

JACUMAR
JUNTA NACIONAL ASESORA DE CULTIVOS MARINOS

PLANES NACIONALES DE CULTIVOS MARINOS

INFORME FINAL

**Título: Nuevas vías para el tratamiento de infecciones
sistémicas en acuicultura**

DATOS DE LOS INVESTIGADORES

- Investigador responsable
Nombre y apellidos: Dr. José Luis Múzquiz Moracho
Organismo: Universidad de Zaragoza
Centro: Facultad de Veterinaria
Departamento: Patología Animal
Equipo: Laboratorio de Ictiopatología
Teléfono: 976 761569
Fax.: 976 761612
Correo electrónico: muzquiz@unizar.es
Dirección postal: c/ Miguel Servet, 177; 50013 Zaragoza

- Resto de investigadores
Nombre y apellidos: Dr. Imanol Ruiz-Zarzuela
Organismo: Universidad de Zaragoza
Centro: Facultad de Veterinaria
Departamento: Patología Animal
Equipo: Laboratorio de Ictiopatología
Teléfono: 976 764110
Correo electrónico: imaruz@unizar.es

Nombre y apellidos: Dr. Ignacio de Blas Giral
Organismo: Universidad de Zaragoza
Centro: Facultad de Veterinaria
Departamento: Patología Animal
Equipo: Laboratorio de Ictiopatología
Teléfono: 976 764111
Correo electrónico: deblas@unizar.es

TITULO: NUEVAS VÍAS PARA EL TRATAMIENTO DE INFECCIONES SISTÉMICAS EN ACUICULTURA

FECHA DE REALIZACIÓN: 2005-2008

DATOS DEL COORDINADOR DEL PROYECTO:

NOMBRE Y APELLIDOS: Isabel Márquez Llano-Ponte

ORGANISMO/CENTRO: Servicio Regional de Investigación y Desarrollo
Agroalimentario del Principado de Asturias (SERIDA)

DEPARTAMENTO: AREA DE SANIDAD ANIMAL

TELÉFONO: 985 30 84 70

FAX: 985 32 78 11

Correo electrónico: imarquez@serida.org

DIRECCIÓN: Laboratorio Sanidad Animal. SERIDA.

Travesía del Hospital 96; 33299 GIJON- ASTURIAS

PARTICIPANTES: por cada comunidad autónoma

CENTROS DE INVESTIGACIÓN

Tipo de Centro: Centro público de I+D

Nombre: Universidad de Zaragoza

CIF: Q-50018001-G

Nombre del representante legal: D. José Ramón Beltrán Blázquez
(Vicerrector de Investigación)

Nombre y apellidos: Dra. Olivia Gironés Puñet

Organismo: Universidad de Zaragoza

Centro: Facultad de Veterinaria

Departamento: Patología Animal

Equipo: Laboratorio de Ictiopatología

Teléfono: 976 762013

Correo electrónico: ogirones@unizar.es

Nombre y apellidos: Dr. José Luis Alonso Martínez

Organismo: Universidad de Zaragoza

Centro: Facultad de Veterinaria

Departamento: Patología Animal

Equipo: Laboratorio de Ictiopatología

Teléfono: 976 762044

Correo electrónico: jalonso@unizar.es

Nombre y apellidos: Dr. Nabil Halaihel Kassab

Organismo: Universidad de Zaragoza

Centro: Facultad de Veterinaria

Departamento: Patología Animal

Equipo: Laboratorio de Ictiopatología

Correo electrónico: nabilhk@unizar.es

Nombre y apellidos: Dr. Daniel Vendrell Pérez

Organismo: Universidad de Zaragoza

Centro: Facultad de Veterinaria

Departamento: Patología Animal

Equipo: Laboratorio de Ictiopatología

Correo electrónico: danivendrell@yahoo.es

Nombre y apellidos: Dr. José Luis Bálcazar Rojas
Organismo: Centro Superior de Investigaciones Científicas (CSIC)
Centro: Instituto de Investigaciones Marinas
Correo electrónico: balcazar@iim.csic.es
Dirección postal: c/ Eduardo Cabello, 6; 36208 Vigo

Nombre y apellidos: Lda. Tania Pérez Sánchez
Organismo: Universidad de Zaragoza
Centro: Facultad de Veterinaria
Departamento: Patología Animal
Equipo: Laboratorio de Ictiopatología
Correo electrónico: taniaper@unizar.es

2-Tipo de centro: Centro público I+D

Nombre: Servicio Regional de Investigación y Desarrollo Agroalimentario del Principado de Asturias (SERIDA)

CIF: S 3300003E

Nombre representante legal: Pedro Castro Alonso

DATOS DE LOS INVESTIGADORES

- Investigador responsable

Nombre y Apellidos: Isabel Márquez Llano-Ponte

Organismo: Consejería de Medio Rural y Pesca de Asturias

Centro: Servicio Regional de Investigación y Desarrollo Agroalimentario

Departamento: Área de Sanidad Animal

Equipo: Ictiopatología

Teléfono: 985 30 84 70

fax: 985 32 78 11

Correo electrónico: imarquez@serida.org

Dirección postal: Laboratorio de Sanidad Animal. (serida).

Travesía del hospital 96; 33299-Gijón-Asturias

Nombre y Apellidos: José Miguel Prieto Martín
Centro: Servicio Regional de Investigación y Desarrollo Agroalimentario
Departamento: Área de Sanidad Animal
Teléfono: 985 30 84 70
fax: 985 32 78 11
Correo electrónico: jmprieto@serida.org
Dirección postal: Laboratorio de Sanidad Animal. (serida).
Travesía del hospital 96; 33299-Gijón-Asturias

Nombre y Apellidos: Rosa Casais Goyos
Centro: Servicio Regional de Investigación y Desarrollo Agroalimentario
Departamento: Área de Sanidad Animal
Teléfono: 985 30 84 70
fax: 985 32 78 11
Correo electrónico: rosacg@serida.org
Dirección postal: Laboratorio de Sanidad Animal. (serida).
Travesía del hospital 96; 33299-Gijón-Asturias

Nombre y Apellidos: Ana del Cerro Arrieta
Centro: Servicio Regional de Investigación y Desarrollo Agroalimentario
Departamento: Área de Sanidad Animal
Equipo: Ictiopatología
Teléfono: 985 30 84 70
fax: 985 32 78 11
Correo electrónico: anadelcerro@rocketmail.com
Dirección postal: Laboratorio de Sanidad Animal. (Serida).
Travesía del hospital 96; 33299-Gijón-Asturias

2- RESULTADOS TÉCNICOS DEL PLAN NACIONAL

2.1 OBJETIVOS:

OBJETIVO GENERAL:

Encontrar nuevas vías para el tratamiento de infecciones sistémicas en acuicultura, particularmente frente a tres importantes bacteriosis que afectan a salmónidos tanto de cultivo como de poblaciones salvajes

OBJETIVOS PARCIALES:

1. Caracterizar molecularmente los agentes causales de los brotes de forunculosis, síndrome del alevín y lactococosis registrados en los últimos años y que se podrían registrar a lo largo del desarrollo del proyecto, con el fin de profundizar en la relación filogenético a nivel intraespecie.
 - 1.1. Obtener un banco de cepas de las tres bacterias bajo estudio a partir de distintas especies de salmónidos (*Salmo salar*, *Oncorhynchus mykiss* y *Salmo trutta*) en las comunidades autónomas implicadas en el proyecto: Aragón, Asturias, La Rioja y Navarra, tanto en piscifactorías como en ríos.
 - 1.2. Tipificación fenotípica y genotípica de las cepas aisladas. Entre las últimas se aplicarán: amplificación de secuencias de ADN aleatorias (RAPD), macrorestricción genómica y electroforesis en campo pulsante (PFGE) y perfil de genes de virulencia (genes-V) y genes de resistencia a antimicrobianos (genes-R)
2. Seleccionar bacterias de la flora endógena en salmónidos por sus propiedades antibacterianas para reducir las mortalidades producidas por infecciones bacterianas sistémicas.
 - 2.1. Identificar la flora endógena de salmónidos en condiciones naturales.
 - 2.2. Evaluar el antagonismo in vitro de la microflora de los peces con cepas patógenas de *A. salmonicida*, *Fl. psychrophilum* y *L. garvieae*.
 - 2.3. Evaluar adhesión in vitro de las cepas seleccionadas en el mucus y resistencia a bilis de los peces.

2.4. Evaluar el efecto in vivo de las cepas seleccionadas en los peces, observando la supervivencia, crecimiento, colonización, inmunoestimulación y lesiones histopatológicas.

2.5. Tipificación genética de las cepas bacterianas probióticas seleccionadas.

3. Evaluación in vivo las cepas probióticas seleccionados frente a los tipos o grupos de bacterias patógenas caracterizadas por técnicas moleculares

3.1. Evaluar el efecto in vivo de las cepas seleccionadas al desafiarlas con cepas patógenas de *A. salmonicida*, *Fl. psychrophilum* y *L. garvieae* en los salmónidos, observando supervivencia y colonización.

2.1. OBJETIVOS INICIALES: LINEA 1

- Caracterizar molecularmente los agentes causales de los brotes de forunculosis, síndrome del alevín y lactococosis registrados anteriormente y durante la realización del proyecto, con el fin de profundizar en el conocimiento de la relación filogenética intraespecie.
 - Obtener un banco de cepas de las tres bacterias bajo estudio a partir de distintas especies de salmónidos (*Salmo salar*, *Oncorhynchus mykiss* y *Salmo trutta*) en las comunidades autónomas implicadas en el proyecto: Aragón, Asturias, La Rioja y Navarra, tanto en piscifactorías como en ríos.
- Tipificación genética de cepas probióticas seleccionadas.
- Evaluar el efecto in vivo de las cepas seleccionadas al desafiarlas con cepas patógenas de *A. salmonicida*, *Fl. psychrophilum* y *L. garvieae* en los salmónidos, observando supervivencia y colonización.
- Evaluación in vivo de cepas probióticas frente a las bacterias caracterizadas molecularmente.

2.1.2.- OBJETIVOS REALIZADOS LINEA 1

- Puesta a punto de la metodología para caracterizar mediante amplificación de secuencias aleatorias (RAPD: random amplified polymorphic DNA) las especies a estudiar en el proyecto.
- Puesta a punto de la metodología para caracterizar mediante macrorrestricción de ADN (PFGE: pulsed field gel electrophoresis) las especies a estudiar en este proyecto.
- Caracterización molecular mediante RAPD y PFGE, de las cepas de *A. salmonicida*, *L. garvieae* y *F. psychrophilum*, aisladas a partir de brotes infecciosos ocurridos durante el período de estudio, en las CCAA participantes y en otras adyacentes.
- Puesta a punto de la metodología para caracterizar mediante PFGE las cepas probióticas seleccionadas.

2.3. METODOLOGÍA LINEA 1

2.3.1. Línea 1: Recolección, caracterización molecular y epidemiología de las especies bacterianas implicadas en los brotes de forunculosis, síndrome de alevín y lactococosis en salmónidos

2.3.1.1. Actividad: Obtención de cepas bacterianas para su estudio y establecimiento de un cepario

Para la obtención de las cepas de las tres bacterias en estudio (*A. salmonicida*, *L. garvieae* y *F. psychrophilum*), se utilizaron los métodos siguientes:

- Colecciones de cepas recogidas en años anteriores de brotes en ríos y piscifactorías que se mantienen en los ceparios del laboratorio de Acuicultura de la Universidad de Zaragoza, del Departamento de Ictiopatología del SERIDA (Asturias) y del Laboratorio de Sanidad Animal de

la Comunidad Autónoma de Castilla y León, del Departamento de Diagnóstico de Enfermedades de Peces de BioMar y del Servicio de Diagnóstico de Skretting SA.

- A partir de brotes infecciosos que han ocurrido en las piscifactorías situadas en las zonas objeto de estudio en colaboración de las ADS (Agrupación de Defensa Sanitaria) de Asturias, Aragón, La Rioja y Navarra.
- Cepas de referencia, de otras regiones y de distintos orígenes para cada una de las especies.
- Cepas de otras especies taxonómicamente y/o ecológicamente relacionadas (*Flavobacterium* sp., *Aeromonas* sp., *Lactococcus* sp., *Streptococcus* sp., etc).

