

Patología bacteriana en acuicultura

Alicia Estévez-Toranzo

Dpto. Microbiología y Parasitología. Facultad de Biología/CIBUS.
Universidad de Santiago de Compostela

Los investigadores del equipo forman parte del grupo de Ictiopatología del Departamento de Microbiología y Parasitología de la Facultad de Biología y del Instituto de Acuicultura de la Universidad de Santiago de Compostela. Desde que se se desarrolló esta línea hace 25 años, el grupo ha hecho un gran esfuerzo investigador en la caracterización fenotípica y genética de los agentes etiológicos de las enfermedades infecciosas que afectan a cultivos de peces de gran importancia económica a nivel mundial como son el rodaballo, dorada, lubina, lenguado, salmón y trucha, entre los que podemos mencionar a *Vibrio anguillarum*, *Photobacterium damsela subsp. piscicida*, *Aeromonas salmonicida*, *Pseudomonas anguilliseptica*, *Yersinia ruckeri*, *Tenacibaculum maritimum*, *Lactococcus garvieae* y *Streptococcus parauberis* (Toranzo et al., 2005). Sin embargo, la acuicultura intensiva ha provocado que, una vez solventados unos problemas patológicos, emergieran nuevas enfermedades o nuevos grupos serológicos y/o genéticos dentro de los patógenos ya conocidos.

Entre los patógenos emergentes o reemergentes en los que el grupo ha centrado su investigación en los últimos años se encuentra *Edwardsiella tarda* en rodaballo, *Tenacibaculum maritimum* en rodaballo y lenguado y *Yersinia ruckeri*

y *Streptococcus phocae* en salmónidos. Hemos desarrollado para estos patógenos técnicas rápidas basadas en la PCR que permiten su detección específica no sólo a partir de cultivos puros sino a partir de tejidos. Además, la sensibilidad conseguida con estas técnicas permitió la detección de portadores asintomáticos. Asimismo, la aplicación de diferentes técnicas de tipado como son la electroforesis en campos pulsantes (PFGE), la amplificación aleatoria de los polimorfismos del DNA (RAPD-PCR) y otras técnicas basadas en la PCR como REP y ERIC, nos ha permitido determinar dentro de cada patógeno la variabilidad genética intraespecífica o líneas clonales, lo cual es de gran utilidad para estudios epidemiológicos y búsqueda del origen de una infección.

La investigación básica en la caracterización antigénica y genética de los patógenos mencionados nos ha permitido desarrollar estrategias de vacunación exitosas para prevenir las principales enfermedades bacterianas que han afectado y/o afectan a los cultivos marinos y continentales (Toranzo et al., 2005; Romalde et al., 2005, 2009; Castro et al., 2008) habiendo establecido para el caso del rodaballo un calendario vacunal a aplicar en su ciclo de crecimiento. Algunas de estas vacunas y estrategias de vacunación han sido patentadas y están siendo comercializadas.



Miembros del grupo (de izquierda a derecha): Beatriz Magariños (Prof. Contratado Doctor), Soledad Núñez (técnico FP), Nuria Castro (investigadora contratada), Alicia E. Toranzo (Catedrática), Celsa Pérez (administrativa grupo), Noemí Buján (becaria FPI), Asmine Bastardo (investigadora predoctoral FONDECYT, Venezuela).

