29-41.

Sakai, M., Kamiya, H., Ishii, S., Atsuta, S. y Kobayashi, M. (1992). **The immunostimulating effects of chitin in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*.** En: Shariff, M., Subasighe, R.P., Arthur, J.R. Eds., Diseases in Asian Aquaculture Vol. 1. Fish Health Section, Asian Fisheries Society, Manila, Philippines, pp: 413-417.

Sakai, M., Atsuta, S., Kobayashi, M., Kawakami, H. y Yoshida, T. (1993). **The cell surface hydrophobicity and hemagglutinating properties of the bacterial fish pathogen, *Pasteurella piscicida*.** Bulletin of European Association of Fish Pathology 13: 168-170.

Sakai, M., Kobayashi, M. y Kawauchi, H. (1996). ***In vitro* activation of fish phagocytic cells by GH, prolactin and somatolactin.** Journal of Endocrinology 151: 113-118.

Sakai, M. (1999). **Current research status of fish immunostimulants.** Aquaculture 172: 63-92.

Sakazaki, R. (1968). **Proposal of *Vibrio alginolyticus* for the biotype 2 pf *Vibrio parahaemolyticus*.** Japanese Journal of Medical Science and Biology 21: 359-362.

- Salati, F., Hamaguchi, M. y Kusuda, R., (1987). **Immune response of red sea bream to *Edwardsiella tarda* antigens.** Fish Pathology 22: 93-98.
- Salinas, I., Lockhart, K., Bowden, T.J., Collet, B. y Ellis, A.E. (2004). **An assessment of immunostimulants as Mx inducers in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) parr. Effect of temperature on the kinetics of Mx responses.** Fish & Shellfish Immunology 17: 159-170.
- Salte, R., Gjøen, H.M., Norberg, K. y Gjedrem, T. (1993). **Plasma protein levels as potential marker traits for resistance to furunculosis.** Journal of Fish Diseases 16: 561-568.
- Samuel, C.E. (1991). **Antiviral action of interferon. Interferon-regulated celular proteins and their surprisingly selective antiviral activities.** Virology 183: 1-11.
- Samuel, C.E. (2001). **Antiviral actions of interferons.** Clinical Microbiology Review 14: 778-809.
- Santos, Y., Pazos, F y Barja, J.L. (1999). ***Flexibacter maritimus*, causal agent of flexibacteriosis in marine fish.** En: Olivier, G. (Ed.), ICES Identification Leaflets for Diseases and Parasites of Fish and Shellfish. No. 55. International Council for the Exploration of the Sea. Copenhagen, Denmark, pp: 1-6.
- Sarmiento, A., Marques, F., Anthony, E., Ellis, A.E. y Afonso, A. (2004). **Modulation of the activity of seabass (*Dicentrarchus labrax*) headkidney macrophages by macrophage activating factor(s) and lipopolysaccharide.** Fish & Shellfish Immunology 16: 79-92.
- Scapigliati, G., Buonocore, F., Randelli, E., Casani, D., Meloni, S., Zarletti, M. *et al.* (2010) **Cellular and molecular immune reponses of the sea bass (*Dicentrarchus labrax*) experimentally infected with *betanodavirus*.** Fish & Shellfish Immunology 28: 303-311.
- Schneider-Schaulies, S., Schneider-Schaulies, J., Schuster, A., Bayer, M., Pavlovic, J. y ter Meulen, V. (1994). **Cell type-specific MxA mediated inhibition of measles virus transcription in human brain cells.** Journal of Virology 68: 6910-6917.

- Sealey, W.M. y Gatlin III, D.M (2001). **Overview of nutritional strategies affecting the health of marine fish**. En: Lim, C. & Webster, C.D. (eds). Nutrition and Fish Health. New York: The Haworth Press, pp: 103-118.
- Secombes, C.J. y Fletcher, T.C. (1992). **The role of phagocytes in the protective mechanisms of fish**. Annual Review of Fish Diseases 2: 53-71.
- Secombes, C.J., Hardie, L.J. y Daniels, G. (1996). **Cytokines in fish: an update**. Fish & Shellfish Immunology 6: 291-304.
- Secombes, C.J. y Olivier, G. (1997). **Host-pathogen interactions in salmonids**. En: Bernoth, E-M., Ellis, A.E., Midtlyng, P.J., Olivier, G. y Smith, P. editors. Furunculosis. Multidisciplinary fish disease research. Academic Press. pp: 269-296.
- Selvaraj, V., Sampath, K. y Sekar, V. (2004). **Extraction and Characterization of Lipopolysaccharide from *Aeromonas hydrophila* and Its Effects on Survival and Hematology of the Carp, *Cyprinus carpio***. Asian Fish Science 17: 163-173.
- Seo, J.Y., Kim, K.H., Kim, S.G., Oh, M.J., Nam, S.W. y Kim, Y.T. (2006). **Protection of flounder against hirame rhabdovirus (HIRRV) with a DNA vaccine containing the glycoprotein gene**. Vaccine 24: 1009-1015.
- Seydel, U., Schromm, A. B., Blunck, R. y Brandenburg, K. (2000). **Chemical structure, molecular conformation, and bioactivity of endotoxins**. Chemical Immunology 74: 5-24.
- Shao, Z.J. (2001). **Aquaculture pharmaceuticals and biologicals: current perspective and future possibilities**. Advances in Drug Delivery Review 50: 229-243.
- Shephard, K.L. (1994). **Functions for fish mucus**. Reviews in Fish Biology & Fisheries 4: 401-429.

