



Trabajo de Tesis

*Vacunación oral de Clarias
gariepinus (Siluriformes:
Clariidae) con bacterina de*

Autora: Rocmira Pérez Nicado

2012



Universidad Central "Marta Abreu" de las Villas
Facultad de Ciencias Agropecuarias
Licenciatura en Biología



TESIS DE DIPLOMA

Título: Vacunación oral de *Clarias gariepinus* (Siluriformes: Clariidae) con bacterina de *Aeromonas hydrophila* administrada con adyuvantes AFCo3a y AFCo3b.

Autora: Rocmira Pérez Nicado

Tutores

- **Dr. Luis Orlando Maroto Martín.** Universidad Central "Marta Abreu" de las Villas. Carretera a Camajuaní, Km 5 ½. Santa Clara. Villa Clara. Cuba. **e-mail:** lmarotomar@uclv.edu.cu
- **Dr. Oliver Pérez.** Instituto Finlay. Vicepresidencia de Investigaciones. Ciudad de la Habana, Cuba. **e-mail:** oliverp@finlay.edu.cu

Asesores

- **MsC. Ada Fonticiella Monteagudo.** (Empresa Pesquera de Villa Clara, PESCAVILLA)
- **MsC. Sergio Sifontes Rodríguez.** (Centro de Bioactivos Químicos, CBQ)

Año

2012

Resumen

Clarias gariepinus (pez gato africano) es una especie explotada en la acuicultura mundial. La intensificación de su cultivo ha provocado la aparición de enfermedades bacterianas por *Aeromonas hydrophila*. La vacunación oral y el uso de inmunopotenciadores económicos son una alternativa en el control de las mismas. Este trabajo tuvo como objeto desarrollar un protocolo de vacunación oral contra *A. hydrophila* aplicando adyuvantes como AFCo3a y AFCo3b junto con la bacterina. Para ello se elaboró primeramente una bacterina formolizada de *A. hydrophila*. Los peces fueron divididos en cuatro grupos de tratamientos: grupo A (sin tratamiento), grupo B (inmunizado con bacterina de *A. hydrophila*), grupo C (inmunizado con bacterina y AFCo3a) y grupo D (inmunizado con bacterina y AFCo3b). A los grupos tratados se les inmunizó con 10^8 células/ animal de bacterina, se administró el AFCo3a y el AFCo3b para $10\mu\text{L}/\text{animal}$ de LPS. Los tratamientos fueron aplicados junto con la primera comida del día, cinco días continuos desde el día 1, con una dosis de refuerzo el día 17. La determinación de anticuerpos totales y específicos IgM se realizó por ELISA indirecto utilizando muestras de suero extraídas los días 0, 7, 14, 21 y 28 del calendario de vacunación. En las muestras analizadas se encontraron títulos de anticuerpos de 1:1280 y la producción de anticuerpos específicos fue mayor en los animales inmunizados con AFCo3b. El grupo no inmunizado mantuvo una producción de anticuerpos menor. Los anticuerpos totales no aumentaron durante el experimento. Los resultados indican que el tratamiento más eficaz fue el aplicado con AFCo3b puesto que este posee más antígenos que el AFCo3a, aunque ambos como cocleatos ofrecieron mejores resultados que la administración de la bacterina sin adyugar. En conclusión, se desarrolló un protocolo de vacunación adecuado contra *A. hydrophila* utilizando AFCo3a y AFCo3b como adyuvantes los que a su vez aumentan la efectividad de la bacterina formolizada como formulación vacunal.

Palabras claves: *Aeromonas hydrophila*, bacterina, *Clarias gariepinus*, cocleatos, IgM, vacunación oral

Abstract

Clarias gariepinus (African catfish) is an exploited species in world aquaculture. The intensification of his cultivation has led to the emergence of bacterial diseases by *Aeromonas hydrophila*. Oral immunization and the use of economic immunopotentiators are an alternative in the control of them. The aim of this job was to develop a protocol for oral vaccination against *A. hydrophila* using adjuvants such as AFCo3a and AFCo3b together with the bacterin. For this purpose was firstly developed a formalin-killed bacterin of *A. hydrophila*. The fish were divided into four treatment groups: group A (untreated), group B (immunized with *A. hydrophila* bacterin), group C (immunized with bacterin and AFCo3a) and group D (immunized with bacterin and AFCo3b). In the treated groups were immunized with 10^8 cells / animal bacterin was administered AFCo3a and 10 μ L/animal AFCo3b to LPS. Treatments were applied with the first meal of the day, five continuous days from day 1, with a booster dose on day 17. The determination of total and specific IgM antibodies was performed by indirect ELISA using serum samples taken on days 0, 7, 14, 21 and 28 of the vaccination schedule. In the analyzed samples were found antibody titers of 1:1280 and the production of specific antibodies was higher in animals immunized with AFCo3b. The non-immunized group remained a minor production of antibodies. The total antibodies did not increase during the experiment. The results indicate that the most effective treatment was the one applied with AFCo3b since this has more antigens that AFCo3a, although both as cochleates offered better results than the administration of the bacterin without adjuvant. In conclusion, was developed an appropriate vaccination protocol against *A. hydrophila* using AFCo3a and AFCo3b as adjuvants which at the same time increase the effectiveness of formalin-killed bacterin as vaccine formulation.

Keywords: *Aeromonas hydrophila*, bacterin, *Clarias gariepinus*, cochleates, IgM, oral vaccination.

*"La ciencia se compone de errores, que a su vez, son los pasos hacia la verdad."
Julio Verne*

A mis padres

Agradecimientos

En este apartado quiero agradecer a todos los que de una forma u otra contribuyeron durante el desarrollo de este trabajo.

En primer lugar agradecer a todos los profesores del departamento de Licenciatura en Biología de la Universidad Central Marta Abreu de las Villas por el tiempo que dedicaron y dedican a la formación de buenos profesionales en especial al Dr. Luis Orlando Maroto Martín por haberme conducido hacia este trabajo, a Katia por ser nuestra madre durante todos estos años y a Elizabeth por ser además mi amiga

Mis profundos respetos hacia el Dr. Oliver Pérez por acogerme en su laboratorio y brindarme su experiencia y apoyo en todo momento.

Agradezco también a Sergio Sifontes por sus sabios y oportunos consejos y por ayudarme tan incondicionalmente.

Quiero agradecer de forma muy especial a todos los trabajadores de la Unidad Empresarial de Base INTEPEZ donde cuidaron de mi trabajo y de mi , durante tantos años, en especial a MsC. Ada Fonticiella y a su familia por poder contar con su experiencia y sabios consejos.

No quiero pasar por alto a los investigadores del Centro de Estudios de Proteínas de la Universidad de la Habana, especialmente al Dr. Anselmo Otero por acogerme como su alumna.

Agradezco además a la profesora Leopoldina Triana y al Dr. Pedro de la Fe por aconsejarme siempre.

Quisiera no pasar por alto a Cupull y al laboratorio de Microbiología del Instituto de Medicina Tropical “Pedro Kourí”.

Agradezco además a mis compañeros de estudio de la Universidad Central, a mis compañeros de laboratorio del Instituto Finlay especialmente a Belquis Romeu y Dianella.

A mis amigas Leidy y Dayana, muchas gracias por escucharme y estar ahí cuando hace falta.

Finalmente, quiero usar esta oportunidad para expresar mi eterno agradecimiento a mi amada familia por todo el amor que me ofrecen diariamente.

Especialmente a mis padres, a mis abuelos donde quiera que estén, a Michaerlys, a mis tíos, a mis hermanas y a mis sobrinos, por ser el soporte y el motivo de todo lo que hago.

A todos muchas gracias,

Tabla de contenidos

1.	Introducción	11
2.	Revisión Bibliográfica.....	14
2.1	Caracterización de la especie <i>Clarias gariepinus</i>	14
2.1.1	Descripción morfológica y ubicación taxonómica de <i>Clarias gariepinus</i>	14
2.1.2	Migraciones, reproducción y alimentación de la especie.....	15
2.1.3	Distribución geográfica de la especie.....	15
2.1.4	Situación del cultivo de <i>Clarias spp.</i> en Cuba y el mundo	15
2.1.5	Principales enfermedades infecciosas en <i>Clarias gariepinus</i>	16
2.1.5.1	Bacterianas	16
2.1.5.2	Micóticas	17
2.1.5.3	Virales.....	17
2.2	<i>Aeromonas hydrophila</i> y las septicemias causadas por aeromonas mótils.....	17
2.2.1	Taxonomía y clasificación.....	18
2.2.2	Patología	18
2.2.3	Diagnóstico e identificación.....	20
2.2.4	Serología y vacunación.....	21
2.2.5	Ocurrencia y rango	21
2.2.6	Métodos de control	22
2.3	Vacunación en los peces óseos	22
2.3.1	Tipos de formulaciones vacunales utilizadas en los peces	23
2.3.2	Adyuvantes vacunales.....	24
2.3.3	Métodos de vacunación usados en los peces.....	24
2.3.4	Respuesta inmune a la vacunación contra bacterias	25
2.4	Caracterización del sistema inmune de los peces teleósteos	26
2.4.1	Órganos del sistema inmunológico de los peces	26
2.4.2	Mecanismos inmunológicos innatos.....	27
2.4.2.1	Barreras externas.....	27
2.4.2.2	Componentes humorales	27
2.4.2.3	Reconocimiento de lipopolisacárido en peces	28
2.4.2.4	Componentes celulares.....	28
2.4.3	Mecanismos inmunológicos adquiridos.....	29
2.4.3.1	Componentes humorales	29
2.4.3.2	Memoria inmunológica	30
2.4.3.3	Componentes celulares.....	31
2.4.4	Factores que afectan la respuesta inmune	32
3.	Materiales y Métodos.....	34
3.1	Elaboración de bacterina formolizada de <i>A. hydrophila</i>	34
3.2	Vacunación oral de <i>C. gariepinus</i> con bacterina de <i>A. hydrophila</i> administrada con AFCo3a o AFCo3b.....	34
3.2.1	Animales y condiciones experimentales.....	34
3.2.2	Esquema de inmunización de <i>C. gariepinus</i> con bacterina de <i>A. hydrophila</i>	35
3.2.3	Determinación de la producción de IgM sérica de <i>C. gariepinus</i> mediante ensayos inmunoenzimáticos	36
3.2.3.1	Titulación de anticuerpos IgM específicos anti bacterina de <i>A. hydrophila</i>	36
3.2.3.2	Determinación de la producción de anticuerpos IgM específicos anti-bacterina de <i>A. hydrophila</i> mediante ensayos inmunoenzimáticos	37
3.2.3.3	Determinación de la producción de anticuerpos IgM totales en las muestras de suero de <i>C. gariepinus</i> inmunizados con bacterina de <i>A. hydrophila</i>	38
3.3	Procesamiento estadístico	38

4.	Resultados.....	39
4.1	Bacterina formolizada de <i>A. hydrophila</i>	39
4.2	Vacunación oral de <i>Clarias gariepinus</i> con bacterina de <i>A. hydrophila</i> administrada con AFCo3a o AFCo3b.....	39
4.2.1	Animales y condiciones experimentales.....	39
4.2.2	Producción de IgM sérica de <i>C. gariepinus</i> ante vacunación ante vacunación oral con bacterina de <i>A. hydrophila</i> administrada con AFCo3a y AFCo3b	41
4.2.2.1	Título de anticuerpos IgM específicos anti-bacterina de <i>A. hydrophila</i>	41
4.2.2.2	Producción de anticuerpos IgM específicos anti-bacterina de <i>A. hydrophila</i> ...	41
4.2.2.3	Producción de anticuerpos IgM totales en las muestras de suero de <i>C. gariepinus</i> inmunizados con bacterina de <i>A. hydrophila</i>	43
5.	Discusión.....	45
5.1	Bacterina formolizada de <i>A. hydrophila</i>	45
5.2	Vacunación oral de <i>Clarias gariepinus</i> con bacterina de <i>A. hydrophila</i> administrada con AFCo3a o AFCo3b.....	46
5.2.1	Animales y condiciones experimentales.....	46
5.2.2	Producción de IgM sérica de <i>C. gariepinus</i> ante vacunación oral con bacterina de <i>A. hydrophila</i> administrada con AFCo3a y AFCo3b	47
5.2.2.1	Título de anticuerpos IgM específicos anti-bacterina de <i>A. hydrophila</i>	47
5.2.2.2	Producción de anticuerpos IgM específicos anti-bacterina de <i>A. hydrophila</i> ...	48
5.2.2.3	Producción de anticuerpos IgM totales en las muestras de suero de <i>C. gariepinus</i> inmunizados con bacterina de <i>A. hydrophila</i>	52
5.3	Discusión general.....	52
6.	Conclusiones	55
7.	Recomendaciones	56

1. Introducción

Los peces constituyen uno de los grupos de vertebrados más ampliamente explotados durante el desarrollo de la humanidad, de ahí que la acuicultura represente una de las mejores técnicas ideadas por el hombre para incrementar la disponibilidad de alimento desde tiempos remotos. Actualmente esta actividad económica juega un papel importante en el suplemento de proteína de alta calidad para la alimentación de una población mundial en constante crecimiento. En el ámbito mundial, la acuicultura es el sector de mayor crecimiento en la producción de alimento; en la actualidad es responsable de cerca del 50% de la oferta mundial de pescado (FAO, 2012) considerándose que será una de las principales esferas económicas del presente siglo.

Clarias gariepinus (Burchell, 1822), o pez gato africano es un pez de agua dulce de la familia *Clariidae*, esta especie tropical está ampliamente distribuida debido a su alta tasa de crecimiento, fecundidad y tamaño. Alcanza hasta 29 kg de peso y tiene como desventaja su gran voracidad. La carne es suave, de sabor agradable y su valor en el mercado internacional es de 2,38 dólares el kg. La producción mundial está alrededor de las 260 000 toneladas con una fuerte tendencia al crecimiento sobre todo en países como Nigeria, Malasia, Hungría, Holanda, Tailandia e Indonesia (Vinjoy *et al.*, 2000).

En julio de 1999 se realizó la primera introducción en Cuba y al año siguiente se decide su explotación a gran escala principalmente para el cultivo intensivo (Fonticiella, 2009). En los últimos años el cultivo de esta especie se ha extendido por todas las regiones de país, constituyendo de esta forma uno de los alimentos de la población cubana actual. Se estima que en el año 2010 se produjeron en el país alrededor de 5 000 toneladas de carne de este animal.

A pesar de que esta especie es reconocida por su fortaleza, adaptabilidad a diferentes condiciones y resistencia a enfermedades, la tendencia creciente hacia la intensificación de los sistemas de producción de la especie, comienzan a favorecer el aumento de los problemas sanitarios. Dentro las principales enfermedades que predominan en estos sistemas se encuentran las infecciosas que representan anualmente pérdidas cuantiosas en la producción global (Georgiadis *et al.*, 2001).

Los principales agentes causales de enfermedades infecciosas en el cultivo de *Clarias gariepinus* son las bacterias, las cuales provocan, mayormente, septicemias donde intervienen diversos géneros y especies entre las que se encuentran *Aeromonas hydrophila* (Chester, 1901), *Pseudomonas* sp., *Flexibacter columnaris*, *Vibrio* sp. y *Edwardsiella* spp, comúnmente encontradas en el agua y que invaden al pez cuando existen condiciones estresantes en el ambiente donde estos habitan aumentando la virulencia del patógeno y disminuyendo la inmunocompetencia del pez (Vinjoy, 2000). Otras enfermedades importantes en el cultivo del pez gato son las causadas por hongos, *Saprolegnia* sp. y *Achlya* sp. son los géneros más comunes (Rafai *et al.*, 2010).

Entre las bacterias, *Aeromonas hydrophila* ha sido encontrada en un amplio rango de especies de peces de agua dulce por todo el mundo, se encuentra además formando parte del tracto gastrointestinal de los animales, llegando a causar grandes pérdidas económicas bajo condiciones estresantes (Negrete *et al.*, 2002). Hasta el presente, el principal método de control de las enfermedades causadas por *A. hydrophila* es el tratamiento con antibióticos y con la mejora de las prácticas de manejo, sin embargo, el uso extensivo de estos medicamentos ha llevado a que esta bacteria desarrolle resistencia a los mismos, causando efectos colaterales poco deseables. Una alternativa al uso de estas sustancias es la vacunación, la cual constituye una de las herramientas más valiosas para prevenir enfermedades en la acuicultura y asegurar un producto limpio sin efectos sobre el ambiente (Bowden *et al.*, 2003).

En la acuicultura las vacunas que predominan son de microorganismos muertos o inactivados, también llamadas bacterinas. Estas tienen como ventaja que son vacunas generalmente bien toleradas, menos reactógenas que las vacunas vivas, muy seguras y de más fácil fabricación, una de sus desventajas es que deben ser administradas con adyuvantes por ser poco inmunógenas. La vacunación oral es el método de administración ideal para la acuicultura por la facilidad del procedimiento, por los relativos costos bajos y porque no causa ningún tipo de estrés a los peces, sumado a la posibilidad de vacunar grandes poblaciones de peces pequeños en corto tiempo (Vanderberg, 2004).

Uno de los principales componentes de las formulaciones vacunales son los adyuvantes o inmunopotenciadores los cuales tienen un papel importante en la liberación y modulación de la respuesta inmunológica. AFCo3a y AFCo3b son inmunoestimulantes producidos en el Instituto Finlay obtenidos a partir de la membrana externa de *Neisseria meningitidis* B como parte de los subproductos provenientes del proceso de producción de la vacuna VA-

MENGOC-BC®. Al ser de esta naturaleza su uso reduce los costos de producción de dicha vacuna y disminuye la necesidad de importación de productos de este tipo para uso nacional.

Por las razones anteriormente expuestas *A. hydrophila* puede convertirse en un patógeno peligroso en los sistemas de cultivo intensivo de clarias en Cuba. Al ser relativamente nueva la introducción de este pez en la acuicultura nacional, las investigaciones pueden dirigirse hacia el desarrollo de nuevas estrategias preventivas accesibles y económicas que eviten o atenúen la incidencia de enfermedades causadas por dicho patógeno en nuestros sistemas de cultivo, favoreciendo de esta forma el buen desarrollo de esta actividad económica con mayor productividad y eficiencia.