AVANCES EN ENFERMEDADES EMERGENTES O REEMERGENTES

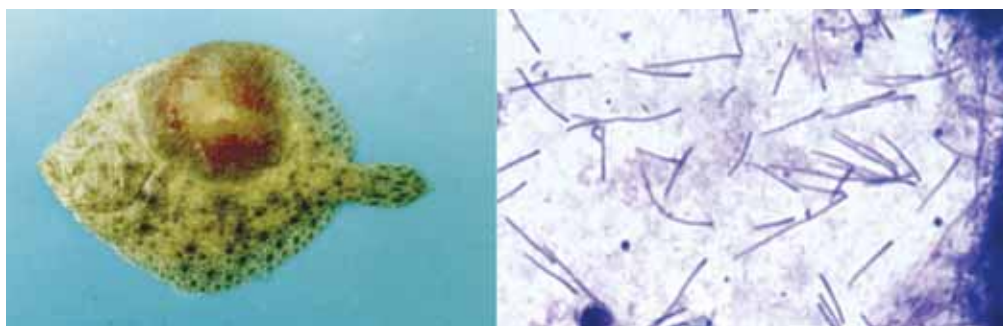
E*dwardsiella tarda* es un patógeno bacteriano perteneciente a la familia de las Enterobacterias que, desde 2005 hasta la actualidad, produce epizootías repetitivas en diferentes plantas de cultivo de rodaballo europeas. Los trabajos de investigación desarrollados por nuestro grupo han demostrado que todas las cepas que infectan al rodaballo forman un único grupo serológico, diferente al del resto de cepas de *E. tarda* aisladas de otros hospedadores (Castro *et al.*, 2006). Además, estudios de patogenidad con este grupo de aislados, han demostrado su elevado grado de virulencia y que no poseen especificidad de huésped, pudiendo infectar a otras especies como el lenguado y la lubina y siendo capaces de provocar la muerte de animales homeotermos con el consecuente riesgo para la salud pública (Castro *et al.*, 2010a). Desde el punto de vista molecular, aunque las cepas del rodaballo constituyen un grupo genético bastante homogéneo, empleando la técnica de RAPD y REP-PCR, se ha detectado la presencia de dos clones distintos que pueden coexistir en la misma planta o incluso en el mismo brote de mortalidad (Castro *et al.*, 2010b). Por otra parte, nuestro grupo ha evaluado diferentes protocolos de diagnóstico basados en la técnica de PCR con el fin de determinar el más sensible y específico para la detección del patógeno incluso en el caso de animales portadores (Castro *et al.*, 2010c). Además, hemos desarrollado una vacuna adyuvantada que confiere a los peces una protección superior al 90 % durante gran parte del ciclo de producción del rodaballo (Castro *et al.*, 2008).

Tenacibaculum maritimum (antes *Flexibacter maritimus*), bacteria halófila filamentosa con movilidad deslizante y con un estricto requerimiento de sales marinas, es el agente etiológico de la enfermedad conocida como tenacibaculosis o flexibacteriosis. Aunque *T. maritimum* constituye un grupo homogéneo desde el punto de vista bioquímico, serológicamente se han descrito tres serotipos predominantes en la península ibérica (O1, O2 y O3) sin una estricta asociación con el hospedador (Avendaño-Herrera *et al.*, 2004a, 2006, Castro *et al.*, 2007). Sin embargo, desde el punto de vista molecular, demostramos la existencia de dos genogrupos principales que sí pudieron asociarse con el hospedador (Avendaño-

Herrera *et al.*, 2006). Además, hemos desarrollado un protocolo no destructivo de diagnóstico basado en la técnica de *nested-PCR* que permite la detección del patógeno en peces asintomáticos sin necesidad de su sacrificio (Avendaño-Herrera *et al.*, 2004b). Los estudios que hemos llevado a cabo referente a mecanismos de virulencia nos han demostrado que *T. maritimum* posee, al menos, dos mecanismos de captación de hierro que son muy eficaces dentro del hospedador, uno relacionado con la producción de sideróforos y otro con la captación de hierro a partir de grupos hemo (Avendaño-Herrera *et al.*, 2005). Más recientemente en colaboración con el grupo de la Dra. Ana Otero de la USC se ha comenzado a estudiar la posible implicación del sistema de “*Quorum Sensing*” (sistema de comunicación o lenguaje en bacterias) en la virulencia de este patógeno (Romero *et al.*, 2010). Dicho sistema está mediado por unas moléculas de bajo peso molecular (principalmente acil-homoserín-lactonas, AHL) que son liberadas al medio para controlar la densidad de población permitiendo que se expresen determinados factores de virulencia