El procesado de las muestras, y el aislamiento del correspondiente patógeno a partir de tejidos de peces enfermos, se realizó según la metodología descrita en del Cerro y cols. (2002a). La confirmación de las colonias crecidas en los medios de cultivo y condiciones de incubación correspondientes para cada especie, se realizó mediante PCR según la metodología descrita en del Cerro y cols. 2002. Las cepas confirmadas se conservaron mediante resiembra periódica en placa y conservación en 15 % glicerol y Crioteca® skim milk a -80 °C.

2.3.1.2. Actividad: Caracterización de las cepas de *F. psychrophilum*, *A. salmonicida* y *L. garvieae*.

- Caracterización fenotípica mediante perfil de resistencias a antimicrobianos de uso en acuicultura, utilizando el método de macrodilución en medio líquido (Muller-Hinton diluido) descrito por Alderman y Smith (2001).
- Caracterización mediante análisis de polimorfismos en el ADN cromosómico:
 - Polimorfismos del ADN total mediante análisis de restricción y electroforesis en campo pulsante (PFGE) según metodologías descritas en la literatura para las especies *A. salmonicida* (García y

cols, 2000; O'hici y cols, 2000) y *L. garvieae* (Vela y cols, 2000), y una metodología desarrollada en este proyecto para *F. psychrophilum* y cepas probióticas.

- Técnicas de amplificación de ADN basadas en la PCR: perfil de genes de resistencia (genes-R) y amplificación de secuencias aleatorias y universales (RAPD). La metodología a seguir para el RAPD ha sido utilizada en trabajos previos (Soto y cols, 1999 y 2001; del Cerro y cols, 2002b).

2.3.1.3. Actividad: Análisis estadístico y epidemiológico

Para el análisis de similitud genética entre tipos definidos por los diferentes métodos genéticos, se compararon los patrones de bandas obtenidos mediante un método cualitativo (presencia o ausencia de bandas cuantificada por 1 ó 0), se aplicó el programa MVS (Multivariate Statistics Package 2.0a) utilizando el coeficiente de Dice y se generaron los correspondientes dendogramas de relación genética entre tipos correspondientes (Struelens y cols, 1996).

2.2.- OBJETIVOS ESPECIFICOS LINEA 2

- Seleccionar bacterias de la flora endógena en salmónidos por sus propiedades antibacterianas para reducir las mortalidades producidas por infecciones bacterianas sistémicas.

OBJETIVOS REALIZADOS LINEA 2

Para la consecución de los objetivos planteados inicialmente se optó por abordar cada una de las patologías a estudio de forma independiente, puesto que se trata de enfermedades no correlacionadas entre sí que aparecen en distintas épocas del año y afectan a diferentes fases de producción. Así, las tareas llevadas a cabo durante la duración del proyecto fueron las siguientes:

- Durante el año 2005, se llevó a cabo el estudio y selección de cepas bacterianas con propiedades inhibitorias frente a diversas bacterias patógenas, así como la caracterización de aquellas cepas probióticas candidatas. De todas las cepas estudiadas (n = 246), se demostró que *L. lactis* subs. *lactis* CLFP

100, *L. mesenteroides* CLFP 196, *Lactobacillus plantarum* CLFP 238 y *L. sakei* CLFP 202, aisladas a partir del intestino de diferentes especies salmonícolas sanas (trucha común, trucha arco iris y salmón atlántico), presentaron una buena adhesión al mucus intestinal y mostraron actividad antibacteriana frente a algunas bacterias patógenas, principalmente frente a *Aeromonas salmonicida* y *Lactococcus garvieae*.

- Durante el año 2006 se llevaron a cabo dos estudios experimentales con el fin evaluar “in vivo” el papel de las cepas probióticas seleccionadas (*L. lactis* subs. *lactis* CLFP 100, *L. mesenteroides* CLFP 196 y *L. sakei* CLFP 202), al ser administradas a diferentes dosis por vía oral junto al pienso, con el fin de evaluar la inocuidad de las mismas, su capacidad de colonización de la mucosa intestinal y finalmente, determinar el grado de estimulación de la respuesta inmunológica en peces infectados experimentalmente con *Aeromonas salmonicida*.

- Durante el año 2007, se llevaron a cabo diferentes experimentos con el fin de evaluar “in vivo” el efecto probiótico de dos cepas candidatas identificadas molecularmente como *Leuconostoc mesenteroides* CLFP 196 y *Lactobacillus plantarum* CLFP 238, frente al agente patógeno *Lactococcus garvieae*.

- Durante el año 2008, se llevó a cabo el aislamiento e identificación de cepas bacterianas con efecto inhibitorio (n = 335), frente a *Lactococcus garvieae*, agente etiológico responsable de la Lactococosis de la trucha, así como la tipificación genética de las cepas probióticas candidatas seleccionadas.

2.3. METODOLOGÍA LINEA 2

La consecución de los objetivos se ha basado en gran medida en metodologías y técnicas previamente utilizadas por otros autores o puestas a punto en nuestro laboratorio como consecuencia de los estudios realizados, si bien en algunos casos han sido adaptadas y/o modificadas a las características del presente proyecto.

2.3.1.- Selección y recogida de peces (Condiciones de campo).- A partir de brotes sospechosos de enfermedad, detectados en piscifactorías de las Comunidades Autónomas de Aragón, La Rioja, Aragón, Asturias y Navarra se procederá a la recogida de un número predeterminado de peces. La muestra estará formada por peces que presenten manifestaciones clínicas de enfermedad ($n = 10$) y peces aparentemente sanos ($n = 10$), que compartan las mismas condiciones de manejo. Para el cálculo del tamaño muestral se utilizará el programa informático Win Episcope 2.0 (Thrusfield y cols., 2001). El tamaño resultante $n = 10$ es suficiente para detectar agentes que están presentes en la población con una prevalencia esperada mínima del 30% y un nivel de confianza (NC) del 95%. Los peces una vez recogidos serán etiquetados y transportados en condiciones de refrigeración al laboratorio para su posterior procesamiento.

2.3.2.- Aislamiento de agentes patógenos - Se utilizarán los medios de cultivo sólidos, agar Bilis Esculina (BEA), agar Tripticasa Soja (TSA), Agar Cytophaga y agar Sangre, a partir de siembras de los órganos internos bazo, hígado y riñón anterior, con el fin de confirmar la presencia de *Lactococcus garvieae* como agente etiológico responsable de los brotes estudiados. Así mismo, podremos valorar igualmente el estado sanitario de la población y descartar la presencia de otros agentes patógenos diferentes al estudiado.

2.3.3.- Aislamiento de cepas bacterianas con propiedades antibacterianas - Se utilizarán los medios de cultivo sólidos, TSA y agar De Man Rogosa Sharpe (MRS), así como caldo MRS a partir de siembras realizadas de la porción final del intestino, branquias y mucus cutáneo de aquellos peces aparentemente sanos. De forma paralela se podrán realizar siembras a partir de los órganos internos, hígado, bazo y riñón anterior, para confirmar el estado sanitario de la población.

2.3.4.- Identificación bacteriana – Mediante pruebas de crecimiento, tinción y microscopía y pruebas bioquímicas entre las que se incluirán sistemas de identificación API 20E, API 20NE, API 50CH y API 20Strep.

2.3.5.- Selección de cepas con propiedades antibacterianas – Según método descrito por Austin y cols. (1992).

2.3.6.- Secuenciación de las cepas probióticas candidatas - Se utilizarán cebadores basados en las regiones conservadas del gen 16S ARNr para amplificar aproximadamente un producto de 500bp del gen 16S rARN. Los cebadores utilizados serán plb16 (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') y mlb16 (5'- GGCTGCTGGCACGTAGTTAG-3'). Todas las amplificaciones serán realizadas en un termociclador Perkin-Elmer GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems, Perkin-Elmer, USA). Los productos de la PCR serán purificados utilizando un kit comercial (Promega, Madison, WI), siguiendo las instrucciones del fabricante. Los productos serán directamente secuenciados en un secuenciador MegaBACE ET Terminators (Amersham Biosciences, UK). Las secuencias obtenidas serán alineadas mediante la utilización de la base de datos GenBank y el programa informático Clustal W (Thompson y cols., 1994).

2.3.7.- Mantenimiento de animales - Disponemos de un set experimental aislado que nos permitirá llevar a cabo los diferentes ensayos experimentales "in vivo". Dicho set cuenta con 5 tanques de 1000 litros de capacidad cada uno, circuito abierto de agua, oxigenación forzada y sistemas para controlar tanto el fotoperiodo como la temperatura del agua y del ambiente. Todos los peces serán proporcionados por una piscifactoría ubicada en la Comunidad Autónoma de Aragón y perteneciente a la Asociación de Defensa Sanitaria Acuícola, lo que implica la instauración y seguimiento de un programa sanitario, asegurándonos que los peces que forman parte del estudio no han estado previamente en contacto con el agente etiológico *Lactococcus garvieae*.

2.3.8.- Peces y condiciones experimentales – Se utilizarán truchas arco iris (*Oncorhynchus mykiss*), con un peso aproximado de 25-30 gramos. Antes del comienzo de cada experiencia éstos serán aclimatados durante una semana a las condiciones del mismo. Para cada uno de los dos ensayos experimentales que forman parte de los objetivos 3 y 4 del presente proyecto, se prepararán un número determinado de grupos de trabajo (estarán en función del número de cepas probióticas candidatas que pretendamos estudiar), en estanques de

1000 litros de capacidad, con una renovación diaria del agua del 25%, oxigenación forzada, a una temperatura de 16 ± 1 °C y un fotoperiodo de 12 h oscuridad / 12 h luz. En cada uno de estos estanques se introducirán de forma aleatoria 60 peces formando grupos homogéneos. Así mismo, los peces serán alimentados diariamente con un pienso comercial al 1% de la biomasa.

2.3.9.- Preparación del alimento suplementado con probióticos - Las bacterias candidatas serán mantenidas en caldo MRS a 22 °C durante 14 horas en constante movimiento. Posteriormente se centrifugarán a 1000 g durante 10 minutos a una temperatura de 4 °C. El precipitado obtenido se disolverá en solución salina hasta obtener una concentración de 1.0×10^6 cels/ml determinado por un hemocitómetro (cámara de Neubauer). Una vez conocida la concentración, se disolverán en la dieta para alcanzar una concentración final de 1×10^6 ufc / gramo de pienso. La viabilidad de las bacterias será determinada mediante conteo en placas de agar MRS.

2.3.10.- Infección experimental – Las infecciones experimentales con los diferentes agentes patógenos en estudio serán realizadas por el método de cohabitación. Previamente se seleccionaran 16 peces de cada grupo de trabajo establecido en cada uno de los ensayos experimentales (serán marcados mediante un corte en la aleta adiposa), a los cuales se les inoculará 0.1 ml de suspensión bacteriana a una concentración de 1.7×10^6 ufc / ml, por vía intraperitoneal. Todos los datos de mortalidad serán registrados diariamente en cada uno de los grupos de trabajo.

2.3.11.- Recuento de células sanguíneas.- A partir de muestras de sangre se determinará un conteo de eritrocitos en cámara de Neubauer previa dilución 1/200 en solución de Natt y Herrick. Para establecer la fórmula leucocitaria se utilizará la técnica de Panóptico rápido.

2.3.12.- Recogida de muestras - Se seleccionarán al azar entre 6-10 peces de cada grupo al final de la primera, segunda, tercera y cuarta semana. Los peces serán sacrificados por inmersión en un tanque con triclaína metano sulfatado (MS-222) a una concentración de 150 mg/l de agua durante 10 min.

Inmediatamente después de la eutanasia se extraerán entre 0.5 - 1.0 ml de sangre de cada pez con jeringuillas de insulina mediante punción en la vena caudal. La mitad de la muestra fue destinada para obtener plasma (0.5 ml), recogido en tubos eppendorf con heparina de litio (10 µl), centrifugada a 1500g y refrigerada a 4 °C durante 10 min. Mientras, la otra mitad fue empleada para obtener suero (0.5 ml), para lo que fue recogida en tubos eppendorf, mantenida a 10 °C durante 2 h y centrifugada a 1500g y posteriormente refrigerada a 4 °C durante 20 min.