Una de las estrategias más prometedoras para el control de estas enfermedades infecciosas es la vacunación oral con bacterinas administradas con adyuvantes como AFCo3a y AFCo3b, ya que son de fácil fabricación y administración, sin embargo, se hace necesario el estudio de la respuesta inmunológica de las mismas, con el fin de determinar cuánta protección se le brinda a los animales con este método de inmunización y sentar las bases para futuras investigaciones. Por tales motivos este trabajo se traza los objetivos siguientes:

Objetivo general

Desarrollar un protocolo de vacunación oral en *C. gariepinus* contra *A. hydrophila* administrando bacterina con adyuvantes AFCo3a y AFCo3b.

Objetivos específicos

- ✚ Elaborar bacterina formolizada de *A. hydrophila*.
- ✚ Determinar la producción de IgM en *C. gariepinus* ante la vacunación oral con bacterina de *A. hydrophila* administrada con AFCo3a y AFCo3b.

2. Revisión Bibliográfica

2.1 Caracterización de la especie *Clarias gariepinus*

2.1.1 Descripción morfológica y ubicación taxonómica de *Clarias gariepinus*

Clarias gariepinus es una especie de pez óseo, perteneciente al género *Clarias* spp, de la familia *Clariidae* del orden *Siluriformes*, este género comprende alrededor de 100 especies de peces descritas hasta la fecha, sin embargo, algunos autores basados en la morfología, anatomía y estudios biogeográficos reconocen como válidas sólo 32 especies de estas (Tewgels, 1984).

Los miembros de esta especie, también denominada pez gato africano, pueden ser descritos como animales que presentan forma anguiliforme, cuerpo elongado y cilíndrico con aletas dorsales y anales extremadamente largas donde ambas aletas contienen un solo rayo blando. El rayo pectoral exterior tiene forma de una espina y la aleta pélvica normalmente posee seis bandejas. La cabeza es achatada y altamente osificada, los huesos del cráneo forman un casco y el cuerpo está cubierto con una piel suave carente de escamas. La piel generalmente está pigmentada de forma oscura en las partes dorsales y laterales del cuerpo. La coloración es uniforme gris oscuro, barro negro o marrón. En condiciones naturales puede alcanzar de 1-1,5 metros y un peso de 29 kg.

Estos peces poseen cuatro pares de barbelos, uno nasal, uno maxilar en el vómer y dos mandibulares (interiores y exteriores). Los barbelos tienen como función la detección de cambios de presión en su ambiente (de Graaf *et al.*, 1996). Las placas dentales están presentes en la mandíbula así como en el vómer.

Otra característica significativa de la especie es la presencia de un órgano suprabranquial u órgano respiratorio accesorio, compuesto por cámaras pareadas en forma de pera que contienen dos estructuras arborescentes. Estas arborescencias o estructuras en forma de coliflor están localizadas en el segundo arco branquial, y están sujetadas por cartílago y cubierto por un tejido altamente vascularizado el cual puede absorber oxígeno directamente de la atmósfera (Ip, Y. K., *et. al.* 2005). El órgano respiratorio accesorio permite al pez sobrevivir por muchas horas fuera del agua o por muchas semanas en el fango. Presenta un dimorfismo sexual notable, el macho tiene una papila sexual distintiva, localizada justamente detrás del ano. Esta papila sexual está ausente en las hembras.

2.1.2 Migraciones, reproducción y alimentación de la especie

En condiciones naturales *C. gariepinus* emprende migraciones laterales desde grandes cuerpos de aguas, en los cuales se alimentan y maduran alrededor de 12 meses, a áreas marginales temporalmente inundadas con el objetivo de reproducirse. Estas migraciones reproductivas normalmente tienen lugar poco tiempo después de la estación de lluvia. La maduración gonadal final es asociada con el aumento de los niveles del agua. Bajo condiciones ambientales estables, los adultos de *C. gariepinus* maduran sus gónadas alrededor del año. Bajo condiciones ideales una hembra puede depositar alrededor de 60000 huevos/kg. Las larvas comen y crecen rápidamente en aguas cálidas (usualmente >24 °C) alcanzando alrededor 3-7 g dentro de 30 días. Como las aguas marginales temporalmente inundadas se secan después de las lluvias, los juveniles y los adultos hacen su viaje de regreso a las aguas profundas. En áreas con dos estaciones de lluvias, ellos tienen usualmente dos picos reproductivos durante un año, correspondiente con la magnitud de las lluvias (FAO, 2012).

Su alimentación natural se basa en insectos, gasterópodos, crustáceos, pequeños peces, plantas acuáticas, pero han sido encontrados semillas terrestres e incluso pequeños mamíferos y aves. La fuente de alimentación primaria en todas las etapas de su desarrollo es el zooplancton. Aunque generalmente omnívoros, *C. gariepinus* digieren relativamente mejor dietas de alta proteínas que carbohidratos. Aproximadamente el 70% de la actividad alimenticia tienen lugar en la noche.

2.1.3 Distribución geográfica de la especie

Clarias gariepinus habita en aguas calmadas desde lagos, arroyos, ríos pantanosos hasta llanuras inundadas, muchas de las cuales está sujetas a sequías temporales. Los hábitats más frecuentados son llanuras cenagosas inundadas y charcas (Bruton, 1979a)

El pez gato africano tiene una amplia distribución en África. La especie está presente en Jordania, Líbano, Israel y Turquía. *C. gariepinus* ha sido introducida también en otros países de África, así como en Europa, Asia y América (FAO, 2012)

2.1.4 Situación del cultivo de *Clarias spp.* en Cuba y el mundo

Su cultivo en los tiempos modernos sigue un camino similar al de las tilapias: la primera domesticación tuvo lugar por los años 50 y la adopción de *C. gariepinus* como el pez gato más beneficioso para la acuicultura fue a mediados de la década de 1970. Sin embargo

bajo condiciones de cultivo, es difícil para los peces reproducirse espontáneamente. Los protocolos para la propagación artificial basados en estimulación hormonal fueron desarrollados en los años 1980. Las investigaciones en el desarrollo de la tecnología del cultivo de este pez ha sido conducida en Europa (Bélgica y Holanda), así como en África (FAO, 2012).

En el mes de julio de 1999 se realiza la primera introducción de esta especie en Cuba, con fines de investigación científica, desde Malasia. Actualmente esta especie se destina para su explotación mediante el cultivo intensivo, realizando prácticas de manejo inicialmente obtenidas por referencias de otros países (Vinjoy, 2000). La producción mundial está alrededor de las 260 000 toneladas, con una fuerte tendencia al crecimiento sobre todo en países como Nigeria, Malasia, Hungría, Tailandia e Indonesia (*op. cit*).

Este pez, en condiciones propicias de cultivo, es capaz de ganar 10 gramos de peso por día ya que posee una gran capacidad de convertir el alimento en peso corporal, esto lo hace ideal para garantizar crecientes niveles de producción. En el año 2000, un año después de introducida, la acuicultura cubana produjo apenas 28 toneladas de clarias, en el año 2003 alcanzó las 438, ya en el 2007 la producción fue de 3 889 toneladas y en el 2010 ascendió a 5 000 toneladas. Su carne, firme y agradable al paladar, con un 18% de proteína, se compara favorablemente con la de cualquier otro pez tanto de mar como de agua dulce (Vinjoy, 2000).

Actualmente el cultivo de *Clarias gariepinus* constituye uno de las principales aristas dentro de la acuicultura nacional por la rentabilidad del mismo en todos los aspectos, siendo uno de los principales destinos la producción de alimentos para la industria del turismo, lo cual contribuye a disminuir los costos de las importaciones por este concepto.

2.1.5 Principales enfermedades infecciosas en *Clarias gariepinus*

2.1.5.1 Bacterianas

Las septicemias constituyen un grupo de enfermedades más comunes en estas especies, donde intervienen diversos géneros y especies de bacterias entre las que se encuentran *Aeromonas hydrophila*, *Pseudomonas* sp. *Vibrio* sp., y *Edwardsiella spp* comúnmente encontradas en el agua y que invaden al pez cuando las condiciones que lo rodean lo permiten, lo que provoca el aumento de la virulencia del patógeno y la disminución de la inmunocompetencia del pez (Douglas, 2008). Estas bacterias gram-negativas causan

infecciones sistémicas y los síntomas externos de la enfermedad son: hemorragias, úlceras, hidropesía, inflamación en la base de las aletas. Internamente se observa palidez hepática y la presencia de focos hemorrágicos en la superficie de los órganos y la cavidad abdominal (Paperna, 1996).

Otra enfermedad muy común es la columnariosis (enfermedad de la mancha blanca) cuyo agente causal es *Flexibacter columnaris* (Paperna, 1996). Esta mixobacteria afecta una amplia variedad de especies, siendo los peces gatos altamente susceptibles a ella causando altas mortalidades. (Richards y Roberts, 1978).

2.1.5.2 Micóticas

Las enfermedades causadas por hongos son extremadamente importantes en el cultivo de pez gato y en la incubación de sus huevos. Se consideran invasores secundarios y aparecen debido a daños provocados por la manipulación, cambios bruscos de temperatura o a la presencia de huevos o tejidos muertos. Estos hongos están siempre presentes en el agua y son saprófitos facultativos, ya que pueden vivir sobre la materia orgánica o sobre tejidos vivos (Vinjoy, 2000).

Saprolegnia sp. y *Achlya* sp. son los géneros de hongos más comunes en las infecciones micóticas de los peces y pertenecen al orden *Saprolegniales*. (Rafai, *et al.* 2010). Los peces afectados presentan masas compuestas por muchos hilos blanquecinos los cuales se asemejan a masas de algodón sobre la superficie del cuerpo del pez (Paperna, 1996).

2.1.5.3 Virales

Las enfermedades virales más peligrosas para el cultivo de *Clarias gariepinus* son las causadas por *Channel Catfish Virus* (Virus del pez gato de canal) o CCV que afecta al pez gato americano (*Ictalurus punctatus*) causando grandes mortalidades, por ser un patógeno tan peligroso que ataca a otra especie del mismo orden, se debe mantener una estrecha vigilancia, con respecto a este virus (Vinjoy, 2000).

2.2 *Aeromonas hydrophila* y las septicemias causadas por aeromonas móviles.

Aeromonas hydrophila y otras aeromonas móviles son posiblemente las bacterias más comunes en los hábitats de agua dulce en el mundo, y causan frecuentemente enfermedades en los cultivos de peces. La etiología exacta de las enfermedades donde se encuentran las aeromonas es complicada por la heterogeneidad genética, bioquímica y antigénica que existe en los miembros de este grupo bacteriano. Las aeromonas móviles

son referidas a un grupo de enfermedades asociadas a septicemias hemorrágicas y otras condiciones ulcerativas en los peces (González, 2004).

Aunque las aeromonas mótils reciben apropiadamente mucha notoriedad como patógeno de los peces, es muy importante resaltar que forman parte de la microbiota intestinal normal de los peces sanos (Trust *et al.*, 1974). La presencia de esta bacteria, por sí misma, no es indicativa de enfermedad, el estrés es considerado habitualmente un factor desencadenante de las enfermedades causadas por esta bacteria y está comúnmente asociado con parámetros ambientales y fisiológicos característicos de los cultivos intensivos. Esta es la razón por la cual un pez como *C. garipienus* normalmente resistente a enfermedades, puede ser susceptible a las enfermedades causadas por este patógeno.

2.2.1 Taxonomía y clasificación

A causa de la heterogeneidad bioquímica, genética y serológica el taxón de *Aeromonas spp.* posee una posición inestable. Las aeromonas son cortos bacilos (0,5x1,0~m), gram-negativos, móviles, con un único flagelo, que fermenta la glucosa con o sin producción de gas. Las aeromonas mótils (Popoff y Vernon, 1976) pueden ser clasificadas en dos especies diferentes: *A. hydrophila*, y *A. sobria*, bioquímicamente *A. hydrophila* hidroliza esculina y fermenta a la salicina y a la arabinosa, mientras *A. sobria* no utiliza estos compuestos (Lallier *et al.* 1981). Pueden ser pleomórficas pero generalmente producen colonias circulares de superficie elevada en agar. Fenotípicamente, las aeromonas mótils son citocromo oxidasa positivas y son insensibles a los agentes vibriostáticos (Yardimci y Aydin, 2011).

2.2.2 Patología

Las aeromonas mótils causan diversas condiciones patológicas que incluyen infecciones agudas, crónicas y cubiertas. La severidad de las enfermedades está influenciada por un número de factores interrelacionados, que incluyen la virulencia bacteriana, el tipo y el grado de estrés al que estuvo sometida la población de peces, las condiciones fisiológicas del hospedante, y el grado de resistencia genética inherente dentro de las poblaciones de peces. Estos patógenos difieren inter e intraespecíficamente en su relativa patogenicidad o en su habilidad de causar enfermedad (Botero, *et al.* 2005).

Las condiciones patológicas atribuidas a los miembros de las aeromonas mótils pueden incluir las ulceraciones dérmicas, putrefacción de las aletas y de la cola, ulceraciones

oculares, eritrodermatitis, septicemia hemorrágica, enfermedad de las llagas rojas, enfermedad de la putrefacción roja y enfermedad del erizamiento de las escamas. En la fase aguda de la enfermedad, puede ocurrir una septicemia fatal tan rápidamente que el pez muere después de desarrollar cualquiera de los signos de la enfermedad. Los peces afectados pueden desarrollar exoftalmia, enrojecimiento de la piel, y una acumulación de fluido en la base de las escamas y el abdomen comienza a distenderse. Las branquias pueden tener hemorragias y úlceras e histopatológicamente, pueden exhibir además hiperplasia epitelial en el intestino, congestión leptomenigeal en el cerebro, así como trombosis e inflamación en la región perisclerótica y en el epitelio corneal del ojo (Yardimci y Aydin, 2011).

Las infecciones sistémicas son caracterizadas por una necrosis difusa en muchos de los órganos internos y la presencia de melanina en los macrófagos de la sangre. Internamente, el riñón y el hígado son los órganos blancos de la septicemia aguda. El riñón puede palidecer o adquirir una coloración verdosa mientras que el hígado puede hincharse. Estos órganos aparentemente se unen con toxinas bacterianas y pierden su integridad estructural. El intestino también se muestra protuberante del cuerpo, hinchado y hemorrágico (Falcón *et al.*, 2004).

Las infecciones crónicas de aeromonas móviles se manifiestan primariamente como formas ulcerosas de la enfermedad, en la cual las lesiones son aparentes con hemorragias locales e inflamación. Tanto la dermis como la epidermis se erosionan y la musculatura adyacente comienza a desarrollar una necrosis. Las células inflamatorias comienzan a escasear en la musculatura necrótica, y en la zona de la epidermis adyacente se comienza a desarrollar hiperplasia que da como resultado un margen abultado (Huizinga *et al.*, 1979).

Los peces con infecciones solo cutáneas pueden tener muchos tipos de lesiones ocultas incluyendo el incremento del lipofuchina y hemosiderina en el hígado y el bazo, sin embargo, la mayoría de los órganos viscerales no estarán necróticos (Ventura y Grizzle, 1988).

Factores de virulencia

Los factores producidos por las aeromonas móviles, que pueden facilitar el contagio, son elementos importantes de la virulencia de las bacterias. Se ha demostrado que las

aeromonas pueden actuar adhiriéndose a las líneas celulares usando receptores mucosales y dentro de ellas *A. hydrophila* es una de las que más mucinas posee. Las aeromonas móviles producen fimbrias (pili) que facilitan la adhesión, estas estructuras permiten además que las células mantengan su virulencia (Osman, 2009).

Enterotoxinas, hemolisinas, proteasas, hemoaglutininas, y endotoxinas producidas por este complejo grupo de organismos han sido sujetas a numerosas investigaciones. Sin embargo, la naturaleza de la virulencia observada intra e interespecífica dentro de las aeromonas móviles puede ser bien definida observando las relaciones sinérgicas entre los factores de virulencia. Algunos autores han llegado a la conclusión de que es la hemolisina y no la proteasa, el principal factor de virulencia de *A. hydrophila* (Botero, 2005).

La virulencia de las aeromonas móviles depende de múltiples factores, se ha demostrado que 22 fragmentos de ADN presentes en las cepas virulentas codifican para cinco factores de virulencia conocidos incluyendo hemolisina A (hlyA), proteasa (oligopeptidasa A), proteína del exterior de la membrana (Omp), proteína resistente a múltiples drogas y proteína similar a histona (HU-2). Estos mismos fragmentos se encuentran ausentes en la mayoría de las cepas avirulentas aisladas que han sido examinadas (Zhang *et al.* 2000).

2.2.3 Diagnóstico e identificación

Un diagnóstico presuntivo de *A. hydrophila* puede ser basado en las especies de peces afectados, en el estatus de las enfermedades pasadas por esos peces, y la presencia de signos clínicos de la enfermedad. Tanto Agar soya tripticasa (AST) o Infusión de cerebro-corazón (ICC) son los medios de cultivo recomendados para hacer una separación primaria de las aeromonas móviles de peces enfermos. Para facilitar la recuperación de aeromonas móviles a partir de un aislado primario, Shotts y Rimler en 1973 elaboraron un medio diferencial para la separación selectiva de las aeromonas móviles denominado Agar Rimler-Shotts (Agar R-S), en este medio las colonias de las aeromonas son amarillas (Shotts y Rimler, 1973).

La confirmación de la especie para el diagnóstico se realiza a través de la fermentación ácida de la glucosa en la cual se produce una coloración típica amarilla (Bullock, 1961).

A causa de que las aeromonas móviles tienen una considerable diversidad antigénica, la identificación por serodiagnóstico no es realizable. Los procedimientos de aglutinación, los

test de anticuerpos fluorescentes (Soltani y Khorasgani, 1999), y los procedimientos inmunoenzimáticos (Mishra, 1998) han sido adaptados para el uso dentro de sistemas homólogos antígeno/anticuerpo, por lo que no existe un antisuero específico para todas las cepas de estas bacterias. Los análisis genéticos por PCR también han sido dificultados por la diversidad genética de esta especie (Joseph y Carnahan, 1994).

