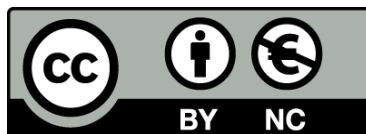




UNIVERSITAT DE
BARCELONA

Caracterització immunogènica d'*Aeromonas salmonicida* respecte a la proteïna de la capa-A i al lipopolisacàrid

Anicet Blanch i Gisbert



Aquesta tesi doctoral està subjecta a la llicència **Reconeixement- NoComercial 4.0. Espanya de Creative Commons.**

Esta tesis doctoral está sujeta a la licencia **Reconocimiento - NoComercial 4.0. España de Creative Commons.**

This doctoral thesis is licensed under the **Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0. Spain License.**

UNIVERSITAT DE BARCELONA

FACULTAT DE BIOLOGIA

CARACTERITZACIÓ IMMUNOGÈNICA D'Aeromonas salmonicida
RESPECTE A LA PROTEÏNA DE LA CAPA-A
I AL LIPOPOLISACÀRID.

Micropues R. 433407



Plau

Director de la Tesi

Dr. JOAN JOFRE i TORROELLA

Catedràtic de Microbiologia

Memòria presentada per
ANICET BLANCH i GISBERT
per a optar al grau de
Doctor en Biologia.

Barcelona, febrer de 1988.

BIBLIOTECA DE LA UNIVERSITAT DE BARCELONA



0700182693

"...M'han dit les veus assenyades
que és inútil el cansar-me,
però a mi un somni mai no em cansa..."

LI. Llach.

Per a tu, Maria.

ÍNDEX

	pàg.
0. PRESENTACIÓ.	
1. INTRODUCCIÓ GENERAL.	
1.1. Característiques generals.	1
1.2. Signes clínics i patologia.	4
1.3. Diagnòstic. Prevenció. Tractament.	6
1.4. Factors de virulència:	10
1.4.1. Factors de virulència cel·lulars.	15
1.4.2. Factors de virulència extracel·lulars.	21
1.5. Vacunes experimentals.	28
1.6. Objectius i pla de treball.	52
2. CAPÍTOL I. CARACTERITZACIÓ ANTIGÈNICA I ELECCIÓ DE LES SOQUES REPRESENTANTS.	
2.1. Introducció.	56
2.2. Materials i mètodes:	
2.2.1. Bacteris.	58

2.2.2. Antisèrums.	58
2.2.3. Selecció inicial dels aïllaments:	
2.2.3.1. Floculació cel.lular.	59
2.2.3.2. Hidrofobicitat.	60
2.2.3.3. Creixement en CBB-Agar.	61
2.2.3.4. Estabilitat de la suspensió en NaCl.	63
2.2.4. Caracterització antigènica inicial.	
2.2.4.1. Microaglutinació	64
2.2.4.2. Electroforesi en SDS-PAGE.	64
2.2.5. Determinació de l'antigenicitat:	
2.2.5.1. Electrotransferència.	67
2.2.5.2. Immunodetecció.	68
2.3. Resultats.	
2.3.1. Selecció inicial dels aïllaments.	71
2.3.2. Caracterització antigènica inicial.	75
2.3.3. Soques representants de cada grup.	82
2.3.4. Determinació de l'antigenicitat.	88
2.4. Discussió.	
2.4.1. Caracterització antigènica.	94
2.4.2. Relació de l'antigenicitat, la resistència al sèrum i la virulència.	96

2.4.3. Confirmació del pes molecular de la proteïna-A.	98
2.4.4. Immunodetecció de l'antigenicitat.	99
2.4.5. Models moleculars de la membrana externa d' <u>Aeromonas salmonicida</u> .	100
3. CAPÍTOL II. CARACTERITZACIÓ IMMUNOGÈNICA.	
3.1. Introducció.	103
3.2. Materials i mètodes:	
3.2.1. Peixos.	105
3.2.2. Eritròcits de be.	105
3.2.3. Antisèrums.	105
3.2.4. Purificació del lipopolisacàrid.	106
3.2.5. Marcatge dels eritròcits de be amb el lipopolisacàrid.	108
3.2.6. Preparació de les vacunes.	109
3.2.7. Immunització: Vies d'administració.	112
3.2.8. Estudi de la immuno-resposta:	
3.2.8.1. Microaglutinació.	116
3.2.8.2. Test de la placa per hemolisi passiva.	119
3.3. Resultats.	
3.3.1. Preparació de les vacunes.	122

3.3.2. Valoració de la immuno-resposta: humoral i cel.lular.	124
3.3.3. Valoració de les vies d'administració.	133
3.4. Discussió.	139
4. CAPÍTOL III. ESTUDI DE LA PROTECCIÓ ADQUIRIDA.	
4.1. Introducció.	143
4.2. Material i mètodes:	
4.2.1. Peixos.	147
4.2.2. Preparació de les vacunes.	147
4.2.3. Vacunació.	148
4.2.4. Inducció d'una furoncolosi experimental.	149
4.3. Resultats.	154
4.4. Discussió.	158
5. CONCLUSIONS.	160
6. RESUM.	164
7. BIBLIOGRAFIA.	174

0. PRESENTACIÓ.

O. P R E S E N T A C I Ó.

Fa uns anys en acabar la llicenciatura en Biologia, vaig decidir orientar la meua professionalització en el camp científico-tècnic i en concret en el món de l'Aqüicultura. Dues foren les raons que em portaren a fer-ho: la primera per un gust personal pels sistemes aquàtics i en particular pel mar, i una segona perquè sempre he pensat que la feina ha d'ésser una eina transformadora del nostre entorn social.

Vaig començar els meus primers passos col·laborant desinteressadament en el Laboratori d'Aqüicultura de la Càtedra de Zoologia-Vertebrats d'aquesta Facultat. Al cap d'un any vaig ésser seleccionat com un dels alumnes del "1er Plan de Formació de Tècnics Superiores en Acuicultura" organitzat per la CAICYT (Ministerio de Educació y Ciencia). La idea d'aquest Pla fou preparar personal qualificat ja que s'havia valorat com un dels punts prioritaris i necessaris per al desenvolupament de l'Aqüicultura. El Pla de Formació s'inicià amb un curs teòric i pràctic on els alumnes varem poder copsar la situació científico-tècnica i socio-econòmica actual tant a nivell estatal com a nivell internacional. Fou llavors quan vaig definir una mica més el meu camp d'estudi centrant-me en l'ictiopatologia, en veure com estava de

poc desenvolupada a l'estat espanyol respecte d'altres països i la importància que presenta la sanitat en els cultius.

Posteriorment el Pla comprenia dues fases de formació pràctica: una dintre de l'estat espanyol i l'altra a l'estranger. En la primera vaig tenir com a destinació els Departaments de Zoologia-Vertebrats i Microbiologia (aquest darrer principalment) d'aquesta Facultat. Els meus directors i supervisors científics foren el Dr. Jacint Nadal i el Dr. Joan Jofre respectivament per cada Departament, i als qui agraeixo els seus consells i el seu assessorament. Aquesta etapa em resultà molt útil per a familiaritzar-me amb diferents tècniques de diversos camps (Histologia, Bacteriologia, Virologia, Sistemàtica i Filogènia, etc.).

Al gener de 1986 em vaig incorporar al National Fish Health Laboratory situat a Leetown (West Virginia, USA). Aquest centre d'àmbit federal depèn del "Department of the Interior" del govern nord-americà i té com a objectius la recerca i l'assessorament tècnic institucional. El director del centre, el Dr. G.L. Bullock, em va facilitar de bon principi fer un rotatori pels diferents equips, cosa que em va permetre conèixer on es concentren actualment els esforços de recerca en l'ictiopatologia. Més tard em vaig centrar en l'estudi

d'un patogen, en concret, l'Aeromonas salmonicida. Aquest bacteri és l'agent causant de la furunculosi, una de les malalties que sovint es troba en les piscifactories i que produeix pèrdues considerables en la població afectada. Com posteriorment s'explica en la introducció general, han estat i encara són molts els estudis sobre els factors de virulència d'aquest patogen i diversos els intents de trobar una vacuna eficaç. Així fou com vaig iniciar els meus estudis sota l'assessorament científic del Dr. R.C. Cipriano. En saber que disposava de més temps d'estada en aquell país, els meus treballs varen ésser encaminats a la realització d'aquesta memòria sota la direcció del Dr. Joan Jofre i la supervisió del Dr. Rocco C. Cipriano.

Cal dir que sempre, en tot moment i en tots els centres o departaments que he estat en els darrers quasi quatre anys, he tingut un bon acolliment i ajuda pels companys. En especial, tot el personal del National Fish Health Laboratory, que m'ajudaren a fer més fàcil i agradable la meva estada als EUA. D'una manera especial vull agrair al Dr. R.C. Cipriano el seu ajut i orientació al llarg de tots aquests mesos de treball al seu costat. També dono les gràcies al Dr. Joan Jofre per la direcció d'aquesta memòria.

Molts han estat els companys i amics amb qui he compartit moltes hores i a qui vull fer-los aquesta consideració tot i que en l'anonimat. Vull esmentar, però, en Francesc Piferrer, perquè el nostre treball en equip sobre diferents aspectes des que vàrem començar tots dos el Pla de Formació m'ha estat indispensable en molts moments.

Aquest treball ha estat possible pel suport econòmic de la CAICYT a través del "1er Plan de Formación de Técnicos Superiores en Acuicultura", i agraeixo als seus organitzadors la confiança dipositada en la meva persona.

D'una manera molt especial he de donar moltes gràcies a la meva muller, Maria, a qui dedico aquesta memòria. M'ha ajudat als EUA com una eficient "technician" tot i que la biologia no és el seu camp. En tot moment m'ha donat el toc just de serenitat, empena i comprensió que, com tot humà, he necessitat.

Ara bé, tot el camí fet en els darrers anys no hauria estat possible sense la confiança, el suport, el sacrifici i l'esforç que ha fet tota la meva família. Especialment els meus pares, de qui he rebut molt del que sóc i de qui he après una gran lliçó en "no tallar mai les ales" a cap dels seus fills perquè poguéssim abastar els nostres somnis. Gràcies.

1. INTRODUCCIÓ GENERAL.

1.1. CARACTERÍSTIQUES GENERALS.

En les darreres dècades, l'Aqüicultura s'ha anat consolidant com un sector econòmic important en la nostra societat. Ara bé, el seu desenvolupament no ha estat per un igual en l'ample ventall d'espècies cultivables. En concret, la piscicultura, i més específicament el cultiu de Salmònids, han adquirit un desenvolupament considerable. Aquesta situació fa incrementar els esforços de recerca per a millorar les tècniques de cultiu i solucionar els diferents problemes que van apareixent.

Un àmbit important és el sanitari. En aquest han estat i encara són molts els estudis de la malaltia coneguda com furunculosi. Aquesta produeix pèrdues econòmiques considerables en les piscifactories de Salmònids. L'agent causant d'ella és un coco-bacil gram negatiu, anomenat Aeromonas salmonicida. Aquest bacteri es classifica dintre la família de les Vibrionàcies essent citocrom-oxidasa positiu, presenta motilitat negativa, creixement òptim entre 22 -25 C i no creix a 37 C. Les colònies són circulars, poden ésser rugoses o llises. Alguns aïllaments produeixen un pigment fosc soluble en aigua quan creix en TSA. Es anaeròbic facultatiu per la glucosa i gelatinasa positiu tal com



s'indica en el Bergey's Manual of Systematic Bacteriology (1984). Actualment es classifiquen tres subspècies dintre aquesta espècie: *A. s.* subsp. *salmonicida*, *A. s.* subsp. *achromogenes* i *A. s.* subsp. *masoucida*, les quals presenten certes diferències metabòliques (Taula 1).

Fou descrit per primer cop per Lehmann & Neumann en 1896 segons el Bergey's Manual of Systematic Bacteriology (1984), tot i que Bullock et al. (1983) citen a Emmerich & Weibel (1890) com els primers que varen descriure'l com el causant de la furoncolosi a Alemanya. Posteriorment i més en els darrers anys alguns autors han indicat que *A. salmonicida* o les seves variants atípiques (subspècies) també produeixen diferents malalties en d'altres espècies de peixos no Salmònids (McFadden, 1970). Podem citar l'eritrodermatitis en *Cyprinus carpio* (Bootsma et al., 1977; Gayer et al., 1980), "goldfish ulcer disease" en *Carassius auratus* (Elliot & Shotts, 1980 a i b; Shotts et al., 1980), "ulcer disease of trout" (Paterson et al., 1980) i infeccions septicèmiques en *Morone mississippiensis* (Bulkley, 1969), *Micropterus dolomieu* (Le Tendre et al., 1972), *Abramis abramis* i *Rutilus rutilus* (McCarthy, 1975 a), *Anoploma fimbria* (Evelyn, 1971), *Phoxinus phoxinus* (Hästein et al., 1978), *Solea*

solea (Fluchter, 1979).

Taula 1: Diferenciació de les subspècies d'Aeromonas salmonicida.

	<u>Aeromonas salmonicida</u>		
	<u>salmonicida</u>	<u>achromogenes</u>	<u>masoucida</u>
Pigment en TSA	+	-	-
Indol	-	+	+
Esculina	+	-	+
L-Àrabinosa	+	-	+
Sucrosa	-	+	+
Manitol	+	-	+

1.2. SIGNES CLÍNICS I PATOLOGIA.

La simptomatologia associada a la furunculosi està exposada per diversos autors (Herman, 1968; McCraw, 1953; McCarthy & Roberts, 1980; Cipriano, 1983 a). Les infeccions agudes en alevins es caracteritzen per un ràpid enfosquiment epitelial i una lleugera exoftalmia seguida de la mort. Si els individus són adults aquest mateix tipus d'infeccions produeix, prèviament a la mort, un enfosquiment epitelial, hemorràgies a la base de les aletes, aparició de furòncols i inapetència. També es presenten infeccions cròniques en exemplars adults els quals tenen alguns furòncols al llarg del seu cos que estan formats per una exsudació tissular, teixit necròtic i alguns macròfags (Bullock et al., 1983).

En un estudi macroscòpic intern d'una infecció aguda es veuen hemorràgies a les parets abdominals, al tub digestiu i al cor, una melsa crescuda i de color roig viu, el teixit renal tou i un fetge pàl·lid que pot presentar hemorràgies subcapsulars o focus necròtics. L'estómac i l'intestí no contenen restes de menjar i en el seu lumen, s'hi troba una supuració formada per mucus, sang i cèl·lules epitelials. En el cas d'infeccions cròniques els Salmònids afectats presenten una congestió

visceral general i peritonitis, el ronyò blanquinòs i hemorràgies en la zona pilòrica i en el fetge.

1.3. D I A G N Ò S T I C . P R E V E N C I Ó . T R A C T A M E N T .

Diagnòstic

Un diagnòstic definitiu de furoncolosi requereix sempre aïllar i identificar l'A. salmonicida per proves bioquímiques. Tant les soques típiques com les atípiques són bacils gram negatius, motilitat negativa, citocrom-oxidasa positius i fermenten la glucosa. Com a diagnòstics presumptius es poden realitzar diferents tècniques serològiques com microaglutinacions, immunofluorescències o immunotincions (Rabb et al., 1964; McCarthy & Rawle, 1975; McCarthy et al., 1977; Eurell et al., 1979). Cal tenir en compte que hi poden haver reaccions inespecífiques, com demostren Pyle & Cipriano (1986), en utilitzar un sèrum de conill contra cèl.lules completes d'A. salmonicida trobant reaccions creuades amb A. hydrophila. En aquestes situacions és aconsellable l'ús d'un antiserum contra el lipopolisacàrid d'A. salmonicida perquè és altament específic a causa de l'homogeneïtat serològica que presenta pel lipopolisacàrid (Pyle & Cipriano, 1986; Aoki & Trust, 1984; Chart et al., 1984).

Prevenció

La infecció es pot evitar si s'obtenen els ous i els peixos de zones certificades com a lliures de furoncolosi. Si els ous procedeixen d'un lloc sense certificació, cal desinfectar-los tan prompte arribin i mantenir-los aïllats dels altres lots per evitar el contacte entre ells o l'ús de les mateixes aigües. Si la remesa és de peixos sense cap mena de certificació sanitària, cal tenir-los en quarantena per evitar qualsevol tipus de contacte o barreja d'aigües o d'altres peixos. També cal desinfectar tot el material on s'ha fet el transport, tancs o aquaris i eines de treball. Aquestes darreres s'utilitzaran estrictament només per als ous o pels peixos rebuts.

Els millors desinfectants per als ous són els iodòfors o complexos de iode amb solvents orgànics inerts, sotmetent-los a un bany de 10-15 minuts en una concentració de 100 ppm a pH 7, i a una temperatura de 10 -15 C (Bullock et al., 1983). Immediatament després cal esbandir-los o bé col·locar-los en la incubadora amb un bon flux d'aigua. Els iodòfors, a la concentració indicada, no són tòxics per als ous embrionats, però si que ho són per als alevins. Cal indicar que McCarthy (1977) trobà que un tractament de 10 minuts amb 50 o 100

ppm de iode en ous embrionats i artificialment infectats no fou suficient per matar a l'*A. salmonicida*, però que una exposició de 30 minuts a una dissolució de 1000 ppm d'acriflavina ho aconsegueix. D'altres tractaments també eficients són l'ozon (Wedemeyer & Nelson, 1977; Colberg & Lingg, 1978) i la irradiació amb ultravioleta (Bullock & Stuckey, 1977).

La transmissió horitzontal (McCarthy & Roberts, 1980; Cipriano, 1982 a) i vertical són possibles vies de disseminació tot i que la segona no és una ruta significativa d'infecció, tal com indica McCarthy (1977). La selecció de races resistents a la furoncolosi dintre la població ictica pot resultar la millor prevenció i la més recomanable en àrees on la furoncolosi és enzoòtica (Ehlinger, 1964; Cipriano, 1983 b i c).

Tractament

La furoncolosi ha estat la primera malaltia de peixos tractada amb antimicrobians actuals -sulfonamides i nitrofurans- (Gutsell, 1948). Tot i que hi ha una gran varietat de drogues per a la seva teràpia, un parell d'elles són les més aconsellables (Herman, 1970):

- Sulfamerazina, en una dosi de 200 mgrs per quilo de peix fresc i per dia durant un màxim de dues

setmanes. Es aconsellable per a Salmo gairdneri i Salvelinus fontinalis. Aquest producte inhibeix el creixement a Salmo trutta (Snieszko & Wood, 1955) i per tant s'ha d'evitar el seu ús en aquesta espècie.

- Oxitetraciclina, per a totes les espècies de Salmònids en una dosi de 50-80 mg per quilo de peix fresc i per dia durant uns 10 dies.

Qualsevol tractament acabarà com a mínim tres setmanes abans que els peixos vagin al mercat, o més temps si les regulacions per a l'ús d'una droga així ho requereixen.

1.4. FACTORS DE VIRULÈNCIA.

En 1935, Mackie et al., caracteritzen histopatològicament la furoncolosi com una leucopènia aguda i proteolisi de determinats teixits, indicant-ho com a factors de virulència. Tambè varen notar que el grau de virulència de les soques d'A. salmonicida disminuïa al llarg del temps quan es mantenien en medis de cultiu en el laboratori. Uns anys més tard Duff (1937, 1939) fa una primera diferenciació basada en la presència o absència d'un antigen indeterminat i la morfologia colonial. Aquest autor classificà les colònies en dos tipus: rugoses que precipiten en el medi de cultiu que presenten l'antigen addicional i no són patògenes, i les que són llises que estan en solució estable en el brou de cultiu, no presenten l'antigen addicional i són patògenes. Aquesta classificació fou errònea tal com 40 anys més tard Udey (1977) va demostrar al detectar la presència d'un embolcall addicional a la membrana externa de la paret cel.lular (Munro, 1984). Va anomenar-la "A-layer" (capa-A), i les soques que la tenien presentaven una morfologia colonial rugosa, autoaglutinaven i eren virulentes. Per altra banda diferenciava les colònies llises, que no tenen la capa-A, no autoaglutinen i han perdut la virulència (Udey & Fryer, 1978).

Durant aquest període de 40 anys es considerava una homogeneïtat serològica dintre A. salmonicida. Els primers estudis, fets per Willianson, daten de 1928 i no tingueren èxit a causa de l'autoaglutinació del bacteri. Blake & Anderson (1930) utilitzaren la tècnica de fixació del complement i obtingueren una reacció positiva per totes les 82 soques estudiades. Duff (1939) va indicar la presència d'un antigen addicional en les seves colònies rugoses, i va anotar una possible diferència. En 1961 Ewing et al. estudiaren 21 soques d'A. salmonicida utilitzant diversos tests serològics, i van trobar una forta homogeneïtat dintre d'aquesta espècie, però ja detectaren reaccions creuades amb sèrum contra A. hydrophila. Liu (1961) parlà d'homogeneïtat dintre l'espècie però també cità reaccions creuades d'A. hydrophila amb anti-sèrum contra A. salmonicida, tot i que no es donaven quan provava les soques de la darrera enfront de l'anti-sèrum contra A. hydrophila. Karlsson (1964) no va trobar diferències entre els antigens termoestables i termolàbils de 12 aïllaments d'A. salmonicida. Spence et al. (1965) en els seus treballs d'immunització activa i passiva en Oncorhynchus kitsutch també ressenyaren una homogeneïtat serològica dintre d'A. salmonicida.

Bullock (1966), utilitzant antigens solubles d'A.

salmonicida i d'A. hydrophila, va trobar també reaccions creuades quan realitzava els tests d'aglutinació i precipitació. Sandvick & Hagan (1968) en un estudi enzimo-serològic detectaren també reaccions creuades entre les dues espècies.

En 1968, Klontz & Anderson examinen 24 aïllaments amb tres antisèrums diferents utilitzant el test d'immunofluorescència indirecta. Basant-se en el resultat positiu o negatiu de cada soca respecte de cada antisèrum, digueren que existien un mínim de 7 serotips diferents. Aquests resultats erronis cal adjudicar-los a la poca precisió del test com a mètode per a anàlisis serològiques, tot i que pugui ser un test pràctic per a un ràpid diagnòstic de la furoncolosi.

Popoff (1969) compara 39 soques d'A. salmonicida pel que fa a les seves característiques bioquímiques i serològiques i anota una remarcable homogeneïtat en totes dues.

Com s'ha dit anteriorment, no fou fins el 1978 que Udey & Fryer detectaren la presència de l'embolcall extern addicional o capa-A en algunes soques diferenciant-les clarament de les altres. Per fi, en 1980, Paterson et al. diferencien dos grups serològics segons la composició antigènica, i també confirmen que A.

salmonicida comparteix almenys un antigen amb A. hydrophila. Hahnel et al. (1983) comparant 8 soques virulentes aïllades del medi natural a Nord-amèrica i les seves 8 formes avirulentes i no autoaglutinants induïdes en el laboratori, demostren la presència d'un antigen addicional comú a totes les soques virulentes.

Aoki & Trust (1984) i Pyle & Cipriano (1986) comproven l'homogeneïtat antigènica d'A. salmonicida respecte el lipopolisacàrid, remarcant l'especificitat d'aquest per l'espècie. També trobaren reaccions serològiques creuades amb A. hydrophila però degudes a antígens comuns extracel·lulars.

La conclusió de tots aquests treballs és que en A. salmonicida hi ha una homogeneïtat del lipopolisacàrid, que hi ha una diversitat serològica deguda majoritàriament a la presència o absència de la capa-A i que presenta una sèrie de reaccions creuades amb A. hydrophila degut a antígens extracel·lulars (Hastings & Ellis, 1985; Titball & Munn, 1985).

Hi han d'altres factors de tipus enzimàtic associats a la furoncolosi. En 1944, Field et al. realitzen un estudi de la seqüència de reaccions bioquímiques que presentava Cyprinus carpio davant d'una infecció experimental d'A. salmonicida. Trobaren una ràpida baixada del nivell de sucres en sang que causava

un "shock" hipoglucèmic que provocaria la mort. Aquesta disminució de glucosa en sang és deguda al fet que el bacteri la utilitza en la seva multiplicació. També detectaren un augment del nivell de creatines, com a resultat de la destrucció del teixit muscular, i un increment d'urea en la sang. Més tard Griffin (1954) suggereix que la hipoglucèmia observada per Field et al. pot causar-la un compost farmacològicament actiu; que la leucopènia ressenyada per Mackie et al. (1935) pot ser el resultat d'una producció "in vivo" per part del bacteri d'una substància leucocitolítica; i que la producció d'hemolisines "in vitro" no deu tenir un paper gaire important en la malaltia. En 1962, Karlsson troba que els eritròcits de salmó són més sensibles "in vitro" a l'hemolisina produïda per *A. salmonicida* que no pas els eritròcits d'humans, de cavall o de conillet d'Índies. Klontz et al., en 1966, troben una substància extracel·lular leucocitolítica que destrueix la resposta inflamatòria en els peixos, cosa que reafirmà les valoracions de Griffin. Shieh & MacLean (1975) purificaren una proteasa extracel·lular obtinguda dels sobrenedants d'un cultiu del bacteri, tot i que els seus experiments no eren orientats a determinar els efectes patogènics d'aquesta proteasa. En un estudi del sèrum de

peixos infectats varen trobar alts nivells d'aminoàcids i compostos nitrogenats, aldolasa, creatina-fosfokinasa derivats de les proteïnes musculars, i un alt nivell d'ornitina-carbamil-transferasa provinent de cèl.lules hepàtiques. Això els va fer suposar que no devia ser la hipoglucèmia anotada per Field et al. la causant de la mort, sinó una proteolisi dels teixits de l'organisme infectat donada per enzims d'origen bacterià (Shieh & MacLean, 1976; Shieh, 1978).