Yersinia ruckeri causa la enfermedad de la boca roja (ERM), una patología que constituyó un importante factor limitante en el desarrollo de la salmónicultura a nivel mundial. Aunque el desarrollo de una vacuna efectiva permitió el control de la enfermedad, desde los últimos cinco años se están detectando brotes de ERM en peces previamente vacunados con el serotipo O1a. Por ello, actualmente estamos evaluando cepas de *Y. ruckeri* aisladas de diferentes brotes de ERM ocurridos entre 2003-2009 en salmónidos cultivados en Europa y Suramérica en búsqueda de información útil al desarrollo inmediato de estrategias más eficaces de control y prevención. Los resultados indican una importante variabilidad fenotípica, serológica y molecular entre estos aislados (Bastardo *et al.*, 2010) con respecto a los de hace algunos años. Aunque aproximadamente el 50 % de las cepas pertenecían al clásico serotipo O1a, hemos detectado la emergencia en peces vacunados de un elevado porcentaje de cepas del serotipo O1b y en menor proporción del O2b. Es interesante mencionar que los grupos genéticos detectados por técnicas moleculares de tipado estaban estrechamente relacionados con los serotipos. No obstante, se continúan nuevos estudios que permitan dilucidar las interrelaciones filogenéticas entre estos aislados así como las posibles causas de diseminación.

Lesiones externas en rodaballo producidas por *Tenacibaculum maritimum* (a). Tinción Giemsa de un frotis de las lesiones mostrando las típicas células filamentosas del patógeno (b).



Hemorragias oculares (a) y úlceras profundas con licuefacción muscular (b) producidas por *Streptococcus phocae* en salmón Atlántico.



Streptococcus phocae, es un patógeno Gram positivo y β -hemolítico que, desde 2004, produce mortalidades masivas en los cultivos de salmón atlántico en Chile. Aunque el modo de transmisión y ruta de infección de esta enfermedad son desconocidos, no se descarta la hipótesis de un salto de especie desde su hospedador natural, las poblaciones de pinnípedos (focas) cercanas a las jaulas de salmones (Romalde *et al.*, 2008). Recientes estudios de genéticos y de serotipificación así como el análisis de proteínas de membrana, ácidos grasos (FAME) y secuenciación de genes metabólicos (MLST) han mostrado la existencia de dos perfiles o líneas clonales estrechamente relacionados con el origen de aislamiento (Valdés *et al.*, 2009). Sin embargo, el estudio del proteoma mediante MALDI-TOF MS no detectó diferencias entre los aislados de salmón y foca. En la actualidad se están llevando a cabo más estudios genéticos con el fin de dilucidar si los dos grupos clonales detectados podrían llegar a constituir dos subspecies distintas de *S. phocae*.