2.2.4 Serología y vacunación

Las aeromonas móviles son uno de los grupos más diversos taxonómica y antigénicamente de las bacterias patógenas de los peces esto ha provocado que bacterinas monovalentes preparadas contra una cepa de *A. hydrophila*, sólo proveen niveles aceptables de protección cuando los animales son sometidos a desafíos con bacterias homólogas (Ibrahem, 2008) con las que se preparó la vacuna.

Se ha encontrado que las vacunas inactivadas con formalina son superiores a las preparaciones de bacterias inactivadas por calor, especialmente cuando las bacterinas fueron inyectadas con adyuvantes. También se ha indicado que la inyección fue superior a la inmersión o la vacunación con spray para el desarrollo de anticuerpos humorales (Penagos *et al.*, 2009). La vacunación oral es otro método que ha demostrado ser menos estresante que la inyección aunque esta provea mayor protección, haciéndolo accesible durante el cultivo de grandes cantidades de peces.

A causa de la diversidad que existe dentro de este grupo de organismos, las estrategias adicionales de vacunación incluyen investigaciones para el desarrollo de vacunas polivalentes y la inmunización contra toxinas extracelulares (toxoides).

2.2.5 Ocurrencia y rango

Las aeromonas móviles causan enfermedades en cualquier lugar donde se propaguen tanto los peces ornamentales o los peces de aguas cálidas. Las enfermedades asociadas con aeromonas móviles son más severas en peces que se propagan bajo condiciones de cultivo intensivo, esta bacteria puede afectar además a peces susceptibles y se encuentra en el tracto digestivo de peces aparentemente sanos (Trust *et al.*, 1974). La bacteria se puede encontrar tanto en la columna de agua como en los centímetros cercanos al sedimento. Las aeromonas móviles se han adaptado a ambientes donde poseen un amplio rango en los parámetros de conductividad, turbidez, pH, salinidad y temperatura. El óptimo de temperatura depende de la cepa en particular que se investiga, pero generalmente entra en el rango de 25°C a 35°C. Bajo condiciones de estrés, puede ocurrir

incluso que algunas cepas de las aeromonas móviles que son ordinariamente parte del intestino normal comienzan a ser patogénicas (Osman, 2009).

2.2.6 Métodos de control

Un correcto manejo, es la mejor estrategia de prevención para evitar las infecciones y las subsecuentes epizotias causadas por esta bacteria. Las septicemias causadas por aeromonas móviles son generalmente mediadas por el estrés causado por la temperatura elevada del agua, el descenso del oxígeno disuelto, o el incremento de las concentraciones de amonio y dióxido de carbono (González, 2004). El monitoreo de las variables ambientales pueden además evitar las situaciones estresantes, impidiendo de esta forma los problemas que se puedan causar.

Oxitetraciclina (Terramicina) ha sido la droga de opción para el tratamiento de las septicemias ocasionadas por aeromonas móviles en peces. Sin embargo el uso indiscriminado de este antibiótico puede ocasionar resistencia a drogas reduciendo el valor de los antibióticos en la medicina humana, además las cepas de aeromonas móviles muestran múltiple resistencia a las drogas. Los productores han encontrado dificultades para el tratamiento de *A. hydrophila* en peces principalmente por la resistencia de este patógeno a los antibióticos. La producción de vacunas ha encontrado dificultades por la ya mencionada diversidad antigénica, esto hace a la inmunoestimulación con componentes bacterianos una estrategia fiable para combatir estos patógenos dentro de los cultivos intensivos de peces (Penagos, *et al.* 2009).

2.3 Vacunación en los peces óseos

Como ya se ha dicho diferentes sustancias químicas y antibióticas han sido usadas para controlar los agentes infecciosos, pero estos productos son poco deseables por sus efectos colaterales (Furushita *et al.*, 2003). Una alternativa al uso de estas sustancias es la vacunación, una de las herramientas más valiosas para prevenir enfermedades en acuicultura y asegurar un producto limpio sin efectos sobre el ambiente (FAO, 2012).

Una vacuna es cualquier preparación biológicamente basada, que intenta establecer o inducir inmunidad a una enfermedad particular o un grupo de enfermedades, exponiendo al sistema inmune del animal a un antígeno perteneciente al patógeno, con el objetivo de prepararlo cualitativa y cuantitativamente mejor contra infecciones posteriores causadas por el organismo que causa la enfermedad (Toranzo *et al.*, 2009).

La vacunación de los peces se ha convertido, durante la última década en un método muy efectivo en la reducción de pérdidas económicas, causadas por la mortalidad y el crecimiento reducido a causa de enfermedades infecciosas. Esta práctica se ha desarrollado especialmente en la industria de los salmónidos, y en la del pez gato de canal. Se dice que una vacuna ideal debe ser segura para los peces, las personas que consumen al pez vacunado y las personas que los vacunan, debe proteger contra una cepa o tipo de patógeno correcto, brindando un 100% de protección, proveer además una protección duradera, y tan larga como el ciclo de producción, ser fácilmente aplicada y efectiva en varias de especies de peces, así como tener un costo efectivo y ser fácil de licenciar y de registrar (Grisez y Tan, 2005), para lograr todo esto se necesita obviamente de estudios previos que demuestren la efectividad inmunológica de la vacuna en cuestión.

2.3.1 Tipos de formulaciones vacunales utilizadas en los peces

La mayoría de las vacunas usadas en la acuicultura han sido vacunas de patógenos inactivados o **bacterinas** obtenidas a partir de medios de cultivos (caldos) para las cepas específicas, los cuales son sujetos subsecuentemente a inactivación por formalina o calor (Toranzo *et al.*, 1997). Los mejores resultados obtenidos con estas bacterinas son obtenidos cuando se unen tanto las células completas como los productos extracelulares de las bacterias.

Estas tienen como ventaja que son vacunas generalmente bien toleradas, menos reactógenas que las vacunas vivas, muy seguras y de más fácil fabricación. Desde el punto de vista inmunológico son menos inmunógenas que las vacunas vivas, precisando adyuvantes, la administración de varias dosis para la primovacuna y posteriormente varias dosis de refuerzo para que la protección obtenida sea a largo plazo. Por lo general estimulan fundamentalmente la inmunidad humoral y preparan la memoria inmunológica e incluso en algunos casos, sobre todo cuando se administran con adyuvantes o sistemas de liberación, pueden estimular la inmunidad mediada por linfocitos T citotóxicos. Por esta razón una forma efectiva de valorar la inmunogenicidad de estas vacunas es realizando ensayos que permitan cuantificar la producción de anticuerpos antes y después de la vacunación (Tort, 2003).

Las **vacunas vivas atenuadas** pueden tener potencialmente muchas ventajas en la acuicultura ya que estimulan la respuesta celular del sistema inmune pero se han presentado problemas concernientes con la seguridad, la persistencia en el pez y en el

ambiente, la reversión de la virulencia y el consumo por otros animales incluyendo peces salvajes (Toranzo, 2009)

Las **vacunas ADN** son teóricamente más ventajosas que las vacunas convencionales en los mamíferos, la respuesta inmune específica después de la vacunación con ADN armoniza anticuerpos, células T-colaboradoras y células citotóxicas. Las vacunas ADN que han sido aplicadas, son seguras para los peces, el ambiente y los consumidores a los que ha sido dirigido (*op cit*).

Cuando las vacunas son desarrolladas con moléculas que constituyen parte de la estructura de los patógenos se denominan **vacunas de subunidades antigénicas**. Pueden estar basadas en polisacáridos o proteínas provenientes de bacterias o virus específicos, pero a pesar de sus ventajas son muy caras de producir lo que las hace en ocasiones poco viables. La formulación ideal de una vacuna es la **vacuna polivalente** la cual protege simultáneamente contra la mayoría de las enfermedades a las cuales la especie particular de peces es susceptible en un área en particular. Tienen como desventaja que puede ocurrir competición antigénica, especialmente cuando estas vacunas son administradas por inyección (Toranzo *et al.*, 2009).

2.3.2 Adyuvantes vacunales

Dentro de la formulación de una vacuna, juega un papel fundamental la elección del **adyuvante**. Los adyuvantes son sustancias o preparados químicos que, incorporados al antígeno o inyectados simultáneamente con él, hacen más efectiva la respuesta inmune. Con su empleo se logra una economía de antígeno y de tiempo, así como un mayor nivel de anticuerpos específicos. Los tipos de adyuvantes más utilizados son las sales de aluminio, adyuvantes tensoactivos, adyuvantes derivados de bacterias, emulsiones, liposomas, adyuvantes de microesferas de polímeros y las citoquinas (Morris *et al.*, 1999).

2.3.3 Métodos de vacunación usados en los peces

La elección de la vía o el método de vacunación tiene vital importancia en el desarrollo de las vacunas en los peces. La **vacunación por inmersión** por ejemplo, es un método ideal para vacunar gran número de peces pequeños (Pasnick *et al.*, 2005). Este método es más usado que la vacunación oral y normalmente provee mejor protección, se evita la degradación de la vacuna en el estómago y algunos antígenos bacterianos ingresan a través de la mucosa gastrointestinal (Klesius, 2004). Tiene como desventaja que los

antígenos se pueden degradar en el agua (Evans *et al.*, 2004) y el estrés que implica el traslado de los peces al recipiente de vacunación (Shao, 2001; Bowden *et al.*, 2003a).

La **vacunación oral** es el método ideal de inmunización en acuicultura por la facilidad del procedimiento, por los relativos costos bajos y porque no causa ningún tipo de estrés a los peces, sumado a la posibilidad de vacunar grandes poblaciones de peces pequeños en corto tiempo (Yang, 2003). Otra ventaja adicional, es la estimulación de inmunidad en las mucosas (Vanderverg, 2004). Sus principales inconvenientes son la dificultad para determinar la dosis consumida por cada pez, los niveles bajos de protección alcanzados por estas vacunas cuando se comparan con los de inyección (Heppell y Davis, 2000) y la necesidad de recubrir los antígenos para evitar que sean destruidos en el agua o en el estómago del pez (Vanderverg, 2004).

La **vacunación intraperitoneal** es la ruta más efectiva para inducir protección, asegura una dosis idéntica en todos los individuos y permite la adición de adyuvantes que estimulan protección por más tiempo (Evans *et al.*, 2004). Sin embargo, los costos y las dificultades de implementación, el estrés excesivo que induce en los peces, sumado a la poca viabilidad en peces pequeños, y a la estimulación deficiente de inmunidad de superficies, hacen que la inyección de vacunas se limite (Midtlyng, 1996). La **vacunación intramuscular** en peces a excepción de algunos trabajos experimentales con bacterinas (Klesius *et al.*, 2000) se limita a la evaluación de vacunas basadas en tecnología de ADN.

2.3.4 Respuesta inmune a la vacunación contra bacterias

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 que afectan la respuesta inmune que se discutirán posteriormente (Azad, *et al.* 2000).

No existe claridad en el tiempo en el que el pez se hace inmunocompetente (Mulero *et al.*, 2007). Algunos autores plantean que se debe evaluar protección frente a determinados microorganismos a través de pruebas distintas a las serológicas o en sitios diferentes a la sangre como el moco y la bilis (Ruiz *et al.*, 2003b), otros autores han demostrado que en ciertas especies la protección es directamente proporcional al peso del animal sin importar la vía de inmunización (Evans *et al.*, 2004).

La ruta de inmunización es fundamental a la hora de estimular protección contra bacterias. Es necesario conocer específicamente los tejidos por los que ingresa el patógeno para asegurar estimulación del sistema inmune en esos sitios (Mydtling, 2005). La mayoría de las bacterias que causan enfermedad en los peces, ingresan preferiblemente por el tracto gastrointestinal como *Aeromonas* spp., y para actuar contra ellas sería indicada la vacunación oral, pero algunas penetran fácilmente por la piel y/o las branquias en cuyo caso adquiere peso el método de inmersión (Bowden *et al.*, 2003).

A pesar de que algunos autores consideran que en acuicultura una única vacunación es suficiente para inducir protección hasta que los peces son cosechados (Heppell y Davis, 2000; Bowden *et al.*, 2003), y esto puede tener validez luego de 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 (Vandenberg, 2004).

En conclusión, la vacunación oral es el método más viable teóricamente en los cultivos intensivos de clarias en Cuba, por la facilidad del proceso, la posibilidad de usarlo en todo el ciclo productivo y por el ahorro de recursos contrastado con otros métodos de vacunación, usados contra enfermedades bacterianas como las causadas por *Aeromonas hydrophila*.

Por la diversidad antigénica bacteriana ya explicada para el caso de *A. hydrophila*, las vacunas deben ser elaboradas a partir de cepas presentes en la región donde se desarrolla el pez, esto lleva a la necesidad de elaborar vacunas en Cuba que inmunicen contra bacterias presentes en las estaciones de cultivo intensivo que se encuentran en el país, lo cual evitaría el uso desmedido de antibióticos.

2.4 Caracterización del sistema inmune de los peces teleósteos

2.4.1 Órganos del sistema inmunológico de los peces

Como en todos los vertebrados, los peces tienen respuestas inmunes celulares y humorales, y órganos centrales que realizan las principales funciones involucradas en la defensa inmune. La mayoría de los órganos linfoides presentes en los mamíferos se encuentran también en los peces, excepto los nódulos linfáticos y la médula ósea. El riñón, aglomerular, asume las funciones hematopoyéticas y es el principal órgano responsable de la fagocitosis, el procesamiento antigénico, y la formación de IgM y de la

memoria inmunológica dentro de los centros melanomacrófagos. La parte activa inmunológicamente, la cabeza del riñón o los pronefros es clave además dentro de las funciones regulatorias inmunológicas y neuroendocrinas (Tort, *et al.*, 2003).

El timo, otro órgano linfoide situado cerca de la cavidad opercular en los teleósteos, produce los linfocitos T involucrados en el rechazo de trasplantes, estimulación de fagocitosis y la producción de anticuerpos por las células B. La infiltración de la sangre y la destrucción eritrocitaria tienen lugar en los centros melanomacrófagos (CMM), formados por la acumulación macrófagos (donde se producen y almacenan pigmentos como la melanina), células plasmáticas, linfocitos y células reticulares. Estos centros son característica particular del sistema inmune de los peces y se encuentran principalmente en el bazo y los riñones (Ferguson, 2006).

2.4.2 Mecanismos inmunológicos innatos

2.4.2.1 Barreras externas

Las escamas de los peces, las superficies mucosas de la piel, las branquias y la epidermis actúan como la primera barrera contra la infección, asociado a los tegumentos de estos tejidos se encuentra el tejido linfoide lo que se complementa con protección física y química provista en cada estructura. En las secreciones epidérmicas y mucus, se encuentra el complemento, las proteínas antimicrobiales, lizozima, fosfatasas y tripsina que son parte de los componentes humorales de este mecanismo de defensa. En estos tejidos se encuentran además células inmunocompetentes como son los leucocitos y las células plasmáticas intraepiteliales (Magnadóttir, 2006).

2.4.2.2 Componentes humorales

Entre los factores humorales se encuentran las sustancias solubles presentes en los fluidos internos del pez, y las moléculas expresadas como receptores en la superficie de las células del sistema inmune. Según su actividad o los patrones moleculares que reconocen, los factores humorales inespecíficos pueden clasificarse en diferentes grupos. Entre ellos se encuentran los inhibidores del crecimiento, que interfieren en el metabolismo bacteriano (Stafford y Belosevic, 2003); los inhibidores de proteasas, que restringen la capacidad de invasión y crecimiento bacteriano (Ellis, 1999) y las lectinas (aglutininas y precipitinas) que favorecen la opsonización, la fagocitosis y la activación del complemento (Endo *et al.*, 2006). Además de estos se encuentran los péptidos antimicrobianos con propiedades bactericidas frente a diferentes patógenos (Silphaduang

et al., 2006), las enzimas líticas o lisinas que se encargan de la lisis bacteriana (Alexander e Ingram, 1992) y los “anticuerpos naturales” que se producen en ausencia de reorganizaciones génicas y sin aparente estimulación específica de antígeno (Magnadottir, 2006).

De todos estos factores humorales el más estudiado es el complemento compuesto por una serie de proteínas séricas (al igual que en mamíferos) que tienen tres funciones defensivas primordiales: recubrir patógenos y partículas ajenas al cuerpo para facilitar su reconocimiento y destrucción por parte de las células fagocíticas (opsonización); iniciar las respuestas inflamatorias estimulando la contracción del músculo liso, la vasodilatación y la quimioatracción de leucocitos; y lisar patógenos mediante la perforación de sus membranas (Rubio-Godoy, 2010). El complemento se activa en los teleosteos por las vías conocidas en los mamíferos (alternativa, clásica y de las lectinas) y es considerado un proceso altamente conservado en la inmunología de los vertebrados (Rubio-Godoy, 2010).

2.4.2.3 Reconocimiento de lipopolisacárido en peces

Algunos componentes estructurales esenciales para la sobrevivencia de los microorganismos denominados genéricamente patrones moleculares asociados a patógenos (PMAP), así como la interacción de estos con el sistema inmune innato a través de los receptores de reconocimiento de patrón del sistema inmune (RRP), han comenzado a tenerse en cuenta en la búsqueda de mejores respuestas vacunales en peces (Iliev *et al.*, 2005). De estos receptores los más estudiados son los del sistema *Toll-like* los cuales reconocen principalmente LPS presentes en las bacterias (Akira *et al.*, 2006), que como ya se ha mencionado pueden ser usados como inmunoestimulantes o adyuvantes y antígenos vacunales (Magnadottir, 2005)..