A partir del que s'ha exposat anteriorment podem classificar els factors de virulència en dos grups: els associats a la cèl.lula o cel.lulars (lipopolisacàrid i capa-A) i els extracel.lulars amb diferents activitats enzimàtiques.

1.4.1. Factors de virulència cel.lulars.

Udey & Fryer (1978) demostren, per mitjà d'observacions al microscopi electrònic, que les soques virulentes d'A. salmonicida tenen un embolcall addicional extern a la paret cel.lular que no presenten les soques avirulentes. La presència d'aquesta capa proteica que anomenen "A-layer" es correspon amb les propietats d'autoaglutinació i adhesió als teixits de peixos i cultius cel.lulars. Trust et al. (1980), també mitjançant



microscopia electrònica, demostren que la capa-A és present en una soca atípica aïllada d'un Carassius auratus i li calculen un pes molecular de 50,000 dàltons. Hubbert & Brain (1980) ho demostren en una soca acromogènica i virulenta aïllada de Rutilus rutilus i indiquen que la capa-A és formada per subunitats tetragonals de 7.5-11 nm. Els mateixos autors troben que la capa-A no és present en una soca avirulenta i cromogènica aïllada de Salmo gairdneri. Hamilton et al. (1981) veuen que es pot inhibir la formació de la capa-A incorporant un 0.25 % de clorur de liti en el medi de cultiu. Ishiguro et al. (1981) i Ishiguro & Trust (1981) demostren que si es cultiva una soca d'A. salmonicida a temperatures més altes de les òptimes perd la virulència, la capacitat d'autoaglutinar, la capa-A i passa de tenir morfologia colonial rugosa a tenir-la llisa. Kay et al. (1981) purifiquen la proteïna constituent de la capa-A (proteïna-A) i li calculen un pes molecular de 49,500 dàltons.

Munn et al. (1982), en uns estudis de resistència de les diferents soques a sèrums normal i immune de truita, de conill o d'home, troben que les soques virulentes (amb capa-A) tenen una resistència alta o intermèdia a l'activitat bactericida del complement, sigui o no present l'anticòs específic. Les soques que no

tenen la capa-A i presenten complet el lipopolisacàrid (LPS) respecte de l'antigen-O tenen diferents nivells de resistència als sèrums. Finalment, les soques sense la capa-A i sense l'antigen-O en el LPS són sensibles a l'acció del complement en tot tipus de sèrum. Cipriano (1987 i comunicació personal) demostra una clara relació entre la presència de la proteïna-A i la resistència al sèrum. La diferència dels resultats d'aquest autor als dels anteriors és que Cipriano clona i valora les soques per assegurar que el 100 % de les cèl.lules dels cultius utilitzats presenten la composició antigènica desitjada per a cada grup estudiat. Això explicaria la diversitat de sensibilitat al sèrum trobada per Munn et al. dintre de cada grup.

En 1983, Phipps et al. arriben a la conclusió que la proteïna-A no presenta activitat enzimàtica però que és una barrera refractària macromolecular essencial per a la virulència.

Paral·lelament als estudis anteriors, Evenberg et al. (1982 I) i Evenberg & Lugtenberg (1982 II) estudien la capa-A i conclouen que és majoritàriament formada per una proteïna (ACE: Additional Cell Envelope) que forma les subunitats tetragonals, i que hi ha una estreta relació entre la seva presència, l'autoaglutinació,

l'adhesió al mucus de l'epidermis dels peixos o a la superfície de les cèl·lules i la virulència. Li calculen un pes molecular de 54.000 dàltons. Es insoluble en aigua i la seqüència terminal d'aminoàcids és H N-Asp-Val-Leu-²Leu. No presenta aminoàcids amb grups sulfur ni residus de sucres, i té una composició d'aminoàcids semblant a la fimbria adhesiva K 88 d'E. coli i a la proteïna d'un porus de la membrana exterior d'E. coli K 12. El mateix grup d'autors (Evenberg et al., 1985) estudien el LPS i l'ACE i arriben a les següents conclusions:

1- L'antigen-O del LPS es pot perdre en subcultius del bacteri en medis de creixement, havent perdut prèviament la capacitat de produir l'ACE.

2- L'antigen-O i l'ACE són els antigens més importants de la membrana exterior, tot i que detecten la presència d'un altre antigen de tipus polisacàrid que anomenen PS-antigen.

3- La lipoproteïna de la membrana exterior no és accessible als anticossos.

4- La presència del LPS d'alt pes molecular (HMW-LPS o antigen-O) podria ser un desavantatge selectiu en l'absència de l'ACE.

5- Mai no ha estat observada la falta del HMW-LPS amb la presència de l'ACE.

Amb aquestes conclusions elaboren un model de la

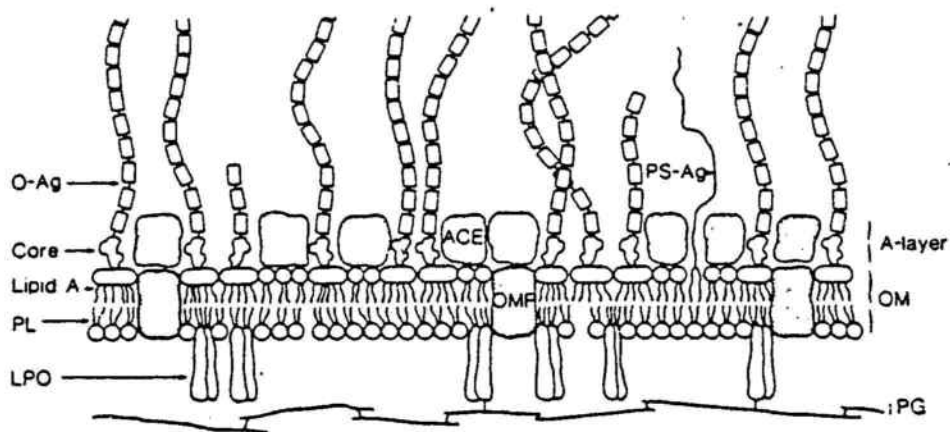


Figura 1. Model molecular de la membrana externa d'*A. salmonicida* segons Evenberg et al. 1985. O-Ag: antigen-O, ACE: Embolcall adicional cel.lular (subunitats de la proteïna-A), PS-Ag: antigen de tipus polisacàrid capsular, OM: membrana externa, OMP: proteïnes de la membrana externa PL: fosfolípids, LPO: lipoproteïnes, PG: capa del glucopèptid.

membrana exterior d'A. salmonicida en la seva variant virulenta (Figura 1).

Kay et al. (1986) assenyalen que l'ACE és associada al LPS, essent aquest darrer essencial per mantenir la integritat de la capa-A. Indiquen que els mutants no posseïdors de l'antigen-O són invariablement ACE negatius. També comproven que la capa-A és una protecció física completa per als components de la membrana exterior davant de l'acció del complement, la digestió proteolítica i els bacteriòfags. Les soques deficientes de capa-A són eliminades ràpidament pels macròfags dels peixos, mentre que el fet de posseir la capa-A li dóna protecció al bacteri davant l'absorció pels macròfags i resistència a l'activitat lítica dels fagòcits. També Sakai & Kimura (1985) estudiant l'autoaglutinació en diferents aïllaments d'A. salmonicida arriben a la conclusió que les soques que autoaglutinen tenen la capacitat d'escapar dels mecanismes de defensa de l'hoste perquè resisteixen l'activitat bactericida del sèrum i la fagocitosi dels leucòcits.

Per altra banda, Parker & Munn (1985) demostren que les soques virulentes, amb autoaglutinació i ACE positiu aglutinen els eritròcits de truita i de diferents mamífers i presenten adhesió a les cèl.lules de línies de

cultiu d'origen humà o ictic. Quan les soques són ACE negatives no presenten aquestes característiques. Comproven que la manosa, la glucosa, la fucosa i la galactosa no inhibeixen el procés d'hemoaglutinació, de la qual cosa conclouen que l'adhesió produïda per A. salmonicida no és específica sinó una conseqüència de la marcada hidrofobicitat que confereix la capa-A.

Per tant, en la membrana externa d'A. salmonicida hi trobem presents dos antígens: l'antigen-O i l'ACE. Un d'ells es presenta com un factor estretament relacionat amb la virulència, la proteïna-A (ACE).

1.4.2. Factors de virulència extracel·lulars.

Proteasa

Shieh & McLean (1975) foren els primers a detectar la presència d'una proteasa en els sobrenedants d'un cultiu d'A. salmonicida. La proteasa tenia un òptim de temperatura de 60 C, pH òptim de 10.5, pes molecular 11,000 dàltons i, que com era sensible al PMSF (Phenylmethano Sulphonyl Fluoride), la determinaren com una serin-proteasa.

Sakai (1977) estudiant 77 aïllaments procedents de Salmònids en el Japó, va trobar que tots produïen

proteasa extracel.lular la qual era un enzim caseinolític. Aquesta, injectada intramuscularment (i.m.), produïa els típics furòncols en el teixit muscular del peix. Quan utilitzava mutants deficients de proteasa induïts amb NTG (N-metil-N-nitro-N-nitrosoguanidina), va comprovar que havien perdut la virulència i que els sobrenedants injectats i.m. en salmons no produïen furòncols. D'aquests resultats va concloure la importància de la proteasa per a la virulència.

Munro et al. (1980) demostraren que els productes extracel.lulars (ECP) d'una soca avirulenta i proteïna-A negativa eren molt ictiotòxics per injecció intracelomàtica (i.c.) o intramuscular; aquesta darrera via d'administració produïa furòncols. La via intracelomàtica en els Teleostis és l'equivalent de la via intraperitoneal en els vertebrats superiors. Els primers no tenen dividida la cavitat celomàtica mentre que els segons la tenen separada en una cavitat toràcica i una ventral (peritoneu) pel diafragma. Munro et al. (1980) trobaren que els productes extracel.lulars tenien també activitats hemolítiques i leucocitolítiques, eren tòxics per al cultiu cel.lular RTG-2 i altament caseinolítics. Comprovaren que el sèrum normal de Salmo gairdneri podia neutralitzar la toxicitat i l'activitat

caseïnolítica i hemolítica. Tambè Ellis et al. (1981), utilitzant injeccions i.m. i i.c. de productes extracel.lulars, reproduïen en S. gairdneri la patologia d'una furoncolosi aguda.

Sheeran & Smith (1981) i Sheeran et al. (1983), utilitzant una soca salvatge virulenta aïllada de Salmo salar a Irlanda, demostraren la presència d'una segona proteasa. Aquesta mostrava activitat gelatinasa i colagenasa, però no caseïnasa. Fou inhibida per l'EDTA, i per tant la consideraren un metalo-enzim. Un cop purificada i injectada, no va presentar ictiotoxicitat.

Cipriano et al. (1981), mitjançant una columna de Sephadex, separen i purifiquen quatre factors o components dels productes extracel.lulars procedents de soques virulentes i de soques avirulentes. La fracciò II té propietats leucocitolítiques i proteolítiques, i les fraccions I, III i IV presenten activitat citolítica en RTG-2 i no estan relacionades ni amb la leucocitolisi ni proteolisi. Conclou que la virulència del patogen no és associada amb la leucocitotoxicitat però sí que ho és a l'activitat de la proteasa, coincidint amb les observacions de Sakai (1977). Troba que les soques virulentes produeixen més toxines, especialment per les fraccions II i III. En un treball posterior, Cipriano

(1982 c) demostra la citotoxicitat "in vitro" i el caràcter immunogènic de la fracció IV, caracteritzada com una glicoproteïna amb pes molecular de la part proteica de 66.000 dàltons, la reacció negativa de l'antisèrum de conill preparat contra aquesta fracció davant el LPS o la proteïna-A.

D'altres autors també assenyalen haver separat una proteasa dels sobrenedants dels cultius virulents (Møllergaard, 1983) o avirulents (Findley, 1983). Aquesta presenta una temperatura òptima de 48-50 °C, pH òptim de 9, és sensible al PMSF, té un pes molecular entre 70,000 i 87,000 dàltons i produeix les lesions característiques de la furoncolosi quan s'injecta per via i.m.

Sakai (1985) demostra la pèrdua de la virulència en un mutant proteasa deficient procedent d'una soca virulenta i productora de proteasa. El mutant continua presentant autoaglutinació, hemoaglutinació, resistència al sèrum, adhesió cel·lular i és hemolisina i leucocitolisina positiu. Aquestes característiques també les presenta la soca virulenta d'origen del mutant. Aquesta darrera es mostra altament infectiva i proliferativa en Salmo gairdneri contrastant amb el mutant que és eliminat ràpidament per l'hoste. Amb això Sakai indica que la proteasa extracel·lular és el factor de virulència més important en la furoncolosi. El mateix

autor Sakai, en 1987, aconseguix la transmissió dels gens de proteasa des d'una soca virulenta d'A. salmonicida, una soca virulenta d'A. hydrophila, una no virulenta de Pseudomonas fluorescens i una virulenta de Vibrio anguillarum, al mutant proteasa deficient i no virulent d'A. salmonicida. Aquest passa a ser productor de proteasa i virulent per S. gairdneri si la soca donant ho és, a excepció quan el donant és V. anguillarum que és virulent i el seu receptor no ho és.

Leucocidina

Fuller et al. (1977) aïllen i purifiquen una glicoproteïna leucocitolítica dels sobrenedants del cultiu d'una soca virulenta i salvatge, i també d'una avirulenta. Quan injecten S. gairdneri amb aquesta glicoproteïna detecten una disminució del 66 % de leucòcits a les 5 hores. També comproven que l'anticòs específic pel LPS no reacciona amb aquest factor leucocitolític. Per altra banda Munro et al. (1980) troben que els productes extracel·lulars d'una soca avirulenta presenten una alta activitat lítica pels macròfags i eritròcits de S. gairdneri. Cipriano et al. (1981) també troben activitat leucocitolítica en la seva fracció II, que és aïllada i purificada dels productes

extracel.lulars com ja s'ha indicat anteriorment.

Fosfolipasa

MacIntyre et al. (1979) demostren que els sobrenedants d'un cultiu d'A. salmonicida reaccionen amb les membranes d'eritròcits humans i produeixen àcids grassos, fosfats solubles i ester de colesterol, el que indica l'activitat d'una fosfolipasa-A i d'altres enzims. Més tard, MacIntyre et al. (1980) i Buckley et al. (1982) troben tres activitats enzimàtiques en una proteïna extracel.lular de pes molecular 24,000 dàltons: fosfolipasa, lisofosfolipasa i colesterol-aciltransferasa.

Hemolisina

Titball & Munn (1981) demostren la presència de dues hemolisines en els sobrenedants: una H-eritrolisina (Horse-erythrocytelysin) i una T-eritrolisina (Trout-erythrocytelysin). Totes dues es produeixen al final de la fase logarítmica del cultiu o al principi de la fase estacionària. Nomura & Saito (1982) també detecten hemolisines extracel.lulars utilitzant eritròcits de S. gairdneri.

Titball & Munn (1985) no aprecien diferències

entre els nivells finals de productes extracel·lulars de les soques virulentes i capa-A positives, i els de les soques avirulentes i capa-A negatives. Això els fa suposar que els productes extracel·lulars no són determinants de la virulència tot i que actuarien com a factors d'agressió. La formació dels productes extracel·lulars en les soques capa-A negatives fou detectada al final de la fase logarítmica del cultiu, mentre que en el cas de les soques capa-A positives es dona més tard i ja dintre la fase estacionària. Aquests autors conclouen que la capa-A actuaria com una barrera per la pròpia cèl·lula al retardar l'alliberament dels productes extracel·lulars, i suposen que aquest desavantatge per les soques capa-A positives vindria compensat pel paper de resistència que confereix la capa-A davant dels mecanismes de defensa de l'hoste.

1.5. V A C U N E S E X P E R I M E N T A L S .

Els primers intents de vacunació contra la furoncolosi els féu Duff en 1939, estudiant la relació serològica de les diferents variants colonials d'A. salmonicida. Smith (1940) també demostrà la formació d'aglutinines en la carpa i en la truita. En 1942, Duff va realitzar uns experiments d'immunització amb A. salmonicida obtenint uns resultats que no han estat superats i encara avui tenen vigència. Aquest mateix autor, uns anys abans, va descriure les diferents formes colonials d'aquest organisme buscant la relació entre la seva virulència i la naturalesa serològica (Duff, 1932, 1937 i 1939). En aquesta sèrie de treballs se sosté la solidesa de la seva immunització en 1942, ja que possiblement va utilitzar cultius d'una soca virulenta amb completa dotació antigènica per a la preparació de la seva vacuna. L'espècie immunitzada fou Salmo clarkii i ho va fer per via oral barrejant la vacuna amb una dieta humida d'un 25 % de fetge de vedella i un 75 % de salmò en conserva. La vacuna consistia amb un cultiu d'A. salmonicida durant 4 dies a 22^o -25^o C inactivant-ho amb cloroform. Com Duff mateix va indicar, el tipus de dieta utilitzada contribuïa a prevenir la destrucció de certs antígens en l'estòmac permetent que passessin a l'intestí

per a la seva posterior absorció. S'indueïa la furoncolosi per un bany en una suspensió bacteriana a 19 ° C de temperatura. També va fer-ho per via intracelomàtica i per transmissió horitzontal afegint als aquaris truites infectades. En tots els casos, el percentatge de mortalitat dels exemplars immunitzats fou menor que el dels controls. Va mesurar el títol d'aglutinines veient que aquest era més alt en valors mitjans en els peixos immunitzats (m= 80). Va indicar que alguns peixos del control presentaven títols considerables, essent la mitjana de 20, tot i que procedien d'una piscifactoria sense historial de furoncolosi. Alguns peixos immunitzats no varen presentar aglutinines. Duff mai no va intentar passar aquesta experiència a nivell pilot en el medi.

Snieszko & Friddle (1949) utilitzen una vacuna oral de cèl.lules inactivades per calor, i l'administren a Salvelinus fontinalis en un bany de 53 -55 ° C durant 1 hora. No presentaven protecció quan s'indueïa la malaltia per injecció i.c., però sí que en tenien quan la infecció provenia del medi natural. En aquest mateix estudi comprovaren l'eficàcia de les sulfamides per al control de la furoncolosi. Això darrer, va ser tan exitós que en la dècada següent van minvar considerablement els

treballs d'immunització fins que l'aparició de soques resistents en les piscifactories va fer revifar la recerca d'una vacuna.

Krantz et al. (1963) vacunen parentalment Salmo trutta amb cèl.lules inactivades amb formol, conjuntament amb una emulsió d'oli mineral com a adjuvant. La soca era virulenta i aïllada de Salvelinus fontinalis. La inducció de la furoncolosi (challenge) fou per via i.m., i moriren tots els peixos control mentre que no ho feren cap dels immunitzats. Trobaren alts títols d'aglutinines (1472 - 3280) en els peixos immunitzats, i considerablement menors en els controls (0 - 41). Ara bé, la DL50 utilitzada en el "challenge" fou molt alta (10⁸ - 10⁹ CFU/peix) la qual cosa fa suposar que utilitzaren una soca avirulenta tant per a la immunització com per al "challenge".

Spence et al. (1965) realitzaren una immunització passiva en Oncorhynchus kisutch amb sèrum immune de truita irisada contra A. salmonicida. Els salmons immunitzats presentaren una mortalitat del 70 % davant d'una del 90 % en els controls (no tractats o tractats amb sèrum normal de truita irisada). També provaren una immunització per via oral que no va donar resultats positius i on no detectaren aglutinines en els peixos immunitzats.

Klontz & Anderson (1970) exposen una sèrie d'intents de vacunació realitzats a finals de la dècada dels 60. Utilitzen una vacuna oral basada en un extracte soluble en aigua que és tòxic pels Salmònids. Procedeix de cèl.lules disruptades de cultius virulents d'A. salmonicida. Prepararen la vacuna, que anomenaren FSA, fent precipitar la toxina amb alum ($\text{NH}_4\text{Al}(\text{SO}_4)_2 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$). Els peixos immunitzats són O. kisutch que sotmeten a una furoncolosi natural als 94 dies de la vacunació. La mortalitat és del 58 % en els lots control i de 0 % en els immunitzats. Més tard porten a gran escala la immunització en tres piscifactories amb una preparació comercial de la vacuna FSA, però no hi ha protecció i les mortalitats en els lots immunitzats són iguals o superiors als controls. Tal i com comenta Munro (1984), la conclusió d'aquests treballs és que no identifiquen l'antigen o els antígens importants i necessaris per a conferir immunitat i, consegüentment, a la vacuna comercial li manca la seva potencialitat.

Paterson & Fryer (1974 a) investigaren els efectes en alevins de salmò coho (O. kisutch) d'un gradient de dosis de lipopolisacàrids procedents de dues soques virulentes d'A. salmonicida. Les administraren per via i.c. Trobaren una bona resposta a la dosi més baixa de

l'antigen (1 µg/peix) comparant-ho amb la més alta (5 mg/peix). Aquesta incrementava molt poc el títol d'aglutinines i, encara no era una dosi tòxica. Immunitzant amb el LPS a tres temperatures (7^o, 12^o i 18 C) veieren que a 7 C quedava retardada i reduïda la immuno-resposta. En un altre treball, Paterson & Fryer (1974 b) administraren intracel·lomàticament cèl·lules d'A. salmonicida inactivades amb formol i adjuvant (FCA: Freund's Complete Adjuvant) a alevins de 1.2 gr de salmò coho en una proporció de 1:1. Trobaren una bona resposta d'aglutinació i protecció contra la furoncolosi. Aquestes persisteixen, com a mínim, un any després de la injecció. Aquest fet contrasta amb la duració de la immuno-resposta quan injectaren només LPS que disminuïa després de 5 o 6 setmanes.

Udey & Fryer (1978) compararen l'eficàcia de quatre vacunes en el salmò coho, tres d'elles per via oral: cèl·lules inactivades amb formol, cèl·lules inactivades amb formol més Al(OH)₃ i la vacuna comercial FSA de Klontz & Anderson. L'altra era per via i.c. i eren cèl·lules inactivades amb formol més adjuvant (FCA). Tots els grups varen ésser exposats després de 45 dies a una epizoòtia natural en una piscifactoria utilitzant un sumistre d'aigua procedent d'una bassa amb furoncolosi. Cap vacuna no va donar protecció completa. La més eficaç

fou la donada per via i.c. que va presentar una mortalitat del 2 % davant d'un 10 % dels lots control. Els peixos immunitzats per via oral presentaren un baix títol d'aglutinació davant l'alt títol dels injectats. Un tercer lot, on la vacuna va ser donada per les dues vies (i.c. i oral) mostrava un nivell baix d'aglutinines, cosa que els va fer concloure que la utilització d'una doble via suprimiria la resposta humoral.

Michel (1979) aïlla una soca d'A. salmonicida i utilitza la forma rugosa-virulenta i la seva mutant llisa-avirulenta en estudis de vacunació de S. gairdneri. Inactiva els cultius amb formol i administra les vacunes per via oral i per via intracelomàtica. Cap de les dues dona protecció quan s'indueix la malaltia per ruta intramuscular. Ara bé, els peixos immunitzats per via i.c. tenen alts títols d'aglutinació. Tampoc no troba cap diferència en la resposta sobre la utilització de soques llises o rugoses. En un segon experiment, immunitza S. gairdneri amb tres injeccions successives que administra setmanalment. Al cap d'un mes, els hi dona una injecció recordatori (booster). Fa el "challenge" per injecció i.c. en uns lots i per i.m. en d'altres. No troba protecció per al primer cas però sí per al segon. Alguns dels peixos que sobreviuen són portadors del bacteri. Ho

comprova pel mètode de Bullock & Stuckey (1975), que consisteix a augmentar de sobte la temperatura de l'aigua a 18 C, i facilitar el creixement del bacteri quan s'immunoreprimeix els sistemes de defensa mitjançant una injecció intramuscular de delta-hidro cortisona. Michel (1980 a, 1980 b) demostra que la infecció experimental per via i.m. és la més semblant a la infecció crònica de la malaltia, ja que comença localment en el teixit muscular i fins al tercer dia no la detecta en el ronyó. Michel & Faivre (1982) constaten que en alguns peixos que sobreviuen a la furunculosi es presenta un baix títol d'aglutinines que contrasta amb els alts títols que presenten molts dels peixos immunitzats experimentalment. Això, els fa realitzar una prova per veure la protecció que presenta S. gairdneri que ha sobreviscut a diferents rutes d'infecció experimental. Utilitzen tres grups: el primer injectat i.m. amb una dosi letal de 3,000 CFU/peix; el segon grup injectat i.m. amb la mateixa dosi letal però rep un tractament d'antibiòtic des del quart al sisè dia; i el tercer rep una dosi no-letal de 1,000 CFU/peix amb una freqüència mensual. Només el segon grup desenvolupa una resposta d'aglutinines significativa. Els supervivents de cada lot es sotmeten a un "challenge" per via i.m. Els resultats mostren que el nivell d'aglutinines no indica necessàriament una protecció

contra la furoncolosi.