Bibliografía

- Shoemaker, C.A. y Klesius, P.H. (1997). **Streptococcal diseases problems and control: a review.** En: Fitzsimmons K. **Tilapia Aquaculture.** Proc. Fourth International Symposium on Tilapia in Aquaculture. Florida. USA. 2: 671-680.
- Shoemaker, C.A. Klesius, P.H. y Evans, J.J. (2002). **In ovo methods for utilizing the modified live *Edwardsiella ictaluri* vaccine against enteric septicemia in channel catfish.** Aquaculture 203: 221-227.
- Simidu, U. y Egusa, S. (1972). **A re-examination of the fish-pathogenic bacterium that had been reported as a Pasteurella species.** Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries 38: 803-812.
- Sinderman, C.J. (1990). **Principal Diseases of Marine Fish and Shellfish.** Vol I. En: Disease of Marine Fish. 2nd ed. Academic Press, New York. pp: 106-125.
- Siwiki, A.K., Anderson, D.P. y Dixon, O.W. (1990). **In vitro immunostimulation of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) spleen cells with levamisole.** Developmental & Comparative Immunology 14: 231-237.
- Skretting. (2007). **Enfermedades emergentes en la piscicultura marina española.** [http://www.skretting.es/Internet/SkrettingSpain/webInternet.nsf/wprid/85AD4A8A80404486C125746E0045F310/\\$file/EspPri072231.pdf](http://www.skretting.es/Internet/SkrettingSpain/webInternet.nsf/wprid/85AD4A8A80404486C125746E0045F310/$file/EspPri072231.pdf)
- Skretting. (2008). **Nutrición activa. Nutrición adaptada al medio ambiente y la salud.** <http://www.skretting.es/Internet/SkrettingSpain/webInternet.nsf/wPrld/2722D023F1AF4B10C125746B00455886!OpenDocument>
- Sköld, O. (2000). **Evolution and mechanisms for spread of microbial resistance.** ACTA Veterinaria Scandinavica Supplement 93: 23-32.
- Smith, S.K., Sutton, D.C., Fuerst, J.A. y Reichelt, J.L. (1991). **Evaluation of the genus *Listonella* and reassignment of *Listonella damsela* (Love et al.) MacDonell and Colwell to the genus *Photobacterium* as *Photobacterium damsela* comb. nov. with an emended description.** International Journal of Systematic Bacteriology 41:529-534.

- Smith, H.A. y Klinman, D.M. (2001). **The regulation of DNA vaccines.** Current Opinion in Biotechnology 12: 299-303.
- Snegaroff, J. (1993). **Induction of interferon synthesis in rainbow-trout leukocytes by various homeotherm viruses.** Fish & Shellfish Immunology 3: 191-198.
- Sniezko, S.F., Bullock, G.L., Hollis, E. y Boone, J.G. (1964). ***Pasteurella* spp. from an epizootic of white perch (*Roccus americanus*) in Chesapeake Bay tidewater areas.** Journal of Bacteriology 88: 1814-1815.
- Snoussi, M., Noumi, E., Hajlaoui, H., Usai, D., Sechi, L.A., Zanetti, S. y Bakhrouf, A., (2009). **High potencial og adhesion to abiotic and biotic materials in fish aquaculture facility by *Vibrio alginolyticus* strains.** Journal of Applied Microbiology 106: 1591-1599.
- Solem, S.T., Jørgensen, J.B. y Robertsen, B. (1995). **Stimulation of respiratory burst and phagocytic activity in Atlantic salmon *Salmo salar* L. macrophages by lipopolysaccharide.** Fish & Shellfish Immunology 5: 475-491.
- Sommerset, I., Lorenzen, E., Lorenzen, N., Bleie, H. y Nerland, A.H. (2003). **A DNA vaccine directed against a rainbow trout rhabdovirus induces early protection against a nodavirus challenge in turbot.** Vaccine 21: 4661-4667.
- Sommerset, I., Skern, R., Biering, E., Bleie, H., Fiksdal, I.U., Grove, S. y Nerland, A.H. (2005). **Protection against Atlantic halibut nodavirus in turbot is induced by recombinant capsid protein vaccination but not following DNA vaccination.** Fish & Shellfish Immunology 18: 13-29.
- Srinivasan, S. y Kjellberg, S. (1998). **Cycles of famine and feast: the starvation and outgrowth strategies of a marine *Vibrio*.** Journal of Bioscience 23: 501-511.
- St. Louis-Cormier, E.A., Osterland, C.K. y Anderson, P.D. (1984). **Evidence for a cutaneous secretory immune system in rainbow trout (*Salmo gairdneri*).** Developmental & Comparative Immunology 8: 71-80.

- Staheli, P., Yu, Y.X., Grob, R. y Haller, O. (1989). **A double-stranded RNA inducible fish gene homologous to the murine influenza virus resistance gene Mx**. *Molecular Cell Biology* 9: 3117-3121.
- Staheli, P., Pitossi, F. y Pavlovic, J. (1993). **Mx proteins: GTPases with antiviral activity**. *Trends in Cell Biology* 3: 268-272.
- Stark, G.R., Kerr, I.M., Williams, B.R., Silverman, R.H. y Schreiber, R.D. (1998). **How cells respond to interferons**. *Annals Reviews in Biochemistry* 67: 227-264.
- Starkey, W.G., Millar, R.M., Jenkins, M.E., Ireland, J.H., Muir, K.F. y Richards, R.H. (2004). **Detection of piscine nodaviruses by real-time nucleic acid sequence based amplification (NASBA)**. *Diseases of Aquatic Organisms* 59: 93-100.
- Stoskopf, M.K. (1993). **Immunology**. En: W.B. Saunders Company (Ed.). *Fish Medicine*. Harcourt Brace Jovanovich Inc., Philadelphia, USA. 153.
- Swain, P., Nayak, S.K., Sahu, A., Mohapatra, B.C. y Meher, P.K. (2002). **Bath immunisation of spawn, fry and fingerlings of Indian major carps using a particulate bacterial antigen**. *Fish & Shellfish Immunology* 13: 133-140.
- Swain, P., Nayak, S.K., Nanda, P.K. y Dash, S. (2008). **Biological effects of bacterial lipopolysaccharide (endotoxin) in fish: a review**. *Fish & Shellfish Immunology* 25: 191-201.
- Tafalla, C., Aranguren, R., Secombes, C.J., Figueras, A. y Novoa, B. (2004). **Cloning and analysis of expression of a gilthead sea bream (*Sparus aurata*) Mx cDNA**. *Fish & Shellfish Immunology* 16: 11-24.
- Tafalla, C., Sanchez, E., Lorenzen, N., Dewitte-Orr, S.J. y Bols, N.C. (2007a). **Effects of viral hemorrhagic septicemia virus (VHSV) on the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) monocyte cell line RTS-11**. *Molecular Immunology* 45: 1439-1448.