Todas las muestras serán congeladas a - 80 °C. Las muestras de plasma serán usadas para determinar el porcentaje de inmunoglobulina total y las muestras de suero para determinar la actividad lisozima y la actividad complemento vía alternativa.

Tras la obtención de las muestras de sangre se procederá a realizar la necropsia de los peces seleccionados, con el fin de evaluar la ausencia de lesiones internas y realizar el análisis bacteriológico de diferentes órganos internos (bazo, riñón anterior, hígado e intestino).

2.3.13.- Evaluación del grado de colonización – Se realizará un análisis bacteriológico antes de empezar el ensayo y hacia la mitad del estudio. Los intestinos obtenidos serán pesados y macerados, después de retirar cuidadosamente el contenido del mismo con PBS. A continuación, se realizarán diluciones seriadas en PBS de 10⁻¹ a 10⁻⁶ para realizar el conteo de unidades formadoras de colonias (ufc), utilizando medio de cultivo MRS.

Las placas sembradas serán incubadas aeróbicamente a 22 °C durante 48 h. Para la identificación molecular de las BAL, se realizarán amplificaciones de 20 a 30 colonias seleccionadas al azar de las placas de agar MRS que presentan entre 30 y 300 colonias.

2.3.14.- Actividad fagocítica - Se utilizarán los métodos descritos por Bálcazar y cols. (2006).

2.3.15.- Producción de anión superóxido - Según los métodos establecidos por Puangkaew y cols. (2004).

2.3.16.- Actividad lisozima – Se utilizarán los métodos descritos por Demers y Bayne (1997).

2.3.17.- Determinación de la actividad complemento vía alternativa - Se utilizarán los métodos descritos por Yano (1992).

2.3.18.- Determinación de Inmunoglobulinas totales - Se utilizarán los métodos descritos por Siwiki y Anderson (1993). La determinación del porcentaje de proteínas se realizará mediante la técnica descrita por Lowry y cols. (1951).

2.3.19.- Prueba de resistencia a bilis - Se utilizará una adaptación de la técnica descrita por Nikoskelainen y cols. (2001). Suspensiones bacterianas de las cepas seleccionadas a una concentración de 10⁸ ufc/ml se colocarán en buffer fosfato salino PBS (10 mM fosfato, pH 7.2) y en PBS con 10% de bilis. Las muestras se incubarán por 1.5 h a 37°C. Después de la incubación, las muestras serán diluidas en solución PBS y se realizará el conteo utilizando placas de agar TSA.

2.3.20.- Prueba in vitro de adhesión al mucus - Se utilizará una adaptación de la técnica descrita por Nikoskelainen y cols. (2001). Las cepas serán marcadas con tritiated thymidine (10 µL/mL, 177 Ci/mmol). Una vez obtenidas las suspensiones se realizará un lavado con buffer fosfato salino (PBS; 10 mM fosfato, pH 7.2) y se resuspenderán en PBS.

En la extracción del mucus de los peces, se utilizará una espátula y solución HEPES (10 mM; pH 7.4) balanceado con solución Buffer Hank's (HH). Una vez obtenidos, se almacenarán en alícuotas de 1 ml a -70°C.

Para la caracterización del mucus se utilizará la técnica descrita por Lowry y cols. (1951), utilizando suero de albúmina bovino (BSA) como un estándar. La concentración de proteína del mucus será 0.5 mg/ml en HH.

El porcentaje de adhesión se medirá por los niveles de radioactividad, incubando la bacteria marcada por 1 h a 37°C en el mucus y luego se realizará un lavado con HH, para remover las bacterias que no lograron adherirse.

2.3.21.- Análisis estadístico.- Los datos de supervivencia y colonización serán analizados por el método de Kaplan Meier, buscando diferencias significativas con un nivel de significación $p < 0.05$ entre los diferentes tratamientos. También se evaluará la supervivencia final y otras variables diagnósticas cualitativas usando la prueba de Chi-cuadrado y la estimación de sus residuos tipificados corregidos para una significación de $p < 0.05$. Cuando proceda se contrastarán las variables diagnósticas cuantitativas según el tratamiento utilizando la prueba de t de Student o de Mann-Whitney en el caso de dos tratamientos, y ANOVA ó Kruskal-Wallis cuando haya más de dos tratamientos. Todos los datos serán analizados utilizando el programa informático SPSS 12.0 para Windows (SPSS, EE.UU.).

2.4. RESULTADOS

2.4.1 LINEA 1

2.4.1.1 Establecimiento de un cepario

Durante todo el proyecto se aislaron, identificaron y almacenaron a -80°C , un total de 28 cepas de *A. salmonicida*, 25 de *F. psychrophilum* y 3 de *L. garvieae*.

2.4.1.2 Caracterización de las cepas y análisis estadístico

2.4.1.3 Resistencias a antimicrobianos

Se realizaron ensayos de concentración mínima inhibitoria (CMI) para oxitetraciclina (OTC) y fluorfenicol (FLO) en cepas de *F. psychrophilum*, ya que son los antibióticos utilizados normalmente para tratar los brotes. El 80% de las cepas presentaba unas CMIs entre 2.44 and 9.74 $\mu\text{g/ml}$ para OTC, mientras que no se detectaron cepas resistentes a FLO, con CMIs entre ≤ 0.1 y 2.44 $\mu\text{g/ml}$.

2.4.1.4. RAPD

Durante el período 2005-2006 se desarrolló y optimizó la metodología de la técnica RAPD para las 3 especies bacterianas bajo estudio. De los 11 iniciadores ensayados, los mejores perfiles se obtuvieron con R03 (5' GATGACCGCC 3') y R05 (5' AGATGCAGCC 3'), que fueron los utilizados en análisis posteriores. Una vez establecido el protocolo se aplicó a los aislamientos de las diferentes especies obtenidos a lo largo del período de estudio.

La tipificación de *A. salmonicida* con los iniciadores R03 y R05 dio lugar a 3 RAPD-tipos respectivamente. El análisis combinado de estos resultados no aumentaba el número de perfiles diferenciados. En ambos casos, la mayoría de las cepas analizadas presentaban el mismo RAPD-tipo, independientemente de la región donde ocurrió el brote. Los otros dos tipos resultaron específicos de una cepa procedente de Asturias y otra de Aragón respectivamente. En base al dendograma producido mediante el algoritmo UPGMA, todas las cepas, excepto una cepa aislada en Aragón, formaban un único grupo con más del 70% de similitud según el coeficiente Dice.

En el estudio de *L. garvieae* se incluyó un grupo de cepas aisladas en piscifactorías italianas. Utilizando los iniciadores R03 y R05, se observaron 3 perfiles de bandas diferentes con cada uno de ellos, uno de los cuales correspondía a la cepa de colección utilizada procedente de la CECT, otro a todas las cepas aisladas de diferentes brotes ocurridos en España, y un tercero que agrupaba a los aislamientos italianos. Debido al escaso número de cepas aisladas no se hizo análisis estadístico de estos resultados.

En el análisis de las cepas de *F. psychrophilum*, únicamente se diferenciaron tres perfiles diferentes con cada uno de los iniciadores, por lo que no resultó muy discriminativo.

2.4.1.5 PFGE

Para la caracterización genética de las cepas mediante esta técnica, debieron de ajustarse las condiciones del protocolo para cada una de ellas, ya que existe mucha variación de una especie a otra. Una cepa se consideraba diferente a otra si su perfil difería en una o más bandas de tamaño mayor de 50 kb, ya que por debajo de este tamaño, a veces, la densidad de bandas existente no permite diferenciarlas con exactitud.

En el caso de *A. salmonicida*, el enzima de restricción elegido fue *SpeI*, el cual ya había sido utilizado por otros autores (García y cols, 2000). Las condiciones de electroforesis fijadas fueron: 1.0-15.0 sg / 22h / 14 °C / 6 V. Se obtuvieron un total de 9 perfiles diferentes y el RAPD-tipo predominante se separó en 6 PFGE-tipos diferentes, mientras que los otros dos se correspondían con cada uno de los RAPD-tipo específicos. La comparación de

estos PFGE-tipos mediante el análisis de similitud mostró que todas las cepas formaban un único grupo presentando más del 70% de similitud entre ellos.

Para el análisis de *L. garvieae* se utilizaron los enzimas de restricción *Apal* y *SmaI*, con unas condiciones de electroforesis de dos bloques de B1: 0.5-15-sg / 8h / 14 °C / 6 V, B2: 15-30-sg / 10h / 14 °C / 6 V. Al igual que con el RAPD, únicamente se distinguieron tres PFGE-tipos, uno de los cuales agrupaba a todas las cepas aisladas de brotes ocurridos en España, otro la cepa procedente de la CECT y otro las cepas italianas. Como hemos mencionado anteriormente, el escaso número de cepas disponible no permitió realizar el análisis estadístico de los resultados.

La puesta a punto de la metodología para caracterizar *F. psychrophilum* mediante PFGE resultó más laboriosa, por un lado debido a la falta de información en la bibliografía y por otro a lo dificultoso que resulta trabajar con este patógeno. En total se ensayaron 17 enzimas de restricción, y los mejores perfiles se obtuvieron con *StuI*. Las condiciones de electroforesis fueron: B1: 0.2-5 sg / 10h / 14°C / 6V, B2: 5-15 sg / 12h / 14 °C / 6V, siendo importante para la buena resolución de los perfiles la adición de tiourea (8 mg/l) al tampón de electroforesis. Se obtuvieron un total de 16 perfiles diferentes para las 25 cepas procedentes de brotes, que se agruparon en 4 grupos genómicos con más de 80% de similitud y seis ramas independientes, con lo que resulta una técnica más discriminatoria que la anterior.

También se realizaron los experimentos para poner a punto los protocolos de PFGE para la tipificación de las bacterias probióticas aisladas durante este proyecto. Las cepas con las que se trabajó fueron ZAR 100 (*Lactococcus lactis* subsp. *lactis*), ZAR 102 (*Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*), ZAR 150 (*Lactobacillus curvatus*), ZAR 202 (*Lactobacillus sakei*) y ZAR 8H (*Brochothrix thermosphacta*). Al tratarse de especies diferentes hubo que ajustar los protocolos de extracción de ADN y las condiciones de electroforesis para cada una de ellas. Además, hubo que buscar el enzima de restricción más apropiado para cada especie. Los enzimas *Apa I* y *Sma I* dieron buenos resultados para la cepa ZAR 100; además de estos, los enzimas *BamH*

I y Xho I también cortaron el ADN de la cepa ZAR 102. En el caso de la cepa ZAR 202 los mejores resultados se obtuvieron con Xho I. Las condiciones de electroforesis fueron: bloque 1: 0.5-15 sg /8h/ 14°C / 6 Vcm⁻¹ y bloque 2: 15-30 sg /10h / 14 °C / 6 Vcm⁻¹. Sin embargo no se consiguió poner a punto el protocolo para las otras dos cepas restantes.

LINEA 2

2.4.2.- Periodo 2005

2.4.2.1.- Notificación de brotes de enfermedad

Durante el periodo de estudio se registraron un total de 6 episodios de enfermedad, registrados principalmente en explotaciones localizadas en las Comunidades Autónomas de Aragón y Navarra, respectivamente (Tabla 1).

En todos ellos, se diagnosticó como agente etiológico responsable *Aeromonas salmonicida* (Forunculosis). Las especies piscícolas afectadas fueron la Trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*), Trucha común (*Salmo trutta*) y Salmón atlántico (*Salmo salar*). Así mismo, se aislaron un total de 246 cepas bacterianas distribuidas en función de cada uno de los episodios de enfermedad señalados, tal y como podemos observar en la Tabla 1.