2.4.2.4 Componentes celulares

El componente celular principal en la respuesta inmune innata lo constituyen los macrófagos, además de su función como presentadores primarios de antígenos en la respuesta inmune adquirida, son los principales fagocitos de los peces, secretan citoquinas proinflamatorias como la IL-1 (Blazer, 1991; Dalmo *et al.*, 1997), aparecen en los eventos tempranos de inflamación en diferentes enfermedades (Ewart *et al.*, 2007). Por otra parte, también existen leucocitos granulares en peces, denominados al igual que en mamíferos: neutrófilos, acidófilos y basófilos según sus características tintoriales, a pesar de que no aparecen siempre en las distintas especies y sus funciones biológicas no

son idénticas (Palic *et al.*, 2007). De otro lado, los eosinófilos de los peces denominados eosinófilos granulares homogéneos (EGH) o células granulares eosinofílicas (CGE) se encuentran asociadas al tejido conectivo especialmente en el tracto gastrointestinal y las branquias, se encuentran fácilmente en procesos inflamatorios, en los cuales liberan su contenido granular, por lo que se han comparado con los mastocitos de mamíferos (Ferguson, 2006).

La inmunidad celular no específica comprende tres mecanismos defensivos: la inflamación, la fagocitosis y la citotoxicidad no específica. La inflamación es una respuesta que involucra a granulocitos, monocitos/macrófagos y linfocitos, y sigue a la exposición a un desafío antigénico. El proceso de la fagocitosis en los teleósteos es muy similar al observado en los vertebrados superiores: incluye las etapas de reconocimiento, unión, incorporación, destrucción y digestión del antígeno.

Se han detectado células citotóxicas no específicas en la sangre periférica, el fluido peritoneal, el timo, el bazo y el riñón de los peces; y se ha demostrado que son citotóxicas en contra de una serie de líneas celulares normales y transformadas de origen tanto mamífero como teleósteo, así como contra células infectadas por virus y protozoarios parásitos (Rubio-Godoy, 2010).

2.4.3 Mecanismos inmunológicos adquiridos

2.4.3.1 Componentes humorales

La inmunidad humoral adquirida de los peces teleósteos está representada por los anticuerpos, que son glicoproteínas producidas por los linfocitos B. Las inmunoglobulinas de los teleósteos están limitadas principalmente a IgM que es un tetrámero de aproximadamente 800 kDa y un coeficiente de sedimentación de 17 S, y no se ha demostrado evidencia de diversidad de IgG en peces. Está compuesta por cuatro unidades monoméricas, dos cadenas pesadas (H) idénticas (70 kDa) y dos cadenas ligeras (L) idénticas (25 kDa) en la que se encuentran los dominios variables que interaccionan específicamente con el antígeno con el que se combinan. No obstante, existe una considerable heterogeneidad inter e intraespecífica, pudiendo encontrar distintos tipos de cadenas pesadas y ligeras (revisado y citado por Penagos *et al.*, 2009). La IgM de los peces generalmente carece de de cadena J, asociada en mamíferos a la polimerización de la misma.

En el caso de los peces solo un gen puede generar alrededor de seis isoformas estructurales y por lo tanto la diversidad puede ser un resultado de la organización estructural más que de la variabilidad genética. La relevancia funcional de esta diversidad estructural no es clara y existen considerables variaciones entre especies (Vandenger, 2004). Se las encuentra en la mayoría de los fluidos tisulares, en el plasma, la linfa y el mucus epitelial (Stoskopf, 1993).

Se han encontrado diferencias funcionales entre inmunoglobulinas de secreciones mucosas y las del suero, que son otro ejemplo de la heterogeneidad intraespecífica. Las diferencias fisico-químicas entre ellas son mínimas, pero han podido diferenciarse por anticuerpos monoclonales (Rombout, *et al.*, 1993) pero no se ha detectado en peces una clase de inmunoglobulina secretoria, análoga al isotipo IgA de los mamíferos (Magnattottir, 2005).

Básicamente la producción de anticuerpos se realiza siguiendo el mismo proceso que en mamíferos. Las células presentadoras de antígeno (principalmente macrófagos), captan el antígeno y lo procesan para presentarlo en el contexto del complejo mayor de histocompatibilidad (CMH) tipo II, a los receptores de antígeno de los linfocitos T, y de esta forma se activan. Los linfocitos B se activan por la unión del antígeno entero a los receptores de superficie que son inmunoglobulinas. Así, en las células B inactivadas, se desencadena la proliferación y secreción de anticuerpos, para lo que es necesaria en ocasiones la asociación con las células T activadas. La colaboración entre estos tipos celulares requiere gran proximidad entre ellos, por lo que las interacciones se producen en órganos linfoides como bazo y riñón (Vallejo *et al.*, 1992).

2.4.3.2 Memoria inmunológica

El hecho de que se pueda inmunizar o vacunar a los peces frente a varios patógenos, pone de manifiesto la presencia de un fenómeno de memoria inmunológica. Este proceso permite al organismo producir una respuesta inmune mucho más rápida y eficaz en el segundo o posteriores encuentros con el antígeno. En general la respuesta secundaria es más débil en peces que en mamíferos, pero los títulos de anticuerpos en esta segunda respuesta alcanzan niveles entre 2 y 8 veces superiores a los de la primera, y la cantidad de antígeno necesaria para desencadenarla es menor (Arkoosh y Kaattari, 1991).

La afinidad del anticuerpo por el antígeno en la respuesta secundaria es igual que en la primaria, por tanto en el caso de los peces no hay un aumento de la capacidad de los

linfocitos B para producir anticuerpos de alta afinidad (IgG), tal y como sucede en mamíferos. Algunos estudios demuestran que el desarrollo de la memoria se debe a un aumento en el número de células B precursoras, y no a una mayor capacidad de proliferación de estas células, como sucede en mamíferos (Arkoosh y Kaattari, 1991), mientras que otros han descrito la gran capacidad de expansión y proliferación clonal de las células B (van Ginkel *et al.*, 1992).

Según su actividad biológica, los anticuerpos pueden clasificarse en: anticuerpos aglutinantes, producidos frente a antígenos particulados en los que induce la formación de agregados, probablemente menos tóxicos y más fáciles de fagocitar; anticuerpos precipitantes, que precipitan antígenos de naturaleza soluble, y son importantes como antitoxinas; y anticuerpos neutralizantes, que neutralizan la acción del agente patógeno, mediante su unión a la membrana (Ruiz *et al.*, 2003). La primera aparición de IgM en los linfocitos varía considerablemente entre las especies de peces. Se ha demostrado la transferencia materna de anticuerpos a huevos, embriones y alevines en varias especies de peces (Magnadóttir, 2005).

La naturaleza del antígeno tiene gran influencia en la respuesta de los anticuerpos y es de fundamental importancia en la investigación inmunológica y también en la producción de vacunas. Los antígenos más efectivos son aquéllos de alto peso molecular, con una estabilidad estructural y que sean moléculas químicamente complejas y no inertes. En general, los complejos virales y bacterianos y los antígenos tipo eritrocito parecen ser inmunógenos efectivos en la mayoría de las especies de teleósteos, mientras que las proteínas solubles son poco inmunogénicas (Tizard 1992). Esto justifica nuevamente la utilización de bacterinas como vacunas en los peces óseos.

2.4.3.3 Componentes celulares

En los peces óseos se han caracterizado fenómenos que sugieren la presencia de células T citotóxicas: rechazo a alotrasplantes, reacción injerto contra huésped, hipersensibilidad retardada y citotoxicidad mediada por células en contra de células alogénicas. Considerando que las respuestas mediadas por células están restringidas al reconocimiento de las moléculas del MHC clase I, es probable que jueguen un papel en el reconocimiento de los antígenos virales presentados por las células infectadas (Nakanishi, 1999).

Las interacciones entre las células inmunitarias no sólo están mediadas por contacto célula a célula, sino también a través de la secreción de factores solubles (citocinas). Las células T colaboradoras (Th1 y Th2) de los peces secretan varias citocinas análogas a las de los mamíferos en dependencia del tipo de respuesta inmunitaria. En general, las citocinas de tipo Th1 (interleucina 2 (IL- 2), interferón gamma (IFN- γ) y los factores de necrosis tumoral alfa (TNF- α) y beta (TNF- β) inducen defensas en contra de patógenos intracelulares al activar a los macrófagos, aumentando la presentación de antígenos e induciendo la diferenciación de células T. En contraste, las citocinas de tipo Th2 (IL-4, IL-5, IL-10 e IL-13) activan a las células B y de esta manera coordinan la inmunidad en contra de patógenos extracelulares mediante la producción de anticuerpos (Rubio-Godoy, 2010).

2.4.4 Factores que afectan la respuesta inmune

La respuesta inmune se ve afectada por numerosos factores que dependen del hospedero, del medio o del patógeno *per se*. Entre los factores que dependen del hospedero se presentan diferencias en la respuesta inmune humoral y celular que son propias de la especie y que pueden variar entre individuos de una misma población (Ruiz *et al.*, 2003). La edad es tal vez uno de los factores más importantes pero altamente variable dentro de las especies (Klesius *et al.*, 2004).

Otro de los factores intrínsecos determinantes en la respuesta inmunológica es el estrés causado por hipoxia, altas densidades, manipulación, temperatura y tóxicos (contaminantes acuáticos) (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, estos 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 el sistema inmunológico de los peces provocado principalmente por las deficiencias de las vitaminas C y E (Blazer, 1991) y los imbalances de ácidos grasos (Ringo *et al.*, 2001).

En lo que concierne a los factores extrínsecos, la temperatura es trascendental en los peces cuando debe responder a un agente patógeno (Ferguson, 2006). La temperatura del agua afecta 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 reporta la disminución de la

respuesta mediada por linfocitos la alteración de la fagocitosis y de la citotoxicidad (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). Algunos metales pesados e insecticidas, así como amoníaco, los nitritos y el cianuro tienen efecto sobre componentes celulares y humorales del sistema inmune y son conocidos estresores de los peces (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 (revisado y citado por Penagos *et al.*, 2009).

3. Materiales y Métodos

3.1 Elaboración de bacterina formolizada de *A. hydrophila*

Para la preparación de la bacterina se usó la cepa control de *A. hydrophila* 9911, procedente del Princess Margaret Hospital de Australia, obtenida a través del laboratorio de Microbiología del Instituto de Medicina Tropical “Pedro Kourí” (IPK) de Ciudad de La Habana, Cuba.

El procedimiento utilizado para la elaboración de la bacterina fue modificado por el protocolo descrito por Osman *et al.*, 2009. La cepa de *A. hydrophila* se inoculó en medio Caldo Soya Tripticasa (CST) y se incubó durante 24 h a 28 °C. Luego de transcurrido este período se estimó la concentración final de bacterias mediante conteo directo en cámara de Newbawer a través de un microscopio óptico. El cultivo bacteriano se inactivó mediante la adición de formalina al medio de cultivo hasta una concentración de 3% durante 24 h a 30 °C. Las células inactivadas se centrifugaron a 4 000 g durante 10 min, se eliminó el sobrenadante y el precipitado se resuspendió en solución salina tamponada con fosfato (SSTF) 0,1M pH 7,4, esta operación se repitió tres veces.

La inactivación de la bacterina se comprobó inoculando 0.1 mL de bacterina y la cepa de *A. hydrophila* como control positivo en medio de cultivo Agar Soya Tripticasa (AST) a 30 °C durante 72 h. La bacterina fue conservada a -20 °C.

3.2 Vacunación oral de *C. gariepinus* con bacterina de *A. hydrophila* administrada con AFCo3a o AFCo3b

3.2.1 Animales y condiciones experimentales

El esquema de vacunación se realizó en la Unidad Empresarial de Base INTENPEZ perteneciente a la Empresa Pesquera de Villa Clara (PESCAVILLA) que se encuentra en el km 16 ½ de la carretera a Camajuaní, municipio de Santa Clara, provincia Villa Clara, Cuba. La ceba se realizó en estanques de tierra de una hectárea para el cultivo intensivo de *C. gariepinus* y la alimentación es a base de pienso y subproductos de la industria cárnica y pesquera el cual es procesado según las normas del sistema (PAC, 2012).

Se utilizaron 75 animales de la especie *C. gariepinus* por grupos de tratamiento a los cuales se les determinó el peso al inicio y final del experimento. Los animales fueron

examinados externamente para verificar su estado de salud y ubicados al azar en cajas de plástico.

Los peces se sometieron a siete días de aclimatación antes de comenzar la inmunización. Durante el período de inmunización los animales se mantuvieron a fotoperíodo natural, con recambio de agua diario del 100% y se alimentaron dos veces al día con pienso comercial para clarias de 25% de proteínas a una tasa del 3,4% del peso corporal en correspondencia con el flujo tecnológico del centro para animales de esa talla. Se controló diariamente la temperatura, el pH del agua y la mortalidad de los peces.

3.2.2 Esquema de inmunización de *C. gariepinus* con bacterina de *A. hydrophila*

Para la aplicación de los diferentes tratamientos se formaron cuatro grupos experimentales:

Grupo A (control negativo) no inmunizado

Grupo B inmunizado oralmente con bacterina de *A. hydrophila* (BAh) (10^8 células/por animal)

Grupo C inmunizado oralmente con bacterina de *A. hydrophila* (10^8 células/por animal) más adyuvante AFCo3a (Instituto Finlay, Cuba) 10 μ g LPS/por animal

Grupo D inmunizado oralmente con bacterina de *A. hydrophila* (10^8 células/por animal) más adyuvante AFCo3b (Instituto Finlay, Cuba) 10 μ g de LPS/por animal.



Figura 1. Cajas de plástico donde fueron distribuidos los peces en los diferentes grupos experimentales (A) y proceso de administración oral de los tratamientos junto con la comida (B).

El esquema de inmunización tuvo una duración de 28 días. Los grupos B, C, D fueron inmunizados a partir de día uno, durante cinco días, junto con la primera comida del día y se repitió una dosis el día 17 (Fig. 2).

Se realizó la extracción de sangre a 15 animales de cada grupo de experimentación, los días 0, 7, 14, 21 y 28, por el método de punción a la vena caudal del pez. La sangre extraída se mantuvo a 37 °C hasta la formación del coágulo, se centrifugó a 3500 g durante 10 min a 4 °C y se extrajo el sobrenadante este se conservó en alícuotas a -20 °C.

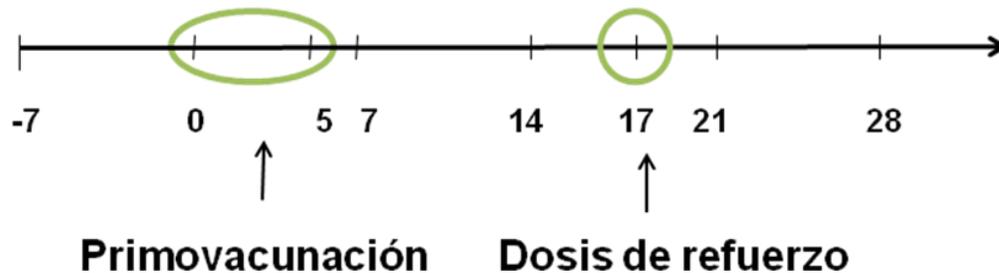


Figura 2. Esquema utilizado para la vacunación oral de *C. gariepinus* con bacterina de *A. hydrophila* y adyuvantes AFCo3a y AFCo3b

3.2.3 Determinación de la producción de IgM sérica de *C. gariepinus* mediante ensayos inmunoenzimáticos

3.2.3.1 Titulación de anticuerpos IgM específicos anti bacterina de *A. hydrophila*

Preparación del antígeno de recubrimiento

Las células de la bacterina de *A. hydrophila* resuspendidas en SSTF 0,1 M y pH 7,2 fueron sonicadas en baño de sonicación con hielo (Retomed; Cuba) 10 veces por 30 segundos a intervalos de un minuto. Posteriormente se centrifugó a 3000 g durante 10 min. Se decantó el sobrenadante y se almacenó a -20 °C.

Ensayo Inmunoenzimático para la determinación de anticuerpos (ELISA)

Para la titulación de anticuerpos IgM específicos anti-bacterina de *A. hydrophila* se empleó un ELISA indirecto a partir de modificaciones del protocolo realizado por Shoemaker *et al.*, 2006. Las placas de microtitulación (Nunc, Maxisorp) fueron recubiertas con 100 µL del antígeno de recubrimiento a 20 µg/mL en solución tampón de recubrimiento (Na₃CO₃ 11 mM, NaHCO₃ 35 mM (pH 9,6) y se incubaron durante toda la

noche a 4 °C. Posteriormente, se lavaron tres veces con SSTF 0,1M pH 7,2. Los sitios no específicos de unión fueron bloqueados con 150 µL/pocillo de leche descremada al 3% (p/v) diluida en SSTF 0,1M pH 7,2 y se incubaron a temperatura ambiente en cámara húmeda durante una hora, seguidamente las placas se lavaron tres veces con solución de lavado (SSTF 0,1M pH 7,2 con 0.05% de Tween-20 v/v).

Se colocaron 100 µL de las muestras de suero obtenidas mediante el procedimiento descrito en el acápite **3.2.2** en el primer pocillo, a partir de la cual se realizaron diluciones seriales dobles (1:10 a 1:2 560) en solución de lavado con albúmina sérica bovina (ASB) al 1% p/v y se incubaron una hora a 37 °C. Las muestras fueron colocadas por duplicado.

Seguidamente, las placas se lavaron tres veces con solución de lavado y se colocó 100 µL de antisuero policlonal de conejo anti-IgM de *Clarias gariepinus* (Instituto Finlay, Cuba), diluido 1:50 000 en cada pocillo. Las placas fueron mantenidas una hora a 37 °C seguido de tres lavados de la misma forma descrita.

Se agregó 100 µL de anticuerpo IgG anti-conejo conjugado con peroxidasa de rábano (SIGMA, EUA) diluido 1:5 000 en SSTF- Tween-20 0.05%- ASB 1% en cada pocillo y se incubó una h a 37 °C. Las placas fueron nuevamente lavadas tres veces con SSTF- Tween-20 0.05%.

Posteriormente, se adicionaron 100 µL/pocillo de una solución de H₂O₂ 0,01% (v/v) y del cromógeno ortho-fenilendiamina 0,6 mg/mL en solución tampón sustrato (Na₂HPO₄ 52 mM y ácido cítrico 25 mM (pH 5,6) y se incubaron en la oscuridad durante 30 min. La reacción se detuvo mediante la adición de 50 µL de una solución de H₂SO₄ 2 M. La absorbancia se leyó a 492 nm en un lector de microplacas (Titertek, Multiskan Plus).