- Tafalla, C., Chico, V., Perez, L., Coll, J.M. y Estepa, A. (2007b). **In vitro and in vivo differential expression of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) Mx isoforms in response to viral haemorrhagic septicaemia virus (VHSV) G gene, poly I:C and VHSV.** Fish & Shellfish Immunology 23: 210-221.
- Tamai, T., Sato, N., Kimura, S., Shirata, S. y Murakami, H. (1992). **Cloning and expression of flatfish interleukin 2 gene.** En: Murakami, H. *et al.* (Eds.). Animal Cell Technology: Basic and Applied Aspects, Kluwer, Netherlands, 509-514.
- Tamai, T., Shirata, S., Noguchi, T., Sato, N., Kimura, S. y Murakami, H. (1993). **Cloning and expression of flatfish (*Paralichthys olivaceus*) interferon cDNA.** Biochemical & Biophysical Act 1174: 182-186.
- Tanaka, S., Mori, K., Arimoto, M., Iwamoto, T. y Nakai, T. (2001). **Protective immunity of sevenhand grouper, *Epinephelus septemfasciatus* Thunberg, against experimental viral nervous necrosis.** Journal of Fish Diseases 24: 15-22.
- Tang, L., Lin, C.S., Krishna, N.K., Yeager, M., Schneemann, A. y Johnson, J.E. (2002). **Virus-like particles of a fish nodavirus display a capsid subunit domain organization different from that of insect nodaviruses.** Journal of Virology 76: 6370-6375.
- Taniguchi, T., Mantei, N., Schwarzstein, M., Nagata, S., Muramatsu, M. y Weissmann, C. (1980a). **Human leukocyte and fibroblast interferons are structurally related.** Nature 285: 547-549.
- Taniguchi, T., Fujii-Kuriyama, Y. y Muramatsu, M. (1980b). **Molecular cloning of human interferon cDNA.** Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 77: 4003-4006.
- Tarazona, J.V. y Muñoz, M.J. (1995). **Water quality in salmonid culture.** Reviews in Fisheries Science 3: 109-139.
- Taubes, G. (1997). **Immunology: Salvation in a snippet of DNA?** Science 278: 1711-1714.

- Thiery, R., Peducasse, S., Castric, J., Le Ven, A., Jeffroy, J. y Laurencin, F.B. (1997). **Experimental transmission of viral encephalopathy and retinopathy to juvenile sea bass (*Dicentrarchus labrax*)**. Bulletin of the European Association of Fish Pathologists 17: 118-122.
- Thomas, L. (1954). **The physiological disturbances produced by endotoxins**. Annual Review of Physiology 16: 467-490.
- Thompson, I., White, A., Fletcher, T.C., Houlihan, D.F. y Secombes, C.J. (1993). **The effect of stress on the immune responses of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) fed diets containing different amounts of vitamin C**. Aquaculture 114: 1-18.
- Thompson, K.D., Cachos, A. e Inglis, V. (1995). **Immunomodulating effects of glucans and oxytetracycline in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, on serum lisozyme and protection**. En: Shariff, M., Subasighe, R.P. y Arthur, J.R. (Eds.). Diseases in Asain Aquaculture. Fish Health Section, Asian Fisheries Society, Manila, Philippines, 11: 433-439.
- Thyssen, A., Van Eygen, S., Hauben, L., Goris, J. Swings J. y Ollevier F. (2000). **Application of AFLP for taxonomic and epidemiological studies of *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida***. International Journal of Systematic Evolution Microbiology 50: 1013-1019.
- Tonheim, T.C., Bøgwald, J. y Dalmo, R.A. (2008). **What happens to the DNA vaccine in fish? A review of current knowledge**. Fish & Shellfish Immunology 25: 1-18.
- Toranzo, A.E., Barja, J. y Hetrick, F.M. (1982). **Survival of *Vibrio anguillarum* and *Pasteurella piscicida* in estuarine and fresh waters**. Bulletin of European Association of Fish Pathology 3: 43-45.
- Toranzo, A.E., Barreiro, S., Casal, J.F., Figueras, A., Magariños, B. y Barja, J. (1991). **Pasteurellosis in cultured gilthead seabream (*Sparus aurata*): First report in Spain**. Aquaculture 99: 1-15.

- Toranzo, A.E., Magariños, B. y Romalde, J.L. (2005). **A review of the main bacterial fish diseases in marine systems**. *Aquaculture* 246: 37-61.
- Toranzo, A.E. (2007). **Enfermedades Bacterianas Emergentes en Cultivos Marinos de Peces**. XI Congreso Nacional de Acuicultura. Sesión temática: Salud y bienestar animal. Ponencia: 951-956.
- Toranzo, A.E. (2010). **Patología bacteriana en acuicultura**. www.semico.es/.../Patologia%20bacteriana%20en%20acuicultura%20ActSEM-50.pdf
- Torroella, J.J. y Gilsbert, A. (1993) **Patologías bacterianas e víricas**. En *Acuicultura marina: fundamentos biológicos y tecnología de la producción*. Castelló Orvay, F. (Editores). Universitat de Barcelona. Espanha. 499-500pp.
- Traxler, G.S., Anderson, E., LaPatra, S., Richard, J., Shewmaker, B. y Kurath, G. (1999). **Naked DNA vaccination of Atlantic salmon *Salmo salar* against IHNV**. *Diseases of Aquatic Organisms* 38: 183-190.
- Trobridge, G.D. y Leong, J.A.C. (1995). **Characterization of a rainbow trout Mx gene**. *Journal of Interfeon Cytokine Research* 15: 691-702.
- Trobridge, G.D., Chiou, P.P. y Leong, J.C. (1997a). **Cloning of the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) Mx2 and Mc3 cDNAs and characterization of trout Mx protein in salmon cells**. *Journal of Virology* 71: 5304-5311.
- Trobridge, G.D., chiur, P.P., Kim, C.H. y Leong, J.C. (1997b). **Induction of the Mx protein of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* in vitro and in vivo with poly I:C ds RNA and infectious hepatopietic necrosis virus**. *Diseases of Aquatic Organisms* 30: 91-98.
- Trüper, H.G. y De'Clari, L. (1997). **Taxonomic note: necessary correction of epithets formed as substantives (nouns) "in apposition"**. *International Journal of Systematic Bacteriology* 47: 908-909.

Tsolis, R.M. (2002). **Comparative genome analysis of the α -proteobacteria: Relationship between plant and animal pathogens and host specificity.** Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 99: 12503-12505.

Turan, K., Mibayashi, M., Sugiyama, K., Saito, S., Numajiri, A. y Nagata, K. (2004). **Nuclear MxA proteins form a complex with influenza virus NP and inhibit the transcription of the engineered influenza virus genome.** Nucleic Acids Research 32: 643-652.

Uhlend, F.C. y Higgins, R. (2006). **Evaluation of the susceptibility of *Aeromonas salmonicida* to oxytetracycline and tetracycline using antibacterial agent disk diffusion and dilution susceptibility tests.** Aquaculture 257: 111-117.

Vallejo, A.N., Miller, N.W. y Cem, L.W. (1992). **Antigen processing and presentation in teleost immune responses.** Annals of Review of Fish Diseases 2:73-89.

Vandenberg, G.W. (2004). **Oral vaccine for finfish: academic theory or commercial reality?.** Animal Health Research Review 5: 301-304.

Vázquez-Juarez, R.C., Gómez-Chiarri, M., Barrera-Saldaña, H., Hernández-Saavedra, N., Dumas, S. y Ascencio, F. (2005). **Evaluation of DNA vaccination of spotted sand bass (*Paralabrax maculatofasciatus*) with two major outer-membrane protein-encoding genes from *Aeromonas veronii*.** Fish & Shellfish Immunology 19:153-163.