Tabla 1. Episodios de enfermedad registrados a lo largo del periodo de estudio

Origen	Fecha	Especie	Número total de cepas aisladas	Agente patógeno aislado
Gobierno de Navarra	Octubre 2004	Trucha común	73	A. salmonicida (Ref. ZAR 501)
Gobierno de Navarra	Noviembre 2004	Trucha común	42	A. salmonicida (Ref. ZAR 502)
Gobierno de Aragón	Abril 2005	Trucha arco iris	65	A. salmonicida (Ref. ZAR 503-504)

Gobierno de Aragón	Junio 2005	Trucha común	2	A. salmonicida (Ref. ZAR 505-506)
Gobierno de Aragón	Agosto 2005	Trucha común	58	A. salmonicida (Ref. ZAR 507)
Gobierno de Navarra	Enero 2006	Salmón atlántico	6	A. salmonicida (Ref. ZAR 508)

2.4.2.2.- Aislamiento de cepas probióticas candidatas

A partir de las cepas bacterianas aisladas (n = 246), se seleccionaron un total de 10 cepas probióticas candidatas (Tabla 2), en función de la prueba de inhibición in vitro realizadas frente a diversos agentes patógenos. Debemos destacar que todas las bacterias probióticas seleccionadas mostraron un halo de inhibición ≥ 3 mm frente a A. salmonicida, mientras que los resultados obtenidos con respecto al resto de cepas patógenas evaluadas, presentaron una variabilidad alta. Las diferencias observadas pueden estar influenciadas por la producción de ácidos orgánicos, peróxido de hidrógeno y bacteriocinas. Se ha descrito que algunas bacterias ácido lácticas producen bacteriocinas que inhiben el crecimiento de otros microorganismos, sin embargo, la especificidad puede ser dependiente de la especie (Verschuere y cols., 2000).

Tabla 2. Evaluación de la actividad antibacteriana de posibles cepas candidatas frente a diversos agentes patógenos: (1) *A. salmonicida* ZAR 501-508; (2) *A. salmonicida* NCIMB 1102; (3) *A. salmonicida* 2320 variedad atípica; (4) *Y. ruckeri* ATCC 29473; (5) *C. piscicola*; (6) *L. garvieae*; (7) *V. salmoninarum*.

Bacterias probióticas candidatas inhibitorio	Actividad con efecto						
	1	2	3	4	5	6	7
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> (Ref. CLFP 100)	++	++	++	+	-	-	-
<i>Lactococcus lactis</i> (Ref. ZAR 101)	++	++	++	+	-	-	-
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> (Ref. CLFP 102)	++	++	++	+	-	-	-
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> (Ref. CLFP 105)	++	++	++	+	-	-	-
<i>Brevundimonas vesicularis</i> (Ref. CLFP 145)	++	++	++	+	-	-	-
<i>Lactobacillus curvatus</i> (Ref. CLFP 150)	++	++	++	++	+	-	+
<i>Streptococcus</i> sp. (Ref. CLFP 156)	++	++	++	+	+	-	+
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> (Ref. CLFP 196)	++	++	++	++	-	-	-
<i>Lactobacillus sakei</i> (Ref. CLFP 202)	++	++	++	+	-	-	-
<i>Carnobacterium maltaromaticum</i> (Ref. CLFP 228)	++	++	++	+	-	-	-

* Área de inhibición: (+) ≥1 mm; (++) ≥3 mm; (-) ausencia de inhibición

2.4.2.3.- Prueba de adhesión al mucus

En las Figuras 1 y 2 se representan los resultados obtenidos correspondientes a la prueba de adhesión al mucus (piel e intestino de trucha), donde se han valorado las diferentes cepas patógenas utilizadas en el estudio así como, aquellas cepas probióticas candidatas aisladas a partir de los episodios de enfermedad señalados. Estos resultados han puesto de manifiesto un mayor porcentaje de adhesión frente al mucus intestinal alcanzando los valores más elevados frente a *A. salmonicida* (4%), *Y. ruckeri* (4,9%) y *C. piscicola* (5,2%), respectivamente.

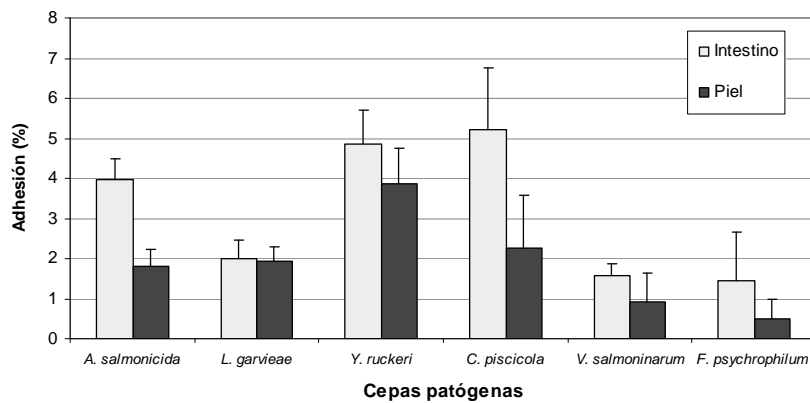


Figura 1. Adhesión de las cepas patógenas a las diferentes preparaciones de mucus.

Por otro lado, las cepas candidatas con referencia ZAR 101, CLFP 100, CLFP 102, CLFP 105 y CLFL 228, mostraron diferencias significativas entre las dos preparaciones de mucus utilizadas en el estudio, obteniéndose los mayores porcentajes de adhesión frente al mucus intestinal (10-19,5%).

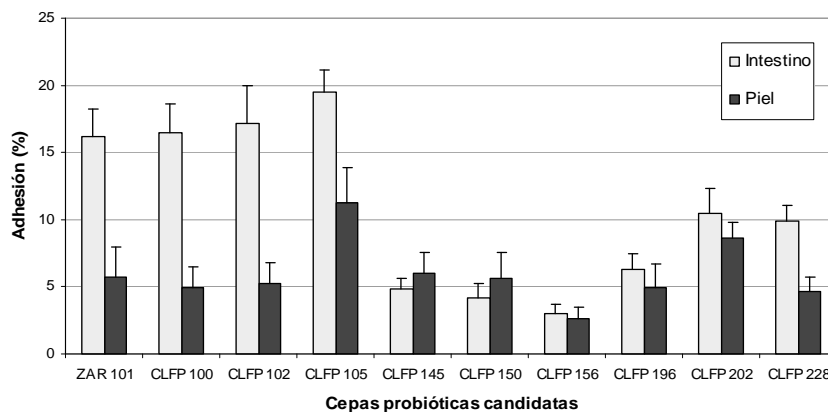


Figura 2. Adhesión de las cepas candidatas a las diferentes preparaciones de mucus.

2.4.2.4.- Exclusión competitiva

Estudios previos han demostrado que la competición es un mecanismo implicado frecuentemente en la reducción de la adhesión al mucus por diferentes cepas probióticas (Lee y cols., 2003). Para el ensayo de exclusión competitiva, *C. piscicola*, *Y. ruckeri* y *A. salmonicida* fueron seleccionadas entre las cepas patógenas evaluadas, debido a su mayor adhesión al mucus intestinal, puesto que los valores obtenidos frente a los agentes *F. psychrophilum*, *L. garvieae* y *V. salmoninarum* fue inferior al 2%.

Tabla 3. Fenómeno de exclusión competitiva de las cepas probióticas candidatas frente a *C. piscicola*, *Y. ruckeri* y *A. salmonicida*.

Cepas probióticas candidatas	% adhesión ^a	% adhesión	% adhesión
	<i>C. piscicola</i>	<i>Y. ruckeri</i>	<i>A. salmonicida</i>
	Intestino	Intestino	Intestino
<i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> (Ref. CLFP 100)	2.86 (0.72)	1.98 (0.93)	2.22 (0.16)
<i>L. lactis</i> (Ref.ZAR 101)	2.60 (0.48)	2.82 (0.14)	1.56 (0.99)
<i>L. lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> (Ref. CLFP 102)	2.51 (1.04)	1.51 (0.46)	1.81 (1.17)
<i>L. lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> (Ref. CLFP 105)	2.64 (0.83)	1.68 (0.22)	1.42 (0.76)
<i>L. mesenteroides</i> (Ref. CLFP 196)	3.78 (1.14)	3.12 (0.52)	4.83 (1.34)
<i>L. sakei</i> (Ref. CLFP 202)	2.85 (0.61)	2.97 (0.49)	2.70 (1.01)
<i>C. maltaromaticum</i> (Ref. CLFP 228)	3.22 (0.48)	1.05 (0.33)	2.88 (1.04)

^a Porcentajes de radioactividad obtenida del mucus inmovilizado mediante comparación de la radioactividad de la bacteria agregada; Entre paréntesis valores correspondientes a la desviación estándar

Las cepas patógenas correspondientes a *C. piscicola*, *Y. ruckeri* y *A. salmonicida* tendieron a adherirse en menor número al mucus inmovilizado debido a la acción de las cepas probióticas candidatas (Tabla 3), con excepción de *Leuconostoc mesenteroides* cuyo incremento en los porcentajes de adhesión frente a *A. salmonicida* alcanzó unos valores próximos al 5%, si bien los resultados obtenidos no fueron significativos. Algunos autores, han descrito también que ciertos microorganismos aislados del tracto gastrointestinal de *Amphiprion percula*, incrementaron la tasa de adhesión de *Vibrio alginolyticus* y *Aeromonas hydrophila* (Vine y cols. 2004). Estos resultados sugieren que el incremento puede estar influenciado por la modificación de la estructura del mucus, creando sitios de adhesión más adecuados para los agentes patógenos.

2.4.2.5.- Tolerancia a condiciones de pH y bilis

Dichas pruebas se llevaron a cabo con el fin de establecer el grado de supervivencia y/o colonización que presentaban las cepas candidatas estudiadas, tanto el mucus intestinal como el mucus de la superficie corporal de los peces.

Así, todas las cepas probióticas mostraron una tolerancia relativa a diferentes condiciones de pH y bilis. Así, se observó una mayor porcentaje de supervivencia frente a valores de pH entre 2.5-6.5. Sin embargo, valores de pH inferiores a 2.0 inhibieron el crecimiento de las cepas candidatas estudiadas.

Aunque no ha sido establecida la concentración fisiológica de bilis en los peces, las cepas probióticas candidatas toleraron la presencia del 10% (vol/vol), aunque los resultados obtenidos no mostraron diferencias significativas respecto al control. Resultados similares fueron obtenidos por Nikoskelainen y cols. (2001), con cepas de origen humano correspondientes a *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus delbrueckii*, *Bifidobacterium lactis*,

Lactobacillus johnsonii, aisladas durante algunos procesos de selección de probióticos frente al tratamiento de determinadas enfermedades en los peces.

2.4.2.6.- Tipificación molecular de las cepas probióticas seleccionadas

Con el fin de confirmar los resultados obtenidos en la identificación de las diversas cepas probióticas aisladas mediante pruebas clásicas de identificación, se llevó a cabo la identificación molecular de las mismas, utilizando previamente la secuenciación de las regiones variables V1 y V2 del gen 16S rARN para la identificación de bacterias ácido lácticas. Así, se obtuvo un fragmento correspondiente a 500 pb cuyo grado de similitud entre las especies aisladas (géneros *Lactobacillus*, *Leuconostoc* y *Lactococcus*), estuvo entre el 98-99%.

En función de estos resultados, la secuenciación genética de las cepas CLFP 100 fue alineada y clasificada como *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*; la cepa ZAR 101 correspondió a *Lactococcus lactis*, las cepas CLFP 102 y CLFP 105 a *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*; la cepa CLFP 196 como *Leuconostoc mesenteroides*; la cepa CLFP 202 como *Lactobacillus sakei*; y la cepa CLFP 228 como *Carnobacterium maltaromaticum*, confirmando los resultados obtenidos previamente.

2.4.2.7.- PCR a tiempo real

La especificidad del ensayo fue confirmada mediante la amplificación de todos los 16 aislados de *A. salmonicida*, mientras las otras 10 especies de *Aeromonas*, incluyendo *A. encheleia*, *A. eucrenophila*, *A. sobria*, *A. bestiarum*, *A. veronii*, *A. allosaccharophila*, *A. culicicola*, *A. media* and *A. hydrophila*, y 14 cepas de patógenos comunes en peces, incluyendo *V. tubiashi*, *V. fluvialis*, *V. splendidus*, *V. furnissii*, *V. pelagius*, *V. aestuarinus*, *V. anguillarum*, *M. viscosa*, *P. phosphoreum*, *Y. ruckeri* and *F. psychrophilum* no presentaron productos amplificados (Tabla 4).