El título se definió como la menor concentración de la muestra a la cual se detectó absorbancia a 492 nm.

3.2.3.2 Determinación de la producción de anticuerpos IgM específicos anti-bacterina de *A. hydrophila* mediante ensayos inmunoenzimáticos

Para la determinación de la producción de anticuerpos IgM específicos anti-bacterina de *A. hydrophila* se empleó el procedimiento descrito en el acápite **3.2.3.1**.

Como muestra se empleó suero obtenido mediante el procedimiento descrito en el acápite **3.2.2** diluido 1:100 en solución de lavado con ASB al 1% p/v y una dilución 1:100 de suero

de sangre extraída el día 0 incubado durante una hora a 37 °C con bacterina de *A. hydrophila* en una relación 1:2.

La producción de anticuerpos se consideró en función de la absorbancia a 492 nm (Titertek, Multiskan Plus).

3.2.3.3 Determinación de la producción de anticuerpos IgM totales en las muestras de suero de *C. gariepinus* inmunizados con bacterina de *A. hydrophila*

Para la determinación de la producción de anticuerpos IgM totales en las muestras de suero de *C. gariepinus* inmunizados con bacterina de *A. hydrophila* se realizó un ELISA indirecto.

Primeramente las placas de microtitulación (Nunc, Maxisorp) se recubrieron con 100 µL de las muestras de suero obtenidas mediante el procedimiento descrito en el acápite **3.2.2** diluidas 1:100 en solución tampón de recubrimiento (Na₃CO₃ 11 mM, NaHCO₃ 35 mM (pH 9,6) y se incubaron durante toda la noche a 4 °C. El resto de la marcha experimental fue realizada de la forma descrita en el acápite **3.2.3.1**.

La producción de anticuerpos se consideró en función de la absorbancia medida a 492 nm (Titertek, Multiskan Plus).

3.3 Procesamiento estadístico

Los datos fueron analizados con el paquete estadístico PASW Statistics versión 18,0, verificándose los supuestos de normalidad mediante Shapiro Wilk. Se realizaron análisis de varianza para dos variables no relacionadas, con la prueba U de Mann Whitney, y para varias muestras independientes, se utilizó la prueba Kruskal Wallis. Los análisis de varianza para dos variables relacionadas se realizaron empleando la prueba de Wilcoxon y para varias muestras relacionadas la prueba de Friedman. En todos los casos las diferencias se consideraron significativas para un valor de $p < 0,05$.

4. Resultados

4.1 Bacterina formolizada de *A. hydrophila*

La bacterina de *A. hydrophila* inactivada se obtuvo a una concentración de 1×10^9 células/mL. Al comprobar la inactivación del cultivo bacteriano en el medio de cultivo AST no se observó crecimiento en las placas inoculadas con bacterina en comparación con las placas inoculadas con el cultivo de bacterias vivas (Fig. 3), de esta forma se comprobó la esterilidad de la preparación bacteriana y la seguridad de la misma para su uso en peces.

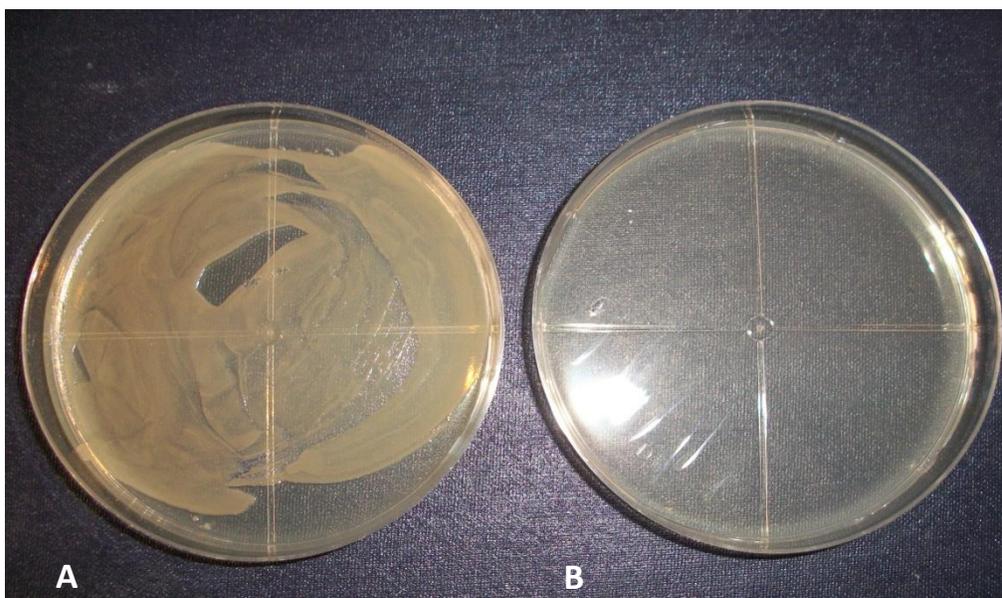


Figura 3. Cultivo de *A. hydrophila* sin inactivar (A) e inactivado en medio de cultivo Agar soya tripticasa después de incubación a 30°C durante 72h.

4.2 Vacunación oral de *Clarias gariepinus* con bacterina de *A. hydrophila* administrada con AFCo3a o AFCo3b

4.2.1 Animales y condiciones experimentales

En el peso de los animales tomado al inicio y al final del experimento no se observaron diferencias significativas en ningún grupo de tratamiento evaluado (Fig. 4), sin embargo se muestra un crecimiento significativo entre los valores iniciales con los valores finales recogidos por los que los animales ganaron en peso durante el experimento.

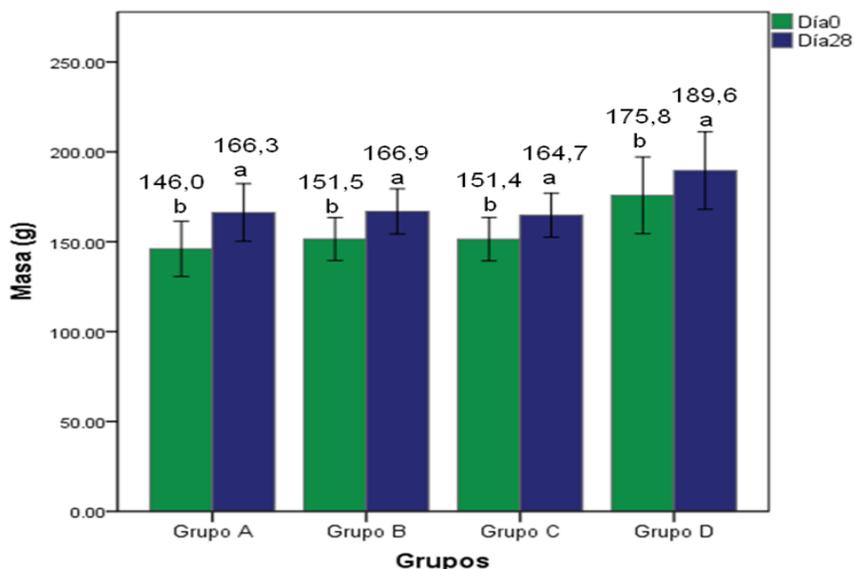


Figura 4. Masa promedio de *C. gariepinus* al inicio y al final de la inmunización. Grupo A (no inmunizado), Grupo B (inmunizado con bacterina de *A. hydrophila*), Grupo C (inmunizado con bacterina de *A. hydrophila* aplicada con AFCo3a) y Grupo D (inmunizado con bacterina de *A. hydrophila* aplicada con AFACo3b). Las barras con letras minúsculas diferentes difieren significativamente dentro del mismo grupo para $p < 0,05$ (Kruskal-Wallis/ U de Mann Whitney).

Paralelamente a esto se registraron los valores de ph y temperatura del agua para controlar el estado óptimo del medio de los animales para la aplicación de la vacuna. Estos parámetros se mantuvieron sin variaciones significativas durante el período de tratamiento de los animales, con valores promedio de 7,8 y de 24,3 °C respectivamente.

El registro de mortalidad de los animales mostró que las muertes ocurrieron durante el período de aclimatación (Fig. 5). Durante el tratamiento solo se registró un deceso el cuarto día después del inicio de la inmunización.

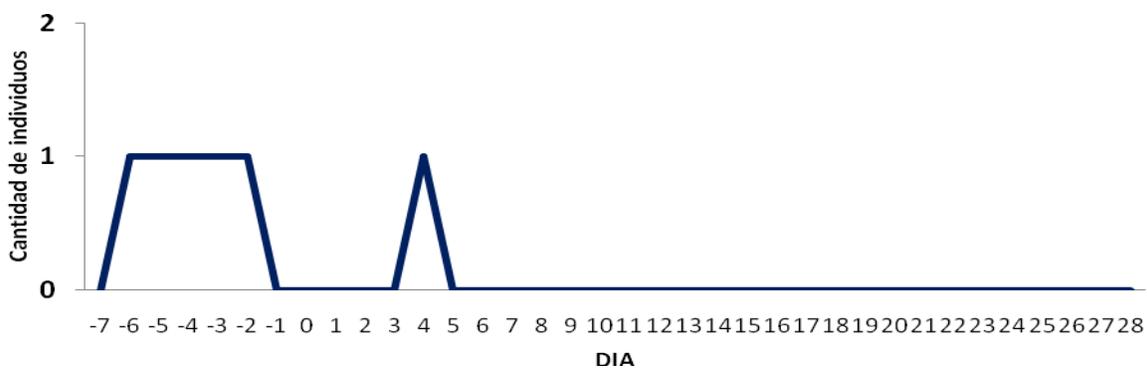


Figura 5. Registro de mortalidad de individuos de *C. gariepinus* durante el proceso de vacunación oral con bacterina de *A. hydrophila* administrada con AFCo3a y AFCo3b.

4.2.2 Producción de IgM sérica de *C. gariepinus* ante vacunación oral con bacterina de *A. hydrophila* administrada con AFCo3a y AFACo3b

Para determinar la efectividad de la vacunación oral con bacterina de *A. hydrophila* administrada con AFCo3a y AFCo3b se realizaron ensayos inmunoenzimáticos (ELISA) indirectos.

4.2.2.1 Título de anticuerpos IgM específicos anti-bacterina de *A. hydrophila*

El título de anticuerpos IgM específicos anti-bacterina de *A. hydrophila* de las muestras analizadas, en todos los días y en cada grupo de tratamiento dio valores de 1:1280 por lo que no se encontraron diferencias entre las muestras tomadas en diferentes días, ni en cada grupo de tratamiento en el transcurso del tiempo de experimentación.

4.2.2.2 Producción de anticuerpos IgM específicos anti-bacterina de *A. hydrophila*

A través de los ensayos inmunoenzimáticos, se detectaron anticuerpos IgM específicos anti-bacterina de *A. hydrophila* el día 0 de inmunización, aunque no existieron diferencias significativas en la producción de estos entre ninguno de los grupos de tratamiento evaluados (Fig 6).

Durante las extracciones realizadas después de la primera inmunización, el grupo A (control negativo), mostró valores de IgM significativamente menores con respecto a los demás grupos en iguales días de extracción (Fig 6).

Estos resultados evidencian que hubo diferencias en la producción de anticuerpos específicos según el tratamiento empleado, obteniéndose los mejores resultados cuando se empleó el adyuvante AFCo3b junto con la bacterina de *A. hydrophila* (grupo D), seguido de en orden descendente por el grupo tratado con bacterina junto a AFCo3a (Grupo C) y el grupo B, tratado con bacterina de *A. hydrophila* solamente (Fig. 6).

En los animales inmunizados con bacterina sin adyuvante (grupo B) hubo un incremento significativo en la producción de anticuerpos en el transcurso del esquema de inmunización con respecto al día 0, obteniéndose los mayores valores hasta el día 21 (Fig. 6).

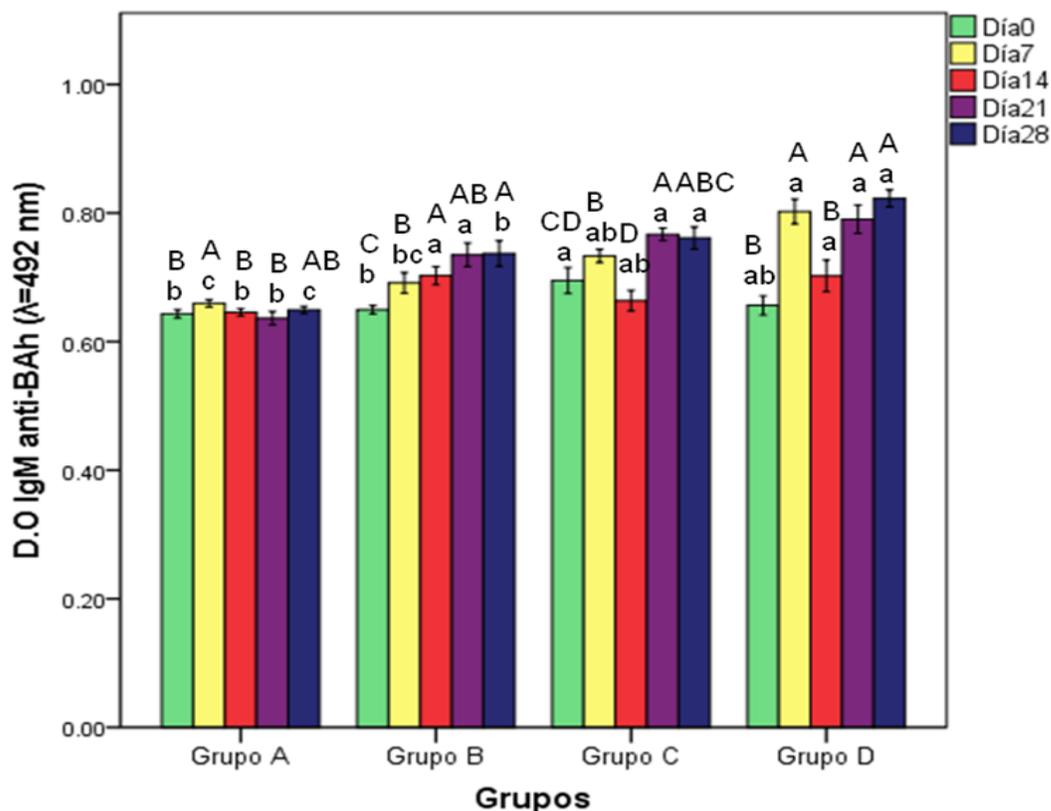


Figura 6. Producción de anticuerpos IgM específicos de *C. gariepinus* anti-bacterina de *A. hydrophila* en cada grupo de tratamiento a los 0, 7, 14, 21 y 28 días. Grupo A (no inmunizado), Grupo B (inmunizado con bacterina de *A. hydrophila*), Grupo C (inmunizado con bacterina de *A. hydrophila* aplicada con AFCo3a) y Grupo D (inmunizado con bacterina de *A. hydrophila* aplicada con AFCo3b). Barras con letras mayúsculas diferentes difieren significativamente en el grupo de tratamiento para los diferentes días de muestreo para $p < 0,05$ (Wilcoxon / Friedman). Barras con letras minúsculas diferentes, sus medias difieren significativamente entre los grupos de tratamiento, para el mismo día de muestreo para $p < 0,05$ (Kruskal Wallis/ U de Mann Whitney).

En los animales del tratados con AFCo3a y bacterina de *A. hydrophila* (grupo C) hubo un incremento significativo en la producción de anticuerpos en el transcurso del esquema de inmunización con respecto al día 0, con excepción del día 14, obteniéndose los mayores valores los días 21 y 28 entre los cuales no se apreció diferencias estadísticas (Fig. 6).

El análisis de las muestras tomadas del grupo tratado con bacterina y AFCo3b (grupo D) mostró un incremento significativo en la producción de IgM en el transcurso del esquema de inmunización con respecto al día 0, con excepción del día 14, obteniéndose los mayores valores los días 21 y 28 alcanzándose mayores valores el día 28, pero sin diferencias significativas con respecto al día 21 (Fig. 6).

Estos resultados indican que hubo diferencias significativas en la producción de anticuerpos durante el tiempo de inmunización, mostrándose los mejores resultados a los días 21 y 28.

Al evaluar las muestras adsorbidas se observó que los valores de absorbancia a 492 nm fueron menores en comparación con las muestras de suero sin adsorber (Fig. 7).

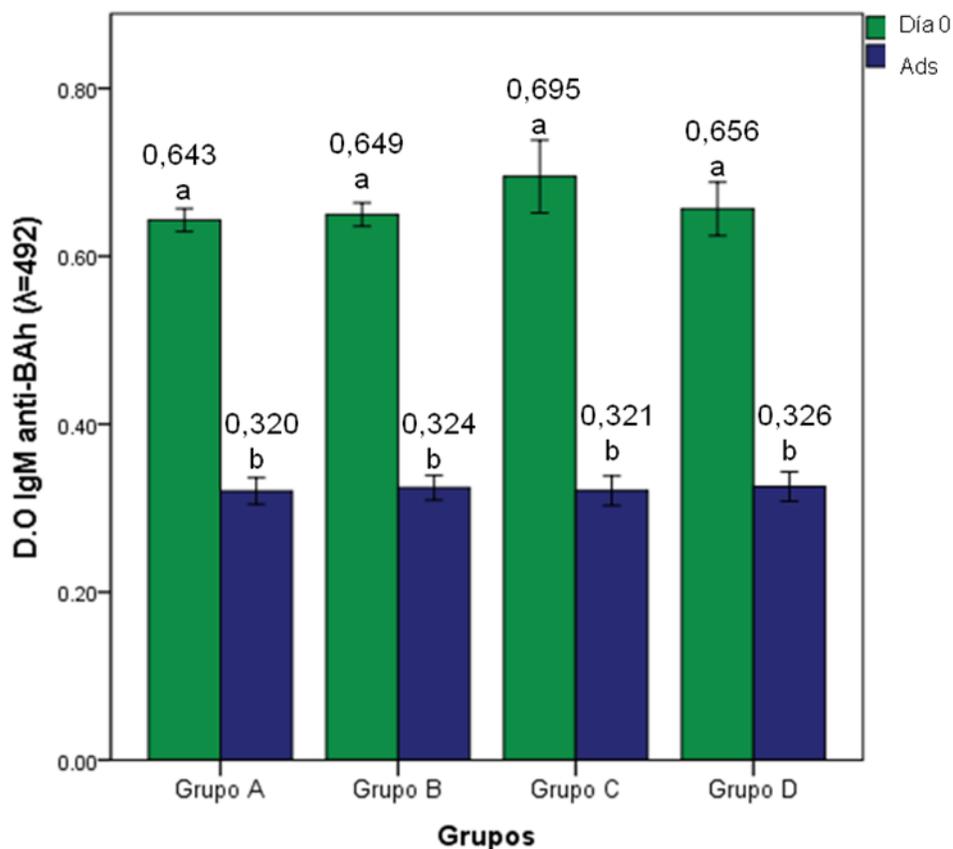


Figura 7. Producción de anticuerpos IgM específicos de *C. gariepinus* en los diferentes grupos anti-bacterina de *A. hydrophila* en suero del día 0 adsorbido con bacterina. Grupo A (no inmunizado), Grupo B (inmunizado con bacterina de *A. hydrophila*), Grupo C (inmunizado con bacterina de *A. hydrophila* aplicada con AFCo3a) y Grupo D (inmunizado con bacterina de *A. hydrophila* aplicada con AFCo3b). Los datos de muestras relacionadas fueron analizados con las pruebas de Kruskal-Wallis/ U de Mann Whitney. Las barras con letras minúsculas diferentes difieren significativamente dentro del mismo grupo para $p < 0,05$.