Verschuere, L., Romaut, G., Sorgeloos, P. y Verstraete, W. (2000). **Probiotic bacteria as biological control agents in aquaculture.** Microbiology & Molecular Biology Review 64: 655-671.

Verburg-Van, B.M.L., Nowak, B., Engelsma, M.Y. y Weyts, F.A.A. (1999). **Differential effects of cortisol on apoptosis and proliferation of carp B-lymphocytes from head kidney, spleen and blood.** Fish & Shellfish Immunology 9: 405-415.

Wang, Y.D., Kung, C.W., y Chen, J.Y. (2010a). **Antiviral activity by fish antimicrobial peptides of epinecidin-1 and hepcidin 1-5 against nervous necrosis virus in medaka.** Peptides 31: 1026-1033.

Wang, Y.D., Kung, C.W., Chi, S.C. y Chen, J.Y. (2010b). **Inactivation of nervous necrosis virus infecting grouper (*Epinephelus coioides*) by epinecidin-1 and hepcidin1-5 antimicrobial peptides, and downregulation of Mx2 and Mx3 gene expressions.** Fish & Shellfish Immunology 28: 113-120.

web.abo.fi/instut/fisk/Swe/Bakterier/yersinia.htm

Wendelaar, S.E. (1997). **The stress response in fish.** Physiology Review 77: 591-625.

Westphal O. y Jann K. (1963). **Bacterial Lipopolysaccharides: Extraction with Phenol-Water and Further Applications of the Procedure.** Method in Carbohydrate Chemistry 5: 83-91.

Willumsen, B. (1989). **Birds and wild fish as potential vectors of *Yersinia ruckeri*.** Journal of Fish Diseases 12: 275-277.

Winton, J.R. (2001). **Fish health management.** En: Wedemeyer, G., (ed). Fish hatchery management. 2nd ed. Bethesda, M.D.: American Fisheries Society. pp: 559-639.

Wise, D.J., Tomasso, J.R., Schwedler, T.E., Blazer, V.S. y Gatlin III, D.M. (1993). **Effect of vitamin E on the immune responses of channel catfish to *Edwardsiella ictaluri*.** Journal of Aquatic Animal Health 5: 183-188.

Woo, P.T.K., Bruno, D.W. y Lim, L.H.S. (2002). **Diseases and disorders of finfish in cage culture.** Wallingford, Oxon, UK, CABI Publishing. 433 pp.

Wu, Y.C. y Chi, S.C. (2007). **Cloning and analysis of antiviral activity of a barramundi (*Lates calcarifer*) Mx gene.** Fish & Shellfish Immunology 23: 97-108.

Xu, C., Ren, H., Wang, S. y Peng, X. (2004). **Proteomic analysis of salt-sensitive outer membrane proteins of *Vibrio parahaemolyticus***. *Research in Microbiology* 155: 835-842.

Xu, C., Wang, S., Ren, H., Lin, X., Wu, L. y Peng, X. (2005). **Proteomic analysis on the expression of outer membrane proteins of *Vibrio alginolyticus* at different sodium concentrations**. *Proteomics* 5: 3142-3152.

Yano, T., Mangindaan, R.E.P. y Matsuyama, H. (1989). **Enhancement of the resistance of carp *Cyprinus carpio* to experimental *Edwardsiella tarda* infection, by some b-1, 3-glucans**. *Nippon Suisan Gakkaishi* 55: 1815-1819.

Yasuike, M., Kondo, H., Hirono, I. y Aoki, T. (2007). **Difference in Japanese flounder *Paralichthys olivaceus* gene expression profile following hirame rhabdovirus (HIRRV) G and N protein DNA vaccination**. *Fish & Shellfish Immunology* 23: 531-541.

Yasunaga, N., Hatai, K. y Tsukahara, J. (1983). ***Pasteurella piscicida* from an epizootic of cultured sea bream**. *Fish Pathology* 18: 107-110.

Yasunaga, N., Yasumoto, S., Hirakawa, E. y Tsukahara, J. (1984). **On a massive mortality of oval file fish (*Navodon modestus*) caused by *Pasteurella piscicida***. *Fish Pathology* 19: 51-55.

Yoshida, T., Sakai, M., Kitao, T., Khilil, S.M., Araki, S., Saitoh, R., Ineno, T. y Inglis, V. (1993). **Immunodulatory effects of the fermented products of chicken egg, EF203, on rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss***. *Aquaculture* 109: 207-214.

Yoshikoshi, K. e Inoue, K. (1990). **Viral nervous necrosis in hatchery-reared larvae and juveniles of Japanese parrotfish, *Oplegnatus fasciatus* (Temminck & Schlegel)**. *Journal of Fish Diseases* 13: 69-77.

Yuasa, K., Kitancharoen, N., Kataoka, Y. y Al-Murbaty, F.A. (1999). ***Streptococcus iniae*, the causative agent of mass mortality in Rabbitfish *Siganus canaliculatus* in Bahrain.** Journal of Aquatic Animal Health 11: 87-93.

Zanetti, S., Deriu, A., Volterra, L., Falchi, M.P., Moliccotti, P., Fadda, G. y Sechi, L. (2000).

Virulence factors in *Vibrio alginolyticus* strains isolated from aquatic environments. Annali di Igiene: medicina preventiva e di comunità 12: 487-491.

Zapata, A.G., Varas, A. y Torroba, M. (1992). **Seasonal variations in the immune system of lower vertebrates.** Immunology Today 12: 142-147.

Zapata, A.G., Torroba, M., Varas, A. y Jiménez, A.V. (1997). **Immunity in fish larvae.** Developmental Biology Stand 90: 23-32.

Zenke, K. y Kim K.H. (2009). **Molecular cloning and expression analysis of three Mx isoforms of rock bream, *Oplegnathus fasciatus*.** Fish & Shellfish Immunology 26: 599-605.

Zhao, Z.J. (2001). **Aquaculture pharmaceuticals and biological: current perspectives and future possibilities.** Advances in Drug Delivery Reviews 50: 229-243.

Zheng, F.R., Sun, X.Q., Liu, H.Z. y Zhang, J.X. (2006). **Study on the distribution and expression of a DNA vaccine against lymphocystis disease virus in Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*).** Aquaculture 261: 1128-1134.

Zlotkin, A., Chilmonczyk, E., Eyngor, M., Hurvitz, A., Ghittino, C. y Eldar, A. (2003). **Trojan Horse effect: Phagocyte-Mediated *Streptococcus iniae* infection of fish.** Infection & Immunity 71: 2318-2325.