BIBLIOGRAFIA

- Avendaño-Herrera, R., Magariños, B., López-Romalde, S., Romalde, J.L. & Toranzo, A.E. (2004a). Phenotypic characterization and description of two major O-serotypes in *Tenacibaculum maritimum* strains from marine fish. *Dis.Aquat. Org.* 58: 1-8.
- Avendaño-Herrera, R., Magariños, B., Toranzo, A.E., Beaz, R. Romalde, J.L. (2004b). Species-specific polymerase chain reaction primer sets for the diagnosis of *Tenacibaculum maritimum* infection. *Dis.Aquat. Org.* 62: 75-83.
- Avendaño-Herrera, R., Toranzo, A.E., Romalde, J.L., Lemos, M.L. & Magariños, B. (2005). The fish pathogen *tenacibaculum maritimum* possesses different iron uptake systems. *Appl. Environ. Microbiol.* 71: 6947-6953
- Avendaño-herrera, R., Toranzo, A.E. & Magariños, B. (2006). Tenacibaculosis infection in marine fish caused by *Tenacibaculum maritimum*: a review. *Dis.Aquat. Org.* 71: 255-266.
- Bastardo, A., Bohle, H., Ravelo, C., Toranzo, A. E. & Romalde, J.L. (2010). Serological and molecular heterogeneity among *Yersinia ruckeri* strains isolated from farmed Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) in Chile. *Dis. Aquatic Org.* (en prensa).
- Castro N., Toranzo A.E., Barja J.L., Núñez S. & Magariños B. (2006) Characterization of *Edwardsiella tarda* strains isolated from turbot. *J. Fish Dis.* 29: 541-547.
- Castro, N., Magariños, B., Nunez, S. & Toranzo, A.E. (2007). Reassessment of the *Tenacibaculum maritimum* serotypes causing mortalities in cultured marine fish. *Bull. Eur. Ass. Fish Path.* 27: 229-233
- Castro N., Toranzo A.E., Núñez S. & Magariños B. (2008) Development of an effective *Edwardsiella tarda* vaccine for cultured turbot (*Scophthalmus maximus*). *Fish & Shellfish Immunol.* 25: 208-212.
- Castro, N., Magariños, B., Núñez, S., Barja, J.L. & Toranzo, A.E. (2010a). *Edwardsiella tarda* from turbot: a potential risk for the marine aquaculture? *Int. Microbiol.* (En prensa).
- Castro, N., Toranzo, A.E., Barja, J.L. & Magariños, B. (2010b). Intraspecific genetic diversity of *edwardsiella tarda* strains from turbot. *Dis. Aquat. Org.* (En prensa).
- Castro N., Toranzo A. E., Núñez C. R. & Magariños B. (2010c) Evaluation of four polymerase chain reaction primer pairs for the detection of *Edwardsiella tarda* in turbot. *Dis.Aquatic Org.* 90: 55-61.
- Romalde, J.L., Ravelo, C., López-Romalde, S., Avendaño, R., Magariños, B. & Toranzo, A.E. (2005). Vaccination strategies to prevent important emerging diseases for spanish aquaculture In: Midtlyng, P.J. (ed), *Progress in Fish Vaccinology.* Dev. Biol. Basel, Karger, Switzerland Vol. 121, pp: 85-95.
- Romalde, J.L., Ravelo, C., Valdés, I., Magariños, B., de la Fuente, E., San Martín, C. & Avendaño-Herrera, R. (2008). *Streptococcus phocae*, an emerging pathogen for salmonid cultured in Chile. *Vet. Microbiol.* 130: 198-207
- Romalde, J.L., Magariños, B., Ravelo, C. & Toranzo, A.E. (2009). Vaccination strategies to prevent streptococcal disease in cultured fish. In *Fish Defenses*, Vol. 2: *Pathogens, Parasites and predators* (G. Zaccane, M.J. Manning, C.J. Secombes, B.G. Kappor, eds). *Sci. Publishers* (USA). Chap. 4: 111-149.
- Romero, M., Avenaño-Herrera, R., Magariños, B., Cámara, M & Otero, A. (2010). Acylhomoserine lactone production and degradation by the fish pathogen *Tenacibaculum maritimum*, a member of the *Cytophaga-Flavobacterium-Bacteroides* (CFB) group. *FEMS Microbiol. Lett.* 304: 131-139.
- Toranzo A.E., Magariños B. & Romalde J.L. (2005) A review of the main bacterial fish diseases in mariculture system. *Aquaculture* 246: 37-61
- Valdés, I., Jaureguiberry, B., Romalde, J.L., Toranzo, A.E., Magariños, B. & Avendaño-Herrera, R. (2009). Genetic characterization of *Streptococcus phocae* strains isolated from atlantic salmon (*Salmo salar*) in Chile. *J. Fish Dis.* 32: 351-358.