4.2.2.3 Producción de anticuerpos IgM totales en las muestras de suero de *C. gariepinus* inmunizados con bacterina de *A. hydrophila*

No existieron diferencias significativas en la producción de anticuerpos totales a ningún tiempo de toma de muestra, ni entre los grupos de tratamiento evaluados (Fig. 8).

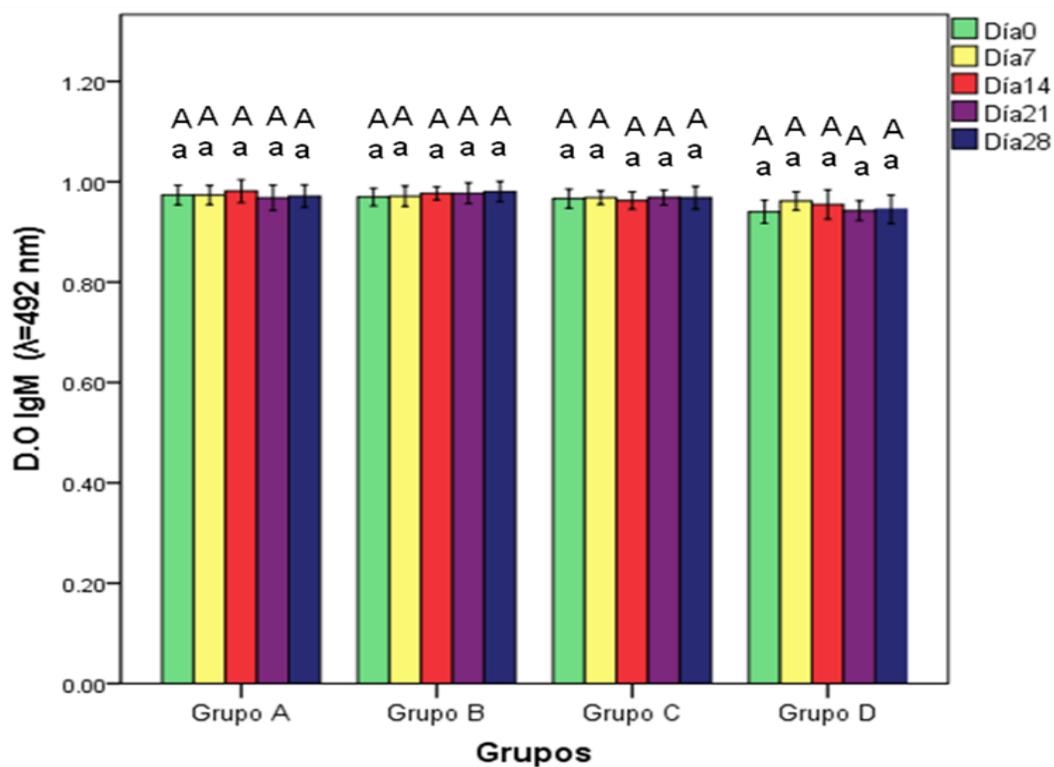


Figura 8. Producción de anticuerpos IgM totales de *C. gariepinus* en los diferentes. Grupo A (no inmunizado), Grupo B (inmunizado con bacterina de *A. hydrophila*), Grupo C (inmunizado con bacterina de *A. hydrophila* aplicada con AFCo3a) y Grupo D (inmunizado con bacterina de *A. hydrophila* aplicada con AFCo3b). Barras con letras mayúsculas diferentes difieren significativamente en el grupo de tratamiento para los diferentes días de muestreo para $p < 0,05$ (Wilcoxon / Friedman). Barras con letras minúsculas diferentes, sus medias difieren significativamente entre los grupos de tratamiento, para el mismo día de muestreo para $p < 0,05$ (Kruskal Wallis/ U de Mann Whitney).

5. Discusión

C. garipepinus es un pez que se somete actualmente al cultivo intensivo a nivel mundial, lo cual puede traer riesgos sanitarios como la aparición de enfermedades infecciosas. Una de las estrategias más prometedoras en la profilaxis de estas enfermedades es la vacunación oral con bacterinas u otras formulaciones vacunales, unidas o no a adyuvantes que permitan la inmunopotenciación de la respuesta de los peces.

5.1 Bacterina formolizada de *A. hydrophila*

Las bacterinas o vacunas de patógenos inactivados son formulaciones vacunales de fácil elaboración y que su producción se puede llevar a gran escala. La inactivación normalmente se realiza con calor o agentes químicos como el formaldehído y son las vacunas más frecuentes usadas comercialmente en la acuicultura actual (Penagos *et al.*, 2009).

En este trabajo la inoculación de *A. hydrophila* en medio de cultivo caldo soya tripticasa crecido a 28 °C durante 24 h mostró buen crecimiento bacteriano, lo cual es comparable con resultados similares de otros autores que usaron esta preparación para la vacunación en diferentes especies peces (Osman *et al.*, 2009, Peyghan *et al.*, 2010, Hosseini *et al.*, 2011), mostrando buenos resultados. Se comprueba, de esta forma, que las condiciones de cultivo utilizadas en este trabajo responden a los métodos estándares establecidos para este procedimiento.

La inactivación realizada con formaldehido en este trabajo fue efectiva bajo las condiciones establecidas, lo que se comprobó con la prueba de esterilidad de la formulación vacunal (Fig 3). Verificar la esterilidad de la bacterina hace de la misma un producto seguro tanto para los peces como para los manipuladores y los futuros consumidores, siendo este un paso muy importante del control de la calidad de las vacunas de patógenos inactivados. Las bacterinas como formulaciones vacunales son más seguras que otras vacunas como las de patógenos atenuados, por lo que pueden constituir una estrategia viable en la producción a gran escala para la acuicultura, una vez comparadas con las vacunas de subunidades y las vacunas ADN (Toranzo, 2009).

5.2 Vacunación oral de *Clarias gariepinus* con bacterina de *A. hydrophila* administrada con AFCo3a o AFCo3b.

5.2.1 Animales y condiciones experimentales

El estrés y la manipulación excesiva en los cultivos intensivos de peces son una de las causas principales de la aparición de grandes mortalidad en la acuicultura. Por esta razón controlar las variables ambientales es un factor determinante en la profilaxis y en el tratamiento de enfermedades infecciosas. Factores como el pH y la temperatura pueden afectar el desarrollo de cualquier protocolo de vacunación, interfiriendo en los resultados (Negrete *et al.*, 2002).

Con el fin de determinar algunos efectos de los tratamientos aplicados se registró durante el experimento la mortalidad, el pH, la temperatura y la masa de los peces tratados.

Para determinar el ganancia en masa de los animales durante el experimento se registró el peso de los mismos antes y después de finalizado los tratamientos, se observó que los mismos aparentemente no influyeron en la ganancia o la pérdida de peso de los peces durante el proceso de vacunación (Fig 4). Esto reafirma el planteamiento de otros autores de que la vacunación oral es el método menos estresante para los peces que la inyección intraperitoneal y la inmersión, puesto que les permite adquirir normalmente su dieta y ganar en peso sin dificultad, lo cual es el fin de la producción intensiva de animales para la alimentación. La inmunización junto con el alimento, tiene como ventaja que permite inmunizar grandes cantidades de animales de diversas tallas por lo que posee un amplio rango de uso en diferentes etapas del cultivo de peces (Rubio-Godoy, 2010).

Los valores de pH y temperatura del agua durante el transcurso del experimento se encontraron dentro de los requerimientos ambientales para la especie. A pesar de su amplio rango de tolerancia la claria puede ser dañada por la mala calidad del agua, condición además que puede ocasionar la aparición de un brote de las enfermedades causadas por bacterias como *A. hydrophila* por inmunosupresión y deterioro de las barreras físicas del animal (Penagos *et al.*, 2009).

El registro de la mortalidad evidenció durante el tratamiento que la estrategia de vacunación oral y la formulación vacunal aplicada, tienen muchas ventajas prácticas porque al disminuir la manipulación a los animales se evitan daños en los individuos tratados. Las mortalidades registradas durante la aclimatación se consideran normales

por la manipulación de los animales durante su traslado hasta las cajas de experimentación.

En resumen, el registro de la mortalidad y el peso de los peces antes, durante y después del experimento reafirman el planteamiento de muchos autores de que la vía oral es el método más adecuado para acuicultura (citado y revisado por Penagos *et al.*, 2009).

5.2.2 Producción de IgM sérica de *C. gariepinus* ante vacunación oral con bacterina de *A. hydrophila* administrada con AFCo3a y AFCo3b

5.2.2.1 Título de anticuerpos IgM específicos anti-bacterina de *A. hydrophila*

La titulación de anticuerpos mediante ELISA es un método semicuantitativo que depende de las diluciones que hayan sido realizadas para su determinación. Es un método de fácil realización, pero posee como desventaja que las diluciones intermedias entre las establecidas no pueden ser evaluadas. Es mucho más sensible que la aglutinación y es un método de mucha utilidad en el diagnóstico rápido de enfermedades (Sukenda y Wakabayashi, 2002). En este trabajo se constata que esta técnica da una noción de la cantidad de anticuerpos en las muestras pero no es concluyente ya que a pesar de que se obtuvieron valores iguales de títulos, los grupos mostraron (Fig. 6) diferencias significativas entre sí mediante el Elisa indirecto utilizando una sola dilución de suero.

Títulos de anticuerpos menores que los obtenidos en este trabajo (1:1280), con métodos de determinación similares se han detectado en alevines de este mismo pez (Vervarcke *et al.*, 2004) y otros peces como *C. batrachus* (Nayak *et al.*, 2004) y el salmón del atlántico (Allnutt *et al.*, 2007) ante la vacunación oral. En todos los casos anteriores los títulos de anticuerpos para el día 0 fueron menores que los mostrados en este trabajo. Estos resultados no son totalmente comparables por la diferencia de tallas entre estos experimentos y el realizado en este trabajo, pero indican que los alevines poseen menores títulos de anticuerpos y que al ser la etapa más susceptible de los peces, las vacunas experimentales deben ser evaluadas también durante el alevinaje con el fin de que la protección sea duradera durante todo el ciclo de producción (Bucarey y Harel 2011).

5.2.2.2 Producción de anticuerpos IgM específicos anti-bacterina de *A. hydrophila*

Los anticuerpos son uno de los componentes humorales más importantes de la respuesta inmune de los peces. Sin embargo muchos autores consideran que este indicador es menos relevante en los peces que en otros vertebrados para medir el estatus de salud. No siempre los altos títulos de anticuerpos son indicadores de la eficiencia de sus funciones inmunológicas, por lo que su función no es aún clara en los peces (Tort *et al.*, 2003). A pesar de esto muchas investigaciones siguen utilizando la producción de anticuerpos para el estudio de la inmunogenicidad y efectividad de diferentes formulaciones vacunales, por lo que el uso en este trabajo de ensayos ELISA para su detección durante el experimento, sólo reafirma que es una vía adecuada para el estudio exploratorio de la respuesta inmune ante un tratamiento experimental (Prasad y Areechon, 2010, Tobar *et al.*, 2011, Hossain *et al.*, 2011).

Con el fin de determinar la producción de IgM inducida por los diferentes tratamientos se realizaron ensayos ELISA indirectos anti-bacterina de *A. hydrophila*. Los anticuerpos específicos anti- bacterina de *A. hydrophila* detectados al inicio del experimento (día 0) mostraron valores sin diferencias estadísticas entre sí (Fig 6), lo que indica que los animales ya estaban expuestos anteriormente al patógeno. *A. hydrophila* es una bacteria que habita normalmente los cuerpos de agua dulce, por lo que los peces normalmente están expuestos a esta bacteria y es lógico que se desarrolle cierta resistencia de forma natural (González *et al.* 2004, Botero *et al.*, 2005). Este resultado indicó además que las diferencias detectadas posteriormente no estuvieron condicionadas por la producción de anticuerpos iniciales sino que fueron inducidas por un efecto realmente inmunoestimulante. Por otra parte el **grupo A** sin tratamiento (control negativo), como se esperaba, mantuvo los mismos niveles de anticuerpos durante todo el experimento sirviendo como control para la comparación con el resto de los grupos experimentales, ya que estos valores fueron significativamente más bajos (Fig. 6).

Por otra parte, el método de adsorción realizado reforzó la idea de que el día 0 existían anticuerpos contra la bacteria, sin embargo en este caso la adsorción con una dilución de 1:2 no resultó totalmente eficiente para eliminar los anticuerpos específicos anti-bacterina (Fig 7). Este resultado puede estar condicionado por la temperatura y el tiempo de incubación, además de la cantidad de bacterina con la que se enfrenta el suero de las muestras (Alfonso, Y. y Bencomo, A. 2001).

En todos los grupos de tratamiento los valores de IgM decayeron el día 14 (Fig 6) que estaba más alejado de los días de vacunación, por lo que se refuerza el planteamiento de que la vacunación oral habitualmente necesita de dosis de refuerzo para que sean efectivas inmunológicamente (Rubio-Godoy, 2010).

El **grupo B**, inmunizado solamente con bacterina de *A. hydrophila*, mostró valores de IgM significativamente menores en comparación con el grupo inmunizado con AFCo3a (**grupo C**) y AFCo3b (**grupo D**), durante todo el experimento (Fig 6). La menor producción de anticuerpos reafirma que las bacterinas son formulaciones vacunales poco inmunógenas y no producen una respuesta inmunológica duradera, por tanto no inducen una protección adecuada ante el agente etiológico, necesitan de varias dosis de refuerzo para tener un efecto significativo. Sin embargo, pueden ser combinadas con un compuesto que no solo facilite la presentación del antígeno a las células del sistema inmune del pez, sino que también ayude a los antígenos a persistir dentro de la cavidad corporal del mismo y de esta forma inducir o prolongar la duración de la protección. Por esta razón la historia de la vacunación en los peces está ligada estrechamente con el desarrollo de los adyuvantes. (Sommerset *et al.*, 2005).

Esta es la causa principal por la cual se aplicó junto con la bacterina adyuvantes, con el fin de inmunopotenciar la respuesta ante ella. El aumento significativo en la producción de anticuerpos de este grupo se correspondió con los días posteriores a la primera dosis de vacunación y a la dosis de refuerzo el día 17. Esto evidencia que aunque su efectividad fue menor, esta formulación vacunal aumentó la producción de IgM en niveles significativamente menores que el resto de los grupos durante todo el experimento (Fig 6).

Las determinaciones de anticuerpos por diferentes autores ante la vacunación con bacterinas de esta bacteria, han arrojado resultados similares a los reflejados en este trabajo en diferentes especies de peces como *C. batrachus* (Nayak *et al.*, 2004) y tilapia (Ibrahim *et al.*, 2008, Silva *et al.* 2009).

El tratamiento realizado con la bacterina adyuvada con AFCo3a (**grupo C**), mostró mejores resultados que el **grupo B** inmunizado con bacterina solamente pero menos eficiente que el del **grupo D**, tratado además con AFCo3b. Como se esperaba, el AFCo3a que solamente posee lipopolisacáridos (LPS) purificados provenientes de la membrana externa de *N. meningitidis* B indujo menos producción de anticuerpos junto con la bacterina que el AFCo3b (Fig 6).

La inoculación de extractos purificados de LPS o bacterinas que incluyen LPS inducen normalmente altas respuestas de anticuerpos protectivos y estimulan protección en inmunizaciones contra patógenos diversos y en diferentes especies piscícolas de agua dulce y salada, por lo que se sigue utilizando como inmunoestimulante o como componente de vacunas (Shao, 2001; Bowden *et al.*, 2003). El LPS tiene excelentes propiedades inmunógenas que validan su utilización como adyuvante o antígeno para la inmunización de peces (Shao, 2001; Bowden *et al.*, 2003).

En relación con el efecto biológico en especies de consumo (salmón, carpa, trucha, flounder japonés, pez gato, entre otras) y en el pez cebra como modelo de investigación, la inoculación de dosis de LPS que serían letales para cualquier mamífero, en la mayoría de los casos no inducen cuadros clínicos (Iliev *et al.*, 2005). En este caso se usaron dosis de 10µg de LPS por animal para AFCo3a y AFCo3b, lo cual, si tenemos en cuenta la conocida resistencia de estas especies a los LPS, es una dosis baja, pero conservadora para los fines exploratorios de esta investigación, por lo que se esperaba que no hubiese un gran aumento de la respuesta. Por esta razón algunos autores como Penagos, *et al.*, 2009 recomiendan determinar para cada especie la dosis de LPS óptima.