La amplificación de los productos generados por la PCR fueron verificados por electroforesis, obteniendo el producto de 131 pb correspondiente al agente etiológico *A. salmonicida*.

El límite de detección de la técnica de PCR a tiempo real sobre cultivos puros de *A. salmonicida* fue 0.5 pg/μl, equivalente a 80 ufc/ml. La curva patrón demostró un Ct con valores próximos a 15, para una concentración de ADN de 50 ng (log 6.9 ufc/ml), y una pendiente cercana al valor -3.52, indicando una buena sensibilidad de la técnica (Figura 3).

Tabla 4. Evaluación de diferentes cepas bacterianas mediante la PCR a tiempo real

Cepas bacterianas	Detección
<i>A. salmonicida</i> subsp. <i>salmonicida</i> ZAR 501	+
<i>A. salmonicida</i> subsp. <i>salmonicida</i> ZAR 502	+
<i>A. salmonicida</i> subsp. <i>salmonicida</i> ZAR 503	+
<i>A. salmonicida</i> subsp. <i>salmonicida</i> ZAR 504	+
<i>A. salmonicida</i> subsp. <i>salmonicida</i> ZAR 505	+
<i>A. salmonicida</i> subsp. <i>salmonicida</i> 793 ^a	+
<i>A. salmonicida</i> subsp. <i>salmonicida</i> MT-004 ^b	+
<i>A. salmonicida</i> subsp. <i>salmonicida</i> NCIMB 1102	+
<i>A. salmonicida</i> subsp. <i>masoucida</i> NCIMB 2020	+
<i>A. salmonicida</i> subsp. <i>achromogenes</i> NCIMB 1110	+
<i>A. salmonicida</i> subsp. <i>achromogenes</i> 265/87 ^b	+
Atypical <i>A. salmonicida</i> F-661-2/89 ^b	+
Atypical <i>A. salmonicida</i> Fin 3 ^b	+
Atypical <i>A. salmonicida</i> 2320 ^a	+
Atypical <i>A. salmonicida</i> 4814 ^a	+
Atypical <i>A. salmonicida</i> 870626-1/1C ^b	+
<i>Aeromonas encheleia</i> CECT 4342 ^d	-
<i>Aeromonas eucrenophila</i> CECT 4224 ^d	-
<i>Aeromonas sobria</i> CECT 4245 ^d	-
<i>Aeromonas bestiarum</i> CECT 4227 ^d	-
<i>Aeromonas veronii</i> CECT 4257 ^d	-
<i>Aeromonas allosaccharophila</i> CECT 4199 ^d	-
<i>Aeromonas culicicola</i> CECT 5761 ^d	-
<i>Aeromonas media</i> CECT 4237 ^d	-
<i>Aeromonas hydrophila</i> S-123-91-1 ^b	-
<i>Aeromonas hydrophila</i> S-228/91 ^b	-
<i>Vibrio tubiashi</i> LMG 10936 ^b	-

Vibrio fluvialis NCIMB 2249 ^b	—
Vibrio splendidus NCIMB 2251 ^b	—
Vibrio furnissii Vib 293 ^b	—
Vibrio pelagius Vib 305 ^b	—
Vibrio aestuarinus Vib 281 ^b	—
Vibrio anguillarum ATCC 19264 ^T	—
Moritella viscosa M 147/92 ^b	—
Photobacter phosphoreum NCIMB 844 ^b	—
Yersinia ruckeri ATCC 29473 ^T	—
Y. ruckeri 146 ^c	—
Y. ruckeri 147 ^c	—
Flavobacterium psychrophilum NCIMB 1947 ^c	—
F. psychrophilum NCIMB 1826 ^c	—

^T Cepa tipo

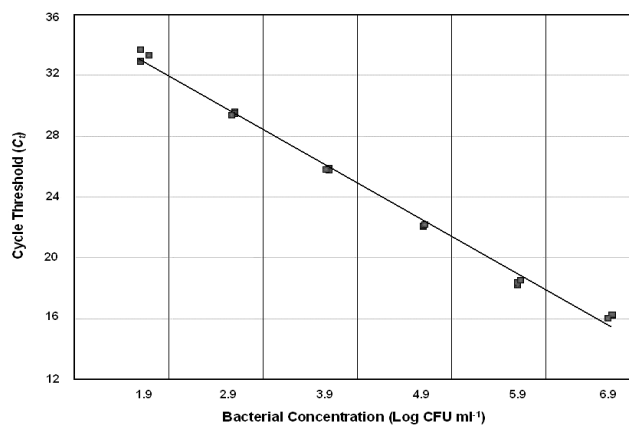


Figura 3. Curva patrón donde se representa el log de la concentración bacteriana inicial frente al valor del Ct obtenido.

Los valores de Ct obtenidos de los análisis de las muestras de tejido fueron extrapolados a la correspondiente curva patrón, previamente calculada. La presencia de tejido del pez no afectó al ensayo, y los resultados obtenidos mediante la técnica de conteo en placa presentaron una buena correlación ($r^2=0.99$) entre los dos ensayos (Tabla 5).

La sensibilidad obtenida en el presente estudio no presentó diferencias apreciables con otros trabajos publicados. Ha sido demostrado que límite de detección por cada reacción de PCR fue 6 ufc en cultivos puros (Del Cerro y cols., 2002), 30 ufc en tejidos de peces (Del Cerro y cols., 2002) y 200 células/gramo (O'Brien y cols., 1994). Esta técnica es comparable en sensibilidad y rango dinámico a otros métodos de cuantificación, aunque son funcionalmente diferentes y pueden estar condicionados por numerosos factores.

El alto coeficiente de regresión ($R^2=0.99$) obtenido durante el ensayo demostró una fuerte correlación entre la concentración de ADN (0.5 pg a 50 ng) y la señal de fluorescencia (ΔR_n). Estos resultados indican que esta técnica es capaz de cuantificar *A. salmonicida* en cultivo puro y mixto.

Tabla 5. Cuantificación de *A. salmonicida* en tejidos inoculados artificialmente

Muestra	Inóculo (log ufc/ml)	Resultados	
		Conteo en placas ^a (log ufc/ml ± SD)	PCR a tiempo real ^b (log ufc/ml ± SD) (C _t ± SD)
Riñón	2.9	3.2 ± 0.14	3.5 ± 0.06 (29.1 ± 0.56)
Riñón	1.9	2.1 ± 0.12	2.4 ± 0.04 (32.6 ± 0.42)
Bazo	2.9	3.1 ± 0.06	3.2 ± 0.02 (30.1 ± 0.78)
Bazo	1.9	2.0 ± 0.12	2.1 ± 0.05 (34.1 ± 0.77)
Hígado	2.9	3.1 ± 0.08	3.2 ± 0.03 (30.3 ± 0.08)
Hígado	1.9	2.1 ± 0.12	2.3 ± 0.07 (33.4 ± 0.10)
Intestino	2.9	3.1 ± 0.14	3.1 ± 0.11 (30.1 ± 0.70)
Intestino	1.9	2.0 ± 0.08	2.1 ± 0.04 (34.5 ± 0.07)
Todos los tejidos ^c	0.9	1.0 ± 0.25	No detectado ^d

^a Niveles de *A. salmonicida* fueron determinados por conteos en placas de TSA

^b Niveles de *A. salmonicida* fueron determinados por PCR a tiempo real, basados en la media de muestras duplicadas

^c Muestras individuales de riñón, bazo, hígado e intestino

^d Amplificación no fue detectada

2.4. 3.- Periodo 2006

2.4.3.1.- Evaluación in vivo de las cepas probióticas aisladas en la trucha común

Para llevar a cabo dicho estudio se seleccionaron peces obtenidos de una explotación libre de forunculosis, es decir que dichos animales no habían estado previamente en contacto con el agente causal de la enfermedad y por lo tanto no presentaban la posibilidad de estar sensibilizados inmunológicamente frente a *A. salmonicida*. Una vez aclimatados, se establecieron 4 grupos de 100 peces cada uno en función de los objetivos planteados inicialmente:

- ✓ Grupo G1: Peces alimentados con un pienso comercial no suplementado con probióticos (grupo control)
- ✓ Grupo G2: Peces alimentados con pienso comercial suplementado con *L. lactis* subsp. *lactis* a una concentración de 10^6 ufc/ gramo de pienso.
- ✓ Grupo G3: Peces alimentados con pienso comercial suplementado con *L. sakei* a una concentración de 10^6 ufc/ gramo de pienso.
- ✓ Grupo G4: Peces alimentados con pienso comercial suplementado con *L. mesenteroides* a una concentración de 10^6 ufc/ gramo de pienso.

Inicialmente, la infección experimental fue diseñada para utilizar el método de cohabitación. En el día 15 se pretendía realizar la inoculación con *A. salmonicida* CLFP 501, previamente aislada durante un brote natural, por vía intraperitoneal con una dosis de 0.1 ml de suspensión bacteriana a una concentración de 1.0×10^6 ufc/ml a 16 peces de cada grupo, previamente marcados mediante un corte en la aleta adiposa. No obstante, en el transcurso de la primera semana del período experimental, se observaron mortalidades provocadas por *A. salmonicida* en todos los grupos. Por ello, las condiciones iniciales del estudio fueron modificadas al remplazar la administración de probióticos (que sólo se realizó durante la primera y segunda semana), por dietas no suplementadas con probióticos durante la tercera y cuarta semana, para observar la capacidad de colonización y efecto en la respuesta inmune humoral, ya que todos los grupos estaban bajo las mismas condiciones experimentales.

Con respecto al primer ensayo experimental, los resultados obtenidos fueron los siguientes:

- Prueba de inocuidad: Ninguno de los peces tratados previamente con probióticos presentaron síntomas y lesiones de proceso patógeno alguno.

- Colonización: Se ha puesto de manifiesto que las cepas seleccionadas son capaces de colonizar el intestino de los peces, y que esta colonización tiene una persistencia breve tras finalizar la administración de las cepas probióticas. Así, se observó que tras la administración de las cepas probióticas, el número viable de BAL (Bacterias ácido lácticas), se incrementaba rápidamente en todos los tratamientos establecidos con un rango entre 2.9×10^5 y 1.2×10^6 ufc/g, al final de la primera semana y entre 2.4×10^6 y 4.9×10^7 ufc/g, al final de la segunda semana. Cuando la dieta fue reemplazada a una dieta no suplementada con probióticos durante la tercera y cuarta semana del estudio, el número de BAL decreció lentamente en todos los tratamientos; y solamente se detectaron concentraciones superiores a 1×10^2 ufc/g al final de la cuarta semana en el caso de *L. lactis* subsp. *lactis* y *L. mesenteroides*.

- Supervivencia: Se pudo constatar una reducción significativa de la mortalidad ($p < 0.05$), en los grupos que recibieron alimento suplementado con probióticos durante las dos primeras semanas, lo que coincidió con el periodo de incubación de la enfermedad. El efecto protector de los probióticos se pudo observar a partir de la primera semana en los grupos que recibieron *L. lactis* ssp. *lactis* y *L. mesenteroides*, mientras en el grupo suplementado con *L. sakei* se observó una reducción de la mortalidad acumulada a partir de la segunda semana. Estos resultados podrían ser debidos a las diferencias existentes en la capacidad de colonización de las cepas estudiadas.

- Actividad complemento vía alternativa: Todos los grupos tratados con probióticos mostraron un incremento significativo ($p < 0.05$), al final de la segunda semana, obteniendo unos valores máximos entre 284.0 unidades/ml (*L. sakei*) y 295.2 unidades/ml, correspondientes a *L. lactis* subsp. *lactis*. Sin embargo, cuando los probióticos fueron retirados de la dieta, la actividad

complemento decreció paulatinamente hasta alcanzar unos valores similares a los obtenidos en el grupo control (210.2 unidades/ml), en el día 28 de estudio.