Smith et al. (1980) proven una vacuna oral de cèl.lules d'A. salmonicida lisades amb SDS (Sodium Dodecylsulphate) i dues de cèl.lules procedents de diferents aïllaments que han lisat per ultrasons. Les administren per bany hiperosmòtic. Després, els peixos són traslladats a una piscifactoria amb historial anual de furoncolosi. Troben unes mortalitats del 35, 62 i 62 % respectivament, i anoten que les soques d'A. salmonicida aïllades dels peixos morts no tenen les mateixes característiques (no les indiquen) que les soques utilitzades per a la immunització. Cap de les tres vacunes dona aglutinines, però totes tres donen una immuno-resposta cel.lular (CMI: Cell-Mediated Immuneresponse) mesurada pel test d'inhibició dels leucòcits. Aquesta resposta és alta quan els leucòcits del peixos immunitzats són inhibits per l'antigen homòleg utilitzat en la immunització, però es presenta menor quan utilitzen l'antigen heteròleg procedent dels aïllaments d'A. salmonicida obtingut dels peixos morts. Aquesta variació podria ser una explicació de la pobra protecció obtinguda en proves en el medi natural i la que s'obté, normalment més alta, en el laboratori.

Anderson et al. (1979) també mesuren la resposta



cel.lular de S. gairdneri utilitzant el LPS d'A. salmonicida que extreuen pel mètode acetona-alcohol. Administren, a diferents dosis, l'antigen per immersió o per via i.c. Mesuren la resposta pel "Passive Haemolytic Plaques Assay" (Anderson, 1978) detectant les cèl.lules productores d'anticòs o de placa (PFC: Plaques Forming Cells). Aquestes són limfòcits de la melsa anomenades així a causa de la lisi que produeixen als eritròcits de be marcats amb el LPS homòleg d'A. salmonicida. Detecten resposta cel.lular amb totes dues vies però necessiten dosis tan altes com 500 µg LPS / peix en injecció i.c. o en immersió amb dosi de 500 µg LPS / ml. Cal qüestionar-se la validesa d'aquests resultats respecte allò que succeix en una infecció en el camp, ja que no utilitzen cèl.lules completes d'A. salmonicida, i per altra banda administren altes dosis de l'antigen purificat.

Palmer & Smith (1980) comparen dues vies d'administració. Una és un bany hiperosmòtic de 1.5 minuts que conté 5×10^8 bacteris inactivats/ml, i l'altra una injecció i.c. de 0.1 ml d'un cultiu inactivat de 2×10^9 cèl.lules amb FCA en una proporció de 1:1. Tot i que els resultats semblaven prometedors per obtenir una baixa mortalitat per immersió (0.5 %), que juntament amb la via oral sembla ser el mètode més econòmic d'immunització; no són vàlids perquè el "challenge"

natural a què es sotmeten és molt feble (mortalitat en els controls de 2.5 %) tal com els autors indiquen.

Cipriano (1982 b) repeteix els experiments de Spence et al. (1965) però canviant l'espècie passivament immunitzada. Immunitza passivament a Salvelinus fontinalis amb sèrum de S. gairdneri que havia estat infectat amb concentracions subletals de bacteris virulents i avirulents. Obté una mateixa protecció (80 % de supervivència) per als dos grups que reben els sèrums immunes, mentre que els peixos injectats amb sèrum normal tenen un 35 % de supervivència i els controls no injectats només viuen un 20 %. En un altre experiment prova tres vacunes per via i.c.: el primer grup amb cèl.lules inactivades amb formol i rentades, el segon grup amb cèl.lules inactivades amb formol i sense rentar, i un tercer grup amb un extracte dels productes extracel.lulars. Als 21 dies indueix la infecció experimental mitjançant un bany de 60 segons en un cultiu de 10^{-9} - 10^{-10} CFU/ml crescut durant 48 hores a 20 °C (Cipriano, 1982 a). El grup control dona un 100 % de mortalitat, els grups primer i segon donen un 97.5 % i el tercer un 55 %. Com a conseqüència d'aquests resultats Cipriano (1983 a) immunitza amb tres concentracions de productes extracel.lulars (1.4, 14, 140 µg ECP

proteïna/peix) en forma soluble o particulada mitjançant DEAE Sephadex. Els resultats són similars, ja que obté una mortalitat del 50 % per a totes les concentracions de la vacuna soluble; i del 60, 40 i 10 % (respectivament) per la vacuna particulada. Després prova d'immunitzar S. fontinalis amb els ECP per via oral (140 µg ECP proteïna/g dieta) durant 10 dies, per via i.c. (140 µg ECP proteïna/peix) i per immersió (140 µg ECP proteïna/ml). Valora l'eficàcia pel títol d'aglutinació, essent: 2458 per i.c., 512 pel bany i 154 per la via oral. Conclou, que la via més pràctica és la immersió ja que a escala comercial la via i.c. no és rendible.

Cipriano (1982 c) utilitza cada una de les quatre fraccions, que havia separat dels productes extracel·lulars de soques virulentes i avirulentes per cromatografia en DEAE-Sephadex, per a la immunització de S. fontinalis. La via d'administració és intracelomàtica en una dosi de 5 µg de proteïna per peix. Als 21 dies fa el "challenge" i troba una protecció significativa només en els lots que ha immunitzat amb la fracció IV, tant si aquesta procedeix d'una soca virulenta o d'una avirulenta. Prepara antisèrum de conill contra la fracció IV, i comprova que aquest forma una banda contra l'antigen homòleg en plaques de difusió d'agarosa. L'antisèrum no forma cap banda contra la proteïna-A de la

capa-A ni contra el LPS. Caracteritza aquesta fracció IV com una glicoproteïna d'un pes molecular de 66,000 dàltons i amb potencial immunogènic.

Cipriano & Starlighter (1982) utilitzen una soca avirulenta com una vacuna viva atenuada. Aquesta soca no presentava la capa-A quan s'observa al microscopi electrònic i té reduït el nivell de la fracció II dels productes extracel·lulars. S'immunitza S. fontinalis per injecció i.c. amb concentracions que van desde 10^6 a 10^9 CFU/ml, i també S. salar amb un bany de 60 segons en un cultiu de 2.3×10^9 CFU/ml. La mortalitat que es presenta després del "challenge" per bany (Cipriano, 1982 a), és del 44 % per S. fontinalis i del 12.5 % per S. salar; amb el 94 % i el 87.5 % en els controls respectius. Els autors diuen que aquesta vacuna pot ésser utilitzada en immunitzacions a gran escala d'alevins. Cal valorar-ho en piscifactories on la furunculosi és endèmica, ja que en la seva infecció experimental utilitzen una dosi de bacteri molt més gran que la que es troba en el medi natural. També avisen que podria produir peixos portadors i que per tant es necessari estudiar-ho prèviament.

Cipriano (1983 a) descriu uns treballs no publicats, fets per ell mateix i Starlighter, on s'estudia la naturalesa dels components del sèrum

respecte a la seva relació amb les fraccions dels productes extracel.lulars. En intervals de quatre setmanes, injecten a Salmo gairdneri amb tres concentracions subletals d'una soca virulenta. Obtenen en el sèrum aglutinines, precipitines i neutralització a la fracció IV dels productes extracel.lulars produïts per A. salmonicida. Després fraccionen el sèrum per cromatografia d'intercanvi iònic. Només les fraccions que contenen aglutinines i precipitines reaccionen amb l'antisèrum de conill contra immunoglobulina de truita. La fracció del sèrum que conté activitat neutralitzadora no reacciona amb l'antisèrum de conill contra immunoglobulina de truita, però sí amb antisèrum de conill contra el sèrum complet de truita. Una immunoelectroforesi de la fracció neutralitzadora manifesta α -mobilitat. Per determinar quina d'aquestes fraccions del sèrum dona immunitat contra la furoncolosi, injecten diferents lots de S. fontinalis amb sèrum complet immune de S. gairdneri, i amb cada una d'aquestes tres fraccions per separat. Després de 72 hores, indueixen una infecció experimental per a determinar quina fracció dona immunització passiva. La mortalitat és del 87.5 % en el lot injectat amb sèrum complet immune, del 71.8 % en els injectats amb la fracció que conté les precipitines, i del 25 % pels lots injectats amb la

fracció d'aglutinines i fracció neutralitzadora. Això indica que aquestes dues darreres són elements importants en la immunesposta humoral contra A. salmonicida.

En el mateix estudi, Cipriano & Starliper, examinen la immunesposta provocada en el sèrum de Salvelinus fontinalis, Salmo gairdneri i Salmo trutta per les fraccions aïllades dels productes extracel·lulars. Els resultats indiquen que les precipitines són majoritàriament contra la fracció II la qual té acció proteolítica i leucocitolítica. Com ja s'ha indicat anteriorment (Cipriano, 1982 c), aquesta fracció no dona protecció en una immunització activa. La fracció del sèrum amb activitat de precipitina tampoc no confereix protecció passiva. Per altra banda, l'acció neutralitzadora del sèrum ve evocada per la fracció IV (citolítica i immunogènica). La fracció del sèrum que conté l'activitat neutralitzadora protegeix, amb immunització passiva les truites davant d'infeccions experimentals. Tambè ho fa la fracció IV en immunització activa. Quan valoren l'activitat d'aglutinació, troben que és molt més baixa si renten les cèl·lules utilitzades en la microaglutinació, i sembla ser perquè perden antígens extracel·lulars en el rentat. Llavors marquen eritròcits de be amb les fraccions dels productes

extracel.lulars, i els utilitzen per a proves d'hemoaglutinació passiva contra el sèrum de peixos convalents. Detecten que l'hemoaglutinació és donada de forma predominant per la fracció I. Comproven que aquesta és l'endotoxina que ha quedat en el medi de cultiu procedent de l'autolisi cel.lular. Cipriano & Pyle (1985) confirmen els resultats de Paterson & Fryer (1974 b), pel que fa al LPS, quan injecten en truita la fracció I (o endotoxina) emulsionada amb adjuvant incomplet (FIA). La barreja resulta ésser immunogènica i confereix protecció davant d'infeccions experimentals. Ara bé, si només injecten la fracció I sense adjuvant troben títols d'aglutinines però no hi ha protecció. En els controls amb injecció només d'adjuvant tampoc troben protecció. Aquests estudis indiquen el caràcter immunogènic de l'endotoxina o LPS.

Com l'endotoxina i la fracció IV mostren ser components immunogènics d'A. salmonicida, Cipriano et al. (1983) realitzen uns experiments per demostrar la seva suposició que ambdós immunògens són necessaris per donar protecció davant la furunculosi. Utilitzen una soca avirulenta, sense autoaglutinació ni proteïna-A, que en els sobrenedants del cultiu presenta com a productes extracel.lulars majoritaris la fracció III i la IV. La fracció III és el melano-pigment característic d'aquesta

espècie i no és immunogènic (Cipriano et al., 1981). Els cultius de la soca avirulenta s'inactiven amb cloroform, i preparen tres vacunes: cèl.lules soles que per les característiques de la soca només porten l'endotoxina com a immunogen; sobrenedants que porten només la fracció IV; i cultius inactivats (cèl.lules i sobrenedants) que porten per tant tots dos immunògens. Administren les vacunes per immersió, i només troben protecció en el darrer grup.

En d'altres treballs, Cipriano (1983 b) investiga la resistència natural a la furunculosi d'onze lots de Salmo gairdneri de diferent origen. Alguns d'ells havien estat seleccionats per ésser resistents a la furunculosi. Ho mesura pel títol d'aglutinines, per l'activitat neutralitzadora de la fracció IV i per la supervivència a una infecció experimental produïda per un bany en una suspensió cel.lular de 10^9 CFU/ml d'una soca virulenta d'A. salmonicida. El lot més resistent no va presentar mortalitat: tenia un baix títol d'aglutinines i un títol de neutralització molt alt. La naturalesa d'aquest component del sèrum, que neutralitza una glicoproteïna (la fracció IV), que té α -mobilitat, que és citotòxic per les cèl.lules del cultiu RTG-2 i que aparentment no té cap efecte en el peix viu, encara no és coneguda.

Aquest component del sèrum amb α -mobilitat es presenta en diferents nivells en S. gairdneri segons el seu origen, i no hi ha cap evidència fundada que formi part del sistema immune. Més aviat sembla que es presenta en el sèrum d'aquesta espècie però possiblement està absent o en molt poca quantitat en d'altres espècies de Salmònids. Munro et al. (1980), Ellis et al. (1981), Grisely et al. (1982) i Ellis (1984) anoten les propietats d'una antiproteasa amb α -mobilitat en el sèrum normal de Salmo gairdneri, Salvelinus fontinalis, Salmo trutta i Salmo salar. Tal com cita Munro (1984), Starley et al. (1982) trobaren en Pleuronectes platessa una α -₂ macroglobulina antiproteasa anàloga a la α -₂ macroglobulina antiproteasa humana, i és possible que hi sigui en tots els vertebrats. En l'home, el seu nivell és relativament constant i independent de l'estadi de la malaltia. En d'altres animals, com la rata i el conill, és present en la fase aguda de la malaltia (Starkety & Barrat, 1977).

McCarthy (1983) estudia el nivell de virulència en un gran nombre d'aïllaments d'A. salmonicida. Conclou que els més virulents provenen de peixos portadors. Amb algunes d'aquestes soques virulentes demostra que la infecció experimental pel mètode d'immersió dels peixos en el cultiu bacterià, sense cap mena d'altra acció

(abrasions en la pell, injeccions hormonals, etc.) és suficient per a reproduir una furunculosi com les que es donen en el medi natural. Utilitzant aquest mètode i amb una soca virulenta (AS-1R), demostra la susceptibilitat de diferents espècies de peixos a banys de 60 minuts en un cultiu de $10^4 - 10^5$ CFU/ml. Ara bé, necessita concentracions de 10^7 CFU/ml per obtenir la mateixa mortalitat en Salmo gairdneri. També diu que els cultius realitzats en BHI (Brain Heart Infusion) perden virulència en un temps excessiu d'incubació, però no indica si és degut per perdre la viabilitat o algun factor de virulència.

McCarthy et al. (1983) demostren protecció passiva en Oncorhynchus nerka utilitzant sèrum immune de S. gairdneri contra la soca virulenta AS-1R (autoaglutinant, proteïna-A positiva, morfologia colonial rugosa). No troben protecció passiva si el sèrum immune de S. gairdneri és contra la soca virulenta AS-1R inactivada per calor, o contra la soca avirulenta AS-1S (no autoaglutinant, proteïna-A negativa, morfologia colonial llisa) derivada de la virulenta AS-1R. Per absorció creuada i immunoelectroforesi, demostren que un component proteic (probablement la proteïna-A) es perd en les dues darreres vacunes esmentades (AS-1R inactivada per calor i

AS-1S). Quan fan créixer la soca virulenta AS-1R en CYBB (Casein Yeast Beef Broth) per preparar una vacuna amb el cultiu inactivat amb formol, obtenen millor protecció que si utilitzen com a medi de cultiu BHI. Comproven també que no hi ha cap avantatge o interferència si inactiven els cultius amb formol, iode o glutaraldèhid, i constaten una pèrdua d'eficàcia si ho fan per calor o per filtració dels cultius bacterians. Utilitzant aquest darrer sistema, o sigui el medi de cultiu filtrat i administrat amb adjuvant (FCA), no troben protecció. Sí que la obtenen amb només cèl.lules virulentes inactivades, contràriament als resultats de Cipriano 1982 b. Per altra banda, McCarthy et al. (1983) extreuen la proteïna-A (ACE) de la capa-A amb 5 mM d'EDTA. Veuen que el seu contingut en les cèl.lules és més gran a les 32 hores de cultiu a 22 C en CYBB que a les 48 hores de cultiu en les mateixes condicions. No donen cap explicació. Aquest mètode d'extracció, de solubilització de la proteïna-A amb EDTA, contrasta amb la naturalesa hidrofòbica d'aquesta proteïna (ACE) descrita per Evenberg et al. (1982). Utilitzant la soca AS-1R crescuda en CYBB i amb el seu mètode d'infecció experimental (McCarthy, 1983), avaluen una sèrie de vacunes i.c. basades en diferents tractaments que solubilitzen o no la proteïna-A (ACE). Aquests tractaments no milloren la protecció quan són

administrats per via intracelomàtica. Ara bé, la vacuna obtesa per tractament amb 5 mM EDTA durant una hora a pH 8 resulta eficaç per immersió (Johnson & Amend, 1984; Nowman & Majuarich, 1985). McCarthy et al. (1983) assenyalen que quan preparen les seves vacunes inactivant amb formol al 0.3 %, són tòxiques a altes concentracions. Munro (1984) comenta que Hastings (comunicació personal) ha trobat que un 1 % de formol és insuficient per a inactivar l'acció de la proteasa dels productes extracel.lulars. Això pot ser l'explicació de l'anterior.

Les contradiccions entre Cipriano (1982 b) i McCarthy et al. (1983), que anteriorment queden exposades, venen explicades per la diferència de longevitat dels cultius (5 dies i 1 dia respectivament). L'acumulació de productes extracel.lulars no és màxima el primer dia per a les soques amb capa-A, però és llavors quan les cèl.lules del cultiu tenen la major acumulació de factors virulents cel.lulars. Als cinc dies, els cultius tenen un nivell molt elevat de productes extracel.lulars, però hi ha una possible autolisi cel.lular que fa incerta la presència de la capa-A. Tot i així, en els sobrenedants de cultius de cinc dies és on podem tenir més factors de virulència (Munro, 1984).

Shieh (1982) aïlla una proteasa extracel.lular

d'una soca virulenta d'A. salmonicida. Un cop purificat l'enzim (Shieh & MacLean, 1975) comprova que és letal per a Salmo salar després d'injectar-lo per via i.m. a baixes concentracions. En 1984, el mateix autor demostra, també en S. salar, que pot immunitzar-lo per una injecció i.m. en dosi subletal d'una proteasa extracel.lular procedent d'una soca virulenta d'A. salmonicida. Shieh (1985) realitza el mateix estudi però amb la proteasa aïllada d'una soca avirulenta, i també troba protecció quan utilitza una dosi de 10^4 CFU/peix per via i.m. com a infecció experimental: Els controls presenten una mortalitat d'un 100 % davant d'un 10 - 15 % dels lots immunitzats. Aquests resultats contrasten amb els de Cipriano (1982 c) que no obté protecció ni amb la proteasa (fracció II) aïllada de soques virulentes ni amb la de soques avirulentes. Aspectes com la quantitat i la freqüència de la dosi injectada i les diferents metodologies d'induir la infecció poden ésser la causa de les diferències en els resultats.

Davant de les divergències entre Cipriano (1982 b) i McCarthy et al. (1983), i entre Cipriano (1982 c) i Shieh (1984 i 1985) cal preguntar-se si és necessària una estandardització dels mètodes d'obtenció i purificació dels components de les vacunes i del mètode d'inducció de la infecció experimental (challenge).

Tal i com s'ha comentat al principi d'aquest apartat, poc s'ha avançat respecte als experiments de Duff en 1942 pel que fa a l'eficàcia d'una vacuna . Existeix sempre un mínim però significant percentatge de peixos vacunats que no queden protegits. En tenir en compte els aspectes econòmics de les piscifactories, tals com les despeses d'una vacunació o les ocasionades per un tractament amb antibiòtic, aquest mínim percentatge pot ésser crític. Si l'administració de la vacuna no ens estalvia el tractament amb antibiòtic, això significarà l'increment de les despeses innecessàriament. Per tant, es prescindirà de la vacunació i es donarà l'antibiòtic en el moment que es manifesti un brot de furoncolosi com ja s'acostuma a fer en les piscifactories. Així s'assegura no perdre aquest percentatge mínim que no protegeix la vacuna. Per exemple en el cas del cultiu del salmó on la furoncolosi és habitual, si els nivells de mortalitat dels peixos vacunats arriba a un 1 %, els piscicultors es veuen obligats a iniciar un tractament amb antibiòtic per evitar importants pèrdues econòmiques. Llavors, la vacuna seria completament inviable desde el punt de vista pràctic (Munro, 1984). Dissortadament poques vegades es valora l'aparició, en un futur, de soques resistents al tractament amb antibiòtics.

Un altre aspecte molt important de l'eficàcia de la vacuna és si aquesta incrementa el nombre de portadors. Tal cosa significaria un augment del nivell de bacteris en el medi natural, que comportaria danys ecològics i econòmics, i violaria les normatives sanitàries en aquells països on hi existeixen.

Pel que fa a la via d'administració, tant la injecció com la immersió donen uns nivells molt similars de protecció. La primera és impracticable (econòmicament parlant) a escala industrial quan s'han de vacunar milers d'alevins. En el cas de la immersió, estudis de diversos autors (Bower & Alexander, 1981; Alexander et al., 1982; Tatner et al., 1984) han demostrat l'entrada de l'antigen per les brànquies. Probablement una altra via és l'epitelial però hi ha pocs estudis sobre les defenses en l'epidermis i el paper que hi jugarien en una immunització per bany. Pel que fa a l'administració de la vacuna oralment, ens trobem sovint que els antigens no resisteixen els processos digestius. Si se soluciona aquesta dificultat no hi ha cap raó per no esperar que aquesta ruta faciliti els mateixos nivells d'immunitat que les altres.

Com diu Munro (1984): "l'objectiu d'obtenir una vacuna contra la furoncolosi només el temps ho dirà. Si es produeix una vacuna serà degut a un estudi científic i

a la comprensiò de les propietats i interaccions entre el patogen i l'hoste".

1.6. OBJECTIUS I PLA DE TREBALL.

Tal com ha quedat exposat anteriorment, molts dels treballs d'A. salmonicida han estat estudis sobre les seves propietats immunogèniques. La recerca més recient ha estat i està essent enfocada en la naturalesa immunogènica dels factors de virulència cel·lulars (LPS i capa-A) i els extracel·lulars. S'han utilitzat, majoritàriament, antigens finament purificats. Ara bé, la producció comercial de vacunes utilitzant aquests antigens d'alt cost d'extracció és impracticable econòmicament a gran escala en cultius de peixos.

Actualment, existeixen tècniques que ens permeten diferenciar i seleccionar determinades soques d'A. salmonicida que presenten paràmetres antigènics específics. Un dels objectius d'aquest estudi és la caracterització antigènica de diverses soques d'A. salmonicida respecte els seus antigens cel·lulars, el LPS i la proteïna-A de la capa-A (ACE: Additional Cell Envelope).

Posteriorment es diferenciaran i seleccionaran les quatre combinacions antigèniques possibles pel que fa a aquests factors cel·lulars. Mitjançant cèl·lules inactivades de cada una i per separat, s'estudiarà la resposta humoral i cel·lular que produeixen en el

salmònid Salvelinus fontinalis. Tambè es compararà la immunoresposta induïda administrant les vacunes per injecció intracelomàtica o per immersió en el medi de cultiu.

En darrer terme es valorarà la protecció que confereix cada una de les vacunes davant una infecció experimental, tenint en compte la via d'administració.

Per tant el pla de treball per abastar aquests objectius quedarà emmarcat en els següents capítols:

1)- Caracterització antigènica. Es realitzarà en 61 aïllaments d'A. salmonicida respecte el LPS i la proteïna-A de la capa-A. Aquest capítol compendrà dos apartats:

1.A. Classificació antigènica de les soques amb electroforesi en gels de poliacrilamida (SDS-PAGE: Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide). S'utilitzarà la tinció per proteïnes de Laemmli (1970) i la tinció del LPS amb nitrat de plata tal com descriuen Tsai & Frasch (1982). Els aïllaments es classificaran en els quatre següents grups segons la combinació antigènica:

<u>Grup</u>	<u>O-Ag</u>	<u>ACE</u>
I	+	-
II	-	+
III	+	+
IV	-	-

1.B. Determinació de l'antigenicitat d'aquestes soques. Utilitzaran tres antisèrums específics de conill contra cèl.lules completes d'A. salmonicida que presenten els dos antígens, contra el LPS i contra la capa-A. S'aplicaran les següents tècniques: microaglutinació, "Western Blot" (electrotransferència) i "Immuno-blot" (immunotinció).

2)- Caracterització immunogènica. Es prepararan les vacunes amb cèl.lules completes i inactivades de les quatre variants i es realitzarà:

2.A. Estudi de la immuno-resposta. S'injectaran separatament les quatre vacunes per via i.c. en diferents lots de Salvelinus fontinalis. Se seguirà la resposta humoral mitjançant el títol d'aglutinines en el sèrum, i la resposta cel.lular pel nombre relatiu de limfòcits productors d'anticòs en la melsa.

2.B. Comparació de la immuno-resposta induïda

segons la via d'administració: injecció intracelomàtica i immersió.

3)- Estudi de la protecció adquirida. Es valorarà la protecció conferida per cada combinació antigènica davant d'una infecció experimental tenint en compte la ruta d'administració.

Aquest treball pretén contribuir al coneixement de la naturalesa immunogènica dels dos factors de virulència cel.lulars, i saber així la viabilitat de la utilització de cèl.lules completes inactivades com una vacuna de baix cost de preparació.

2. CAPÍTOL I.

CARACTERITZACIÓ ANTIGÈNICA

I

ELECCIÓ DE LES SOQUES

REPRESENTANTS.