Estudios previos realizados en otras especies de peces han demostrado, al igual que este trabajo que los peces son relativamente resistentes a los LPS. En el salmón del atlántico (*Salmo salar*) se inocularon dosis de LPS de 2 mg/kg y 50 mg/kg por las vías intraperitoneal (i.p) e intragástrica respectivamente y a pesar de la movilización de la molécula por diferentes tejidos internos y de superficie, no se evidenció ningún tipo de signos clínicos, lesiones histopatológicas o mortalidad (Dalmo y Bogwald, 1996). 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 arco iris (*Salmo gairdneri*) son insensibles al LPS de *Escherichia coli* y de *Aeromonas salmonicida* (revisado por citado por Dalmo y Bogwald, 1996). En estudios *in vitro*, se necesitaron dosis extremadamente altas (µg/ml) de LPS para estimular respuesta de leucocitos y concentraciones de LPS 1000 veces más grandes que las requeridas en mamíferos para inducir en los fagocitos mononucleares la regulación de la producción de factor de necrosis tumoral (citado por Penagos *et al.*, 2009).

En sentido general el mejor tratamiento fue el del **grupo D** donde se aplicó AFCo3b junto con la bacterina. El AFCo3b es un producto que además de lipopolisacáridos posee proteínas, peptidoglicanos entre otros subproductos de la preparación del antígeno

utilizado para la vacuna VA- MENINGOCOC-BC, que están en fase exploratoria de su respuesta inmunológica en diferentes modelos animales. Esto lo hace, un producto supuestamente más inmunogénico que el AFCo3a, lo cual se verificó con este experimento.

AFCo3a y AFCo3b son coleatos derivados del proteoliposoma de *N. meningitidis* B obtenidos en el Instituto Finlay. En este experimento resultaron ser más inmunogénicos en su administración con bacterina de *A. hydrophila* que la misma aplicada sin los adyuvantes, hecho que se esperaba por la demostrada baja inmunogenicidad de las bacterinas. El uso de estos productos aún no ha sido estandarizado en peces, por lo que esta investigación forma parte de la etapa exploratoria de su posterior aplicación o estudio a peces u otros modelos animales.

Los cocleatos se clasifican como estructuras supramoleculares formadas por el enrollamiento en espiral de una o varias bicapas lipídicas planas, sin espacio acuoso en su interior. Estos pueden ser utilizados por vía oral o ser liofilizados sin que se afecte su estructura, además permiten elevados porcentajes de encapsulación de moléculas con diferentes características físico-químicas (e.g hidrofóbicas, hidrofílicas, etc.) (Zarif, 2002). Por lo tanto no es extraño que hayan sido considerados para el desarrollo de vacunas y adyuvantes (Fogerite, *et al.* 1998).

Desde el punto de vista práctico las estructuras cocleares pueden tener numerosas aplicaciones. En general, constituyen estructuras muy atractivas para el diseño de sistemas de liberación ya que se han podido encapsular y adyugar antígenos de diversa naturaleza (proteínas, péptidos, ADN, LPS, polisacáridos, glicoproteínas, etc.) Por otro lado, la presencia de múltiples capas arrolladas sobre sí, permite la protección de las moléculas en las capas interiores frente a la oxidación y a condiciones agresivas del medio (enzimas degradativas, pH extremos, etc.) (Pérez *et al.* 2007).

Los cocleatos derivados de *N. meningitidis* han sido efectivos para la adyuvación de antígenos de *Leishmania* (Pérez, 2004), *Plasmodium* (Brancho, 2009) y Virus de Herpes Simple (VHS) (Hanebergt, 1998) entre otros. En estos trabajos se demostró que la respuesta inmune inducida contra los antígenos adyuvados se caracteriza por altos títulos de anticuerpos a nivel de mucosa (IgA) y sistémico (IgG) y proliferación de células T en mamíferos. Hasta el momento las aplicaciones más exitosas de los cocleatos han sido las empleadas como vehículos para la administración de vitaminas, nutrientes y principios

activos (anti-inflamatorios y antibióticos) para el tratamiento de infecciones bacterianas, virales y fúngicas (Zarif, 2000).

5.2.2.3 Producción de anticuerpos IgM totales en las muestras de suero de *C. gariepinus* inmunizados con bacterina de *A. hydrophila*.

El proceso de inmunización de los diferentes grupos experimentales no influyó significativamente en el aumento de los anticuerpos totales en las muestras de suero, por lo que se asume que el efecto inmunoestimulante se presentó solamente contra la bacterina (Fig 8). De este hecho se infiere que los adyuvantes contribuyeron a la liberación o presentación de los antígenos de la bacterina, siendo esto un hecho demostrado para otros adyuvantes con este mismo tipo de preparación vacunal (Ibrahim *et al.*, 2008).

5.3 Discusión general

Aunque algunos autores consideran que la vacunación oral debe ser el método ideal para los peces, todavía se observan en los experimentos respuestas pobres o inconsistentes debido a la reconocida destrucción de los antígenos en el intestino (Palm y R Landolt, 1998). Diferentes aproximaciones por proteger los antígenos de la degradación, como atraparlos en liposomas o cápsulas de alginato, neutralización de las secreciones gástricas mediante antiácidos o antiproteasas, aplicación de vacunas films o bioencapsulación en copépodos o nauplios de *Artemia* spp., han demostrado resultados prometedores (Sommerset *et al.*, 2005). Los peces gato, debido a sus hábitos alimenticios carnívoros pueden poseer una alta probabilidad de destrucción antigénica en el intestino. Esto estimula la investigación para lograr una vacuna oral efectiva para los peces de hábitos alimenticios carnívoros (Nayak, 2004).

Usando como modelo el pez gato africano se demostró la respuesta inmune es compartimentada (inmunidad mucosal y sistémica) Vervarcke *et al.*, (2005). Esto ha sido sugerido previamente en otros peces como las tilapias (Jenkins *et al.*, 1994; Cain *et al.* 2000; Grabowski *et al.*, 2004). Otros autores han sugerido que la inmunización oral estimula la inmunidad mucosal directamente, mientras la inyección estimula una respuesta sistémica con una subsecuente respuesta mucosal cutánea en *Limanda limanda* Lin *et al.* (2000).

Muchos autores concuerdan en que el sistema inmune sistémico y mucosal son dos ramas diferentes de la respuesta inmune en los peces, y pueden ser considerados como parte de un modelo bicompartimentado. Hasta ahora no está clara la relación entre los niveles de anticuerpos de los compartimentos sistémicos y mucosales y la protección en el desafío. Sin embargo, la entrada de la mayoría de los patógenos en los peces es por el agua, la dieta o por el contacto con otros peces, por esto el componente inmune mucosal es tan importante para la protección (Prasad, S. y Areechon, N. 2010). Teniendo en cuenta que la mayoría de las infecciones tienen que cruzar la barrera mucosal, la protección por anticuerpos de este compartimento es muy importante, dando una indicación extra de que el estudio de la vacunación oral merece estar en continua optimización (Vervarcke, 2004).

Los ensayos específicos para anticuerpos ELISA usando suero de peces, han demostrado que la vacunación oral induce respuesta inmune sistémica. Aunque los títulos de anticuerpos son más bajos para la vacunación oral, que para la vacunación intraperitoneal, los resultados de los desafíos revelan que este método provee suficiente protección contra el patógeno, donde se imbrican la inmunidad humoral y la innata (Quentel y Vigneulle, 1997).

En este trabajo no se efectuaron estudios de la producción de anticuerpos a nivel mucosal, pero el aumento la producción de IgM sérica, inducido por los tratamientos, hace suponer aumentó también la producción de anticuerpos a nivel mucosal siendo esto fundamental en el combate de infecciones causadas por *A. hydrophila*.

En general hay poca información en la literatura de vacunaciones orales y vacunas orales exitosas en peces, en contraste con las vacunas por inmersión, son usadas en una extensión muy limitada en la acuicultura (Hastein 2005). Por esta razón este método no ha sido altamente considerado. A pesar de que en los últimos años se han realizado sustanciales esfuerzos prácticos por la administración oral, siguen siendo principalmente experimentales por la pobre o inconsistente protección (Quentel y Vigneulle, 1997).

En Cuba no se conocen ensayos que difieran de las ideas anteriores, con este fin deben ser realizados experimento que investiguen o establezcan protocolos de vacunación para las condiciones reales que presentan cada uno de los cultivos de peces que se desarrollen en un territorio determinado, como es el caso del cultivo intensivo de *C. gariepinus* en Cuba. En sentido general el protocolo de vacunación oral implementado en

este trabajo ofreció resultados alentadores, demostrados por el aumento de los niveles de anticuerpos IgM séricos en las muestras durante la inmunización. De los tratamientos realizados el de mejores resultados fue la aplicación de bacterina de *A. hydrophila* con AFCo3b. Por otra parte el comparar efecto del AFCo3a y el AFco3b, se demuestra que este último producto tiene mayores valores inmunoestimulantes. Por lo que la adecuada implementación futura de tratamientos con estos productos como antígenos o como inmunoestimulantes puede ser una estrategia económica y viable para la producción de clarias en Cuba.

6. Conclusiones

- El protocolo de vacunación oral permitió la correcta inmunización de *C. gariepinus* contra *A. hydrophila* utilizando como adyuvantes AFCo3a y AFCo3b.
- La inactivación con formaldehído utilizada en la elaboración de la bacterina de *A. hydrophila* permitió la obtención segura de antígenos vacunales.
- La producción de IgM incrementó en *C. gariepinus* ante la vacunación oral con bacterina de *A. hydrophila* administrada con AFCo3a y AFCo3b, siendo este último más inmunoestimulador que el AFCo3a.

7. Recomendaciones

- Evaluar este protocolo de inmunización oral en alevines de *C. gariepinus*, determinando los mismos parámetros inmunológicos.
- Realizar desafíos con la bacteria a los peces después del período de vacunación oral para conocer el nivel de protección real de esta preparación.

8. Referencias Bibliográficas

- ✓ Akira S, Uematsu S, Takeuchi O. 2006. Pathogen recognition and innate immunity. *Cell*.**124**: 783-801.
- ✓ Alexander J.B. e Ingram GA .1992. Non cellular nonspecific defence mechanisms of fish. *Annual Review of Fish Diseases*. **2**: 249-279.
- ✓ Alfonso, Y., Bencomo, A. 2001. Procedimientos para la detección e identificación de anticuerpos eritrocitarios. *Rev Cubana Hematol Inmunol hemoter*. **17** (2): 98-107
- ✓ Allnutt, C. T., Bowers, R. M., Rowe, C. G, Vakharia, V. N, Scott E. LaPatra, and Dhar, A. K. 2007. Antigenicity of infectious pancreatic necrosis virus VP2 sub-viral particles expressed in yeast. *Vaccine*. 21(**32**): 4736-43.
- ✓ Arkoosh, M.R., S.L. Kaattari (1991). Development of immunological memory in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) I. An immunochemical and cellular analysis of the B cell response. *Dev. Comp. Immunol.*, **15**: 279-293
- ✓ Azad I. S., Shankar, K. M., Mohan, C. V., Kalita, B. 2000. Uptake and processing of biofilm and free-cell vaccines of *Aeromonas hydrophila* in Indian major carps and common carp following oral vaccination —antigen localization by a monoclonal antibody *Diseases of aquatic organisms*. Vol. **43**: 103–108,
- ✓ Blazer V.S. 1991. Piscine macrophage function and nutritional influences: A review. *J Aquat Anim Health*.**3**:77-86.
- ✓ Botero E, Rodríguez M., Iregui CA, Figueroa J 2005. Extracción de productos extracelulares de *Aeromonas hydrophila* y sus efectos en tilapia roja (*Oreochromis spp.*) y cachama blanca (*Piaractus brachypomus*) *Acta Biológica Colombiana*, 10.(**2**), 75-93.
- ✓ Bowden, T., Adamson K., Maclachlan P., Pert C., Bricknell I. 2003. Long term study of antibody response and injection-site effects of oil adjuvants in Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus* L.). *Fish Shellfish Immunol*. **14**: 363-369.
- ✓ Bracho G, Zayas C, Wang L, Coppel R, Perez O, Petrovsky N. 2009. AFCo1, a meningococcal B derived cochleate adjuvant, strongly enhances antibody and T-cell immunity against Plasmodium falciparum merozoite surface protein 4 and 5. *Malaria J*. 28(35).
- ✓ Bruton, M.N., 1979a. The breeding biology and early development of *Clarias gariepinus* (*Pisces, Clariidae*) in lake Sibaya, South Africa, with a review of breeding species of the subgenus *Clarias* (*Clarias*). *Trans. Zool. Soc. London*, **35**:1-45.

- ✓ Bruton, M.N., 1979b. The food and feeding behaviour of *Clarias gariepinus* (Pisces, Clariidae) in lake Sibaya, south Africa, with its emphasis on its role as a predator of cichlids. *Trans. Zool. Soc. London*, **35**: 47-114.
- ✓ Bucarey S. A., Harel M. 2011. Oral vaccination of Atlantic salmon (*Salmo salar*) against salmonid rickettsial septicaemia. *Vaccine*. **29**: 2336–2340
- ✓ Bullock, G. L. 1961. The identification and separation of *Aeromonas liquefaciens* from *Pseudomonas fluorescens* and related organisms occurring in diseased fish. *Journal of Applied Microbiology*. **9**: 587 - 590.
- ✓ Cain, K.D., Jones, D.R., Raison, R.L., 2000. Characterization of mucosal and systemic immune response in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) using surface plasmon resonance. *Fish Shellfish Immunol*. **10**: 651–666.
- ✓ Dalmo R., Ingebrigtsen K., Bogwald J. 1997. Non-specific defenses mechanisms in fish, with particular reference to reticuloendothelial system (RES). *J Fish Dis*.**20**: 241-273.
- ✓ De Graaf, G.J.; Janssen, J.A.L. 1996. Artificial reproduction and pond rearing of the African catfish, *Clarias gariepinus* in sub-Saharan Africa – A handbook FAO Fisheries Technical Paper. No 362. Rome, FAO. 73 p
- ✓ 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. *Dev Comp Immunol.*; **32**: 380-390.
- ✓ Ellis A. E. 1999. Immunity to bacteria in fish. *Fish & Shellfish Immunology*, **9**: 291-308.
- ✓ Endo Y, Takahashi M, Fujita T. 2006. Lectin complement system and pattern recognition. *Immunobiology*, **211(4)**: 283-293.
- ✓ Evans J. J., Klesius P.H., 2004. Shoemaker C.A. Efficacy of *Streptococcus agalactiae* (group B) vaccine in tilapia (*Oreochromis niloticus*) by intraperitoneal and bath immersion administration. *Vaccine*. **22**:3769-3773.
- ✓ Evans J.J., Pasnik D, Panangala VS, Klesius PH, Shelby RA, Shoemaker CA. 2005. Antigenicity of *Streptococcus agalactiae* extracellular products and vaccine efficacy. *J Fish Dis*. **28**: 205-212.
- ✓ Ewart K.V., Williams J, Richards RC, Gallant JW, Melville K. 2008. The early response of Atlantic salmon (*Salmo salar*) macrophages exposed *in vitro* to *Aeromonas salmonicida* cultured in broth and in fish. *Dev Comp Immunol*. **32**:380-390.
- ✓ Falcón, Rosabel, Hernández F C., P. Pinto, S V Gatti Maria, Yano Tomasa 2004. Acción de la enterotoxina citotóxica en la patogénesis de *Aeromonas hydrophila*. *Biotecnología Aplicada*. **21(4)**

- ✓ FAO. 2006. State of world aquaculture: FAO Fisheries Technical paper.
- ✓ Ferguson, H.W. 2006. Systemic Pathology of Fish. Second Edition. Scotian Press;
- ✓ Fogerite S, Kheiri MT, Zhang F, Wang Z, Scolpino AJ, Feketeova E, *et al.* 1998. Targeting immune response induction with cochleate and liposome based vaccines. *Advanced Drug Delivery Reviews*. **32**: 273-87.
- ✓ Fonticiella, Ada. 2009. Expediente Técnico de la Estación Intenpez. PESCAVILLA
- ✓ Furushita M., Shiba T., Maeda T., Yahata M., Kaneoka A., Takahashi Y., 2003. Similarity of Tetracycline resistance genes isolated from fish farm bacteria to those from clinical isolates. *Appl Environ Microbiol.*; **69**: 5336-5342.
- ✓ Georgiadis, M. P., Gardner, I. A., Hedrick, R. P. 2001. The role of epidemiology in the prevention, diagnosis, and control of infectious diseases of fish. *Prev Vet Med*. **48**: 287-302.
- ✓ González, Isabel, Torres, Teresa, Chiroles, S. Valdés, Magaly., Domínguez, Isaida 2004. *Aeromonas* sp.: patógenos emergentes a considerar en aguas. *Cub@: Medio Ambiente y Desarrollo*. 4, (6). 55-56.
- ✓ Grabowski, L.D., LaPatra, S.E., Cain, K.D., 2004. Systemic and mucosal antibody response in tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.), following immunization with *Flavobacterium columnare*. *J. Fish Dis*. **27**: 573–581.
- ✓ Grisez, L., Z. Tan. 2005. Vaccine development for Asian aquaculture. In *Diseases in Asian Aquaculture*, P. Walker, R. Lester, and M.G. Bondad-Reantaso (eds), V: 483-494. Fish Health Section, Asian Fisheries Society, Manila.
- ✓ Hastein T, Gudding R, Evensen O. 2005. Bacterial vaccines for fish – an update of the current situation worldwide. *Dev Biol Stand*; **121**: 55–74.
- ✓ Heppell J., Davis H. L. Application of DNA vaccine technology to aquaculture. *Adv Drug Deliv Rev*. 2000; **43**, 29-43.
- ✓ Hossain, M. M. Kawai, K. Oshima, S. 2011. Immunogenicity of Pressure Inactivated *Edwardsiella tarda* Bacterin to *Anquilla japonica* (Japanese Eel). *Pakistan Journal of Biological Sciences* **14** (15): 755-767.
- ✓ Hosseini, M.H., Akhlaghi, M., Moazzeni Jula, Gh. 2011 Experimental vaccine against lactococcosis in cultured rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Archives of Razi Institute*, 66 (1) 51-57
- ✓ http://www.fao.org/fishery/culturedspecies/Clarias_gariepinus. Consultado 1/1/2012

- ✓ Ibrahem M D., R. M. H. Arab, Mostafa M. M and Mahmoud. A. Rezk. 2008. Evaluation of different vaccination strategies for control of (MAS) in Nile tilapia (*O. niloticus*) in Egypt. 8th International Symposium on Tilapia in Aquaculture 1157-1175.
- ✓ Iliev D, Liarte C, Mackenzie S, Goetz F. 2005. Activation of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) mononuclear phagocytes by different pathogen associated molecular pattern (PAMP) bearing agents. *Mol Immunol.* **42**:1215-1223.
- ✓ Imani, P., Akhlaghi, M. 2004. Immunogenicity of Hemolysin, Protease and Lipopolysaccharide Extracted from *Aeromonas hydrophila* in Common Carp (*Cyprinus carpio* L.). *Arch. Razi Ins.* **57**: 55-66
- ✓ Ip, Y.K.; Lau, I.Y.; Wong, W.P.; Lee, S.L.M.; Chew, S.F. 2005. The African sharptooth catfish *Clarias gariepinus* can tolerate high levels of ammonia in its tissues and organs during four days of aerial exposure. *Physiological and Biochemical Zoology*
- ✓ Janeway CA, Travers P, Walport M, Schlomchik MJ. 2005. Immunobiology; the immune system in health and disease. 6th ed. New York: Garland Science Publishing.
- ✓ Joseph, S. W. and A. Carnahan, A. 1994. The isolation, identification, and systematics of the motile *Aeromonas* species. Annual Review of Fish Diseases. 4: 315 – 343.
- ✓ Klesius P, Evans J, Shoemaker C. 2004. Warmwater fish vaccinology in catfish production. *Anim Health Res Rev.* **5**: 305-311.
- ✓ Klesius P, Shoemaker A, 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., Shoemaker, C. 2004. Warmwater fish vaccinology in catfish production. *Anim Health Res Rev.* **5**:305-311.
- ✓ Lallier, R., D. Leblanc, K. R. Mittal, and G. Olivier. 1981. Serogrouping of motile *Aeromonas* species isolated from healthy and moribund fish. *Journal of Applied and Environmental Microbiology.* **42**: 56 - 60.
- ✓ Le Morvan C, Troutaud D, Deschaux P. 1998. Differential effects of temperature on specific and nonspecific immune defences in fish. *J Exp Biol.*; **201(2)**:165-168.