- Actividad lisozima: Se observó un incremento significativo en la actividad lisozima ($p < 0.05$), durante la tercera semana de tratamiento, en aquellos grupos que habían recibido una dieta suplementada con *L. lactis* subsp. *lactis* (7.9 $\mu\text{g/ml}$) y *L. mesenteroides* (7.7 $\mu\text{g/ml}$). Sin embargo, sólo en el grupo suplementado con *L. lactis* subsp. *lactis* se mantuvo dicho incremento (7.8 $\mu\text{g/ml}$) hasta el final de la cuarta semana de estudio. Debemos señalar, que el grupo tratado con *L. sakei* no mostró diferencias significativas con respecto al grupo control a lo largo del periodo de estudio.

- Inmunoglobulinas totales: Los resultados obtenidos demuestran un incremento en el contenido de Igs del plasma de los peces en todos los grupos tratados. Sin embargo, estas diferencias no fueron significativas ($p > 0.05$).

En base a todos los resultados obtenidos en el presente ensayo experimental, podemos concluir que las tres cepas probióticas seleccionadas, *L. lactis*, *L. sakei* y *L. mesenteroides*, produjeron un efecto beneficioso al reducir la mortalidad provocada por *A. salmonicida* e incrementar algunos de los parámetros inmunitarios en la trucha común.

2.4.3.2- Protección inmune mediada por cepas probióticas en la prevención de la Furunculosis en la trucha arco iris

Debemos señalar que en esta segunda experiencia tanto la selección de peces como el diseño experimental fue el mismo que el señalado en la primera experiencia.

Los resultados obtenidos fueron los siguientes:

- Inocuidad: Al final de la segunda semana del período experimental (día 14), ninguno de los peces tratados con probióticos presentó sintomatología ni lesiones por efecto de las BAL.

- Colonización: Tras la administración de las cepas probióticas, el número viable de BAL se incrementó rápidamente en todos los grupos suplementados con probióticos con un rango entre 7.5×10^6 y 2.3×10^7 ufc/g, al final de la segunda semana.

- Parámetros inmunitarios: En el presente estudio, se demostró que la administración de cepas probióticas, *L. lactis* subsp. *lactis* CLFP 100, *L. mesenteroides* CLFP 196 y *L. sakei* CLFP 202 era capaz de incrementar la respuesta inmune humoral y celular mediante el aumento de la proporción de células fagocíticas activas del riñón anterior y por la activación de receptores de expresión de la actividad complemento. Así, se observó que:

Fagocitosis: Todos los grupos tratados con probióticos mostraron un incremento significativo ($p < 0.05$), al final de la segunda semana con respecto al grupo control, obteniendo unos valores máximos entre 43.2% para el grupo tratado con *L. sakei* y 44.9% correspondiente al grupo tratado con *L. lactis* subsp. *lactis*.

Anión superóxido: En el presente estudio se observó que los grupos suplementados con *L. lactis* subsp. *lactis* y *L. mesenteroides* mostraron un incremento significativo ($p < 0.05$), en la producción de anión superóxido con respecto al grupo control, al final de la segunda semana. Así, se obtuvieron unos valores máximos entre 7.0 y 7.3 unidades, correspondientes a *L. mesenteroides* y *L. lactis* subsp. *lactis*, respectivamente. La producción de anión superóxido en el grupo suplementado con *L. sakei* también se incrementó; sin embargo, las diferencias no fueron significativas ($p > 0.05$), con respecto al grupo control.

Actividad complemento vía alternativa: En el presente estudio se observó un incremento significativo ($p < 0.05$), en la actividad complemento vía alternativa (ACH50), durante la segunda semana de tratamiento, en aquellos grupos que habían recibido una dieta suplementada con los probióticos. Los valores

máximos correspondieron entre 249.7 unidades/ml para *L. sakei* y 256.8 unidades/ml para *L. lactis* subsp. *lactis*.

Actividad lisozima: En el presente estudio se observó un mayor incremento de la actividad lisozima en todos los tratamientos con dietas suplementadas con probióticos a una concentración de 106 ufc/g. Sin embargo, las diferencias no fueron significativas ($p > 0.05$) con respecto al control.

En base a todos los resultados obtenidos en este segundo ensayo experimental, podemos concluir que las tres cepas probióticas seleccionadas, *L. lactis*, *L. sakei* y *L. mesenteroides*, produjeron una reducción significativa de la mortalidad provocada por *A. salmonicida* en todos los grupos suplementados con probióticos. Así mismo, se observó un incremento de la respuesta inmune y una modificación de la composición de la microbiota intestinal.

2.4.4.- Periodo 2007

Durante el año 2007, concretamente durante el periodo estival, nos pusimos en contacto con varias piscifactorías que presentaban brotes de Lactococosis, con el fin de obtener muestras procedentes de episodios naturales de enfermedad, antes de que los peces fueran vacunados. No obstante, dichas muestras no se pudieron obtener puesto que aquellos animales que habíamos dejado sin vacunar no presentaron en ninguno de los casos síntomas o lesiones que nos hicieran sospechar la presencia de la misma.

Así mismo, se han llevado a cabo diferentes experimentos con el fin de evaluar "in vivo" el efecto probiótico de dos cepas candidatas identificadas molecularmente como *Leuconostoc mesenteroides* CLFP 196 y *Lactobacillus plantarum* CLFP 238, frente al agente patógeno *Lactococcus garvieae*.

Estas bacterias candidatas fueron obtenidas y seleccionadas inicialmente de un total de 246 cepas a partir de tejido intestinal de truchas sanas, observando previamente que presentaban una alta capacidad de adhesión al mucus intestinal e inhibición del crecimiento de bacterias potencialmente patógenas, así como un alto porcentaje de exclusión competitiva.

2.4.4.1.- Evaluación “in vivo” de cepas probióticas aisladas en trucha arco iris

Para llevar a cabo dicho estudio se seleccionaron peces de unos 30 gramos de peso obtenidos de una explotación libre de Lactococosis. Una vez aclimatados, se establecieron 4 grupos de 60 peces cada uno en función de los objetivos planteados inicialmente:

- Grupo G1: Peces alimentados con un pienso comercial no suplementado con probióticos (grupo control negativo)
- Grupo G2: Peces infectados con *L. garvieae* (grupo control positivo).
- Grupo G3: Peces alimentados con pienso comercial suplementado con *Leuconostoc mesenteroides* a una concentración de 10^6 ufc/ gramo de pienso (durante 30 días).
- Grupo G4: Peces alimentados con pienso comercial suplementado con *Lactobacillus plantarum* a una concentración de 10^6 ufc/ gramo de pienso (durante 30 días).

La infección experimental fue diseñada para utilizar el método de cohabitación. Para ello, se inoculó una cepa de *L. garvieae* aislada previamente durante un brote natural de enfermedad, por vía intraperitoneal con una dosis de 0.1 ml de suspensión bacteriana a una concentración de 3.4×10^3 ufc/ml a 10 peces de cada grupo (G2, G3 y G4), previamente marcados mediante un corte en la aleta adiposa.

Los resultados obtenidos fueron los siguientes:

- Prueba de inocuidad: Ninguno de los peces tratados previamente con probióticos presentaron síntomas y lesiones de proceso patógeno alguno.
- Colonización: Se ha puesto de manifiesto que las cepas seleccionadas son capaces de colonizar el intestino de los peces, y que esta colonización tiene una persistencia breve tras finalizar la administración de las cepas probióticas. Así, se observó que tras la administración de las cepas probióticas, el número viable de BAL (Bacterias ácido lácticas), se incrementaba rápidamente en todos los tratamientos establecidos con un rango entre 8.5×10^6 y 1.2×10^6 ufc/g, al final de la cuarta semana.

- Supervivencia: Se pudo constatar una reducción significativa de la mortalidad ($p < 0.003$), en los grupos que recibieron alimento suplementado con probióticos (G3 y G4), con respecto al grupo G2, grupo control positivo (78%). Así, la mortalidad en el grupo G3 fue del 54% mientras que en el grupo G4 fue del 46%. El efecto protector de los probióticos se pudo observar a partir de la primera semana en los grupos que recibieron *Lc. mesenteroides* y *Lactobacillus plantarum*.

2.4.5.- Periodo 2008

Para llevar a cabo el estudio se partió de peces procedentes de los controles sanitarios, de los cuales se realizaron siembras de la porción final del intestino, branquias y mucus cutáneo. Se obtuvieron un total de 335 cepas bacterianas, las cuales fueron evaluadas para determinar el posible efecto inhibitorio frente al patógeno en estudio (*Lactococcus garvieae*). De éstas, 11 cepas demostraron tener dicho efecto inhibitorio.

Las cepas seleccionadas fueron identificadas mediante pruebas de crecimiento, tinción y microscopía y pruebas bioquímicas entre las que se incluyen sistemas de identificación API 20NE, API 20E, API 50 CH y API 20Strep.

- Tipificación genética de las cepas probióticas candidatas seleccionadas

Para la tipificación genética de las cepas probióticas se utilizó cebadores basados en las regiones conservadas del gen 16S ARNr para amplificar aproximadamente un producto de 900 pb. Las secuencias obtenidas se alinearon mediante la utilización de la base de datos GenBank y el programa informático Clustal W. De las 11 cepas seleccionadas, cinco de ellas se correspondieron a *Lactobacillus plantarum* subs. *plantarum*; cinco fueron *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* y una a *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides*. Los porcentajes de similitud entre las diferentes cepas señaladas se recogen en la siguiente tabla:

Cepas	Identificación molecular	Similaridad
M3(1)	Lactobacillus plantarum subs. plantarum	99,8%
I3(1)	Lactococcus lactis subsp. cremoris	99,9%
I8(1)	Lactococcus lactis subsp. cremoris	99,9%
I9(1)	Lactococcus lactis subsp. cremoris	99,9%
I10(1)	Lactococcus lactis subsp. cremoris	99,9%
I15(1)	Lactobacillus plantarum subs. plantarum	99,8%
I16(1)	Lactococcus lactis subsp. cremoris	99,9%
B2(1)	Lactobacillus plantarum subs. plantarum	99,8%
B5(1)	Lactobacillus plantarum subs. plantarum	99,8%
I11(2)	Lactobacillus plantarum subs. plantarum	99,8%
8B(07)	Leuconostoc mesenteroides subsp. mesenteroides	99,5%

Una vez obtenida la identificación molecular de las cepas inhibitorias, actualmente estamos trabajando en la caracterización de las propiedades probióticas de dichas cepas. Los parámetros en estudio son los siguientes: velocidad de crecimiento, adhesión al mucus intestinal, tolerancia a diferentes condiciones de pH y concentración de bilis, actividad antimicrobiana, crecimiento a diferentes temperaturas y determinación de ácido láctico y ácidos grasos volátiles.

2.5.- CONCLUSIONES

CONCLUSIONES Línea 1

A lo largo de este proyecto se ha ido optimizando la recuperación de *F. psychrophilum* a partir de peces enfermos, de manera que prácticamente en todos los brotes positivos por PCR se aísla el patógeno por microbiología clásica. Esto, junto con el incremento de los brotes en los últimos dos años, explicaría el crecimiento en el número de cepas de esta especie obtenidas en este trabajo. Por el contrario, la utilización de vacunas para combatir la lactococosis nos ha impedido la colección de un número de cepas de *L.*

garvieae suficientemente amplia para realizar análisis estadísticos significativos.

El uso indiscriminado de OTC en la acuicultura ha conducido al incremento de cepas resistentes a este producto (más del 80% de las cepas de este trabajo), lo que ha conducido a la utilización de otros productos como el FLO. Sin embargo, a pesar de que las cepas de *F. psychrophilum* permanecen resistentes al FLO, algunas de ellas presentan CMI's ligeramente por encima de la media, lo que apunta posibles problemas de resistencia en un futuro (Bruun et al., 2000). Por ello es necesario mantener sistemas vigilancia epidemiológica sobre la evolución de estas resistencias, así como ahondar en el conocimiento de los mecanismos de adquisición de estos determinantes de resistencia en esta especie.