Zou, J., Grabowski, P.S., Cunningham, C. y Secombes, C.J. (1999). **Molecular cloning of interleukin 1- β from rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* reveals no evidence of an ice cut site.** Cytokine 11: 552-560.

Bibliografía

- Zou, J., Wang, T., Hirono, I., Aoki, T., Inagawa, H. y Honda, T. (2002). **Differential expression of two tumor necrosis factor genes in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss***. *Developmental & Comparative Immunology* 26: 161-172.
- Zou, J., Secombes, C.J., Long, S., Miller, N., Clem, L.W. y Chinchar, V.G. (2003). **Molecular identification and expression analysis of tumor necrosis factor in channel catfish (*Ictalurus punctatus*)**. *Developmental & Comparative Immunology* 27: 845-858.
- Zou, J., Tafalla, C., Truckle, J. y Secombes, C.J. (2007). **Identification of a second group of type I IFNs in fish sheds light on IFN evolution in vertebrates**. *Journal of Immunology* 179: 3859-3871.
- Zuo, X. y Woo, P.T.K. (1997). **In vivo neutralization of *Cryptobia salmositica* metallo-protease by alpha 2-macroglobulin in the blood of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* and in brook charr *Salvelinus fontinalis***. *Diseases of Aquatic Organisms* 29: 67-72.



Anexos
Anexos

Anexo I.- Medios y Soluciones empleados

Medios de cultivo:

✓ **Caldo Infusión Cerebro Corazón (BHIB)**

Composición (por litro):

Infusión de cerebro de ternera	7,5 g
Infusión de corazón de res	10 g
Dextrosa	2 g
Peptona de gelatina	10 g
Fosfato disódico (Na ₂ HPO ₄)	2,5 g
Cloruro sódico (NaCl)	5 g

pH final: 7,4 ± 0,2

Preparación:

Suspender 37 g en 1 l de agua destilada, calentar y agitar hasta disolución completa. Esterilizar a 121°C durante 15-20 minutos. Agitar el medio antes de servir. Dejar enfriar hasta 45°C y distribuir en placas de petri estériles con 20 ml en cada una.

Soluciones:

✓ **Támpon fosfato salino (PBS)**

Composición (por litro):

Dihidrogenofosfato potásico (KH_2PO_4) (1,4 mM)	0,24 g
Cloruro potásico (KCl) (2,7 mM)	0,2 g
Fosfato disódico (Na_2HPO_4) (0,01 M)	1,44 g
Cloruro sódico (NaCl) (0,137 M)	8 g

Preparación:

Mezclar todos los ingredientes en 1 l de agua destilada, agitar bien hasta que estén todos disueltos. Esterilizar a 121°C durante 30 minutos.

✓ **Agua DEPC**

Composición (por 100 ml):

Dietilpirocarbonato ($\text{C}_6\text{H}_{10}\text{O}_5$) 0,1 ml

Preparación:

Mezclar el ingrediente en 100 ml de agua destilada, agitar toda la noche a temperatura ambiente y en oscuridad. Esterilizar a 121°C durante 30 minutos.

✓ **TBE 10X**

Composición (por litro):

Trisbase (0,89 M)	108 g
Ácido bórico (H_3BO_3)	55 g
Ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) ($C_{10}H_{16}N_2O_8$) (0,02 M)	8,3 g

pH = 8,3

Preparación:

Mezclar todos los ingredientes en 1 l de agua destilada estéril, agitar bien hasta que estén todos disueltos.

Anexo II.- Direcciones de laboratorios y casas comerciales nombradas

Bioline	Ecogen, Madrid, España.
Biorad	Bio-rad Laboratories, S.A., Alcobendas, Madrid, España.
Bioron	Bioron GmbH, Ludwigshafen, Alemania.
Invitrogen	Invitrogen, S.A., Parque Mas Blau, Prat de Llobregat, Barcelona España.
Lonza	Lonza Group Ltd, Basel, Switzerland
Oxoid	Oxoid S.A., Madrid, España.
Panreac Química, S.A.	Panreac Química S.A.U., Polígono Pla de la Bruguera, Castellar del Vallès, Barcelona, España.
Promega	Promega Biotech Ibérica S.L., Alcobendas, Madrid, España.
Pronadisa	Laboratorios Conda, Torrejón de Ardoz, Madrid, España.
Roche	Roche Diagnostics S.L., San Cugat del Vallés, Barcelona, España.
Sigma	Sigma-Aldrich Química, S.A., Tres Cantos, Madrid, España.
Skretting	Skretting España S.A., Cojóbar, Burgos, España.
USB Corporation	High Wycombe, UK.



Agradecimientos
Agradecimientos

Agradecimientos

Este apartado es el más importante para mí puesto que sin toda la gente que nombro en él, y gente que seguro me dejó fuera, no hubiera sido posible esta tesis doctoral.

En primer lugar quería agradecer al Catedrático Fernando Real Valcárcel por haber dado la oportunidad de entrar a formar parte del equipo de investigación de "Enfermedades Infecciosas e Ictiopatología" a esa chica que desconocías hasta ese momento y que venía de la carrera de Ciencias del Mar, que aconsejada por profesores de su facultad, acabó tocando en tu puerta solicitando un tutor para poder realizar un trabajo en enfermedades de peces.

Agradecer a otro miembro de ese equipo, el Dr. Félix Acosta Arbelo, por su facilidad en compartir sus conocimientos e intentar solucionar los contratiempos que surgen en un laboratorio. Gracias por esa pregunta "¿Estas poniendo a calentar la tapa?" que una vez hecha después de unos cuantos quebraderos de cabeza pude continuar con mi trabajo sin problemas.

Muchas gracias al Dr. Daniel Padilla Castillo por ese apoyo incondicional tanto a nivel laboral como a nivel personal, sinceramente, muchísimas gracias por creer en mí.

De verdad, que ha sido para mí un gran privilegio el haber podido realizar este trabajo bajo vuestra dirección. Por otra parte, y ya a nivel personal, quería agradecerles la gran comprensión y paciencia que han tenido conmigo a lo largo de todos estos años, sobre todo en el momento más duro de mi vida que fue la enfermedad y pérdida de mi madre. Gracias de todo corazón.