- ✓ Lilley, J.H., Callinan, R. B., Chinabut, S., Kanchanakhan, S., Macrae, I. H., Phillips, M. J. 1998. Epizootic Ulcerative Syndrome (EUS) Technical Hybook. Bangkok: The Aquatic Animal Health Research Institute.
- ✓ Lin, S.H., Davidson, G.A., Secombes, C.J., Ellis, A.E. 2000. Use of a lipid-emulsion carrier for immunization of dab (*Limanda limanda*) by bath and oral routes: an assessment of systemic and mucosal antibody responses. *Aquaculture* **181**: 11–24.
- ✓ Magnadottir B, Lange S, Gudmundsdottir S, Bogwald J, Dalmo RA. 2005. Ontogeny of humoral immune parameters in fish. *Fish Shellfish Immunol*; **(19)**: 429-439.
- ✓ Magnadottir B. 2006. Innate immunity of fish (overview). *Fish & Shellfish Immunology*, **20 (2)**: 137-151.
- ✓ Midtlyng P. J. 1996. A field study on intraperitoneal vaccination of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) against furunculosis. *Fish Shellfish Immunol*. **6(8)**:553-565.
- ✓ Miller NW, Clem LW. 1984. Temperature mediated processes in teleost immunity: differential effects of temperature on catfish *in vitro* antibody responses to thymusdependent and thymus-independent antigens. *J Immunol.*; **133**: 2356-2359.
- ✓ Mishra, S. S. 1998. Use of dot immunoassay for rapid detection of pathogenic bacteria *Vibrio alginolyticus* and *Aeromonas hydrophila* from shrimps and fishes. *Indian Journal of Marine Sciences*. **27**: 222 - 226.
- ✓ Morris, H. J. Martínez, Clara, Abdala R. T. e Campos, D. 1999. Adyuvantes Inmunológicos. *Rev Cubana Invest Biomed*; **18(2)**:130-137
- ✓ Mulero I, García-Ayala A, Meseguer J, Mulero V. 2007. Maternal transfer of immunity and ontogeny of autologous immunocompetence of fish: A minireview. *Aquaculture*. **268**: 244-250.
- ✓ Nakanishi T, Aoyagi K, Xia C, Dijkstra JM, Ototake M. 1999. Specific cell-mediated immunity in fish. *Vet Immunol Immunopathol*. **72**: 101-109.
- ✓ Nayak D.K., Asha A., Shankar K.M., Mohan, C.V. 2004. Evaluation of biofilm of *Aeromonas hydrophila* for oral vaccination of *Clarias batrachus* - carnivore model *Fish & Shellfish Immunology* **16**: 613-619.
- ✓ Ndong D, Chen Y, Lin Y, Vaseeharan B, 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 immunol.*; **22**: 686-694.

- ✓ Negrete, Pilar, Valencia D. Villegas, Gabriela., Romero, J. 2002 Bacteriosis por estrés ambiental en granjas acuícolas de México. *Sociedades Rurales, Producción y Medio Ambiente*. **3** (1): 49-58.
- ✓ Neish, G.A. & Hughes, G.C., 1980. Fungal diseases of Fishes. S.F. Snieszko & Axelrod, H.R. (ed.) Diseases of Fishes, Book 6. T.F.H. Publ. Inc. Ltd. 159 pp.
- ✓ Osman K. M., Mohamed, L. A., Rahman E. H. A. and Soliman W.S. 2009. Trials for Vaccination of Tilapia Fish Against *Aeromonas* and *Pseudomonas* Infections Using Monovalent, Bivalent and Polyvalent Vaccines. *World Journal of Fish and Marine Sciences* **1** (4): 297-304.
- ✓ PAC. 2012. Programa de Aseguramiento de la Calidad, Base HACCP, UEB INTENPEZ, Procedimiento específico, Alimentación, Versión 3, 1pp.
- ✓ Palic D., Ostoji J, Andreasen C, Roth J. 2007. Fish cast NETs: Neutrophil extracellular traps are released from fish neutrophils. *Dev Comp Immunol.*; **31**: 805-816.
- ✓ Palm Jr., R. C., Landolt M., Busch, R. A. 1998. Route of vaccine administration: effects on the specific humoral response in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *Diseases of aquatic organisms*. **33**: 157-166.
- ✓ Paperna, I. 1996. Parasites, infections and diseases of fishes in Africa. Roma FAO.181 pág.
- ✓ Penagos, G.; Barato, P.; Iregui, C. 2009. Sistema inmune y Vacunación de peces. *Acta biol. Colomb.*, 14 (1) 3 – 24
- ✓ Pérez O, Bracho G, Lastre M, Mora N, del Campo J, Gil D, et al. 2004. Novel adjuvant based on a proteoliposome-derived cochleate structure containing native lipopolysaccharide as a pathogen-associated molecular pattern. *Immunol Cell Biol*; **82** (6):603-10.
- ✓ Pérez O, Lastre M, Cabrera O, del Campo J, Bracho G, Cuello M, et al. 2007. New Vaccines Require Potent Adjuvants like AFPL1 and AFCo1. *Scandinavian Journal of Immunology*; **66**: 271-7.
- ✓ Peyghan, R., Khadjeh G. H., Mozarmnia N., Dadar M. 2010. Effect of intraperitoneal and intramuscular injection of killed *Aeromonas hydrophila* on lymphocytes and serum proteins of common carp, *Cyprinus carpio*. *Advances in Bioscience and Biotechnology*.**1**.26-29
- ✓ Popoff, M. and M. Vernon. 1976. A taxonomic study of the *Aeromonas hydrophila*-*Aeromonas punctata* group. *Journal of General Microbiology*. **94**: 11 - 22.

- ✓ Prasad, S. and Areechon, N. (2010). Efficacy of Formalin-killed *Aeromonas hydrophila* and *Streptococcus* sp. Vaccine in Red Tilapia. *Our Nature* **8**: 231-240.
- ✓ Quentel, C., Vigneulle, M., 1997. Antigen uptake and immune responses after oral vaccination. *Dev. Biol. Stand.* **90**: 69–78.
- ✓ Refai, M. K., Laila, A. Mohamed, Kenawy A. and Shinaa, El-S. M. A. 2010. The Assessment of Mycotic Settlement of freshwater fishes in Egypt. *Journal of American Science.* **6** (11).
- ✓ Richards, R.H. & Roberts, R.J., 1978. The bacteriology of teleosts. In: Roberts, R.J. (ed.) *Fish Pathology*. Bailliere, Tindall, London. pp. 183–204.
- ✓ Ringo E, Lodemel JE, Myklebust R, Kaino T, Mayhew TM, Olsen RE. 2001. Epithelium-associated bacteria in the gastrointestinal tract of Arctic charr (*Salvelinus alpinus* L.). An electron microscopical study. *J. Appl. Microbiol.* **90**: 294-300.
- ✓ Romalde, J. L., Luzardo-Alvárez, A., Ravelo, C., Toranzo A. E., Méndez J. 2004. Oral immunization using alginate microparticles as a useful strategy for booster vaccination against fish lactococcosis. *Aquaculture* **236**: 119–129
- ✓ Rombout, J.H.W.M., N. Taverne, M. Van-De-Kamp & A.J. Taverne-Thiele.1993. Differences in mucus and serum immunoglobulin of carp (*Cyprinus carpio* L.). *Dev. Comp. Immunol.* **17**: 309-317.
- ✓ Rubio-Godoy, M. 2010. Inmunología de los peces óseos. *Revisión Rev Mex Cienc Pecu;***1(1)**:43-57
- ✓ Ruiz I, Fernández A. B., De Blas I. 2003. El sistema inmune de los teleósteos (III): Respuesta inmune específica. *Revista AquaTIC.*; **18**: 33-38.
- ✓ Ruiz I, Fernández A. B., De Blas I. 2003b. El sistema inmune de los teleósteos (IV): Factores que afectan la respuesta inmune. *Revista AquaTIC.* **19**: 1-7.
- ✓ Rukera Tabaro, S. Micha J.C., Ducarme C. 2005. Essais d'adaptation de production massive de juveniles de *Clarias gariepinus* en conditions rurales *Tropicultura* 23, **(4)**, 231-244.
- ✓ Shao Z.J. 2001. Aquaculture pharmaceuticals and biologicals: current perspective and future possibilities. *Adv Drug Deliv Rev.* **50**: 229-243.
- ✓ Shoemaker C. A., Grant W. Vandenberg, André Désormeaux, Phillip H. Klesius, Joyce J. Evans. 2006. Efficacy of a *Streptococcus iniae* modified bacterin delivered using Oralject™ technology in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Aquaculture* **255**: 151–156

- ✓ Shoemaker, C., Klesius, P. 1997. Streptococcal diseases problems and control: a review. In: Fitzsimmons K. *Tilapia Aquaculture. Proc. Fourth international symposium on tilapia in aquaculture*. Florida. USA. **2**: 671-680.
- ✓ Shotts, E. B. and R. Rimler. 1973. Medium for the isolation of *Aeromonas hydrophila*. *Journal of Applied Microbiology*. **26**: 550 - 553.
- ✓ Silphaduang U, Colomi A, Noga EJ 2006. Evidence for widespread distribution of piscidin antimicrobial peptides in teleost fish. *Diseases of Aquatic Organisms*, **72(3)**: 241-252.
- ✓ Silva B. C., Martins M. L., A. Jatobá, Buglione Neto, C. C., Vieira F. N., Pereira, Gabriella, Jerônimo Gabriela, Walter Q. Seiffert and Mouriño, J. L. 2009. Hematological and immunological responses of Nile tilapia after polyvalent vaccine administration by different routes. *Pesq. Vet. Bras.* 29(11):874-880.
- ✓ Soltani, M. and M. Rabani Khorasgani. 1999. Evaluation of indirect immunofluorescent antibody technique for detection of *Vibrio anguillarum* and *Aeromonas hydrophila* infections in cultured fish and prawn. *Journal of the Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran*. **4**: 73 - 78.
- ✓ Sommerset, I, Krossoy B, Biering, E., Frost P. 2005. Vaccines for fish in aquaculture. *Expert Rev. Vaccines* **4** (1): 89-101.
- ✓ Stafford J. L. y Belosevic M. 2003. Transferrin and the innate immune response of fish: identification of a novel mechanism of macrophage activation. *Developmental and Comparative Immunology*, **27(6-7)**: 539-554.
- ✓ Tewgels, G.G., 1984. The nomenclature of African Clarias species used in aquaculture. *Aquaculture*, **38**: 373-374.
- ✓ Thinh N.H. , Kuob T.Y., Hung L.T., Loc T.H. , Chen S.C. , Evensen O. , Schuurman H.J. 2009. Combined immersion and oral vaccination of Vietnamese catfish (*Pangasianodon hypophthalmus*) confers protection against mortality caused by *Edwardsiella ictaluri*. *Fish & Shellfish Immunology* **27**: 773–776.
- ✓ Tizard, I. 1992. The phylogeny of the immune system. In: *Veterinary Immunology an introduction*. W.B. Saunders Company (Ed.). Harcourt Brace Jovanovich, Inc. USA. 457-469.
- ✓ Tobar, J. A., Jerez S., Caruffo M., Bravo C., Contreras F., Bucarey S. A., Harel. M. 2011. Oral vaccination of Atlantic salmon (*Salmo salar*) against salmonid rickettsial septicaemia *Vaccine* **29**: 2336–2340
- ✓ Toranzo A.E, Romalde J.L, Magariños B. and Barja J.L. 2009. Present and future of aquaculture vaccines against fish bacterial diseases. *Options Méditerranéennes*. **86**: 155-176

- ✓ Toranzo, A.E., Santos, Y. and Barja, J.L., 1997. Immunization with bacterial antigens: *Vibrio* infections. In: R. Gudding, A. Lillehaug, P.J. Midtlyng and F. Brown (eds), *Fish Vaccinology*. Karger, Basel, Switzerland. p. 93-105.
- ✓ Tort L., Balasch J.C., Mackenzie. S. 2003. Fish immune system. A crossroads between innate and adaptive responses *Inmunología*. 22 (3):277-286
- ✓ Trust, T. J., L. M. Bull, B. R. Currie, and J. T. Buckley. 1974. Obligate anaerobic bacteria in the gastrointestinal microflora of the grass carp (*Ctenopharyngodon idella*), goldfish (*Carassius auratus*), and rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Journal of the Fisheries Research Board of Canada*. **36**: 1174 - 1179.
- ✓ Vallejo, A.N., N.W. Miller, N.E. Harvey, M.A. Cuchens, G.W. Warr, L.W. Clem 1992. Cellular pathway(s) of antigen processing and presentation in fish APC: endosomal involvement and cell-free antigen presentation. *Dev. Comp. Immunol.*, **3**:51-65.
- ✓ Van Ginkel, F.W., N.W. Miller, C.J. Lobb, L.W. Clem 1992. Characterization of anti-hapten antibodies generated in vitro by channel catfish peripheral blood lymphocytes. *Dev. Comp. Immunol.*, **16**:139-151
- ✓ Vanderberg, G. W. 2004. Oral vaccine for finfish: academic theory or comercial reality?. *Anim Health Res Rev*.**5**: 301-304.
- ✓ Ventura, M. T. and J. M. Grizzle. 1988. Lesions associated with natural and experimental infections of *Aeromonas hydrophila* in channel catfish, *Ictalurus punctatus* (Rafinesque). *Journal of Fish Diseases*. **11**: 397 - 407
- ✓ Vervarcke S., Ollevier F., Kinget R., Michoel, A. 2004. Oral vaccination of African catfish with *Vibrio anguillarum* O2: effect on antigen uptake and immune response by absorption enhancers in lag time coated pellets *Fish & Shellfish Immunology* **16**: 407–414
- ✓ Vervarcke, S., Ollevier, F., Kinget, R., Michoel, A., 2005. Mucosal response in African catfish after administration of *Vibrio anguillarum* O2 antigens via different routes. *Fish Shellfish Immunol.* **18**: 125–133.
- ✓ Vinjoy, M. García, M.T. y Cabrerías, G. 2000. Manual de Patologías del *Clarias spp.* Centro de Preparación Acuícola de MAMPOSTON (CPAM).25pp.
- ✓ Wendelaar Bonga SE. 1997. The stress response in fish. *Physiol Rev.* **77(3)**:591-625.
- ✓ Yang H. L. 2003. Fish oral vaccine with recombinant *E. coli* encapsulated in brine shrimp. In: Proceedings, 3rd International Symposium on Fish vaccinology, April 9–11, 2003, Bergen, Norway.

- ✓ Yardimci B., Aydin Y. 2011. Pathological findings of experimental *Aeromonas hydrophila* infection in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) *Ankara Üniv Vet Fak Derg*, 58, 47-54.
- ✓ Zapata AG, Varas A, Torroba M. 1992. Seasonal variations in the immune system of lower vertebrates. *Immunol Today*.**12**: 142-147.
- ✓ Zarif L. 2002. Elongated supramolecular assemblies in drug delivery. *Journal of Controlled Release*. 81: 7-23.
- ✓ Zarif L. J., Graybill, R., Perlin D., Najvar L., Bocanegra R. and J. Mannino. R. 2000. Cochleates against *Candida albicans* Antifungal Activity of Amphotericin B Infection in a Mouse Model *Antimicrob. Agents Chemother*. **44(6)**:1463.1463-1469.
- ✓ Zhang, Y. L., C. T. Ong, and K. Y. Leung. 2000. Molecular analysis of genetic differences between virulent and avirulent strains of *Aeromonas hydrophila* isolated from diseased fish. *Microbiology*. **146**: 999 – 1009.