El RAPD ha resultado ser una herramienta poco discriminatoria en la caracterización de las diferentes especies de este estudio, mientras que el PFGE ha resultado ser mucho más útil, con unos resultados más reproducibles y discriminatorios. En el caso de *A. salmonicida*, nos ha permitido diferenciar dentro del RAPD-tipo predominante, 6 PFGE-tipos diferentes. Ocho de los PFGE-tipos obtenidos mostraron un patrón de bandas similar, lo que confirma la homogeneidad de este grupo de microorganismos, que ya había sido descrita por otros autores (O'hici et al., 2000).

El análisis de *F. psychrophilum* mediante PFGE, mostró la gran heterogeneidad presente dentro de esta especie, ya que los 16 PFGE-tipos obtenidos fueron agrupados en 4 grupos genómicos con más de un 80 % de similitud entre ellos y 6 ramas independientes. Además, algunos de estos tipos eran exclusivos de determinadas zonas geográficas o de piscifactorías concretas. También se observaron diferentes tipos genómicos en una misma piscifactoría o incluso en un mismo brote.

A lo largo de este proyecto se ha ido optimizando la recuperación de *F. psychrophilum* a partir de peces enfermos, de manera que prácticamente en todos los brotes positivos por PCR se aísla el patógeno por microbiología clásica. Esto, junto con el incremento de los brotes en los últimos dos años, explicaría el crecimiento en el número de cepas de esta especie obtenidas en

este trabajo. Por el contrario, la utilización de vacunas para combatir la lactococosis nos ha impedido la colección de un número de cepas de *L. garvieae* suficientemente amplia para realizar análisis estadísticos significativos.

El uso indiscriminado de OTC en la acuicultura ha conducido al incremento de cepas resistentes a este producto (más del 80% de las cepas de este trabajo), lo que ha conducido a la utilización de otros productos como el FLO. Sin embargo, a pesar de que las cepas de *F. psychrophilum* permanecen resistentes al FLO, algunas de ellas presentan CMI's ligeramente por encima de la media, lo que apunta posibles problemas de resistencia en un futuro (Bruun et al., 2000). Por ello es necesario mantener sistemas vigilancia epidemiológica sobre la evolución de estas resistencias, así como ahondar en el conocimiento de los mecanismos de adquisición de estos determinantes de resistencia en esta especie.

El RAPD ha resultado ser una herramienta poco discriminatoria en la caracterización de las diferentes especies de este estudio, mientras que el PFGE ha resultado ser mucho más útil, con unos resultados más reproducibles y discriminatorios. En el caso de *A. salmonicida*, nos ha permitido diferenciar dentro del RAPD-tipo predominante, 6 PFGE-tipos diferentes. Ocho de los PFGE-tipos obtenidos mostraron un patrón de bandas similar, lo que confirma la homogeneidad de este grupo de microorganismos, que ya había sido descrita por otros autores (O'hici et al., 2000).

El análisis de *F. psychrophilum* mediante PFGE, mostró la gran heterogeneidad presente dentro de esta especie, ya que los 16 PFGE-tipos obtenidos fueron agrupados en 4 grupos genómicos con más de un 80 % de similitud entre ellos y 6 ramas independientes. Además, algunos de estos tipos eran exclusivos de determinadas zonas geográficas o de piscifactorías concretas. También se observaron diferentes tipos genómicos en una misma piscifactoría o incluso en un mismo brote.

Conclusiones LINEA 2

1.- Se ha desarrollado un protocolo viable para la selección de cepas bacterianas con propiedades probióticas, considerando el origen de las cepas, la capacidad de producir sustancias inhibitorias, fijación y exclusión competitiva con bacterias patógenas en el mucus intestinal, la tolerancia a bajas condiciones de pH y elevadas concentraciones de bilis, y su efecto beneficioso en el hospedador.

2.- *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* CLFP 100 y *Leuconostoc mesenteroides* CLFP 196 han demostrado ser las cepas más adecuadas para su aplicación oral como probiótico frente a la forunculosis.

3.- *Lactobacillus sakei* CLFP 202 podría utilizarse como cepa probiótica alternativa frente a *Aeromonas salmonicida* a pesar de que su capacidad inmunoestimulante ha sido inferior a las otras dos cepas seleccionadas.

4.- Las cepas probióticas estudiadas *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* CLFP 100, *Leuconostoc mesenteroides* CLFP 196 y *Lactobacillus sakei* CLFP 202 deben ser administradas de forma continuada para el control de la forunculosis debido a que su capacidad de colonización intestinal no ha sido permanente.

5.- El análisis molecular mediante la aplicación de la técnica de la PCR a tiempo real ha permitido detectar *Aeromonas salmonicida* no sólo en peces enfermos, sino también en portadores asintomáticos.

6.- *Leuconostoc mesenteroides* CLFP 196 y *Lactobacillus plantarum* CLFP 238, han demostrado ser las cepas más adecuadas para su aplicación oral como probiótico frente a la lactococosis de la trucha.

2.6. VALORACIÓN

2.7. DIFUSIÓN

2.7.1.- ARTÍCULOS DE INVESTIGACIÓN

- Balcázar JL, de Blas I, Ruiz-Zarzuela I, Cunningham D, Vendrell D, Múzquiz JL. The role of probiotics in aquaculture. *Veterinary Microbiology*. 2006; 114: 173-186.
- Balcázar JL, Decamp O, Vendrell D, de Blas I, Ruiz-Zarzuela I. Health and nutritional properties of probiotics in fish and shellfish. *Microbial Ecology in Health and Disease*. 2006; 1-6.
- Balcázar JL, de Blas I, Ruiz-Zarzuela I, Vendrell D, Evora MD, Múzquiz JL. Growth inhibition of *Aeromonas* species by lactic acid bacteria isolated from salmonids. *Microbial Ecology in Health and Disease*. 2006; 18: 61-63.
- Balcázar JL, Vendrell D, de Blas I, Ruiz-Zarzuela I, Gironés O, Múzquiz JL. Immune modulation by probiotic strains: Quantification of phagocytosis of *Aeromonas salmonicida* by leukocytes isolated from gut of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) using a radiolabelling assay. *Comparative Immunology Microbiology and Infectious Diseases*. 2006; 29: 335-343.
- Balcázar JL, Vendrell D, de Blas I, Ruiz-Zarzuela I, Gironés O, Múzquiz JL. Quantitative detection of *Aeromonas salmonicida* in fish tissue by real-time PCR using self-quenched, fluorogenic primers. *Journal of Medical Microbiology*. 2007; 56: 323-328.
- Balcázar JL, de Blas I, Ruiz-Zarzuela I, Vendrell D, Gironés O, Múzquiz JL. Sequencing of variable regions of the 16rRNA gene for identification of lactic acid bacteria isolated from the intestinal microbiota of healthy salmonids. *Comparative Immunology Microbiology and Infectious Diseases*. 2007; 30: 111-118.
- Balcázar JL, de Blas I, Ruiz-Zarzuela I, Vendrell D, Calvo AC, Márquez I, Gironés O, Múzquiz JL. Changes in intestinal microbiota and humoral immune response following probiotic administration in brown trout (*Salmo trutta*). *British Journal of Nutrition*. 2007; 97: 522-527.
- Balcázar JL, Vendrell D, de Blas I, Ruiz-Zarzuela I, Gironés O, Múzquiz JL. In vitro competitive adhesion and production of antagonistic compounds by lactic acid bacteria against fish pathogens. *Veterinary Microbiology*. 2007; 122: 373-380.

- Bálcazar JL, de Blas I, Ruiz-Zarzuela I, Vendrell D, Gironés O, Múzquiz JL. Enhancement of the immune response and protection induced by probiotic lactic acid bacteria against furunculosis in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *FEMS Immunology and Medical Microbiology*. 2007; 51: 185-193.
- Vendrell D, Bálcazar JL, de Blas I, Ruiz-Zarzuela I, Gironés O, Múzquiz JL. Protection of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) from lactococcosis by probiotic bacteria. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*. 2008; 31: 337-345.
- Balcázar JL, Vendrell D, de Blas I, Ruiz-Zarzuela I, Múzquiz JL, Gironés O. Characterization of probiotic properties of acid bacteria isolated from intestinal microbiota of fish. *Aquaculture*. 2008; 278(1-4): 188-191.
- Probiotics in aquaculture: A current assessment. *Molecular Genetics and Biotechnology in Aquaculture* (Edited by Arenal Cruz, A.). Research Signpost (Aceptado).
- Effect of *Lactococcus lactis* CLFP100 and *Leuconostoc mesenteroides* CLFP196 on *Aeromonas salmonicida* infection in brown trout (*Salmo trutta*). *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology* (Aceptado).

2.7.2.- TESIS DOCTORALES

- Selección y caracterización de cepas probióticas para la prevención de la forunculosis en trucha común (*Salmo trutta fario*). Realizada por D. José Luis Bálcazar Rojas. 2006
- Estrategias para el control de la Lactococcosis en la trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*). Realizada por D. Daniel Vendrell Pérez. 2008.

2.7.3.- COMUNICACIONES A CONGRESOS

- Balcázar JL, de Blas I, Vendrell D, Ruiz-Zarzuela I, Gironés O, Múzquiz JL. Aislamiento y caracterización de *Lactococcus lactis* con efecto inhibitorio contra bacterias patógenas de peces. X Congreso Nacional de Acuicultura, Gandía (Valencia), 17-21 de octubre de 2005. Póster. Resumen extendido publicado en Libro de resúmenes del X Congreso Nacional de Acuicultura, 2005; Tomo I: 296-7.

- Balcázar JL, de Blas I, Ruiz-Zarzuela I, D. Vendrell, Gironés O, Múzquiz JL. Probiotics: potential use in aquaculture. Premières Journées des Sciences Vétérinaires Toulouse-Munich-Saragosse, Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse (Francia), 17-19 de noviembre de 2005. Póster. Resumen publicado en Premières Journées des Sciences Vétérinaires Toulouse-Munich-Saragosse, 2005; 85.
- Balcázar JL, de Blas I, Ruiz-Zarzuela I, Vendrell D, Gironés O, Múzquiz JL. A Real-Time PCR assay for the quantification of *Aeromonas salmonicida* in fish. World Aquaculture Society AQUA 2006, Florencia (Italia), 9-13 de mayo de 2006. Póster
- A. del Cerro, I. Ruiz, I. Márquez y J.M. Prieto. XI Congreso Nacional de Acuicultura (Vigo, 2007) “Caracterización genética de *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida* mediante amplificación al azar del ADN polimórfico y electroforesis en gel de campo pulsante”

2.8. INCIDENCIAS DE DESARROLLO

Durante el desarrollo del proyecto apenas se han registrado brotes infecciosos causados por *L. garvieae* en las Comunidades Autónomas participantes, por lo que no se ha podido contar con una colección de cepas suficientemente amplia que permita realizar estudios epidemiológicos significativos.

2.9. BIBLIOGRAFÍA

- Austin B, Baudet E, Stobie M. 1992. Inhibition of bacterial fish pathogens by *Tetraselmis suecica*. J Fish Dis. 15: 55-61.
- Austin, B., Stuckey, L., Robertson, P., Effendi, I. y Griffith, D. 1995. A probiotic strain of *Vibrio alginolyticus* effective in reducing diseases caused by *Aeromonas salmonicida*, *Vibrio anguillarum* and *Vibrio ordalii*. J. Fish Dis. 18: 93-96.
- Balcázar JL, Vendrell D, de Blas I, Ruiz-Zarzuela I, Gironés O, Múzquiz JL. 2006. Immune modulation by probiotics strains: quantification of phagocytosis of *Aeromonas salmonicida* by leukocytes isolated from gut of rainbow trout

(*Oncorhynchus mykiss*) using a radiolabelling assay. *Com Immunol Microbiol Infec Dis.* 29: 335-43.

- Balcázar, J.L. 2002. Uso de probióticos en acuicultura: aspectos generales. En: de Blas, I. (ed.) *Memorias del Primer Congreso Iberoamericano Virtual de Acuicultura*, Zaragoza, España. 877-881.