Sin duda agradecer a mis compañeros de laboratorio, los que continúan y los que ya se han ido, por todo el apoyo que me han prestado. A Judit, por esos ánimos y ayuda, no sólo los fines de semana, cambiando el agua a los tanques y dando de comer a los chiquitines cuando Rodrigo estaba dentro de mí, sino en todos los momentos en los que has estado ahí. A Lorena, por esa alegría que nos transmitía casi todos los días con ese arte que tiene. Más de una sonrisa me has arrancado escuchándote por los pasillos del IUSA. A Valentina, Fátima y Lita por vuestros comentarios, que siempre han sido constructivos. A la portuguesa, Micaela, que desde que pasaste por el laboratorio te he echado muchísimo de menos, calaste hondo. A Mafe, trabajadora como la que más, también se te echa de menos. No olvidar, en mis comienzos, el compartir el laboratorio con una cabra loca que no paraba de hablar, Inma, fines de semana que me has amenizado con tus conversaciones, gracias.

No olvidar al resto de miembros de la comunidad del IUSA, a Juanma por tu infinidad de conocimientos en genética, a Davinia por compartir tu saber y por los ánimos en culminar con este trabajo. A las Silvias, Carmen y Yurena, por estar ahí siempre que se os ha necesitado, gracias de todo corazón. A la peruana, Tatí, MUCHÍSIMAS GRACIAS por estar ahí en TODO momento, por tu apoyo también incondicional, siempre me tendrás a tu lado para lo que quieras.

Y a la gente que me ha ayudado incondicionalmente en el ICCM, Ada, Moneiba, Eyad, gracias a los cuales he conseguido transportar los peces y alimentarlos, y a Miguel, sin el que no hubiese podido realizar ni una sola de mis experiencias.

Agradecer también a Carmen, Javi y Carlos, de la unidad de Ictiopatología de la Universidad de Santiago de Compostela por su acogimiento y su ayuda

incondicional en esta tesis doctoral. Y a Patricia, John y Bertrand por mi estancia en Escocia, gracias por acogerme en vuestra casa y compartir vuestros conocimientos conmigo.

Por último, que no los menos importantes, porque sin ellos no hubiese estado en Canarias y no sería como soy, **A MIS PADRES**, que me han dado todo y más. **OS QUIERO**. Agradecer también a la persona que está a mi lado incondicionalmente desde hace 10 años, Pedro, **TE AMO**, y gracias por ser la persona más maravillosa del mundo, por lo menos para mí. Agradecer también a sus padres, Diego y Mari Lola, dos personas extraordinarias, que aunque físicamente no pueden ver la culminación de este trabajo, sí han estado en su comienzo y me han dado muchísimo ánimo y estando dentro de mí pueden ver su culminación. A Merche y Jose, Luly y Ruperto, Diego y Concha, gracias.

Y a esos amigos incondicionales que algunos en la cercanía y a otros en la lejanía, siempre han estado conmigo apoyándome y dándome ánimos. **MUCHÍSIMAS GRACIAS** Alberto y Olga, Silvia y Luis, Silvia y Mario, Natalia y Oscar.

MUCHÍSIMAS GRACIAS



Publicaciones en
Publicaciones en
revistas indexadas
revistas indexadas

Author's personal copy

Fish & Shellfish Immunology 31 (2011) 170–172



Contents lists available at ScienceDirect

Fish & Shellfish Immunology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/fsi



Short Communication

Mx expression in gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.) in response to poly I:C, bacterial LPS and chromosomal DNA: Preliminary study

J. Bravo, F. Acosta*, D. Padilla, V. Grasso, F. Real

Instituto Universitario de Sanidad Animal, Universidad de Las Palmas de Gran Canaria, Trasmontaña s/n, 35413 Arucas, Spain

ARTICLE INFO

Article history:
Received 18 April 2011
Accepted 27 April 2011
Available online 5 May 2011

Keywords:
Mx response
Vibrio alginolyticus
Lipopolysaccharide
DNA
Poly I:C

Cells infected with a virus are stimulated to produce and secrete IFNs, which in turn induce a complex pattern of physiological changes. The IFNs provide vertebrates with a first line of defence against viral infection. Fish are known to produce molecules with IFN activity as measured by a cell protection test [1]. The induction of IFN-1 includes dsRNA virus infection, LPS and some bacterial components [2].

Mx proteins interfere with virus replication by inhibiting viral polymerases in the nucleus and binding viral components in the cytoplasm [3]. Mx genes have been cloned and characterised from several other mammals, birds and fish species [4], such as rainbow trout, Atlantic salmon, Atlantic halibut, Japanese flounder, pufferfish, sea bream [5] and Senegalese sole [6].

Production of IFN-like activity and Mx gene/protein expression in fish has been demonstrated in cells, organs and serum from several fish species [7].

Viral dsRNA and synthetic dsRNA polyinosinic: polycytidylic acid (poly I:C) are very potent inducers of IFN. Most viruses produce dsRNA at some time in their replication, and it seems that animals have evolved the ability to recognise and respond to these molecules by this innate mechanism [7]. IFN-like activity can also be stimulated by other factors such as bacterial lipopolysaccharide (LPS), bacterial DNA and inactivated vaccines against bacteria [8].

LPS is a cell wall component of Gram-negative bacteria. *In vitro*, LPS stimulates phagocytosis and the production of superoxide anions in Atlantic salmon macrophages, the production of the macrophage-activating factor in goldfish lymphocytes, the production of interleukin 1-like molecules in catfish monocytes [9] and elicits the expression of cytokines such as tumour necrosis factor (TNF- α) in rainbow trout [10] and Atlantic salmon [11]. The ability of LPS to induce Mx responses has been demonstrated in fish [12].

The aim of this work was to compare the response of Mx expression induced with poly I:C, purified *Vibrio alginolyticus* LPS and DNA along over 31 days.

The bacteria, *V. alginolyticus* 521, was provided by the Spanish Type Culture Collection and was cultured in Brain Heart Infusion Broth (BHIB) supplemented with 1% NaCl at 25 °C for 24 h.

For DNA extraction, the Wizard Genomic DNA purification kit (Promega) was used according to the manufacturer's instruction. The DNA was diluted in PBS 1 mg ml⁻¹ and stored at -20 °C.

Bacterial LPS was isolated using a modification of the protocol previously described by Wesphal et al. [13]. To remove the nucleic acids, the lyophilised product was dissolved in sterile distilled water and mixed with 1 ml RNase (USB Corporation) per 10 ml of water to 3%. It was then incubated at 37 °C for 1 h and centrifuged at 105,000 \times g for 4 h. The supernatant was removed and resuspend in 1 ml of sterile distilled water. The suspension was then freeze-dried. Then, when inoculated the LPS, was dissolved in PBS at 1 mg ml⁻¹.

Gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.), with 36 g of mean weight, were obtained from a commercial fish farm (ADSA S.A., Gran Canaria, Spain). Fish were acclimatised to laboratory conditions and fed daily *ad libitum* with a commercial diet (SKRETTING). Then, fish were anaesthetised with 2-phenoxyethanol (Panreac). A control group of 50 fish were injected intra-peritoneally (i.p.) with 100 μ l of PBS and the treated group ($n = 50$) were injected with 100 μ l (500 μ g) of poly I:C (Sigma), with 100 μ l (100 μ g) of the bacterial DNA or 100 μ l (100 μ g) of the bacterial LPS.

Fish were euthanised in an anaesthetic bath at 0, 12, 24 and 72 h, and 3, 6, 9, 12, 18, 24 and 31 days post-inoculation, removing about 50 mg of the liver tissue from each individual, which was immediately preserved in 500 μ l RNA-later (Sigma).

RNA extraction of these samples was performed following the protocol of Chomczynski [14]. The RNA was eluted in 75 μ l RNase-free dH₂O. RNA was reverse transcribed to cDNA using the iScript Reverse Transcription Reagent kit (Bio-Rad) as follows: 2 μ l of total RNA (approx. 10 μ g), 5 μ l of buffer reaction 5 \times and 12 μ l of

* Corresponding author. Tel.: +34 928 45 97 29.
E-mail address: facosta@dpal.ulpgc.es (F. Acosta).

RNase-free dH_2O , heated the mixture to $70^\circ C$ for 10 min and chilled on ice. Then, were added 1 μl of enzyme reverse transcriptase ($200 U \mu l^{-1}$) and 5 μl of RNase-free dH_2O . This was subsequently incubated at $25^\circ C$ for 10 min, 50 min at $42^\circ C$ and 15 min at $70^\circ C$, with the cycle ending at $4^\circ C$ or ice.

Specific primers were used for the amplification of the *Mx* gene (forward, 5'-AATCAGCTTGGTGTGTTI-3'; reverse, 5'-TCTGTATGAATCCGTGCTA-3') and as a control β -actin was used (forward, 5'-GGGATGGCCAGAAAGACA-3'; reverse, 5'-CCAGAGCGGTATAGCGCAACA-3'). These specific primers were used to amplify fragments of 435 and 302 bp of the *Mx* and β -actin, respectively. cDNA ($1.5 \mu l$) was added to the following mix: 2.5 μl of buffer reaction $10\times$ (Bioline), 0.5 μl dNTP master mix (2.5 mM of each base, Bioron), 0.75 μl $MgCl_2$ (50 mM, Bioline), 1 μl $10 \mu M$ of each primer and $0.125 (5 U \mu l^{-1})$ of Taq polymerase (Biotaq, Bioline). The final volume was adjusted to 25 μl by adding RNase-free dH_2O . The cycling protocols used for β -actin were as follows: $95^\circ C$ for 4 min and 30 s, 30 cycles of $95^\circ C$ for 30 s, $58^\circ C$ for 30 s, $70^\circ C$ for 30 s, followed by $70^\circ C$ for 10 min. The cycling protocols used for *Mx* were $95^\circ C$ for 4 min and 30 s, 35 cycles of $95^\circ C$ for 30 s, $54^\circ C$ for 30 s, $70^\circ C$ for 30 s, and finally $70^\circ C$ for 10 min.

PCR products for each sample were run on a 2% agarose gel and visualised by staining with ethidium bromide ($0.5 \mu g ml^{-1}$). To counteract the variation in RNA quality and reverse transcription efficiency between samples, the intensity of the PCR product was quantified by the software Quantity One™ (Bio-Rad).

Differences in gene expression data between the control group and the other groups were analysed by one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Duncan's test. The significance level was set at $p < 0.05$. All the statistical analyses were performed using Statgraphics Centurion XV.

Fish are exposed to a wide variety of pathogens. Among these pathogens, viruses pose a serious threat because they infect fish in almost all of their stages. Recent studies in fish have shown that IFNs and an IFN-inducible gene, *Mx*, exert potent antiviral activity, indicating a close similarity between teleost and mammalian IFN signaling pathways [15].

PBS-injected fish showed a slight *Mx* mRNA expression, which is similar to that shown by some non-treated fish on day 0 (Fig. 1). So these levels are considered a constitutive expression, within mean $Mx:\beta$ -a = 0.27, the average being 0.15.

In this study was used poly I:C, which has been extensively shown to induce *in vitro* and *in vivo* antiviral activities in fish [12,16–20] via the stimulation of IFN, LPS and DNA following previous results [12] but using *V. alginolyticus*, a common bacterium in the marine waters of the Canary Islands, where this study was carried out.

In this work, the three products used triggered the IFN system, as observed in the three inductions of the *Mx* gene. Poly I:C results are in agreement with those obtained from numerous works, where it was defined as a potent inducer of IFN. The results show that the maximum value is at 12 h post-inoculation (mean $Mx:\beta$ -a = 1.19) (Fig. 1). This agrees with the results obtained with Senegalese sole [20], but not with those showed for Atlantic salmon [12], where a peak was obtained at 6 d and 9 d post-inoculation depending on the temperature. Other authors found a peak at 2 d [19], and at 24 h [21]. Therefore, it could serve as a good immunostimulant at very short notice or for treating predictable disease outbreaks. With this product, we suffered no mortality unlike other studies where the same amount of immunostimulant was used, suffered mortality after 24 h [19]. Furthermore, after 18 days it reached a basal level (mean $Mx:\beta$ -a = 0.14), taking a broad scope for action.

Mx expression induced by the injection of *V. alginolyticus* DNA and LPS was similar to previous findings showing that *Mx* expression was induced by DNA vaccination with a viral glycoprotein gene, poly I:C administration, virus infections and an injection of IRF-1 during the early stages, i.e., 1–7 days post-vaccination [15]. This suggests the possibility of using bacterial DNA and LPS in regulating the expression of some genes such as *Mx* to mount an early defence against virus infection, such as IPNV [2] or nodavirus infection [22], both very frequent in continental and marine Mediterranean aquaculture.

The fish inoculated with bacterial DNA showed the highest expression on day 3 (mean $Mx:\beta$ -a = 0.89) (Fig. 1) after inoculation, decreasing to a basal level by day 24 (mean $Mx:\beta$ -a = 0.23). These data agree with previous results on *Mx* still being expressed, although weakly, at 25 days after injection with IRF-1 [15]. However, immunostimulation with LPS showed a slight plateau between days 3 (mean $Mx:\beta$ -a = 0.9) and 9 (Fig. 1), this being the last day that showed a slightly higher expression (mean $Mx:\beta$ -a = 0.97). The *Mx* mRNA expression decreased to a basal level by day 31 (mean $Mx:\beta$ -a = 0.25), as previous authors reported [23], who showed that *Mx* expression persisted for at least 35 days in Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*) upon infection with IPNV, suggesting that the persistence of *Mx* is because of molecular stability rather than continuous induction.