2.1. INTRODUCCIÓ.

En 1978, Udey & Fryer, estudien la virulència de diferents aïllaments d'A. salmonicida constatant, per primer cop, que les soques virulentes presenten un embolcall proteic a la membrana exterior que és absent en les soques avirulentes, i l'anomenen "A-layer" (capa-A). Tambè en aquesta espècie s'havia observat que algunes soques presenten morfologia colonial llisa fet que està associat a la formació de suspensions estables en el medi de cultiu. Un altre grup de soques tenen morfologia colonial rugosa, no són estables en el medi de cultiu i presenten autoaglutinació cel.lular.

Udey & Fryer assenyalen que la presència de la capa-A va relacionada amb una morfologia colonial rugosa, autoaglutinació (caràcter hidrofòbic) i virulència, mentre que la seva absència és determinant de morfologia colonial llisa, pèrdua d'autoaglutinació i de virulència.

Mès tard i per diversos autors (Paterson & Fryer, 1974 a; Ishiguro et al. 1981; Evenberg et al. 1982 I i 1985) s'ha constatat el caràcter antigènic del lipopolisacàrid i de la proteïna-A en Aeromonas salmonicida, parlant d'ells com els factors de virulència cel.lulars.

Fins ara s'ha classificat aquesta espècie en tres

grups per la seva composició antigènica cel·lular. (Munn et al., 1982; Evenberg et al., 1985), que correspon a les combinacions possibles de l'absència o presència de l'antigen-O i de la proteïna-A. Si només es parla de tres grups és perquè una de les combinacions antigèniques mai no ha estat trobada. Aquesta correspon a l'absència de l'antigen-O i a la presència de la proteïna-A. Evenberg et al., 1985 i Kay et al., 1986, davant d'aquesta constatació, conclouen que l'absència de l'antigen-O condiciona la formació de la proteïna-A, tenint el primer una funció estructural indispensable per a la citada proteïna.

En aquest capítol s'exposen els resultats de l'anàlisi antigènic de 61 soques Aeromonas salmonicida aïllades d'epizooties naturals i mantingudes en el laboratori. Es classifiquen segons la seva dotació antigènica respecte a l'antigen-O i a la proteïna-A, per veure si és present la combinació d'antigen-O negatiu i de proteïna-A positiu en alguna de les soques. Finalment, s'escolleixen, per cada un dels grups, una soca com el tipus representatiu d'aquell grup.

2.2. MATERIALS I MÈTODES.

2.2.1. BACTERIS.

Han estat utilitzades 61 soques d'Aeromonas salmonicida subsp. salmonicida, procedents de la col·lecció del National Fish Health Research Laboratory (Leetown. WV. USA). Procedeixen d'aïllaments fets des de la dècada dels 50 fins al 1986 de diferents punts del continent nord-americà.

2.2.2. ANTISÈRUMS.

S'utilitzaren tres antisèrums específics de conill. Tots ells preparats en el National Fish Health Research Laboratory de la següent manera: El primer contra cèl·lules completes i inactivades d'A. salmonicida 3.101 que presenta complet el lipopolisacàrid i la capa-A. Un segon contra el lipopolisacàrid purificat amb fenol calent (Westphal & Jahn, 1965; Hanson & Phillips, 1981) de la soca A. salmonicida 3.101. El tercer va ésser preparat contra la proteïna-A, utilitzant la capa-A de la soca A. salmonicida 3.64 a la que li manca l'antigen-O i per tant, majoritàriament és proteïna-A. Posteriorment, aquest antisèrum fou absorbit amb la soca A. salmonicida 3.10 que no presenta proteïna-A.

2.2.3. SELECCIÓ INICIAL DELS AÏLLAMENTS.

La primera classificació dels 61 aïllaments estudiats es realitzà mitjançant les següents quatre proves:

2.2.3.1. Flocculació cel.lular.

Duff en la dècada dels 30 ja va indicar aquesta propietat que presenten les diferents soques d'A. salmonicida en què unes formen una suspensió estable en el medi de cultiu (TSB: Trypticase Soy Broth) i d'altres inestables que formen un precipitat en el fons del tub de cultiu. Això darrer ve donat pel caràcter marcadament hidrofòbic de les cèl.lules que indueix a la formació de "flòculs cel.lulars" (autoaglutinació) a causa de la presència de l'embolcall proteic de la capa-A.

El procediment seguit fou inocular cada una de les soques en 5 ml de TSB estèril, s'incubà a 20 °C durant 24 hores i sense agitació, i s'anotaren els resultats posteriorment. Si el creixement estava en suspensió s'anotava com a NC (No Clumps: no floccula), i si presentava el precipitat cel.lular com a C (Clumps: floccula).

2.2.3.2. Hidrofobicitat.

La hidrofobicitat ve determinada en funció del percentatge de sulfat amònic necessari per fer floccular els bacteris del medi on estan en suspensió.

Després d'un creixement de 48 hores a 20 °C en TSA (Trypticase Soy Agar) inclinat, cada cultiu fou rentat i recollit amb 1 ml d'una solució salina al 0.05 % de NaCl. El rentat va ésser sotmès a una disrupció amb ultrasons per desfer els flòculs cel·lulars, que per l'autoaglutinació forma l'A. salmonicida. El disruptor cel·lular era el Model W185D de Heat Systems-Ultra Sonics Inc. (Plainview. N.Y. USA). Un mililitre de cada rentat es posa en microtubs i es congela a -40 °C. Després es realitza una nova disrupció a 60 W (punt 3 d'intensitat) fins obtenir una bona suspensió cel·lular de la mostra.

Paral·lelament i a partir d'una solució saturada de sulfat amònic es realitzen dilucions del 50 %, 40 %, 30 %, 20 % i 10 %. Cada una d'aquestes, juntament amb aigua destil·lada, es posen en una quantitat de 100 µl/pou en una placa de microaglutinació de 96 pous amb fons cònic. Després s'afegeixen 10 µl del cultiu sonicat en cada un dels pous. Es deixa reposar durant la nit a temperatura de laboratori (aproximadament 20 °C), i al dia següent es llegeixen els resultats.

La hidrofobicitat es basa amb la propietat per part del sulfat amònic de fer precipitar proteïnes i la presència o absència de l'embolcall exterior proteic (proteïna-A) que presenten algunes de les soques d'A. salmonicida. La lectura dels resultats es fa per la concentració més baixa de sulfat amònic on es presenta l'aglutinació.

2.2.3.3. Creixement en Coomassie Brilliant Blue-Agar (CBB-Agar).

En 1982, Udey va veure que si feia créixer A. salmonicida en plaques de TSA on hi havia afegit CBB es diferenciaven clarament dos tipus de colònies (Figura 2):

A)- Colònies blanques. No tenen proteïna-A i el lipopolisacàrid és el component exterior de la paret cel·lular, el qual inhibeix l'absorció del CBB per recobrir les proteïnes de la membrana cel·lular.

B)- Colònies blaves. Presenten proteïna-A en la capa-A de la paret cel·lular, essent el seu component exterior, i quedant tenyida pel CBB de manera selectiva.

S'utilitzà una proporció de 100 ml de TSA amb 0.01 g de CBB. Cada soca estudiada es va sembrar en una placa de CBB-agar i s'incubà 48 hores a 20 C, procedint-se després a la lectura dels resultats.



Figura 2. Creixement d'una soca d'Aeromonas salmonicida en una placa de CBB-Agar (Udey, 1982). Es diferencien clarament l'existència de colònies blanques i blaves. (Foto gentilesa de R.C. Cipriano).

2.2.3.4. Estabilitat de la suspensió en clorur sòdic.

Basada en els treballs de Duff (1939), on es valora la concentració de l'electròlit (% NaCl) en la qual les cèl.lules d'un aïllament d'A. salmonicida estan en solució estable.

Les soques es feien créixer i es sotmetien a una disrupció cel.lular, tal i com prèviament s'ha exposat en la prova de la hidrofobicitat. Després, utilitzant plaques de microaglutinació amb 96 pous de fons cònic, es posaven 100 µl/pou de cada concentració de NaCl d'un gradient de 0.85 %, 0.50 %, 0.25 %, 0.10 %, 0.05 % i 0.00 %. S'afegien 10 µl del cultiu rentat i disruptat a cada un dels pous. Es deixava reposar durant la nit a 20 C i es llegien els resultats al matí següent.

2.2.4. CARACTERITZACIÓ ANTIGÈNICA INICIAL.

Un parell de proves comprenen aquest estudi i es feren per cada una de les 74 soques diferenciades pel CBB-Agar: microaglutinació amb antiserums específics i electroforesi en gel de poliacrilamida. A partir d'aquesta caracterització s'escolliren les soques representants de cada grup.

2.2.4.1. Microaglutinació.

S'utilitza com antigen una suspensió disruptada de cèl.lules vives en solució salina al 0.05 % de NaCl al 30 % de transmitància a 525 nm. Els anticossos foren els tres antisèrums específics de conill contra el LPS complet (amb antigen-O) d'A. salmonicida 3.101, contra la capa-A (només composta de proteïna-A) d'A. salmonicida 3.64, i contra cèl.lules completes (amb antigen-O present en el LPS i proteïna-A) d'A. salmonicida 3.101.

El procediment seguit per la microaglutinació fou el clàssic, realitzant un gradient de concentracions dels antisèrums en una microplaca de 96 pous amb fons cònic. El volum d'antigen per pou fou de 50 µl essent el mateix per a l'anticòs, portant-ho finalment a una dilució inicial d'anticòs de 1/10 i continuant amb un gradient descendent de raó 1/2.

2.2.4.2. Electroforesi en SDS-PAGE.

El gel de poliacrilamida (SDS-PAGE: Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis) fou preparat i corregut tal com és ressenyat en Hoefer Scientific Instruments (1986) i segons Laemmli, 1970. El gel acumulador (Stacking Gel) era d'un porus de 4 % T (percentatge de la suma del pes del monòmer d'acrilamida

i del pes del Bis pel volumen total), 2.7 % C (percentatge del pes del Bis pel del monòmer d'acrilamida), 1.5 mm de gruix i pH 8.8. El corrent utilitzat fou de 15 mA pel "Stacking Gel" i de 25 mA pel "Separating Gel". Les mostres per analitzar procedien de cada una de les soques i foren processades com seguidament s'indica. Cada soca fou incubada en tubs amb 5 ml de TSA inclinat durant 48 hores a 20 C. Després va ésser rentada i recollida en PBS al 1/10 amb aigua destil.lada. S'ajustà la suspensió a una concentració cel.lular de 30 % de transmitància a 525 nm. A partir d'aquí cada mostra es processà de dues maneres:

a)- Tractament amb proteïnasa-K. Extracció del lipopolisacàrid mitjancant l'ús de proteïnasa K (PK) tal com exposen Hitchcock & Brown (1983). Se centrifuga 1.5 ml de la suspensió a 12,000 r/m durant 2 minuts. El precipitat es resuspèn amb 50 µl del tampò per electroforesi (Laemmli Sample Buffer, segons Laemmli, 1970) i es posa a bullir durant 10 minuts. Després es realitza el tractament amb 25 µg de proteïnasa K disolta en 10 µl del tampò durant 60 minuts a 60 C. Posteriorment, s'afegeix blau de bromo-fenol al 0.05 % com a tint marcador.

b)- Disrupció per ultrasons de la suspensió cel·lular (WC de Whole Cells: Cèl·lules senceres). Consisteix a recollir les cèl·lules de 1.4 ml de la suspensió a 30 % de transmitància per centrifugació a 12,000 r/m durant 3 minuts. Resuspendre el precipitat amb 100 µl d'aigua destil·lada i congelar-lo a - 70 °C. Disruptar-ho fins a moldre la mostra a 60 W i centrifugar-ho de nou. Recollir els sobrenedants i barrejar amb el tampò per electroforesi en una proporció de 1:1. Afegir, com a tint marcador, blau de bromo-fenol al 0.05 % en una proporció no superior a 1/10 de la mostra final (Cipriano & Pyle, 1985).

La quantitat de mostra correguda fou de 15 µl per PK i de 20 µl per WC, i de 10 µl pel marcador de pes molecular. L'electroforesi es parava aproximadament a un centímetre del fons del gel, i no s'excedí mai d'una intensitat de 240 V. Posteriorment, el gel amb les mostres de PK era tenyit amb nitrat de plata segons la tècnica de Tsai & Frasch (1982) per a la tinció del lipopolisacàrid. El gel amb les mostres de WC es tenyia per a observar les proteïnes amb Coomassie Brilliant Blue al 0.01 % en un 25 % de metanol i un 10 % d'àcid acètic, utilitzant la mateixa solució sense el CBB per destenyir (Cipriano & Pyle, 1985).

2.2.5. DETERMINACIÓ DE L'ANTIGENICITAT.

La determinació de l'antigenicitat es realitzà mitjançant dues tècniques: una electrotransferència de les mostres ja corregudes en el gel de poliacrilamida sobre paper de nitrocel.lulosa (NC) (Towbin et al. 1979), i una immunodetecció dels antígens amb antisèrums específics (Pyle & Schill, 1985). Aquest procés només es va aplicar a les soques representants de cada grup antigènic.

2.2.5.1. Electrotransferència.

Per cada una de les soques representants es feu córrer un gel utilitzant una mostra processada per als dos tractaments (PK i WC) anteriorment explicats. A continuació es procedí amb l'electrotransferència del SDS-PAGE a NC (Western Blot) tal com s'hi indica:

a)- El gel corregut es posa immediatament i durant 10 minuts en un bany de la solució tampò de transferència (T-buffer). Aquesta consisteix en 25 mM Tris, 192 mM glicina, 20 % metanol a pH 8.3.

b)- El gel es col.loca en contacte amb el paper de nitrocel.lulosa (BA-85, 0.45 um., Schleicher & Schuell, Keene, NH. USA), realitzant-ho sota un bany de la solució T-buffer.

c)- El gel i la nitrocel.lulosa es posen entre dues capes de paper de filtre: un full de GB 003 en la part posterior i dos fulls de GB 002 en la part anterior (totes de Schleicher & Schüell).

d)- Tot aquest complex es col.loca en l'aparell d'electrotransferència (TE-52, Hoefer Scientific Instruments, San Francisco, CA. USA) mitjançant el cassette portador del citat aparell.

e)- L'electrotransferència es realitza durant 60 minuts a una corrent de 100 V i amb un sistema de refrigeració per aigua d'aixeta a 12^o C.

f)- Posteriorment, el paper de nitrocel.lulosa es processa per una immunodetecció, i el gel s'utilitza (en alguns casos) per a la tinció del lipopolisacàrid amb nitrat de plata prèviament citada.

2.2.5.2. Immunodetecció.

Un cop transferides les mostres al paper de NC es va realitzar una immunodetecció amb els reactius i protocols indicats pels laboratoris Bio-Rad (Richmond, CA. USA), tal i com descriuen Pyle & Schill, 1985. Els passos seguits foren:

a)- Finalitzada l'electrotransferència es col.loca el paper de NC en bany de TBS (Tris-Buffered Saline: 20

mM Tris, 500 mM NaCl, pH 7.5) durant 10 minuts i a temperatura de laboratori.

b)- Després - es passa a la solució de bloqueig que consisteix en un 3 % de gelatina (EIA grade) dissolta en TBS per escalfor a 37 C. Es mantè en aquesta solució durant una hora a temperatura de laboratori (20 C) i amb una lleugera agitació.

c)- Bany en el primer anticòs al llarg de tota la nit (aproximadament unes 15 hores) amb lleugera agitació i a temperatura de laboratori. L'anticòs es dilueix en una solució a 1'1 % de gelatina dissolta en TBS per escalfament a 37 C. Les dilucions de l'anticòs variaren segons l'antisèrum específic utilitzat: 1:50 per l'antisèrum contra LPS, 1:100 pels antisèrums contra la proteïna-A i contra les cèl.lules completes (amb tots dos antígens) d'A. salmonicida.

d)- Al matí següent el paper de NC es rentava dues vegades en TBS durant 10 minuts i amb lleugera agitació.

e)- Incubació de la NC en el segon anticòs durant una hora i amb lleugera agitació. Aquest anticòs és l'antisèrum de cabra contra IgG de conill conjugat amb peroxidasa (Goat Anti-Rabbit IgG Horseradish Peroxidase Conjugate) al 1:2000 en una dilució al 1 % de gelatina en TBS.

f)- Es renta dues vegades amb TBS durant 10

minuts.

g)- Bany en la solució de revelatge del color HRP (Horseradish Peroxidase Color Development Solution) que consisteix en un 0.015 % de H₂O₂ i un 0.05 % de 4-cloro-1-naftol.

h)- El revelatge es para amb banys en aigua destil.lada. Posteriorment, s'asseca entre papers de filtre i es pot fer una còpia fotogràfica. Finalment, l'original i la còpia s'arxiven.

2.3. R E S U L T A T S.

2.3.1. SELECCIÓ INICIAL DELS AÏLLAMENTS.

Totes les soques que presentaven una suspensió estable en el brou de cultiu, varen donar colònies blanques en el creixement en plaques de CBB-Agar. Les altres soques tenien una clara flocculació en el brou de cultiu i donaren colònies blaves en CBB-Agar. Ara bé, algunes soques que presentaren flocculació però amb certa terbolesa en el brou, es manifestaren com a mixtes (+/-) en el creixement en CBB-Agar on presentaren colònies blanques i blaves (Taules 2, 3 i 4). Cada una d'aquestes s'aïllà per a procedir amb els següents tests i s'afegí un dígit més en el codi de denominació de les soques. Quan la soca formava colònies blanques en CBB-Agar el nou dígit era W (white) i si les presentava blaves era una B (blue). A partir d'aquest moment, el nombre total de soques estudiades s'augmentà a 74.

Pel que fa a l'estudi de la hidrofobicitat, les soques blanques necessitaven una alta concentració de sulfat amònic en el medi per precipitar (40 - 50 % de la solució saturada). No va ésser aquest el cas de les colònies blaves, les quals presentaven majoritàriament flocculació en aigua destil·lada o a nivells tan baixos

FLOCULAC.CBB HIDROFOB. SAL-ESTABILITAT

3.10	NC	-	50	>0.85
3.17	NC	-	50	>0.85
3.18	NC	-	50	>0.85
3.21	NC	-	40	>0.85
3.23	NC	-	40	>0.85
3.25	NC	-	40	>0.85
3.26	NC	-	50	>0.85
3.27	C	+	00	0.00
3.30	NC	-	50	>0.85
3.33	C	+	00	0.00
3.35	NC	-	50	>0.85
3.37	C	+	00	0.00
3.39	C	+/-	00/10	0.05/0.25
3.41	NC	-	50	>0.85
3.42	NC	-	50	>0.85
3.48	NC	-	50	>0.85
3.49	NC	-	40	>0.85
3.55	NC	-	20	>0.85
3.58	NC	-	50	>0.85
3.64	C	+	00	0.00
3.67	NC	-	50	>0.85
3.68	NC	-	50	>0.85

Taula 2. Resultats de la classificació inicial dels aïllaments. NC: no flocula. C: flocula. -: colònies blanques. +: colònies blaves. +/-: colònies blanques i blaves. Quan hi han dos valors en la hidrofobicitat i en l'estabilitat en la sal, el primer correspon a les colònies blaves i el segon a les colònies blanques d'un mateix aïllament.

FLOCULAC.CBB HIDROFOB. SAL-ESTABILITAT

3.72	NC	-	50	>0.85
3.74	NC	+/-	10/40	0.05/>0.85
3.75	C	+	00	0.00
3.76	NC	-	50	>0.85
3.77	C	+	00	0.05
3.78	C	+	10	0.05
3.80	NC	-	50	>0.85
3.95	NC	-	50	>0.85
3.101	NC	+/-	00/50	0.00/>0.85
3.103	C	+	10	0.05
3.111	C	+	00	0.00
3.112	C	+/-	00/50	0.05/>0.85
3.113	C	+	10	0.00
3.115	NC	+/-	00/50	0.05/>0.85
3.116	C	+	00	0.05
3.117	C	+/-	00/50	0.05/>0.85
3.119	NC	+/-	50/50	>0.85/>0.85
3.121	NC	+/-	00/50	0.05/>0.85
3.122	C	+	00	0.05
3.123	C	+/-	00/50	0.00/>0.85
3.124	C	+/-	00/50	0.05/>0.85
3.125	C	+	10	0.00

Taula 3. (Continuació). Resultats de la classificació inicial dels aïllaments. NC: no flocula. C: flocula. -: colònies blanques. +: colònies blaves. +/-: colònies blanques i blaves. Quan hi han dos valors en la hidrofobicitat i en l'estabilitat en la sal, el primer correspon a les colònies blaves i el segon a les colònies blanques d'un mateix aïllament.

44

FLOCULAC.CBB HIDROFOB. SAL-ESTABILITAT

3.126	C	+	00	0.00
3.127	C	+/-	00/40	0.00/>0.85
3.128	C	+	00	0.00
3.129	C	+	10	0.05
3.130	C	+	00	0.05
3.131	C	+	00	0.00
3.132	C	+	00	0.05
3.133	C	+	00	0.00
3.134	C	+	00	0.00
3.135	C	+	00	0.00
3.136	C	+	00	0.00
3.137	C	+/-	00/40	0.05/>0.85
3.138	C	+/-	00/50	0.00/>0.85
3.139	C	+	00	0.00
3.140	NC	-	10	>0.85
3.141	C	+	00	0.00
3.142	NC	-	40	0.05

Taula 4. (Continuació). Resultats de la classificació inicial dels aïllaments. NC: no flocula. C: flocula. -: colònies blanques. +: colònies blaves. +/-: colònies blanques i blaves. Quan hi han dos valors en la hidrofobicitat i en l'estabilitat en la sal, el primer correspon a les colònies blaves i el segon a les colònies blanques d'un mateix aïllament.

com 10 % de la solució saturada de sulfat amònic (Taules 2, 3 i 4).

Molt paral·lels als resultats anteriors foren els obtinguts en la valoració de la concentració necessària de l'electròlit (NaCl) en el medi per tenir suspensions estables, o sigui, en la que no manifesten autoaglutinació. La majoria de les colònies blanques estan en suspensió estable en qualsevol concentració salina de les mesurades. No així en les colònies blaves, les quals fins i tot precipiten en l'aigua destil·lada, confirmant de nou la seva hidrofobicitat. A partir d'aquests resultats es decidí utilitzar la mínima concentració salina (0.05 %) en les posteriors proves.

2.3.2. CARACTERITZACIÓ ANTIGÈNICA INICIAL.

En la microaglutinació de cada una de les soques d'A. salmonicida davant dels tres antiserums específics de conill contra el LPS, contra la proteïna-A i contra tots dos antígens (WC: Whole Cells), hi ha uns nivells d'aglutinació suficientment significatius per diferenciar-se diversos grups antigènics (Taules 5, 6 i 7). Un primer grup on les soques presenten alts títols d'aglutinació pels antiserums contra el LPS i contra WC, un segon grup on no hi ha pràcticament aglutinació per



SOCA	MICROAGLUTINACIÓ			SDS-PAGE	
	LPS	A-layer	W.C.	O-Ag	A-layer
3. 10W	5	1	7	+	-
3. 17W	2	2	4	+	-
3. 18W	0	1	3	-	-
3. 21W	2	0	3	+	-
3. 23W	2	0	4	+	-
3. 25W	3	0	4	+	-
3. 26W	2	0	3	+	-
3. 27B	5	7	8	+	+
3. 30W	3	0	5	+	-
3. 33B	11	11	11	+	+
3. 35W	2	0	3	+	-
3. 37B	5	6	5	+	+
3. 39B	9	10	10	+	+
3. 39W	4	0	7	+	-
3. 41W	1	0	4	+	-
3. 42W	1	0	3	+	-
3. 48W	1	0	3	+	-
3. 49W	2	0	3	+	-
3. 55W	0	1	3	-	-
3. 58W	1	0	3	+	-
3. 64B	0	8	8	-	+
3. 67W	1	0	3	+	-
3. 68W	1	0	3	+	-
3. 72W	1	0	3	+	-
3. 74B	3	7	7	+	+
3. 74W	2	0	1	+	-
3. 75B	5	7	7	+	+
3. 76W	2	0	3	+	-
3. 77B	2	7	7	+	+
3. 78B	2	6	6	+	+
3. 80W	1	0	2	+	-
3. 95W	2	0	2	+	-

Taula 5. Resultats de la caracterització antigènica. El dígit W en el codi d'identificació de les soques significa que en CBB-Agar les colònies tenen coloració blanca. Quan és B, presenten coloració blava. Els valors de la microaglutinació venen expressats com el Log₂ de la dilució de l'anticòs. En l'electroforesi (SDS-PAGE), els símbols + i - indiquen, respectivament, presència i absència.