- Balcázar, J.L., Vendrell, D., de Blas, I., Ruiz-Zarzuela, I. y Múzquiz, J.L. 2004. Probiotics: a tool for the future of fish and shellfish health management. *J. Aqua. Trop.* 19: 239-242.

-Alderman, D.J. y Smith, P. 2001. Development of draft protocols of standard reference methods for antimicrobial agent susceptibility testing of bacteria associated with fish diseases. *Aquaculture.* 196: 211-243.

-Bruun M.S., Schmidt A.S., Madsen L., Dalsgaard I. (2000) Antimicrobial resistance patterns in Danish isolates of *Flavobacterium psychrophilum*. *Aquaculture* 187, 201-212.

- Brunt, J., Austin, B. 2005. Use of probiotic to control lactococcosis and streptococcosis in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). *J Fish Dis*, 28, 693-701.

- Brunt, J., Newaj-Fyzul, A., Austin, B. 2007. The development of probiotics for the control of multiple bacterial diseases of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). *J Fish Dis*, 30, 573-579.

- Chang, C.I. y Liu, W.Y. 2002. An evaluation of two probiotic bacterial strains, *Enterococcus faecium* SF68 and *Bacillus toyoi*, for reducing edwardsiellosis in cultured European eel, *Anguilla anguilla* L. *J Fish Dis.* 25:311-315.

-Del Cerro, A., Márquez, I. y Guijarro, J.A. 2002a. Simultaneous detection of *Aeromonas salmonicida*, *Flavobacterium psychrophilum* and *Yersinia ruckeri*, three major fish pathogens by multiplex PCR. *Appl. Environ. Microbiol.* 68: 5177-5180.

-Del Cerro, A., Soto, S.M., Landeras, E., González-Hevia, M.A., Guijarro, J.A. y Mendoza, M.C. 2002b. PCR-based procedures in detection and DNA-fingerprinting of *Salmonella* from samples of animal origin. *Food Microbiol.* 19: 567-575.

- Demers NE, Bayne CJ. 1997. The immediate effects of stress on hormones and plasma lysozyme in rainbow trout. *Developmental and Comparative Immunology*. 21: 363-73.
- FAO/WHO. 2001. Report of a joint FAO/WHO expert consultation on evaluation of health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria. Córdoba, Argentina.
- Fuller, R. 1997. *Probiotics 2, Applications and Practical Aspects*, Chapman & Hall, London.
- García, J.A., Larsen, J.L., Dalsgaard, I. y Pedersen, K. 2000. Pulsed-field gel electrophoresis analysis of *Aeromonas salmonicida* ssp. *salmonicida*. *FEMS Microbiol. Lett.* 136-166.
- Gatesoupe, F.J. 1994. Lactic acid bacteria increase the resistance of turbot larvae, *Scophthalmus maximus*, against pathogenic *Vibrio*. *Aquat Liv Res.* 7: 277-282.
- Gildberg, A., Mikkelsen, H., Sandaker, E. y Ringo, E. 1997. Probiotic effect of lactic acid bacteria in the feed on growth and survival of fry of Atlantic cod (*Gadus morhua*). *Hydrobiologia*. 352: 279-285.
- Gomez-Gil, B. 1998. Evaluation of potential probionts for use in penaeid shrimp larval culture. Ph.D. thesis. University of Stirling, Scotland. pp.: 269.
- Gómez-Gil, B., Roque, A., Turnbull, J.F. 2000. The use and selection of probiotic bacteria for use in the culture of larval aquatic organisms. *Aquaculture*. 191: 259-270.
- Gram, L., Melchiorson, J., Spanggaard, B., Huber, I. y Nielsen, T. 1999. Inhibition of *Vibrio anguillarum* by *Pseudomonas fluorescens* strain AH2, a possible probiotic treatment of fish. *Appl Environ Microbiol.* 65: 969-973.
- Havenaar, R. y Huis in't Veld, J.H.J. 1992. Probiotics; a general view. *The Lactic Acid Bacteria*, (ed. B.J. Wood), Elsevier Applied Science, Barking, pp. 151-170.
- Irianto, A. y Austin, B. 2003. Use of dead probiotic cells to control furunculosis in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). *J Fish Dis.* 26:59-62.
- Irianto, A., Austin, B. 2002. Use of probiotics to control furunculosis in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). *J Fish Dis.* 25: 333-342.

- O'hici, B., Olivier, G. Y Powell, R. 2000. Genetic diversity of the fish pathogen *Aeromonas salmonicida* demonstrated by random amplified polymorphic DNA and pulsed field gel electrophoresis analysis. *Dis. Aquat. Org.* 39: 109-119.
- Lara-Flores, M., Olvera-Novoa, B., Guzmán-Méndez, E. y López-Madrid, W. 2003. Use of the bacteria *Streptococcus faecium* and *Lactobacillus acidophilus*, and the yeast *Saccharomyces cerevisiae* as growth promoters in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Aquaculture*. 216:193-201.
 - Lilley, D.M. y Stillwell, R.J. 1965. Probiotics: growth promoting factors produced by micro-organisms. *Science*. 147:747-748.
 - Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. y Randall, R.J. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem*. 19:265-275.
 - Makridis, P., Fjellheim, A.J., Skjermo, J. y Vadstein, O. 2000. Colonization of the gut in first feeding turbot by bacterial strains added to the water or bioencapsulated in rotifers. *Aquaculture Int.* 8: 367-380.
 - Nikoskelainen, S., Ouwehand, A.C., Bylund, G., Salminen, S. y Lilius, E.M. 2003. Immune enhancement in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) by potential probiotic bacteria (*Lactobacillus rhamnosus*). *Fish Shellfish Immunol.* 15: 443–452.
 - Nikoskelainen, S., Salminen, S., Bylund, G. y Ouwehand, A.C. 2001. Characterization of the properties of human and dairy derived probiotics for prevention of infectious diseases in fish. *Appl Environ Microbiol.* 67: 2430-2435.
 - Puangkaew J, Kiron V, Somamoto T, Okamoto N, Satoh S, Takeuchi T, Watanabe T. 2004. Nonspecific immune response of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum) in relation to different status of vitamin E and highly unsaturated fatty acids. *Fish and Shellfish Immunology.* 16: 25-39.
 - Ramírez, R.F, Dixon, B.A. 2003. Enzyme production by obligate intestinal anaerobic bacteria isolated from Oscars (*Astronotus ocellatus*), angelfish (*Pterophyllum scalare*) and southern flounder (*Paralichthys lethostigma*). *Aquaculture*. 227: 417-426.
 - Ringo, E., Bendiksen, H.R., Gausen, S.J., Sundsfjord, A. y Olsen, R.E. 1998. The effect of dietary fatty acids on lactic acid bacteria associated with the epithelial mucosa and from faecalia of Arctic charr, *Salvelinus alpinus* (L.). *J Appl Microbiol.* 85: 855-864.

- Ringo, E., Gatesoupe, F.J. 1998. Lactic acid bacteria in fish: a review. *Aquaculture*. 177: 177-203.
- Ringo, E., Strom, E., Tabacheck, J. 1995. Intestinal microflora of salmonids: a review. *Aqua Res*. 26: 773-789.
- Robertson, P., O'Dowd, C., Burrells, C., Williams, P. y Austin, B. 2000. Use of *Carnobacterium* sp. as a probiotic for Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum). *Aquaculture*. 185: 235-243.
- Sakai, M., Yoshida, T., Astuta, S., Kobayashi, M. 1995. Enhancement of resistance to vibriosis in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum) by oral administration of *Clostridium butyricum* bacteria. *J Fish Dis*. 18: 187-190.
- Siwicki AK, Anderson DP. 1993. Nonspecific defense mechanisms assay in fish. En: *FAO-project GCP/INT/JPA. Disease Diagnosis and Prevention Methods*. IFI Olsztyn, Poland. pp.: 105-12.
- Smith, P. y Davey, S. 1993. Evidence for the competitive exclusion of *Aeromonas salmonicida* from fish with stress-inducible furunculosis by a fluorescent pseudomonad. *J Fish Dis*. 16: 521-524.
- Smoragiewicz, W., Bielecka, M., Babuchowski, A., Boutard, A., Dubeau, H. 1993. Les probiotiques. *Can J Microbiol* 39, 1089-1095.
- Soto, S.M., Guerra, B., González-Hevia, M.A. y Mendoza, M.C. 1999. Potential of three-way randomly amplified polymorphic DNA analysis as a typing method for twelve *Salmonella* serotypes. *Appl. Environ. Microbiol*. 65: 4830-4836.
- Soto, S.M., Guerra, B., del Cerro, A., González-Hevia, M.A. y Mendoza, M.C. 2001. Outbreaks and sporadic cases of *Salmonella* serovar Panama studied by DNA fingerprinting and antimicrobial resistance. *Int. J. Food Microbiol*. 71: 35-43.
- Sotomayor, M.A., Balcázar, J.L. 2003. Inhibition of shrimp pathogenic vibrios by mixture of probiotic strain. *Revista AquaTIC*. 19: 9-15.
- Spanggaard, B., Huber, I., Nielsen, J., Nielsen, T., Appel, K.F. y Gram, L. 2000. The microflora of rainbow trout intestine: a comparison of traditional and molecular identification. *Aquaculture*. 182: 1-15.
- Sugita, H., Kawasaki, J., Deguchi, Y. 1997. Production of amylase by the intestinal microflora in cultured freshwater fish. *Lett Appl Microbiol*. 24(2): 105-8.

- Sugita, H., Okano, R., Suzuki, Y., Iwai, D., Mizukami, M., Akiyama y N., Matsuura, S. 2002. Antibacterial abilities of intestinal bacteria from larval and juvenile Japanese flounder against fish pathogens. *Fish Sci.* 68:1004-1011.
- Struelens, M.J., Bauernfeind, A., Van Belkum, A., Blanc, D., Cookson, B.D., Dijkshoorn, L., El Solh, N., Etienne, J., Garaizar, J., Gerner-Smidh, P., Legakis, N., de Lencastre, H., Nicolas, M.H., Pitt, T.L., Römling, U., Rosdahl, V., Witte, W. y ESGEM. 1996. Consensus guidelines for appropriate use and evaluation of microbial epidemiologic typing systems. *Clin. Microbiol. Infect.* 2: 2-11.
- Swaminathan, B. and Matar, G.M. Molecular Typing Methods. In Persing, D.H., Smith, T.F., Tenover, F.C., y White, T.J. (Ed.), *Diagnostic Molecular Microbiology: principles and applications*, pp: 26-50, American Society for Microbiology: Washington, DC., 1993.
- Thrusfield M, Ortega C, De Blas I, Noordhuizen JP, Frankena K. 2001. Win Episcope 2.0: improved epidemiological software for veterinary medicine. *The Veterinary Record.* 148: 567-572.
- Vaseeharan, B., Ramasamy, P. 2003. Control of pathogenic *Vibrio* spp. by *Bacillus subtilis* BT23, a possible probiotic treatment for black tiger shrimp *Penaeus monodon*. *Lett Appl Microbiol.* 36: 83-87.
- Verschuere, L., Rombaut, G., Sorgeloos, P. y Verstraete W. 2000. Probiotic bacteria as biological control agents in aquaculture. *Microbiol Mol Biol Rev.* 64(4): 655-671.
- Vela, A.I., Vazquez, J., Gibello, A., Blanco, M.M., Moreno, M.A., Liébana, P., Albendea, C., Alcalá, B., Mendez, A., Domínguez, L y Fernández-Garayzabal, J.F. 2000. Phenotypic and genetic characterization of *Lactococcus garvieae* isolated in Spain from lactococcosis outbreaks and comparison with isolates of other countries and sources. *J. Clin. Microbiol.* 38: 3791-5.
- Westerdahl, A., Olsson, J., Kjelleberg, S. y Conway, P. 1991. Isolation and characterization of turbot (*Scophthalmus maximus*) associated bacteria with inhibitory effects against *Vibrio anguillarum*. *Appl Environ Microbiol.* 57:2223-2228.
- Yano T. Assay of haemolytic complement activity. En: Stolen JS, Fletcher TC, Anderson DP, Hattari SL, Rowley AF (eds). *Techniques in fish immunology*. SOS Publications, Poland. 1992; 131-41.