V. alginolyticus LPS is the best product used in this work as a stimulator of the immune system, although it takes three days to reach maximum values (0.9), remains at these levels six days and does not reach basal levels until the 31 days post-inoculation.

In conclusion, on the basis of *Mx* expression in gilthead sea bream, the best results have been obtained with *V. alginolyticus* LPS and poly I:C, but further work is needed to see how stimulated fish react to viral infection.

Acknowledgements

This research was supported by a grant from the Canary Islands Government, Spain (PI042002/153).

References

- Collet B, Secombes CJ. Type I-interferon signaling in fish. *Fish & Shellfish Immunology* 2002;12:389–97.
- Ortega C, Enríquez R. Factores asociados a la infección celular por el virus de la necrosis pancreática infecciosa (IPNV). *Archivos de Medicina Veterinaria* 2007;39:7–18.
- Milev-Milovanovic I, Majji S, Thodima V, Deng Y, Hanson L, Arnizaut A, et al. Identification and expression analyses of poly [I: C]-stimulated genes in channel catfish (*Ictalurus punctatus*). *Fish & Shellfish Immunology* 2009;26: 811–20.
- Jensen I, Albuquerque A, Sommer AI, Robertsen B. Effect of poly I: C on the expression of *Mx* proteins and resistance against infection by infectious salmon anaemia virus in Atlantic salmon. *Fish & Shellfish Immunology* 2002; 13:311–26.

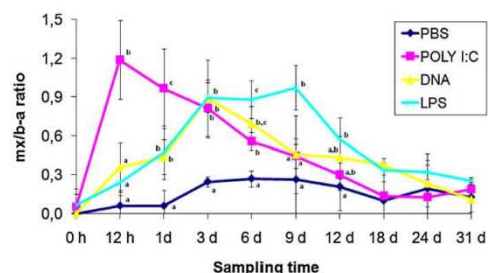


Fig. 1. Analysis of the levels of *Mx* expression in liver of PBS, poly I:C, *Vibrio alginolyticus* DNA and LPS injected gilthead sea bream sampled. Data represent *Mx* expression relative to β -actin as mean \pm SE ($n = 4$). Letters denotes significant differences ($p < 0.05$).

Author's personal copy

172

J. Bravo et al. / Fish & Shellfish Immunology 31 (2011) 170–172

- [5] Acosta F, Petrie A, Lockhart K, Lorenzen N, Ellis AE. Kinetics of Mx expression in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) parr in response to VHS–DNA vaccination. *Fish & Shellfish Immunology* 2005;18:81–9.
- [6] Fernández-Trujillo MA, Porta J, Borrego JJ, Alonso MC, Alvarez MC, Béjar J. Cloning and expression analysis of Mx cDNA from Senegalese sole (*Solea senegalensis*). *Fish & Shellfish Immunology* 2006;11(21):577–82.
- [7] Ellis AE. Innate host defense mechanisms of fish against viruses and bacteria. *Developmental and Comparative Immunology* 2001;25:327–39.
- [8] Robertsen B. Expression of interferon and interferon-induced genes in salmonids in response to virus infection, interferon-inducing compounds and vaccination. *Fish & Shellfish Immunology* 2008;25:351–7.
- [9] Sakai M. Current research status of fish immunostimulants. *Aquaculture* 1999;172:63–92.
- [10] Zou J, Wang T, Hirono I, Aoki T, Inagawa H, Honda T, et al. Differential expression of two tumor necrosis factor genes in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Developmental and Comparative Immunology* 2002;26:161–72.
- [11] Haugland Ø, Mercy IS, Romøren K, Torgersen J, Evensen Ø. Differential expression profiles and gene structure of two tumor necrosis factor- α variants in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Molecular Immunology* 2007;44:1652–63.
- [12] Acosta F, Lockhart K, Gahlawat SK, Real F, Ellis AE. Mx expression in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) parr in response to *Listonella anguillarum* bacterin, lipopolysaccharide and chromosomal DNA. *Fish & Shellfish Immunology* 2004;17:255–63.
- [13] Westphal O, Jann K. Bacterial lipopolysaccharides. extraction with phenol-water and further application of the procedure. *Methods in Carbohydrate Chemistry* 1965;5:83–91.
- [14] Chomczynski P, Sacchi N. Single step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Analytical Biochemistry* 1987;162:156–9.
- [15] Caipang CMA, Hirono I, Aoki T. Modulation of the early immune response against viruses by a teleostean interferon regulatory factor-1 (IRF-1). *Comparative Biochemistry and Physiology - Part A* 2009;152:440–6.
- [16] Eaton WD. Anti-viral activity in four species of salmonids following exposure to poly inosinic:cytidylic acid. *Diseases of Aquatic Organisms* 1990;9:193–8.
- [17] Nygaard R, Husgard S, Sommer AI, Leong JA, Robertsen B. Induction of Mx protein by interferon and double-stranded RNA in salmonid cells. *Fish & Shellfish Immunology* 2000;10:435–50.
- [18] Jørgensen JB, Johansen A, Stenersen B, Sommer AI. CpG oligodeoxynucleotides and plasmid DNA stimulate Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) leucocytes to produce supernatants with antiviral activity. *Developmental and Comparative Immunology* 2001;25:313–21.
- [19] Lockhart K, Bowden TJ, Ellis AE. Poly I:C-induced Mx responses in Atlantic salmon parr, post-smolts and growers. *Fish & Shellfish Immunology* 2004;17:245–54.
- [20] Trobridge GD, Chiou PP, Kim CH, Leong JC. Induction of the Mx protein of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* *in vitro* and *in vivo* with poly I: C dsRNA and infectious hematopoietic necrosis virus. *Diseases of Aquatic Organisms* 1997;30:91–8.
- [21] Fernandez-Trujillo A, Ferro P, Garcia-Rosado E, Infante C, Alonso MC, Bejar J, et al. C induces Mx transcription and promotes an antiviral state against sole aquabirnavirus in the flatfish Senegalese sole (*Solea senegalensis* Kaup). *Fish & Shellfish Immunology* 2008;24:279–85.
- [22] Das BK, Ellis AE, Collet B. Induction and persistence of Mx protein in tissues, blood and plasma of Atlantic salmon parr, *Salmo salar*, injected with poly I:C. *Fish & Shellfish Immunology* 2009;26:40–8.
- [23] Chen YM, Su YL, Shie PS, Huang SL, Yang HL, Chen TY. Grouper Mx confers resistance to nodavirus and interacts with coat protein. *Developmental & Comparative Immunology* 2008;32:825–36.