SOCA	MICROAGLUTINACIÓ			SDS-PAGE	
	LPS	A-layer	W.C.	O-Ag	A-layer
3.101B	4	3	6	+	+
3.101W	3	0	6	+	-
3.103B	2	8	7	+	+
3.111B	9	10	11	+	+
3.112B	2	7	6	+	+
3.112W	2	1	1	+	-
3.113B	2	4	4	+	+
3.115B	2	9	8	+	+
3.115W	3	1	2	+	-
3.116B	2	8	7	+	+
3.117B	2	8	8	+	+
3.117W	2	0	3	+	-
3.119B	3	3	4	+	+
3.119W	3	0	4	+	-
3.121B	3	9	9	+	+
3.121W	2	0	3	+	-
3.122B	2	8	8	+	+
3.123B	4	8	5	+	+
3.123W	4	1	5	+	-
3.124B	2	6	6	+	+
3.124W	1	0	3	+	-
3.125B	2	5	5	+	+
3.126B	4	9	8	+	+
3.127B	2	7	7	+	+
3.127W	1	0	1	+	-
3.128B	5	7	6	+	+
3.129B	1	5	5	+	+
3.130B	9	10	10	+	+
3.131B	2	5	3	-	+
3.132B	7	7	7	+	+
3.133B	2	8	7	+	+
3.134B	11	11	11	+	+

Taula 6. (Continuació). Resultats de la caracterització antigènica. El dígit W en el codi d'identificació de les soques significa que en CBB-Agar les colònies tenen coloració blanca. Quan és B, presenten coloració blava. Els valors de la microaglutinació venen expressats com el Log₂ de la dilució de l'anticòs. En l'electroforesi (SDS-PAGE), els símbols + i - indiquen, respectivament, presència i absència.

SOCA	MICROAGLUTINACIÓ			SDS-PAGE	
	LPS	A-layer	W.C.	O-Ag	A-layer
3.135B	2	7	8	+	+
3.136B	3	10	9	+	+
3.137B	2	6	7	+	+
3.137W	2	0	3	+	-
3.138B	3	11	11	+	+
3.138W	3	0	11	+	-
3.139B	9	9	9	+	+
3.140W	3	2	7	+	-
3.141B	11	11	11	+	+
3.142W	3	1	4	+	-

Taula 7. (Continuació). Resultats de la caracterització antigènica. El dígit W en el codi d'identificació de les soques significa que en CBB-Agar les colònies tenen coloració blanca. Quan és B, presenten coloració blava. Els valors de la microaglutinació venen expressats com el Log₂ de la dilució de l'anticòs. En l'electroforesi (SDS-PAGE), els símbols + i - indiquen, respectivament, presència i absència.

l'antisèrum contra el LPS i si que hi és pels altres dos antisèrums, un tercer grup on es presenten alts títols d'aglutinació per tots tres antisèrums, i un darrer on els títols són relativament baixos o nuls per tots tres antisèrums.

A causa de l'autoaglutinació encara present en moltes de les soques que no permetè una acurada lectura dels títols, es va procedir a reafirmar aquests grups. Es realitzà una electroforesi en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) i les tincions de nitrat de plata pel LPS (Tsai & Frasch, 1982) i de CBB per les proteïnes (Cipriano & Pyle, 1985).

Els resultats demostraren que algunes soques no presenten la porció d'alt pes molecular del lipopolisacàrid que correspondria a l'antigen-O (O-Ag -) i mantenen el nucli ("core") i el lípid-A (Taula 5, 6 i 7; i Figura 3). Ara bé, existeix una clara homogeneïtat en el LPS de les 74 soques estudiades d'A. salmonicida.

Respecte a les bandes obtingudes per la tinció de CBB hi ha algunes soques que presenten clarament una banda més (Fig. 4). Aquesta per la seva posició en el gel correspon a la proteïna-A, tal i com indiquen altres autors (Trust et al., 1980; Hubbert & Brain, 1980; Kay et al., 1981; Evenberg & Lugtenberg, 1982 II). La presència o absència de cada un d'aquests components sembla

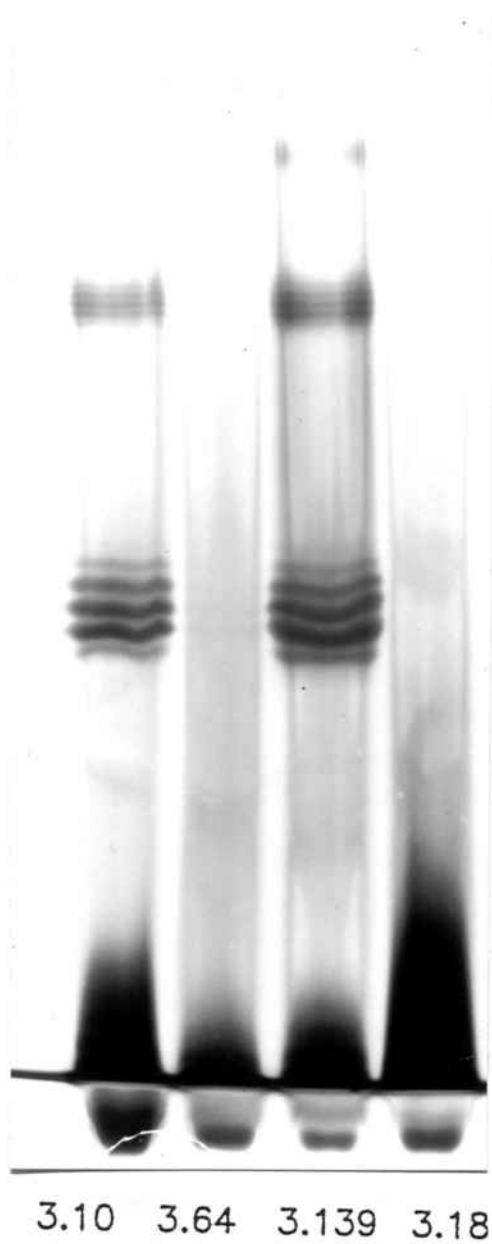


Figura 3. SDS-PAGE de les soques d'A. salmonicida representants de cada grup antigènic tractades amb proteasa K (PK). Tinciò amb nitrat de plata. La resta de les 74 soques estudiades també s'analitzaren per aquesta tècnica.

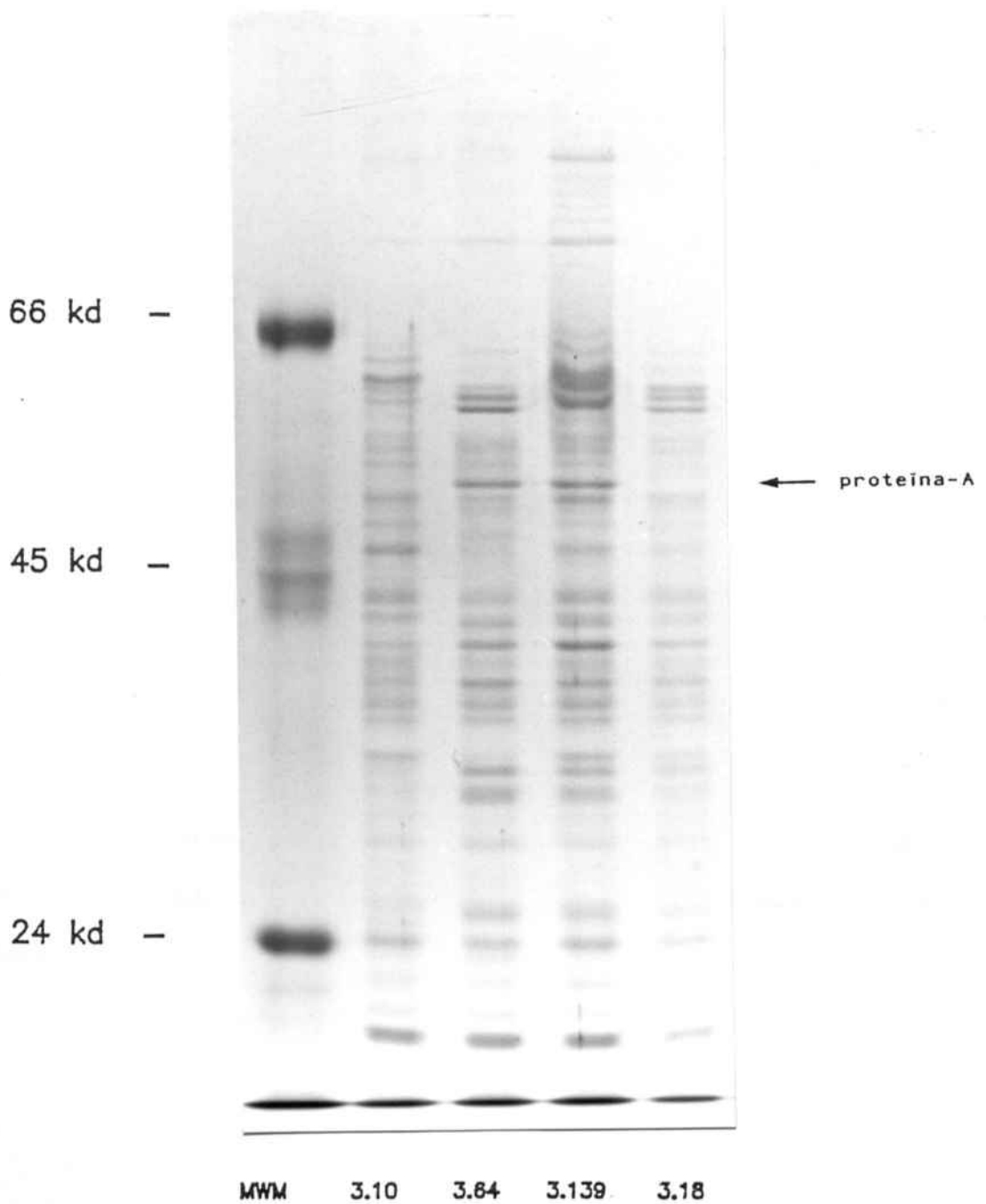


Figura 3. SDS-PAGE de les soques d'*A. salmonicida* representants de cada grup antigènic sotmeses a sonicació (WC). Tinciò amb CBB. La resta de les 74 soques estudiades també s'analitzaren per aquesta tècnica.

completament independent respecte a l'altre, i per tant queden de manifest els grups pressuposats a partir de la microaglutinació. La composició antigènica d'aquests respecte els dos antigens queda de la següent manera:

<u>Grup</u>	<u>O-Ag</u>	<u>ACE</u>
I	+	-
II	-	+
III	+	+
IV	-	-

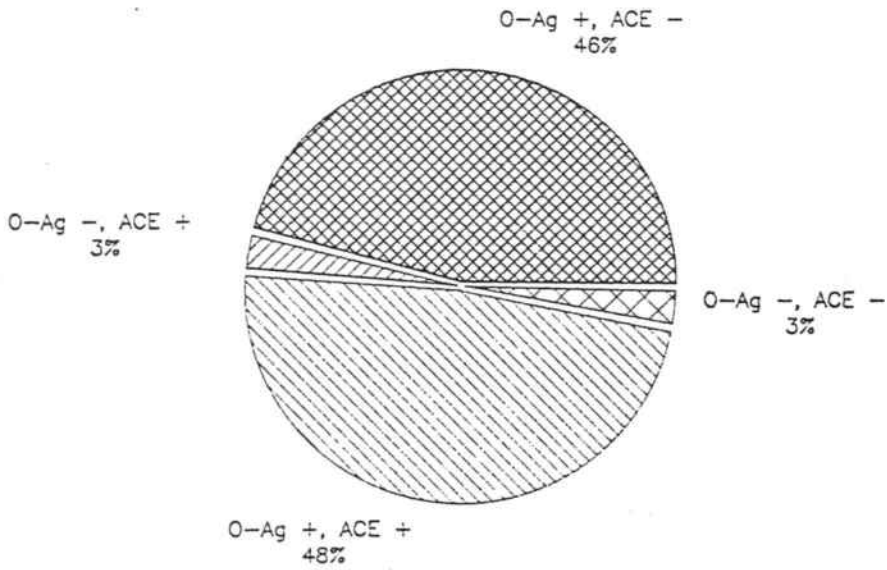
El percentatge de les soques estudiades que cada un dels grups inclou, queda exposat en la figura 5.

2.3.3. SOQUES REPRESENTANTS DE CADA GRUP.

A partir de les dades citades anteriorment es va escollir una soca representant per cada grup. Aquestes foren:

<u>Grup</u>	<u>Soca</u>
I	3. 10
II	3. 64
III	3.139
IV	3. 18

PERCENTATGE DELS QUATRE DIFERENTS GRUPS DE SOQUES



TOTAL DE SOQUES: 74

Figura 4. Percentatges de les soques estudiades per cada un dels quatre grups antigènics definits en aquest estudi.

		3. 10W	3. 64B	3.139B	3. 18W
Precipit.		NC	C	C	NC
Sal-estabilitat		>0.85	0.00	0.00	>0.85
Hidrofob.		50	00	00	50
CBB-Agar		-	+	+	-
M i c r o a g l u t .	LPS	5	0	9	0
	A-layer	1	8	9	1
	W.C.	7	8	9	3
S D S / P A G E	O-Ag	+	-	+	-
	A-layer	-	+	+	-

Taula 8. Característiques relacionades amb els factors de virulència cel·lulars de les soques representants. NC: no flocula. C: flocula. CBB-Agar -: colònies blanques. CBB-Agar +: colònies blaves. SDS-PAGE +: presència de l'antigen. SDS-PAGE -: absència de l'antigen. Els valors de la microaglutinació s'expressen com el Log₂ de la dilució de l'anticòs.

En la taula 8 es resumeixen els resultats obtinguts per cada una d'elles en les proves anteriors. Es realitzaren de nou gels de poliacrilamida amb les quatre soques tenyint-los amb nitrat de plata o CBB. En la figura 3 es veu la presència de la fracció d'alt pes molecular del lipopolisacàrid, que correspon a l'antigen-O només en els aïllaments 3.10 i 3.139. En la figura 4, tal i com indica la fletxa, hi ha una banda proteica de més en els aïllaments 3.64 i 3.139, que correspon a la proteïna-A.

Es va calcular el pes molecular d'aquesta proteïna mitjançant la recta de regressió definida per les distàncies relatives corregudes per cada una de les proteïnes d'una solució estàndard, i el logaritme en base 10 del seu pes molecular expressat en quilodàltons. La solució estàndard estava composta per:

	<u>P.M.</u>	<u>mgr/ml</u>
Albúmina bovina	66	1.5
Albúmina d'ou	45	1.5
Tripsinogen	24	2.0

Les distàncies relatives (D.R.) recorregudes es calcularen dividint l'espai recorregut per cada una de les proteïnes estàndard a partir del límit superior del gel, per l'espai total recorregut per les mostres des de

l'extrem superior fins al lloc que ocupaven en detenir l'electroforesi:

	D.R.(x)	Log P.M.(y)
Albúmina bovina	0.27	1.81954
Albúmina d'ou	0.54	1.65321
Tripsinogen	0.85	1.38021

La recta de regressió obtinguda amb una R^2 de 0.99 fou:

$$y = 2.038 + (-0.76 x)$$

La distància relativa recorreguda per la proteïna-A fou 0.419. Substituint aquest valor en l'equació anterior i calculant després l'antilogaritme del valor de la "y", ens dóna un pes molecular de 52,427 dàltons per la proteïna-A.

Les quatre soques representants també es varen caracteritzar bioquímicament respecte d'altres patògens i d'altres subespècies d'A. salmonicida. No presentaren cap diferència entre elles en els tests utilitzats (Taula 9). Totes elles eren gram negatiu, citocrom-oxidasa positiu, anaeròbiques facultatives per la glucosa, motilitat negativa i gelatinasa positiva. Com produeixen pigment en TSA i cap no produeix indol, es classifiquen les quatre dintre de A. salmonicida subsp. salmonicida.

SOCA	3. 10W	3. 64B	3.139B	3. 18W
GRAM	-	-	-	-
CIT-OX.	+	+	+	+
O/F	+/+	+/+	+/+	+/+
MOTILITAT	-	-	-	-
GELATIN.	+	+	+	+
PIGMENT	+	+	+	+
TSI	A/A	A/A	A/A	A/A
INDOL	-	-	-	-

Taula 9. Caracteristiques bioquimiques de les soques representants.

2.3.4. DETERMINACIÓ DE L'ANTIGENICITAT.

La immunodetecció dels antigens de cada una de les soques ens determina la seva antigenicitat. En les immunotincions sempre s'inclouïa una mostra PK i una WC per cada soca, que ens proporcionaven en el paper de nitrocel.lulosa el LPS i la proteïna-A. Si observem la figura 6 on es mostren els resultats de la immunodetecció per a la soca 3.139, constatem la tinciò positiva de l'antigen-O per l'antisèrum específic contra el LPS (α -LPS). Quan s'utilitzà com a primer anticòs l'antisèrum específic contra la proteïna-A (α -A-layer), també podem veure que la tinciò és positiva i apareix la banda de la proteïna-A. I quan el primer anticòs fou l'antisèrum contra cèl.lules completes amb els dos antigens (α -WC), donà una immunotinciò positiva per a l'antigen-O i per a la proteïna-A.

En la figura 7 on la immunodetecció es feu sobre la soca 3.10, observem que la tinciò també fou positiva enfront de α -LPS. No ho fou així per a la proteïna-A davant de α -A-layer, i només fou positiva per al lipopolisacàrid enfront de α -WC manifestant-se la presència de l'antigen-O.

Si observem la figura 8, poden veure els resultats per a la soca 3.64. La immunodetecció només resultà

positiva per a la proteïna-A, enfront dels antisèrums específics contra ella mateixa i contra les cèl.lules completes. Ni aquest antisèrum darrer ni el del LPS presentaren un resultat positiu per a l'antigen-O, cosa que coincideix amb la seva absència en aquesta soca ja detectada prèviament per la tinció de nitrat de plata del gel de poliacrilamida.

Finalment, en la figura 9 veiem que la immunodetecció sobre la soca 3.18 fou negativa per a tots dos antígens (antigen-O i proteïna-A) en tots tres antisèrums específics.

Les immunodeteccions, tal i com es presenten en les figures 6, 7, 8 i 9, eren acompanyades de les tincions del gel de poliacrilamida en nitrat de plata i en CBB, de manera que servien de control i referència de la presència o absència de l'antigen-O i la proteïna-A en cada una de les soques.

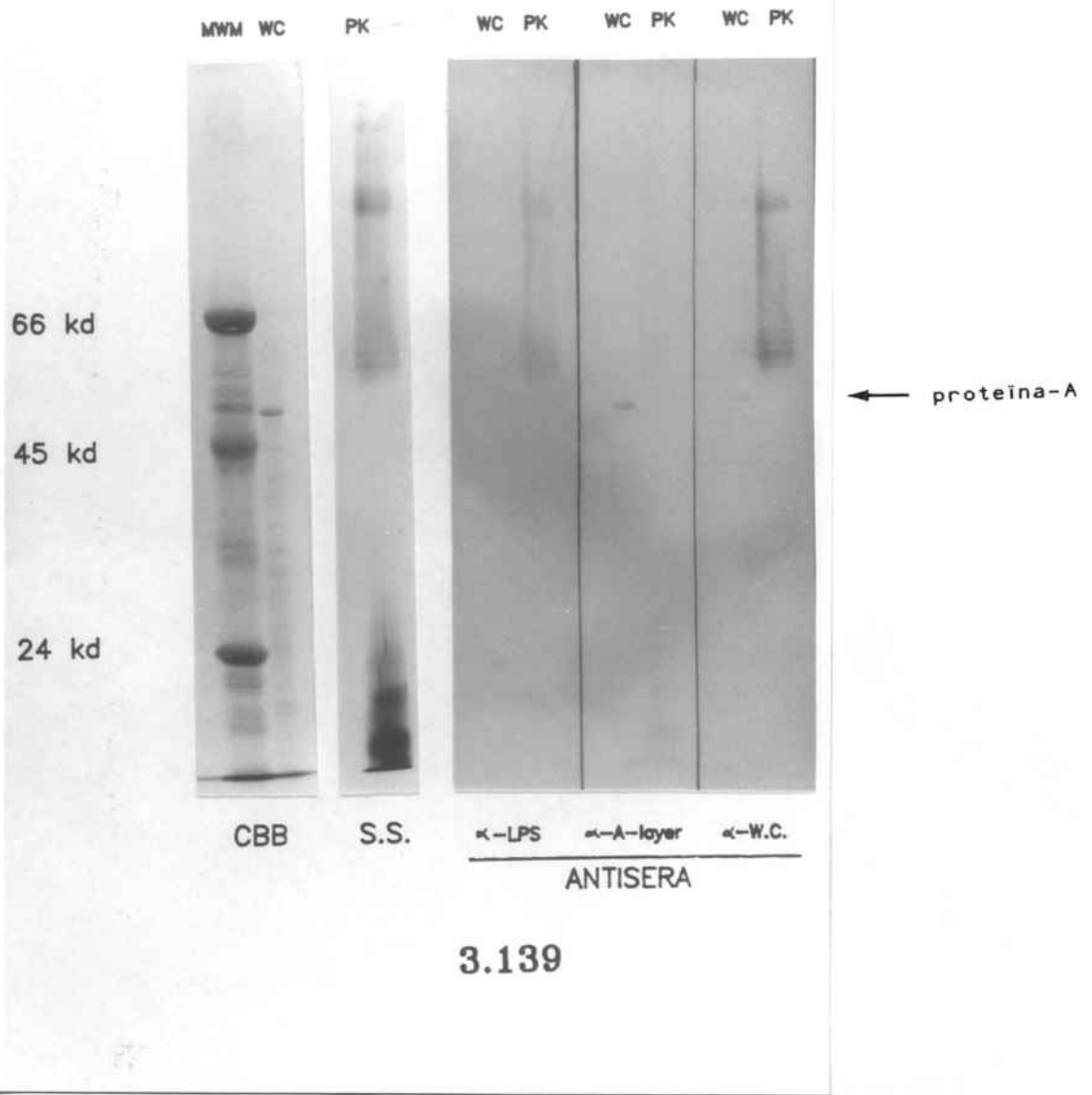


Figura 6. Immunotinciò (Immuno-Blot) sobre paper de nitrocel.lulosa de les mostres de PK i WC de la soca 3.139 amb els antiserums específics de conill indicats. S'inclou com a referència pel LPS i la proteïna-A, una tinciò amb nitrat de plata d'una mostra de PK en SDS-PAGE (S.S.) i una tinciò amb CBB d'una mostra de WC en SDS-PAGE, respectivament.

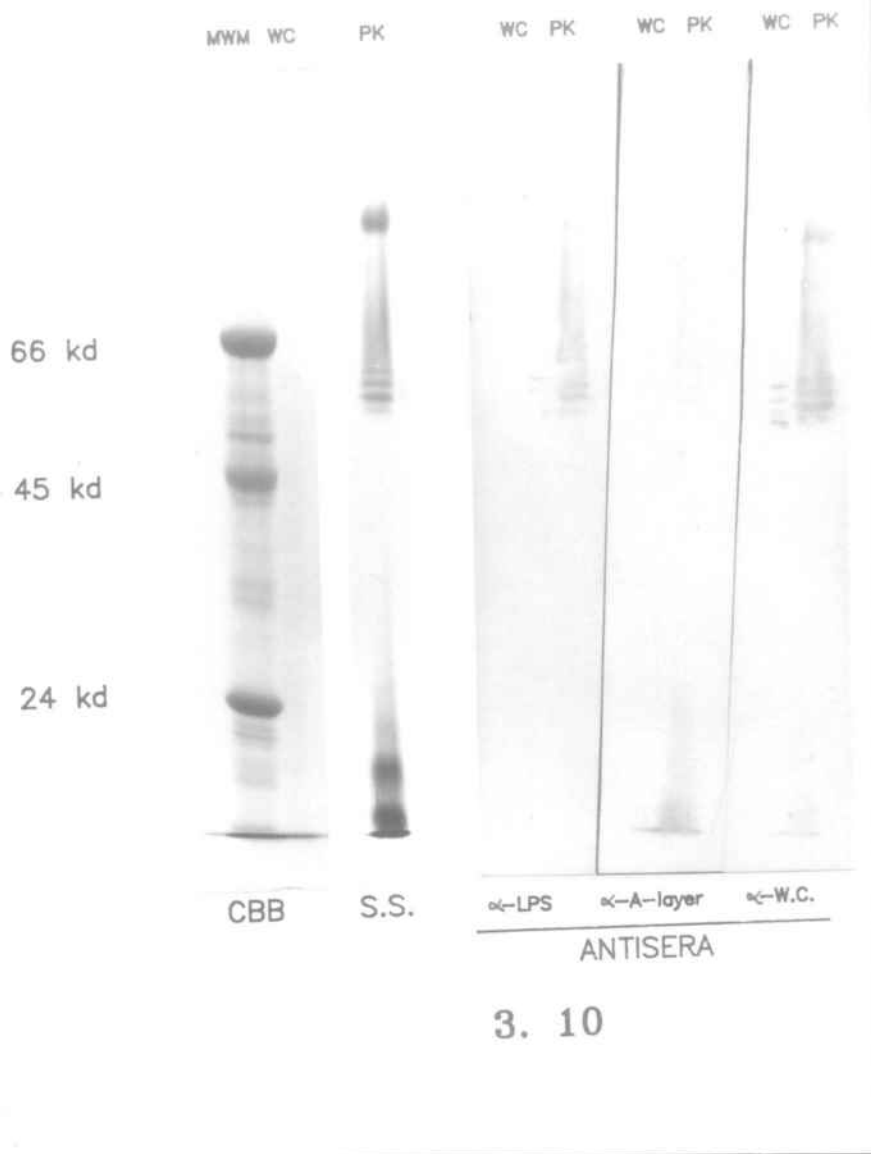
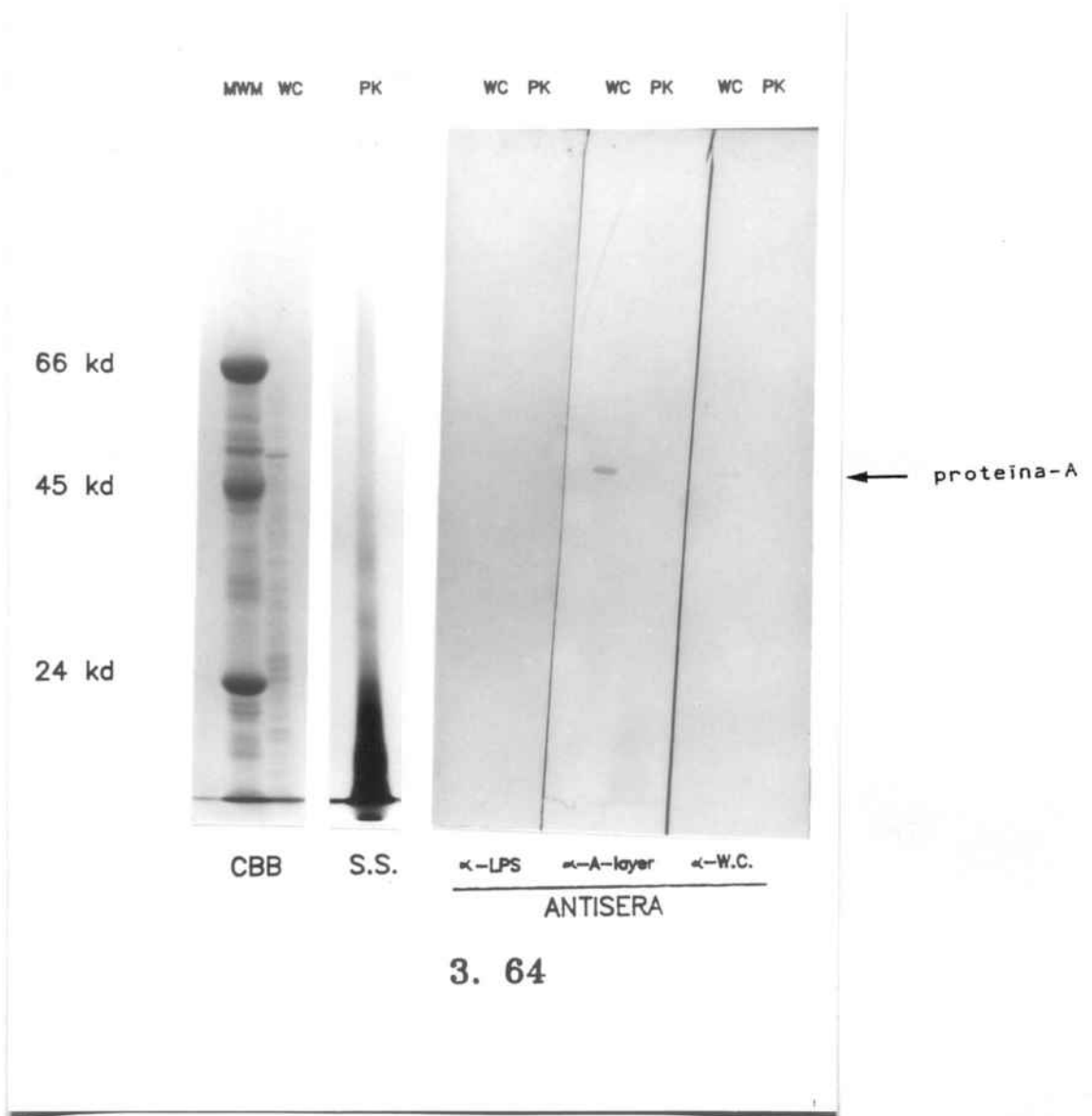


Figura 7. Immunotinciò (Immuno-Blot) sobre paper de nitrocel.lulosa de les mostres de PK i WC de la soca 3. 10 amb els antiserums específics de conill indicats. S'inclou com a referència pel LPS i la proteïna-A, una tinciò amb nitrat de plata d'una mostra de PK en SDS-PAGE (S.S.) i una tinciò amb CBB d'una mostra de WC en SDS-PAGE, respectivament.



3. 64

Figura 8. Immunotinciò (Immuno-Blot) sobre paper de nitrocel.lulosa de les mostres de PK i WC de la soca 3. 64 amb els antisèrums específics de conill indicats. S'inclou com a referència pel LPS i la proteïna-A, una tinciò amb nitrat de plata d'una mostra de PK en SDS-PAGE (S.S.) i una tinciò amb CBB d'una mostra de WC en SDS-PAGE, respectivament.

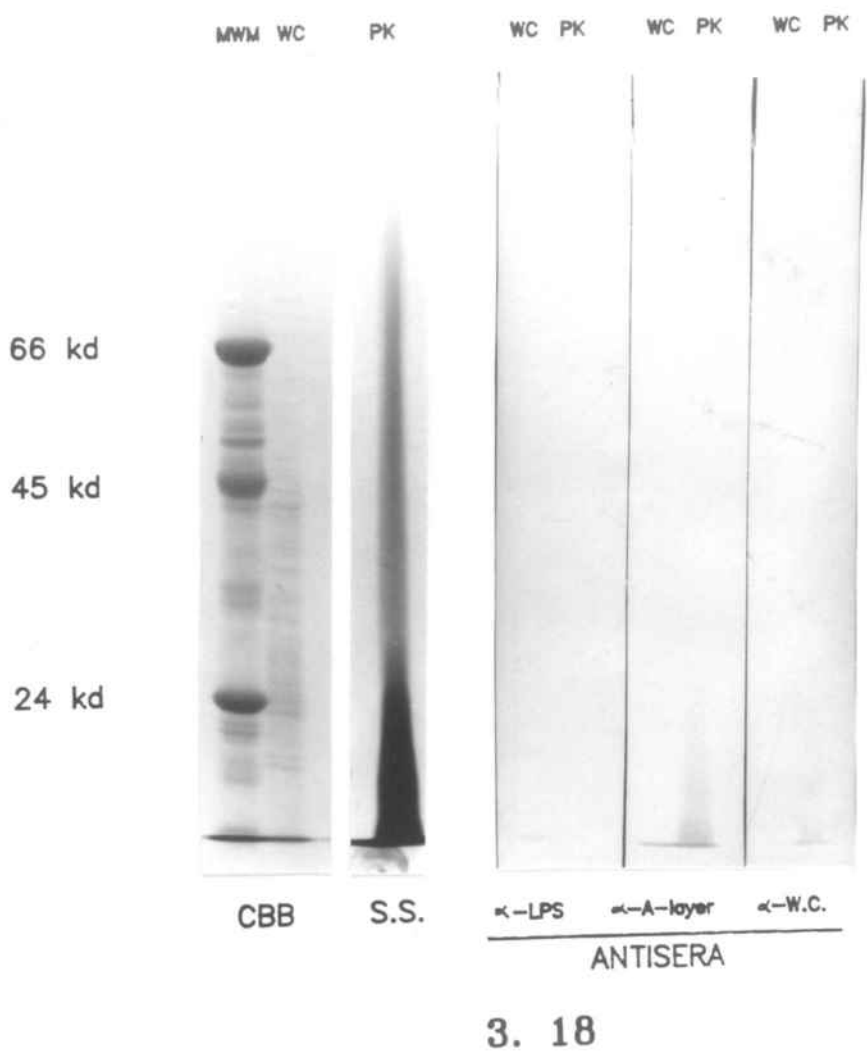


Figura 9. Immunotinciò (Immuno-Blot) sobre paper de nitrocel.lulosa de les mostres de PK i WC de la soca 3. 18 amb els antisèrums específics de conill indicats. S'inclou com a referència pel LPS i la proteïna-A, una tinciò amb nitrat de plata d'una mostra de PK en SDS-PAGE (S.S.) i una tinciò amb CBB d'una mostra de WC en SDS-PAGE, respectivament.

2.4. D I S C U S S I Ó.

2.4.1. CARACTERITZACIÓ ANTIGÈNICA.

En l'estudi inicial per a classificar les soques en els diversos grups antigènics, es presentà una estreta relació entre l'autoaglutinació, la hidrofobicitat i la presència de la capa-A, més concretament de la proteïna-A. Totes les soques que estaven en suspensió estable en el brou de cultiu presentaven colònies blanques en CBB-agar, un alt percentatge de sulfat amònic i una elevada concentració d'electròlit (NaCl) per fer-les flocular. La coloració blanca de les colònies en CBB-agar ens delata la manca de proteïna-A embolcallant la membrana exterior, tal i com ressenyaren Udey & Fryer en 1978. Per altra banda, quan aquesta proteïna hi és present, les colònies queden tenyides de color blau pel CBB. Aquesta característica va correlacionada amb una alta hidrofobicitat manifestada pels baixos o innecessaris nivells de sulfat amònic i també per la baixa concentració de NaCl per fer flocular aquestes soques.

Tot l'anterior corrobora les afirmacions d'altres autors (Duff, 1939; Udey & Fryer, 1978; Evenberg et al., 1982 I; Evenberg & Lugtenberg, 1982 II, Phipps et al., 1983) pel que fa al caràcter hidrofòbic que confereix la

proteïna-A a les soques d'A. salmonicida. Les colònies blanques i per tant sense proteïna-A, han perdut aquest caràcter que es presenta sempre en els aïllaments primaris del bacteri del seu medi natural.

Les anàlisis de la dotació antigènica mostren que no hi ha una homogeneïtat serològica dintre l'espècie coincidint amb Udey & Fryer (1978) i Paterson et al., (1980) entre d'altres. Ara bé, podem parlar d'una homogeneïtat serològica quan només considerem el lipopolisacàrid ja que aquest és el mateix per a tots els aïllaments analitzats. Només s'ha de ressenyar que a algunes soques els manca l'antigen-O en el LPS.

El conjunt de les soques estudiades denota quatre diferents grups antigènics, a partir dels resultats de la microaglutinació i l'electroforesi, respecte als dos factors de virulència cel·lulars considerats en aquest treball. La dotació antigènica dels grups fou la que s'especulava en els objectius de treball.

Es detecta una nova composició antigènica que queda reflexada en el grup II, respecte a les citades per altres autors (Munn et al., 1982; Evenberg et al., 1985). Aquest nou grup presenta la proteïna-A quan no hi és l'antigen-O en el lipopolisacàrid. Evenberg et al., (1985) i Kay et al., (1986) no detectaren en els seus estudis aquesta dotació i diuen que els mutants negatius

de l'antigen-O són invariablement proteïna-A negatius. Podem dir doncs, a partir de l'anterior, que els resultats obtinguts desqualifiquen tal afirmació aportant més informació sobre la relació i dependència d'aquests dos antígens.

Les proves bioquímiques realitzades per cada soca representant donaren els mateixos resultats. Aleshores s'inclouen totes elles dintre A. salmonicida subsp. salmonicida, i per tant podem parlar d'una homogeneïtat bioquímica entre els grups, si més no respecte als tests portats a terme.

2.4.2. RELACIÓ DE L'ANTIGENICITAT, LA RESISTÈNCIA AL SÈRUM I LA VIRULÈNCIA.

Durant el temps que es realitzava aquest treball, Cipriano (1987) estudià la resistència de les quatre soques al sèrum de Salvelinus fontinalis. L'autor conclou que les soques que tenen la proteïna-A són resistents a l'acció del complement del sèrum, mentre que les soques on la proteïna-A és absent són sensibles. Aquesta valoració està d'acord amb la de Munn et al. (1982) tot i que aquests darrers parlen de resistència alta o intermèdia que sembla causada pel fet que no clonaren les seves soques. Aquí s'entén com a soca clonada aquella en

la que totes les cèl.lules de la seva població presenten o no la proteïna-A (o 100 % blanques, o 100 % blaves). Cipriano (1987 i comunicació personal) troba que tots els aïllaments presenten colònies blaves (proteïna-A positives) i colònies blanques (proteïna-A negatives) en proporcions més o menys variables quan es mantenen en medis de cultiu en el laboratori. Cipriano, quan valora la sensibilitat al sèrum i per evitar tenir una població mixta, clona prèviament les quatre soques assegurant-se que treballa amb poblacions 100 % blaves o 100 % blanques. Això li permet corregir les situacions intermèdies, que amaguen els resultats, trobades per Munn et al., (1982).

Tambè Cipriano (1987 i comunicació personal) realitza un estudi de la virulència dels quatre grups antigènics d'A. salmonicida que han quedat anteriorment definits. La presència dels dos antígens (antigen-O i proteïna-A) en les cèl.lules és un requisit necessari per ésser virulent. L'absència de qualsevol dels antígens coincideix amb la pèrdua de la virulència. Les soques del grup I (O-Ag +, ACE -), del II (O-Ag -, ACE +) i del IV (O-Ag -, ACE -) no són virulentes. Munn et al. (1982) consideren que es perd la virulència quan no hi és la proteïna-A. El fet de no haver trobat cap soca del tipus

grup II no permet a aquests autors arribar a les conclusions donades per Cipriano.

2.4.3. CONFIRMACIÓ DEL PES MOLECULAR DE LA PROTEÍNA-A.

En la figura 4 es veu l'electroforesi de les quatre soques que han estat sotmeses prèviament a disrupció cel·lulars i tenyides posteriorment amb la tinció per a proteïnes de CBB. La presència d'una banda de més en les soques 3.64 i 3.139 està indicada per una fletxa. Aquesta banda correspon a la proteïna-A. Tal observació ens confirma els resultats previs d'autoaglutinació i de coloració colonial en CBB-Agar, en els quals ja s'havia constatat l'existència de la proteïna-A en aquestes dues soques.

El pes molecular calculat per la proteïna-A a partir de la recta de regressió obtinguda amb els marcadors moleculars fou de 52,400 dàltons aproximadament. Aquest valor està dintre el rang dels pesos moleculars que se li han calculat per altres autors. Entre ells citarem a Trust et al. (1980) que li calculen 50,000 dàltons utilitzant una soca atípica d'*A. salmonicida* aïllada de *Carassius auratus*, i a Evenberg et al. (1982 I) que li estimen un pes molecular de 54,000 dàltons.

2.4.4. IMMUNODETECCIÓ DE L'ANTIGENICITAT.

En la immunodetecció dels antigens de cada soca representant es manifesta la dotació antigènica. La soca 3.139 té una immunotinció positiva enfront del tres antisèrums específics (Fig. 6), denotant per tant, que posseeix l'antigen-O i la proteïna-A. La soca 3.10 només presenta l'antigen-O, així com la soca 3.64 només té la proteïna-A (Figs. 7 i 8 respectivament). La soca 3.18 no presenta cap dels dos antigens en tenir immunotinció negativa per tots els antisèrums (Fig. 9).

Va ésser necessari incrementar la concentració de la solució en gelatina de l'antisèrum específic contra el lipopolisacàrid fins a l'1/50. En aquest nivell s'obtenia una intensitat de tinció suficient per una bona visualització tot i que, utilitzant dilucions més altes (1/100 i 1/150) ja es mostrava el resultat de la immunotinció.

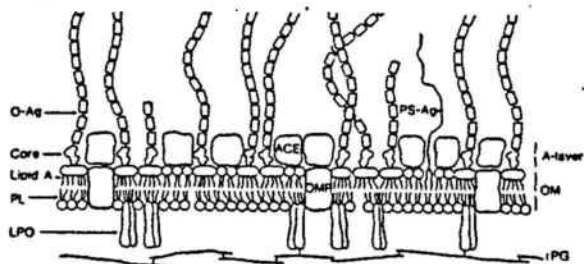
Un augment de la intensitat de la tinció també es podia aconseguir prorrogant les hores d'exposició de les mostres (ja en el paper de nitrocel.lulosa) a la dissolució dels antisèrums en gelatina, tant pel primer anticòs com pel segon, però sempre tenint en compte que ens augmenta el "background" en tot el paper de nitrocel.lulosa perdent contrast.

Per altra banda, en la microaglutinació de les soques en la caracterització inicial enfront dels tres antisèrums específics (Taules 5, 6 i 7) es denota, en general, un baix títol d'aglutinines per a totes les soques davant l'antisèrum contra el LPS. Això es correspon a la necessitat d'utilitzar dilucions menors d'aquest antisèrum en la immunotinció.

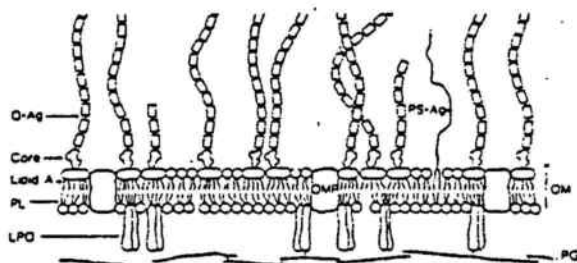
Existeix una lleugera tinció del LPS quan s'utilitza l'antisèrum específic contra la proteïna-A en aquelles soques que presenten l'antigen-O en el seu LPS. Això cal adjudicar-ho al procés de preparació d'aquest antisèrum tot i que, no interfereix en els resultats al no presentar-se en absolut en aquelles soques que són negatives per a l'antigen-O (Figs. 8 i 9) i tenyir la proteïna-A en les que és present.

2.4.5. MODELS MOLECULARS DE LA MEMBRANA EXTERNA D'Aeromonas salmonicida.

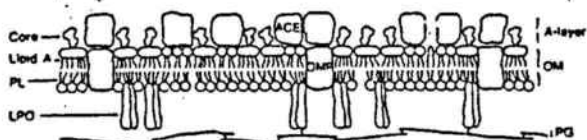
A partir dels resultats obtinguts en aquest estudi i basant-se en el model molecular de la membrana externa donat per Evenberg et al. (1985), es suggereixen les variants d'aquest model per cada un dels quatre grups antigènics descrits (Fig. 10). En elles, podem veure que en les soques O-Ag + i ACE +, la capa-A és una capa



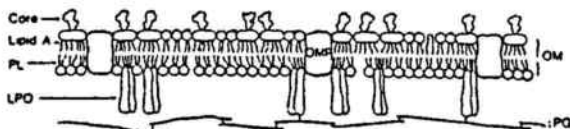
O-Ag +, ACE +



O-Ag +, ACE -



O-Ag -, ACE +



O-Ag -, ACE -

Figura 10. Models moleculars de la membrana externa per cada un dels grups antigènics d'*Aeromonas salmonicida* respecte l'antigen-O i la proteïna-A.

completa que protegeix físicament els components de la membrana externa de l'acció del complement, de la digestió proteolítica i dels bacteriòfags. Tal com s'observa podem afirmar el mateix per les soques O-Ag - i ACE +; explicant-se així la resistència que aquestes presenten a l'acció del sèrum. D'igual manera queda de manifest la sensibilitat al sèrum de les soques O-Ag + i ACE -, i O-Ag - i ACE -; en quedar en descobert els components de la membrana externa del bacteri.

Pel que fa a l'acció del bacteriòfags, en cada una d'elles Ishiguro et al. (1984) han demostrat la sensibilitat de les soques que tenen la proteïna-A al bacteriòfag específic per A. salmonicida TP446. També caldria verificar aquesta conclusió en el nou grup antigènic II i veure si l'especificitat és exclusivament per a la proteïna-A o bé per aquelles soques que presenten necessàriament l'antigen-O i la proteïna-A.

3. CAPÍTOL II.

CARACTERITZACIÓ IMMUNOGÈNICA.

3.1. INTRODUCCIÓ.

Molts han estat els estudis de seguiment de la immuno-resposta en Salmònids induïda per A. salmonicida. En la introducció general d'aquesta memòria hi podem trobar una completa exposició. Majoritàriament, el seguiment s'ha fet pel títol d'aglutinines en el sèrum enfront dels antígens administrats. Aquests han estat diversos, per exemple en 1963 Krantz et al. ja detecten una immuno-resposta injectant cèl.lules completes inactivades amb adjuvant. Paterson & Fryer (1974 a) també troben un nivell considerable d'aglutinines amb diferents dosis de LPS purificat. Els mateixos autors administrant cèl.lules completes inactivades amb adjuvant (FCA), obtenen un alt títol d'aglutinació que és més perdurable que quan injecten només el LPS purificat.

El nivell d'aglutinines es comença a incrementar a partir de la segona o tercera setmana de la immunització, arribant a un màxim entre la sisena o setena setmana en Salvelinus fontinalis i Salmo gairdneri (Blanch et al., 1986).

D'altres treballs han estat orientats a estimar les diferències causades per les vies d'administració. Spence et al. (1965), utilitzant la via oral, no detectaren producció d'aglutinines. Udey & Fryer (1978),

valorant diferents vacunes i vies d'administració, trobaren títols d'aglutinines més baixos per via oral que per via intracelomàtica quan utilitzen una mateixa vacuna. Michel (1979) reafirma els resultats anteriors, i a més a més, no troba diferència en el nivell d'aglutinines entre utilitzar vacunes procedents de colònies rugoses (virulentes) o de colònies llises (avirulentes). Cipriano (1983 a), també comparant diferents rutes, troba el títol més alt quan utilitza una injecció i.c., seguit pel que va obtenir amb immersió i en darrer terme per la via oral.

També s'ha seguit la immuno-resposta cel·lular produïda per cèl·lules lisades (Smith et al., 1980) i pel LPS purificat (Anderson, 1979) utilitzant diferents tècniques per mesurar-la.

En aquest capítol s'estudia, en primer terme, la immuno-resposta -humoral i cel·lular induïda per cada una de les variants antigèniques d'A. salmonicida respecte l'antigen-O i la proteïna-A. Les vacunes són cèl·lules completes, inactivades amb cloroform, que s'administren per via intracelomàtica. Posteriorment, es presenta un estudi que compara la immuno-resposta induïda per aquesta via i la que es dona administrant les vacunes per immersió.

3.2. MATERIALS I MÈTODES.

3.2.1. PEIXOS.

Els Salmònids utilitzats foren Salvelinus fontinalis obtinguts de White Sulphur Springs National Fish Hatchery (West Virginia. USA). Les edats dels exemplars eren 8 - 9 mesos i el pes oscil.lava entre 30 i 100 g. L'estoc es mantenia en tancs circulars de 2,000 l amb circuit obert d'aigua a una temperatura de 12.5 °C, que procedia de diverses fonts localitzades dintre dels terrenys del U.S. National Fisheries Center.

3.2.2. ERITRÒCITS DE BE.

S'obtingueren comercialment procedents de Whittaker. M.A. Bioproducts (Walkersville. Md. USA). Abans del seu ús es rentaven tres cops amb PBS per centrifugació a 1,200 r/m durant 10 minuts i a una temperatura de 4 °C. Es portaven a una dilució final del 10 % amb PBS.

3.2.3. ANTISÈRUMS.

Els tres antisèrums específics de conill utilitzats es prepararen en el mateix National Fish Health Research Laboratory on es realitza aquest estudi.

Tal com s'ha ressenyat en el capítol I, els antiserums són específics contra el lipopolisacàrid complet d'A. salmonicida, contra la proteïna-A de la capa-A i contra cèl·lules completes i inactivades del bacteri que presenten tots dos antígens (LPS i proteïna-A).

3.2.4. PURIFICACIÓ DEL LIPOPOLISACÀRID.

El mètode utilitzat per a purificar el LPS fou l'extracció amb fenol calent segons Westphal & Jahn (1965), modificada per Hanson & Phillips (1981). El procediment dut a terme fou:

a)- Fer créixer cada una de les soques escollides (3.10, 3.64, 3.139, 3.18) en BHI-Agar inclinat durant 48 hores a 20 °C.

b)- Rentar el creixement amb 1 ml de BHI, i amb aquest inocular 1 l de BHI incubant-ho 48 hores a 20 - 23 °C amb una agitació de 150 r/m.

c)- Centrifugar el cultiu a 4,500 r/m i a 4 °C, durant 30 minuts.

d)- Rentar tres vegades el precipitat cel·lular (pellet) amb una solució salina del 0.85 % de NaCl.

e)- Pesar el pellet i resuspendre'l en una proporció de 1:1:10 (pes/volum) en aigua destil·lada.

Aquesta suspensió és millor tenir-la a 65^o -68^o C en un bany d'aigua. Al mateix temps, calentar en el bany el fenol líquid al 90 %.

f)- Barrejar, en igual proporció, el pellet resuspès i el fenol. Incubar-ho a 65^o -68^o C en un bany d'aigua durant 10 - 15 minuts i amb una agitació lleugera. Per sobre els 68^o C, el fenol i l'aigua són miscibles en qualsevol proporció.

g)- Refredar la barreja a 10^o C en un bany de gel, i centrifugar a 3,000 r/m, a 4^o C durant 30 - 45 minuts. En el tub se separen tres bandes:

- Superior: capa aquosa que traurem i guardarem.
- Intermèdia: precipitat de proteïnes en la interfase.
- Inferior: capa de fenol.

h)- Afegir de nou aigua destil·lada a la capa de fenol, i repetir la incubació a 65^o -68^o C i la centrifugació.

i)- Treure de nou la capa aquosa i ajuntar-la amb l'anterior.

j)- Dialitzar contra aigua destil·lada durant 3 - 4 dies a una temperatura de 4^o C.

k)- Liofilitzar el material dialitzat durant unes 36 hores.

Per comprovar la puresa del LPS extret de cada soca representant, es va resuspendre el material liofilitzat amb la solució tampò per mostres d'electroforesi (Laemmli Sample Buffer) en una proporció d'1:1 i es va córrer un SDS-PAGE.

3.2.5. MARCATGE DELS ERITRÒCITS DE BE AMB EL LIPOPOLISACÀRID.

Es va seguir la tècnica utilitzada per Anderson (1978) amb l'única variació que aquest autor purifica el lipopolisacàrid pel mètode acetona-alcohol. Breument consisteix amb el següent protocol:

a)- Els eritròcits es renten tres cops amb PBS estèril per centrifugació a 1,200 r/m, a 4 C durant 10 minuts. Es porten a una dilució final de 1'1:10 (volum/volum) en PBS.

b)- Per altra banda es resuspèn 1 mg del LPS liofilitzat en 1 ml de PBS. Es posa 30 minuts en ebullició en bany d'aigua per facilitar una completa dissolució. Després es centrifuga a 1,200 r/m, a 4 C i durant 10 minuts per fer precipitar el material que no s'hagi resuspès.

c)- Es barreja el lipopolisacàrid resuspès amb

la suspensió 1/10 dels eritròcits, en una mateixa proporció volum/volum.

d)- S'incuba durant 60 minuts a 37 C en un bany d'aigua i s'agita la barreja cada 15 minuts.

e)- Es manté al llarg de la nit a 4 C, i al dia següent abans d'utilitzar-se es renta per centrifugació a 1,200 r/m i 4 C, durant 10 minuts. Després es porta a una dilució final d'1:10 (volum/volum) d'eritròcits marcats i de PBS.

Per comprovar si els eritròcits han quedat marcats abans d'utilitzar-los en el "test de la placa per hemolisi passiva" es realitza una hemoaglutinació per cada un dels diferents lots d'eritròcits marcats amb els LPS de les quatre variants antigèniques de cèl.lules d'A. salmonicida d'aquest estudi. Els antisèrums utilitzats són els específics per al LPS, per a la proteïna-A i per a tots dos antigens tal com s'ha dit en l'apartat 3.2.3. A més a més, s'utilitza antisèrum normal de conill com a control (Taula 10).

3.2.6. PREPARACIÓ DE LES VACUNES.

Seguint el mateix procés es prepararen quatre vacunes amb les cèl.lules completes, inactivades i diferenciades entre elles per la seva dotació antigènica.

ANTISÈRUMS

	LPS	A-layer	W.C.	Normal
3. 10 LPS-SRBC	+	-	+	-
3. 64 LPS-SRBC	-	-	-	-
3.139 LPS-SRBC	+	-	+	-
3. 18 LPS-SRBC	-	-	-	-
CONTROL-SRBC	-	-	-	-

Taula 10. Hemoaglutinació dels eritròcits de be marcats amb el LPS de cada una de les soques representants en front dels antisèrums específics de conill que s'indiquen.

Per tant, cada una corresponia a cada un dels grups antigènics indicats en els objectius:

<u>VACUNA</u>	<u>D-Ag</u>	<u>ACE</u>	<u>AÏLLAMENT</u>
3. 10	+	-	3. 10
3. 64	-	+	3. 64
3.139	+	+	3.139
3. 18	-	-	3. 18

La seva preparació fou tal com s'exposa a continuació i tal com ressenyen Cipriano et al., 1983:

a)- Inocular la soca escollida en 5 ml de BHI-brou, incubant-ho durant 24 hores a 18^o - 20^o C.

b)- Transferir els 5 ml. cultivats a 500 ml de BHI-brou estèril. Incubar-ho durant 48 hores a 18^o - 20^o C, amb una agitació de 150 r/m.

c)- Agafar una alíquota de 100 µl i fer un banc de dilucions per a comptar el nombre de cèl.lules viables (CFU: Colony Forming Cells) segons Miles & Misra (1938). També es realitza una tinció GRAM i una caracterització bioquímica del cultiu per comprovar la seva puresa.

d)- Afegir un 0.3 % de cloroform al cultiu per inactivar les cèl.lules. Mantenir-ho al llarg de la nit a 18^o - 20^o C, amb agitació de 150 r/m.

e)- Airejar, suaument, en condicions estèrils i durant 24 hores el cultiu inactivat. D'aquesta manera s'elimina el cloroform.

f)- Centrifugar a 3896 g i 4 C, durant 30 minuts en condicions estèrils.

g)- Resuspendre el precipitat cel.lular (pellet) en 100 ml de PBS estèril.

h)- Confirmar l'esterilitat de les vacunes en plaques de BHI-agar incubant-les durant 48 hores a 18 - 20 C.

Aquest fou el protocol seguit quan la vacuna va ésser nomès administrada per via intracelomàtica. Quan s'utilitzava la injecció intracelomàtica i la immersió es prescindia de la darrera centrifugació i resuspensió en PBS, administrant-se les cèl.lules conjuntament amb el medi de cultiu. Ara bè, en tots els casos es confirmava l'esterilitat de la vacuna abans d'utilitzar-la.

3.2.7. IMMUNITZACIÓ. VIES D'ADMINISTRACIÓ.

Al llarg d'aquest treball es portaren a terme dos immunitzacions amb l'objectiu de valorar diferents aspectes de les vacunes. La primera va ésser per a l'estudi de la immunoresposta quan s'injectaren les vacunes per via intracelomàtica. S'immunitzaren 300

peixos Salvelinus fontinalis d'un pes mig de 65 g, i es van distribuir en grups de 50 per cada una de les vacunes. El lot control s'injectà amb PBS estèril.

Prèviament a la immunització per via intracelomàtica, els peixos eren anestesiats per una immersió en MS - 222 (Tricaine Methanesulfonate) a una concentració igual o inferior a 0.4 mg per litre d'aigua. S'utilitzaren agulles de 26 1/2 G per a injectar-los, i el volum administrat a cada exemplar fou 0.2 ml. El nombre de cèl.lules inactivades (CFU) injectades per peix fou aproximadament de 10^9 . En la taula 11 s'exposen les dades per cada una de les vacunes utilitzades.

Es mantingueren lots de 20 peixos, com a màxim, en aquaris de 60 litres. El fluxe d'aigua era de dos litres per minut, i la temperatura de 12.5 C.

El segon lot immunitzat fou per valorar la immuno-resposta segons la via d'administració. Es vacunaren 320 Salvelinus fontinalis d'un pes mig de 65 g. La mitat d'ells foren anestesiats prèviament, tal i com s'ha indicat. La immunització fou intracelomàtica, i el volum injectat fou de 0.2 ml. Per tant, la dosi fou de $10^7 - 10^8$ cèl.lules inactivades per peix (Taula 12). Es repartiren en lots de 40 per cada una de les quatre vacunes.

VACUNA	CFU/ml.	Vol. injectat	#CFU injectat
3. 10	1×10^{10}	0.2 ml.	2×10^9
3. 64	1.5×10^{10}	0.2 ml.	3×10^9
3.139	1.5×10^{10}	0.2 ml.	3×10^9
3. 18	1×10^{10}	0.2 ml.	2×10^9

Taula 11. Concentració de les vacunes injectades intracelomàticament per l'estudi de la immuno-resposta.

VACUNA	IMMERSIÓ		INJECCIÓ	
	Temps	CFU/ml.	Dosi	CFU/peix
3. 10	60 s.	1.1×10^8	0.2ml.	2.2×10^8
3. 64	60 s.	2.3×10^8	0.2ml.	4.6×10^7
3.139	60 s.	1.3×10^8	0.2ml.	2.6×10^8
3. 18	60 s.	7.0×10^8	0.2ml.	1.4×10^8

Taula 12. Concentració de les vacunes i temps d'exposició o dosi d'injecció utilitzades en la comparació de les vies d'administració i en l'estudi de la protecció adquirida.

L'altra meitat, sense rebre cap mena d'anestèsia i també repartits en grups de 40 per vacuna, foren immunitzats per immersiò en un bany d'un cultiu inactivat. El títol d'aquest era de $10^8 - 10^9$ CFU/ml (Taula 12), i la durada del bany de 60 segons.

Per cada un dels lots immunitzats per diferent via hi havia un grup control de 40 peixos sense rebre cap mena de tractament o immunització. Cada grup de 40 exemplars era mantingut en subgrups no inferiors a 10 peixos ni superior a 20. La capacitat dels aquaris era de 40 l amb un fluxe d'alimentació d'aigua de 1 l/m i una temperatura de 12.5 C.

3.2.8. ESTUDI DE LA IMMUNORESPOSTA.

3.2.8.1. Microaglutinació.

La resposta humoral es mesura pel títol d'aglutinines mitjançant una microaglutinació del sèrum de cada exemplar contra l'antigen homòleg (cèl.lules vives) respecte la vacuna que li havia estat administrada.

En el primer estudi, sobre la immunoresposta de Salvelinus fontinalis quan s'utilitzava la via intracelomàtica, es va mesurar fins a la vuitena setmana

després de la injecció. Això basant-se en els resultats sobre la cinètica de la immuno-resposta en aquesta espècie obtinguts per Cipriano 1983 a. Els mostres es realitzaren les setmanes 1, 2, 4, 6 i 8. Es van prendre de cada grup de peixos immunitzats amb la mateixa vacuna, un total de 8 exemplars. En el segon lot immunitzat, per comparar les vies d'administració, va seguir-se la immuno-resposta fins a la sisena setmana, basant-se en els resultats de la resposta obtinguda en el primer lot immunitzat per injecció i.c. En aquest cas, la mostra setmanal per grup fou de 10 exemplars i es realitzà la primera, segona, quarta i sisena setmanes.

Prèviament al procés d'anàlisi de les mostres, els peixos s'anestesiaven en un bany de 0.4 mg de MS - 222 per litre d'aigua, i posteriorment se sacrificava cada un d'ells amb un cop a la nuca. Ràpidament es tallava el peduncle caudal i es recollia en un tub la sang que vessava de la vena caudal. Després s'obria la cavitat abdominal per extraure la melsa i utilitzar-la en el "test de la placa per hemolisi passiva" tal i com es descriu en l'apartat 3.2.8.2. Quan es va comparar la immuno-resposta induïda per diferents vies d'administració no es va valorar la resposta cel.lular i per tant, no va ésser necessari extreure les melses.

La sang recollida es deixava coagular en el tub al llarg de la nit, mantenint-ho a 4 C. Al matí següent es centrifugava a 1,200 r/m i 4 C durant 10 minuts. S'extreia el sèrum el qual s'utilitzava en la microaglutinació. Aquesta, es realitzava en microplaques de 96 pous amb fons cònic amb una dilució inicial d'1/2 del sèrum-mostra en solució salina al 0.05 % de NaCl. Es portava a una dilució final en el pou nombre 12 d'1/4096 mitjançant anses de microaglutinació de 50 µl. Finalment, es posaven 50 µl d'una suspensió al 25 - 30 % de transmitància a 525 nm en solució salina (0.05 % NaCl) de l'antigen homòleg (cèl.lules vives) de cada grup estudiat. Per exemple: el sèrum dels peixos del lot, que havia estat injectat amb la vacuna 3.10 constituïda per cèl.lules inactivades de la soca 3.10 (O-Ag +, ACE -), rebia com antigen homòleg cèl.lules vives de la mateixa soca 3.10.

La microaglutinació es deixava reposar al llarg de la nit mantenint-la a 4 C. Al matí següent es feia una primera lectura que es reafirmava al final del mateix dia, donant com a resultat el nombre del pou darrer on es presentava aglutinació. Es feien sempre controls positius i negatius amb tots els antígens utilitzats. Per als positius s'utilitzava antiserum de conill contra cèl.lules completes d'A. salmonicida 3.101, que

presentava tots dos antigens (O-Ag i ACE). El sèrum del lot no immunitzat era valorat enfront de les quatre combinacions antigèniques.

3.2.8.2. Test de la placa per hemolisi passiva.

Per valorar la resposta cel.lular es va utilitzar aquesta tècnica segons l'adaptació d'Anderson (1978). En ella es mesura el nombre de cèl.lules formadores de placa (PFC: Plaques Forming Cells) o també anomenades mediadores de la resposta per ésser productores d'anticossos. El resultat es dona en valor relatiu de les PFC per 10^6 limfòcits presents en la melsa.

El lot de Salvelinus fontinalis utilitzats fou el mateix amb què es va valorar la resposta humoral de les quatre vacunes administrades per via intracelomàtica. Per tant, el seguiment de la immuno-resposta cel.lular es va fer durant 8 setmanes. Després de sangrar els exemplars tal com s'ha indicat anteriorment, s'obria la cavitat abdominal i s'extreia la melsa. Aquesta es col·locava en una placa de Petri de 60 mm de diàmetre on hi havien 10 ml de medi de cultiu cel.lular Eagle's MEM 2 (2 % new born, w/1-glutamina, p/s i NaHCO₃) i una petita malla metàl·lica. Subjectant la melsa amb unes pinces i raspant-la contra la malla es va esparracar l'òrgan. La

suspensió obtinguda es filtrà a través de llana de vidre i es va recollir en un tub amb l'ajut d'un embut de vidre. Posteriorment, se centrifugava a 1,200 r/m i 4 C durant 10 minuts, i es resuspensia el precipitat cel.lular en 1 ml de "Eagle's MEM 2". A partir d'aquesta suspensió cel.lular es feia una dilució 1:10 utilitzant de nou el mateix tipus de medi. Es barrejava 0.1 ml de cada una d'aquestes suspensions amb el medi de plaqueig que es mantenia a 37 - 40 C. Aquest darrer consistia en:

- 0.2 ml d'una dissolució al 0.1 % d'agarosa per electroforesi.
- 0.2 ml de 2X Eagle's MEM 4 (4 % new born, w/1-glutamina, p/s i NaHCO₃).

Es mantenia en un bany d'aigua a 37 - 40 C perquè no solidifiqués l'agarosa. Després s'hi afegia 0.2 ml d'eritròcits de be (marcats o no marcats), i s'agitava per a obtenir una suspensió uniforme. Finalment, s'extenia en un portaobjectes (25 x 75 mm) formant una capa fina. Cada mostra de melsa era processada per triplicat utilitzant eritròcits marcats amb el LPS d'A. salmonicida que presenta l'antigen-O, eritròcits marcats amb el LPS que no presenta l'antigen-O i eritròcits sense marcar com a control.

Els portaobjectes es col.locaren en una safata amb

paper de filtre empapat d'aigua en el fons per a mantenir la humitat. Es tapà amb paper d'alumini i es deixà incubar durant 4 hores a 20 C. Si el test no podia finalitzar-se el mateix dia, es mantenien les safates a 4 C durant la nit i es continuava el seu procés al dia següent. A continuació s'afegia 1 ml de complement (procedent del sèrum normal de Salvelinus fontinalis) a sobre de cada una de les mostres en el portaobjectes. El complement era una dilució a l'1:20 de sèrum fresc en PBS. A les 4 hores s'examinaven les mostres i es comptaren el nombre de plaques d'hemolisi que ens indicaven la presència en el seu centre d'una cèl.lula productora d'anticòs.

Es comptà el nombre total de limfòcits en cada mostra (melsa) en una càmera de glòbuls. S'utilitzà una dilució 1:100 de la suspensió cel.lular original en una solució-tinció composta d'un 2 % àcid acètic en PBS amb algunes gotes de "Tripan Blue" al 4 % també en PBS.

3.3. R E S U L T A T S.

3.3.1. PREPARACIÓ DE LES VACUNES.

Totes quatre vacunes foren preparades com s'ha explicat anteriorment. Cal indicar però que fou necessària una concentració de l'1 % de cloroform per inactivar el cultiu de la soca 3.139. Per les altres soques fou suficient amb el 0.3 % indicat anteriorment.

L'esterilitat en totes elles fou comprovada per no observar creixement en les plaques de BHI-agar. Aquestes havien estat sembrades prèviament a la inactivació del cultiu, i incubades a 18 - 20 C controlant-les durant 48 hores.

La concentració final (#CFU inactivats/ml) de cada vacuna fou de l'ordre de 10^{10} CFU/ml. Com el volum injectat fou 0.2 ml per peix, la dosi aproximada de vacunació fou de 10^9 CFU inactivats per peix. En la taula 10 queden concretats els valors per a les diferents vacunes.

Es realitzà una microaglutinació de les cèl.lules inactivades enfront dels tres antisèrums específics de conill mostrant uns resultats semblants a quan es va fer amb les cèl.lules vives de cada soca. Tot i que presenten títols d'aglutinació lleugerament inferiors, són

	MICROAGLUTINACIÓ			SDS-PAGE	
	LPS	A-layer	W.C.	O-Ag	A-layer
3. 10W	5	0	7	+	-
3. 64B	0	5	6	-	+
3.139B	6	5	6	+	+
3. 18W	1	0	4	-	-

Taula 13. Característiques antigèniques de les quatre vacunes utilitzades en aquest estudi. Els valors de la microaglutinació s'expressen com el Log₂ de la dilució de l'anticòs. Els símbols + i - indiquen, respectivament, presència i absència de l'antigen.

significatius. Tambè es van còrrer els gels de poliacrilamida de cada una d'elles, processant-se amb una tinciò de nitrat de plata i una tinciò de CBB. Totes dues proves ens reafirmen les dotacions antigèniques de les quatre vacunes (Taula 13).

3.3.2. VALORACIÓ DE LA IMMUNORESPOSTA HUMORAL I CEL·LULAR.

3.3.2.1. Resposta humoral.

A partir de la segona setmana posterior a la immunització per injecció intracelomàtica, es comença a observar un increment en els títols d'aglutinines (Fig. 11). En la tercera mostra, que correspon a la quarta setmana, ja es detectaren uns nivells de resposta humoral significatius, en aquells grups que la presentaven. Això es calculà amb una anàlisi de la variància i una comparació múltiple de les cinc mostres amb el test de la menor diferència significativa (Fig. 12) amb un nivell de confiança del 95 % ($P < 0.05$).

Els grups vacunats amb 3.10, 3.64 i 3.139 presenten una resposta humoral significativa mentre que no hi ha un increment significatiu del títol d'aglutinines ni pel grup vacunat amb 3.18 ni pel grup

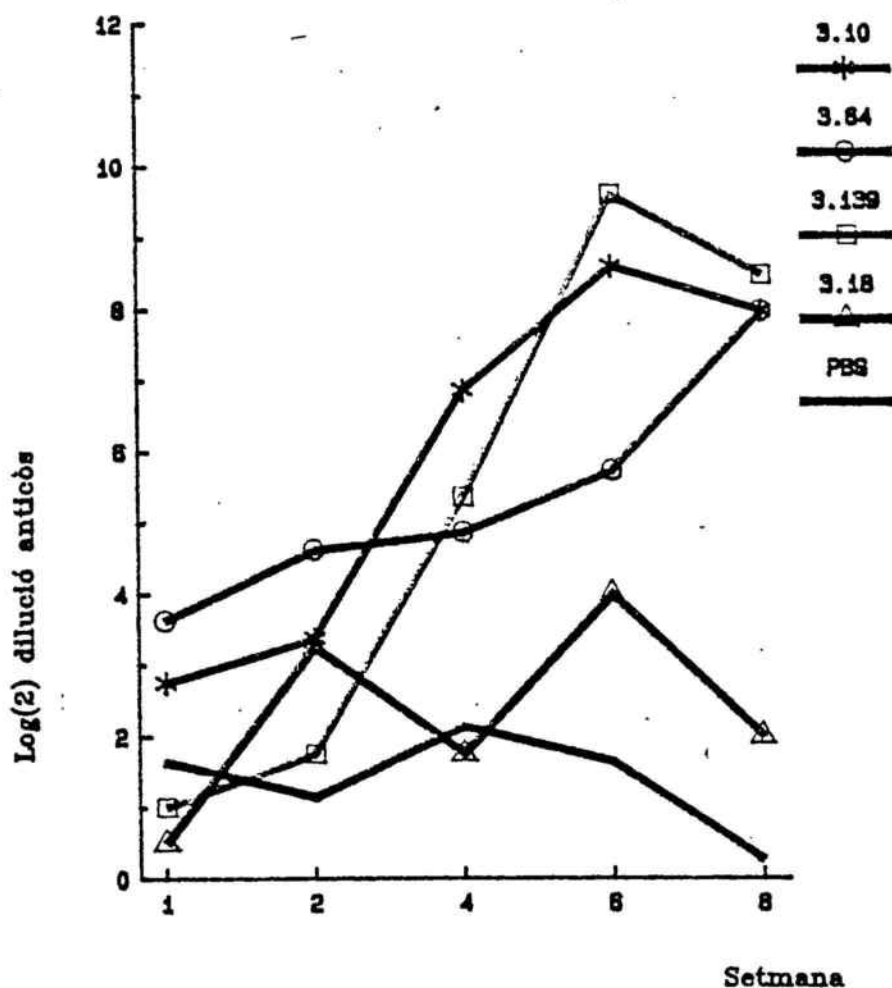


Figura 11. Resposta humoral en *Salvelinus fontinalis* induïda per cada vacuna injectada intracelomàticament i pel grup control. 3.10: O-Ag +, ACE -; 3.64: O-Ag -, ACE +; 3.139: O-Ag +, ACE +; 3.18: O-Ag -, ACE -.

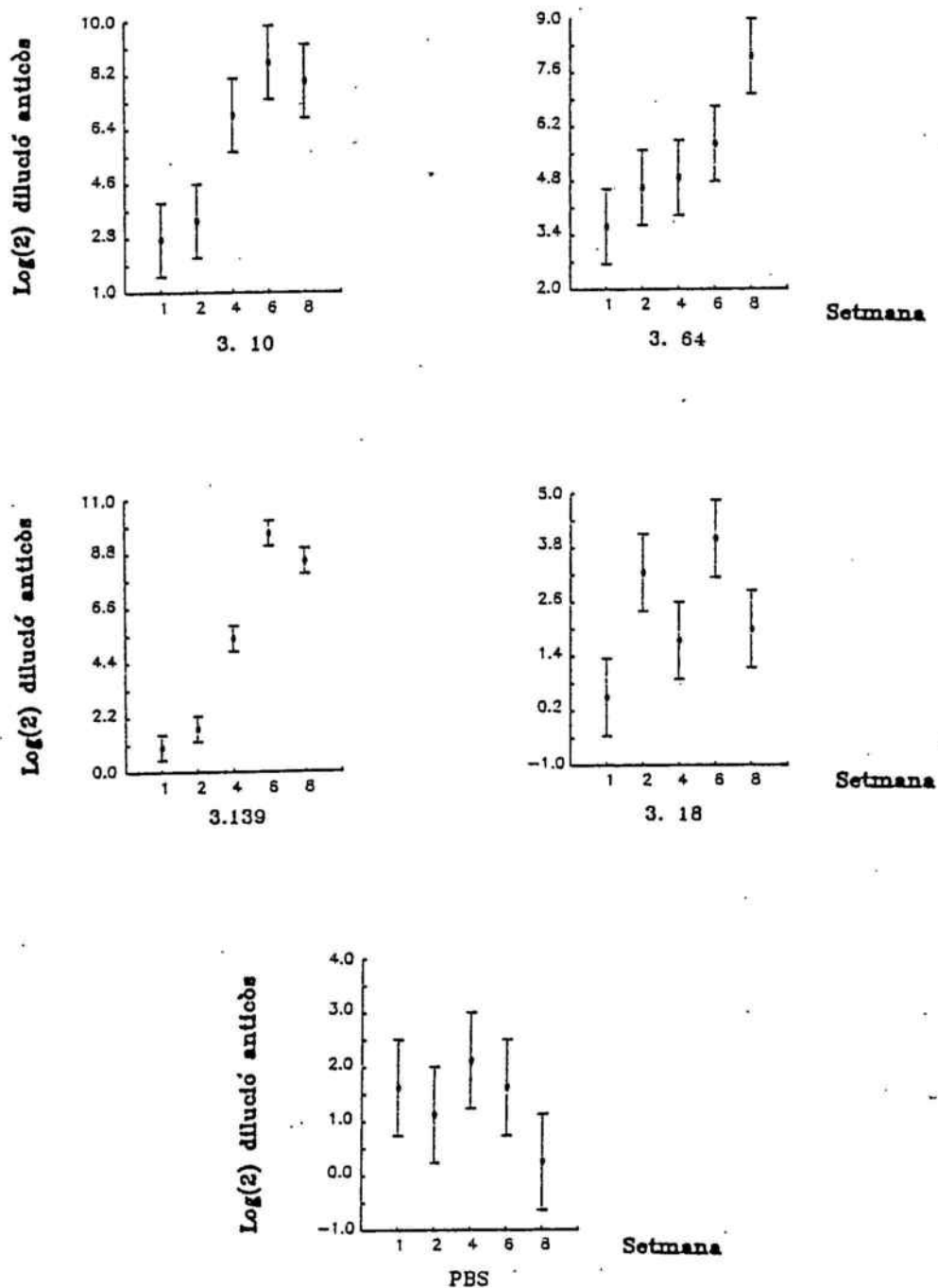


Figura 12. Resultats del test de la menor diferència significativa entre les respostes humerals induïdes per les vacunes injectades i pel control (PBS).

Vacuna	Setmana				
	1	2	4	6	8
3. 10	2.75	3.37	6.87	8.62	8.00
3. 64	3.62	4.62	4.87	5.75	8.00
3.139	1.00	1.75	5.37	9.62	8.50
3. 18	0.50	3.25	1.75	4.00	2.00
Control	1.62	1.12	2.12	1.62	0.25

Taula 14. Valors mitjans del títol d'aglutinines (Log₂ de la dilució de l'anticòs) en cada grup vacunat intracelomàticament i en el control.

control.

Els valors màxims de les mitges d'aglutinació fou assolit en la sisena setmana pels grups 3.10 i 3.139 amb uns nivells de dilució de $1/512$ pel primer i de $1/1024$ pel segon. Aquests corresponen als valors mitjans del nombre de pou 8.625 i 9.625 respectivament (Taula 14). El grup 3.64 presenta la seva mitjana màxima (8.000) en la vuitena setmana amb un nivell de dilució de $1/256$. Molt per sota quedaren els valors mitjans màxims dels grups 3.18 (4.000) o dilució d' $1/16$, en la sisena setmana) i del grup control (2.125 o dilució d' $1/4$ en la quarta setmana).

Es realitzà una T-Student prenent els valors mitjans d'aglutinació dels grups immunitzats i control a partir de la quarta setmana, que és la mostra en què es manifesta significativament la immunoresposta. Amb un nivell de confiança del 95 % ($P < 0.05$, D.F. = 4) els grups immunitzats amb 3.10, 3.64 i 3.139 presenten una mateixa immunoresposta. Aquesta fou significativament superior i diferent a la del grup 3.18 i al control ($P < 0.05$, D.F. = 4). Aquests dos, com ja s'ha indicat anteriorment, no presenten una immunoresposta significativa i els seus nivells d'aglutinines són estadísticament els mateixos ($P < 0.05$, D.F. = 4).

Per comprovar l'especificitat de les aglutinines

per a cada un dels antigens estudiats, es van utilitzar diverses tècniques (Electrotransferència, immunotinció i absorcions). Dissortadament cap d'elles aportà informació alguna sobre l'especificitat, ja que encara no han estat adaptades a les característiques serològiques dels Teleostis.

3.3.2.2. Resposta cel.lular.

No es va detectar cap immunoresposta cel.lular en la melsa per cap dels quatre grups vacunats (Fig. 13). Els valors de PFC per 10^6 limfòcits foren pràcticament nuls i dintre el mateix nivell dels del grup control (Fig. 14). Tampoc no es manifestà cap diferència ni especificitat per part dels diferents grups estudiats enfront de la presència o absència de l'antigen-O en el lipopolisacàrid d'A. salmonicida utilitzat per marcar els eritròcits de be. Tant per la valoració de les mostres amb eritròcits marcats amb el lipopolisacàrid complet (O-Ag +) com per la seva valoració enfront dels eritròcits marcats amb el lipopolisacàrid on manca l'antigen-O, els resultats no aportaren cap informació (Taula 15). Cal tenir en compte que Anderson (1979) utilitzant aquesta tècnica dóna un nivell de $10^2 - 10^3 - 10^6$ PFC/10 limfòcits com a resposta cel.lular en la melsa de Salmo gairdneri

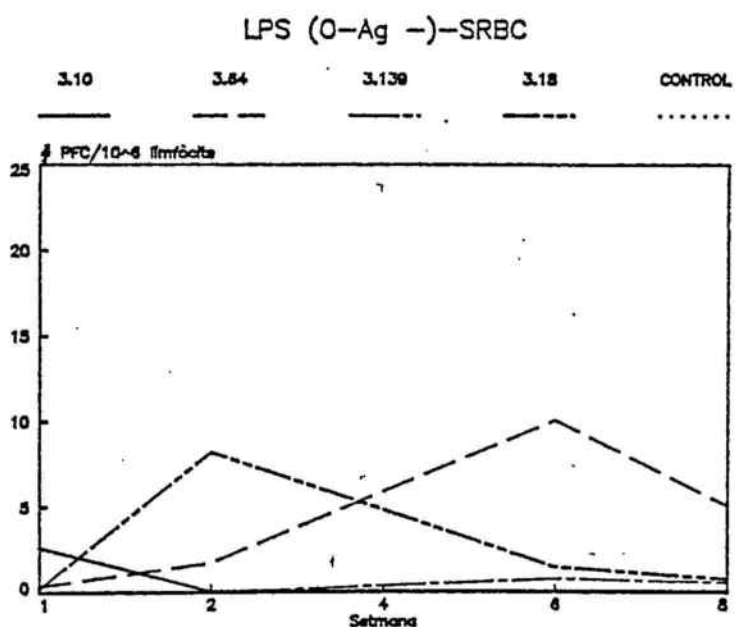
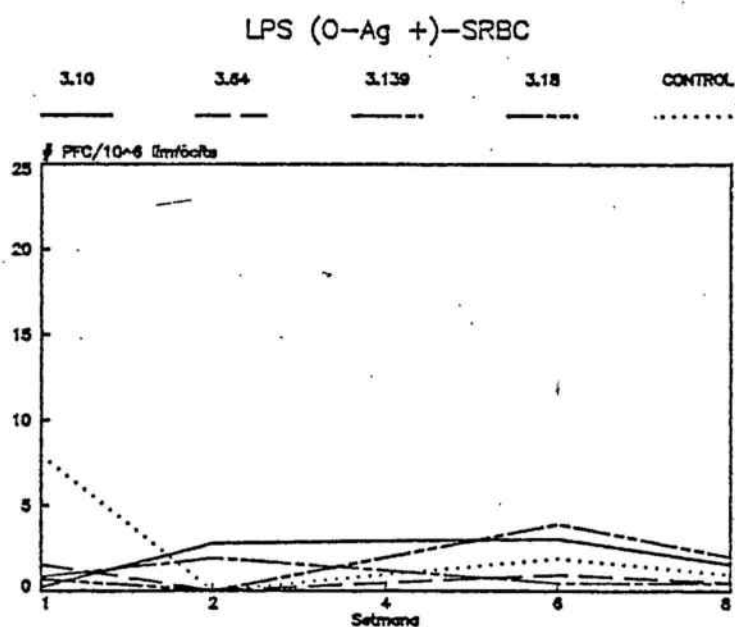
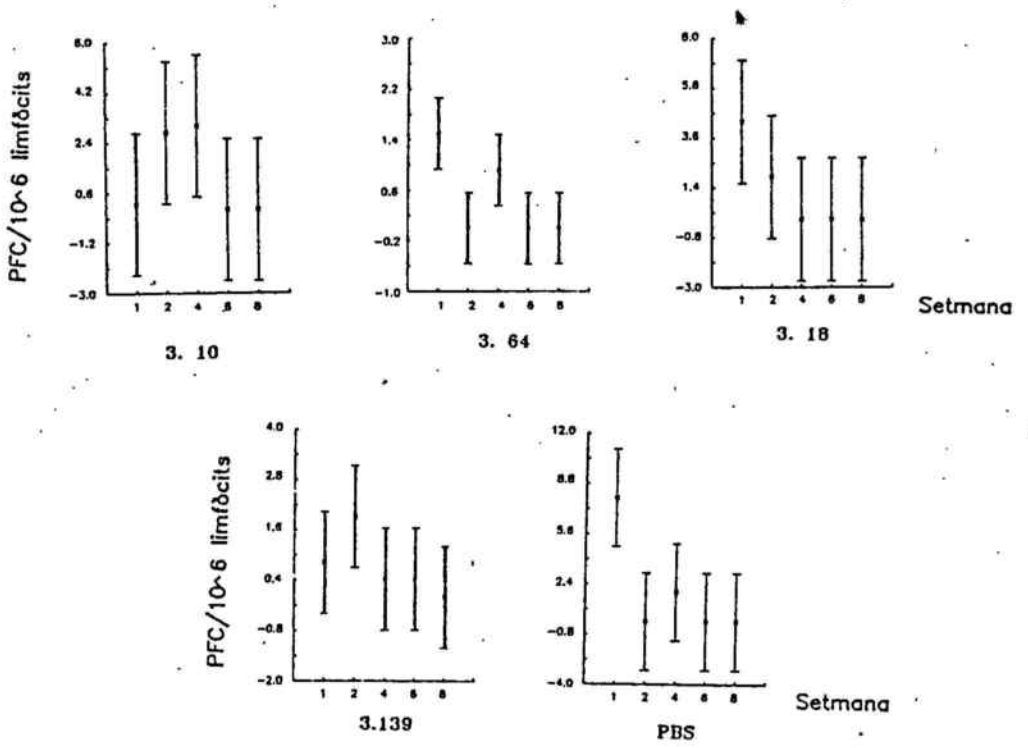


Figura 13. Resposta cel·lular detectada en *Salvelinus fontinalis* per cada vacuna injectada intracelomàticament i pel grup control al llarg de 8 setmanes (mostres bisetmanal). S'indica en cada gràfic el tipus de LPS utilitzat per a marcar els eritròcits.

LPS (0-Ag +)-SRBC



LPS (0-Ag -)-SRBC

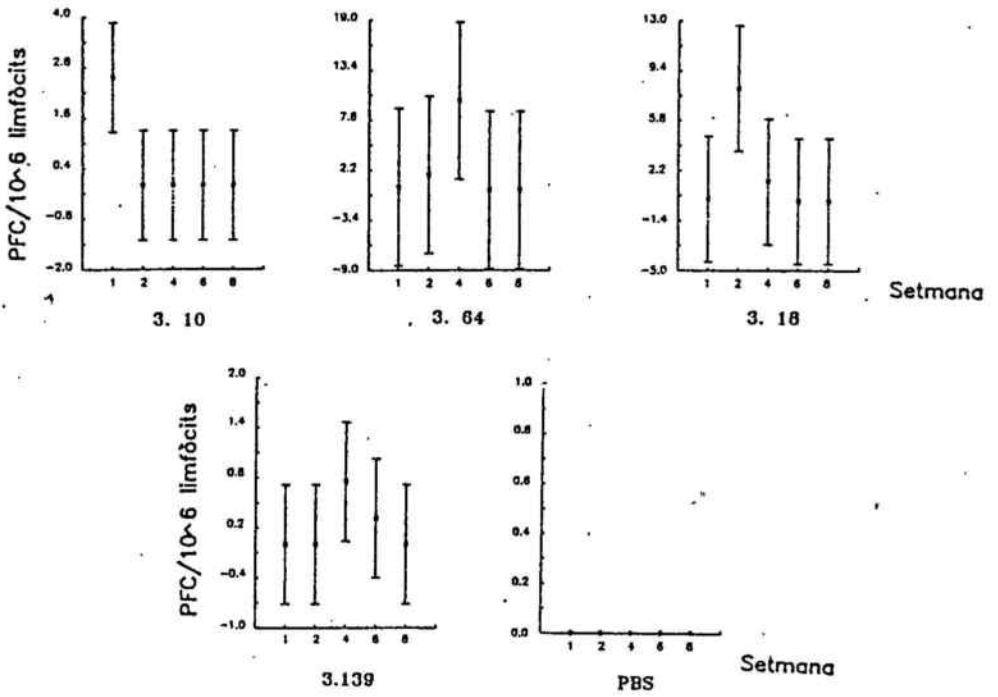


Figura 14. Resultats del test de la menor diferència significativa de la resposta cel.lular induïda per cada vacuna i pel control (PBS), valorats per cada tipus de LPS utilitzat per marcar els eritròcits.

Vacuna	Setmana				
	1	2	4	6	8
3. 10	0.19	2.76	3.01	0.00	0.00
3. 64	1.49	0.00	0.91	0.00	0.00
3.139	0.82	1.92	0.42	0.43	0.00
3. 18	0.63	0.00	3.88	0.00	0.00
Control	7.89	0.00	1.87	0.00	0.00

Vacuna	Setmana				
	1	2	4	6	8
3. 10	2.56	0.00	0.00	0.00	0.00
3. 64	0.32	1.69	10.00	0.00	0.00
3.139	0.00	0.00	0.75	0.31	0.00
3. 18	0.15	8.12	1.40	0.00	0.00
Control	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00

6

Taula 15. Valors mitjans de PFC/10 limfòcits al llarg de 8 setmanes en cada grup vacunat intracelomàticament i en el grup control. En la taula superior el LPS utilitzat per marcar els eritròcits és O-Ag +. En la taula inferior el LPS utilitzat és O-Ag -.

enfront d'una dosi de 100 µg/peix del lipopolisacàrid d'A. salmonicida. El mateix autor, treballant amb el lipopolisacàrid de Yersinia ruckeri a una dosi de 50 µg/peix, dóna també valors de $10^2 - 10^3 - 10^6$ PFC/10 limfòcits. Per tant, els mínims valors obtinguts en aquesta memòria estan molt per sota de poder-se considerar representatius d'una resposta cel·lular. L'oscil·lació tan minsa que presenten queda dintre del marge d'una resposta inespecífica tal com queda palès en el control amb eritròcits sense marcar.

3.3.3. VALORACIÓ DE LES VIES D'ADMINISTRACIÓ.

Basant-se en els resultats obtinguts en la cinètica de la immunoresposta quan s'immunitzà per via intracelomàtica, es va optar per seguir les respostes humorals induïdes per via i.c. i per immersió durant sis setmanes. La comparació es feu seguint-les mitjançant una microaglutinació del sèrum de cada exemplar mostrat enfront de l'antigen homòleg que li havia estat administrat. En el cas dels controls fou enfront de cada una de les combinacions antigèniques administrades en els grups immunitzats.

A causa de la manca d'informació sobre la resposta cel·lular pel "test de la placa per hemolisi passiva"

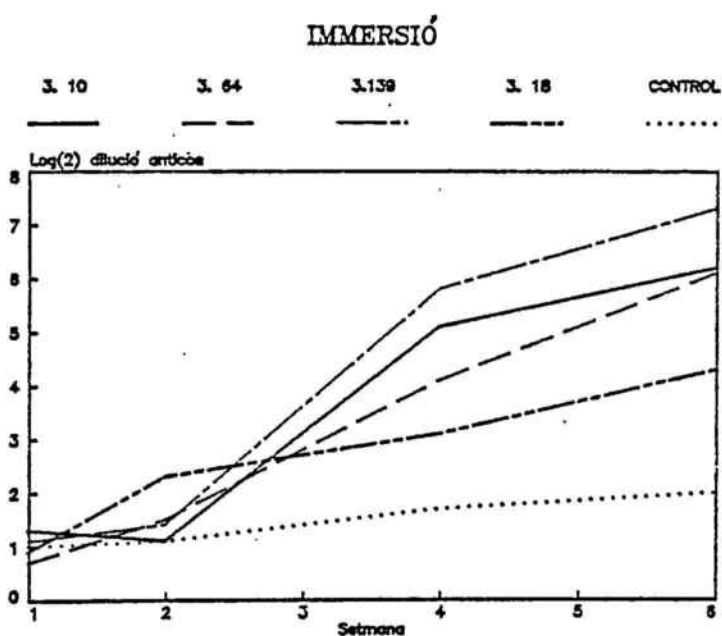
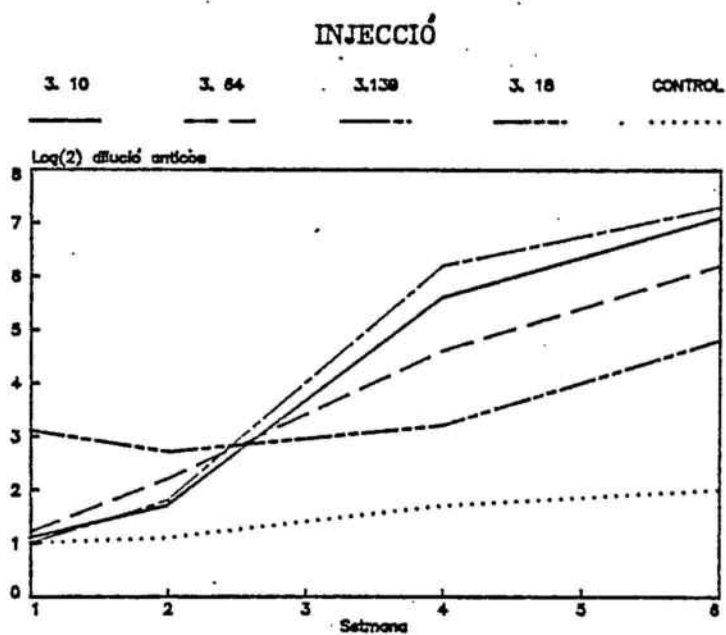


Figura 15. Resposta humoral en *Salvelinus fontinalis* per cada vacuna segons la via d'administració.

constatada en l'anterior apartat (3.3.2.2), es va prescindir aquest cop del citat test com a mesura de la immunoresposta.

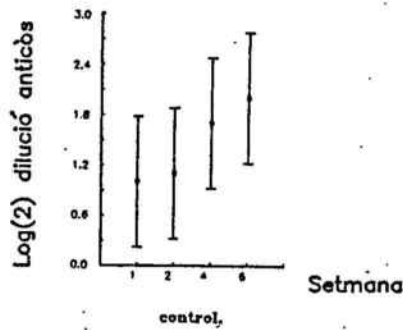
En les gràfiques de la Figura 15 es pot apreciar que la cinètica de les respostes per via intracelomàtica i per immersió de cada una i per cada una de les vacunes, són pràcticament iguals.

Es va realitzar una anàlisi de la variància dels resultats d'aglutinació de cada vacuna i via d'administració, i una comparació múltiple dels quatre mostratges amb el test de la menor diferència significativa (Fig. 16) amb un nivell de confiança del 95 %. Els grups vacunats amb 3.10, 3.64 i 3.139, per qualsevol de les dues vies, presenten una resposta humoral significativa a partir de la quarta setmana. No fou així en cap dels lots immunitzats amb 3.18 ni pels lots control, on els valors de les mostres al llarg de l'estudi es mantenen dintre d'uns mateixos nivells no significatius.

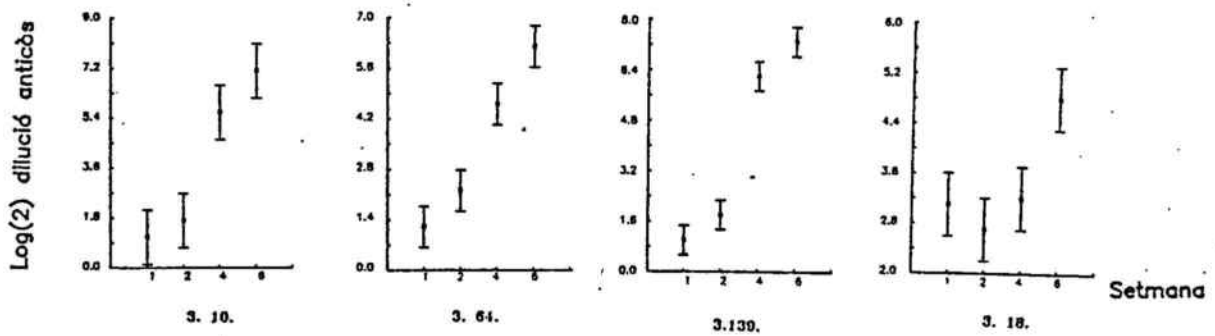
Els valors mitjans del títol d'aglutinines expressat amb un nombre que indica el darrer pou on es presenta aglutinació, estan exposats en la taula 16.

En una T-Student amb els valors mitjans d'aglutinació a partir de la mostra en què es manifesta la immunoresposta i amb un nivell de confiança del 90 %





IMMUNITZATS PER INJECCIÓ



IMMUNITZATS PER IMMERSIÓ

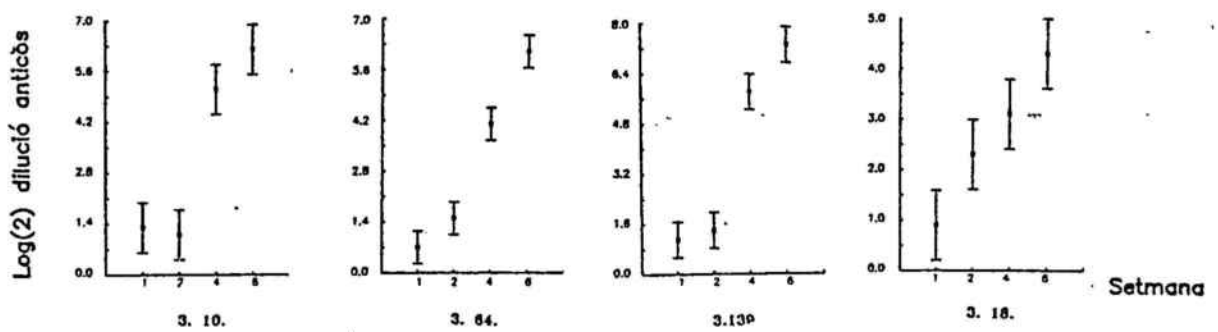


Figura 16. Resultats del test de la menor diferència significativa de la resposta humoral induïda per cada vacuna i pel grup control en cada via d'administració.

Setmana	INJECCIÓ				IMMERSIÓ			
	1	2	4	6	1	2	4	6
3. 10	1.1	1.7	5.6	7.1	1.3	1.1	5.1	6.2
3. 64	1.2	2.2	4.6	6.2	0.7	1.5	4.1	6.1
3.139	1.0	1.8	6.2	7.3	1.1	1.4	5.8	7.3
3. 18	3.1	2.7	3.2	4.8	0.9	2.3	3.1	4.3
Control	1.0	1.1	1.7	2.0	1.0	1.1	1.7	2.0

Taula 16. Valors mitjans del títol d'aglutinació (Log2 de la dilució de l'anticòs) per cada vacuna, via d'administració i pel grup control.

($P < 0.1$, D.F. = 2), es comprova que no hi ha diferència entre la immunoresposta donada pels lots immunitzats intracelomàticament i els immunitzats per immersió en cap de les vacunes.

Els grups immunitzats amb 3.10, 3.64 i 3.139 per qualsevol via tenen una immunoresposta estadísticament superior i diferent a la del grup immunitzat amb 3.18 i el grup control, amb una $P < 0.1$ i D.F. = 2.

3.4. D I S C U S S I Ó.

Tres de les vacunes utilitzades procedents de les soques 3.10, 3.64 i 3.139 induïren a un increment estadísticament significatiu del títol d'aglutinines en el sèrum de Salvelinus fontinalis. Aquesta immuno-resposta es féu present a partir de la quarta setmana, i arribà a uns nivells de dilució de 1'1/512 - 1/1024 en la sisena. No es presenta una diferència en la resposta induïda per aquestes tres soques constatant-se, per tant, la producció d'anticossos contra tots dos antígens. Això queda manifestat per la inexistència d'immuno-resposta en el lot vacunat amb les cèl.lules inactivades de la soca 3.18 que és no portadora de cap dels dos antígens, i pel lot control on tampoc no hi ha increment d'aglutinines.

Michel (1979) tampoc no troba diferències en la immuno-resposta (títol d'aglutinació) entre quan utilitza soques llises (proteïna-A absent) o quan ho fa amb soques rugoses (proteïna-A present). Aquesta valoració coincideix amb els resultats anteriorment exposats, sempre i quan les soques llises d'en Michel tinguessin complet el lipopolisacàrid (antigen-O positives), cosa que no queda explícita per aquest autor.

Quant a les possibles diferències provocades per la via d'administració no se'n detecta cap respecte a

l'ús de la injecció intracelomàtica i els 60 segons d'immersió. Els títols abastats per les tres vacunes que induïren una resposta foren pràcticament els mateixos per a les dues vies. Tampoc no presenten diferències en la cinètica de la seva resposta. Per tant, l'ús del mètode d'immersió es confirmaria com el més pràctic per a un estudi a escala més gran d'experimentació o de producció (escala pilot). Això és degut a la seva facilitat d'aplicació, el baix cost que comporta i l'obtenció dels mateixos nivells d'aglutinines que els que ens dona la injecció intracelomàtica.

El test de la placa per hemolisi passiva, tal i com el descriu Anderson (1978), es mostra pràcticament ineficaç en la detecció i seguiment de la immuno-resposta mediada per cèl.lules en la melsa. Els resultats nuls aquí obtinguts contrasten amb els d'Anderson (1979). Aquest autor anota en ells, uns nivells de $10^2 - 10^3$ PFC/ 10^6 limfòcits en la melsa de Salmo gairdneri quan s'hi injecta el lipopolisacàrid d'A. salmonicida que havia purificat pel mètode d'acetona-alcohol. Anderson (1978 i 1979) indica una alta resposta cel.lular en Salmo gairdneri enfront del lipopolisacàrid de Yersinia ruckeri utilitzant el mateix test. Rijkers et al. (1980) injectant SRBC (eritròcits de be) en Cyprinus carpio i

utilitzant la mateixa tècnica, anota que només un 5 % del nombre total de PFC és detectat en la melsa contrastant amb un alt percentatge en el pronefrò i en el mesonefrò. Neale & Chavin (1970) també trobaren un important paper de la part anterior i mitjana del ronyó en la producció d'anticossos en Carassius auratus enfront de Salmonella typhi. Per altra banda en 1972, Pontius & Ambrosius trobaren un nombre més alt de PFC en melsa i pronefrò que en mesonefrò quan injectaren SRBC a Perca fluviatilis.

Aquesta diversitat de resultats en el seguiment de la resposta produïda per cèl.lules productores d'anticòs qüestiona la sensibilitat de la tècnica utilitzada i convida a un aprofundiment en l'estudi dels mecanismes de la resposta cel.lular dels Teleostis. També dona peu perquè es conegui com condiciona la resposta el tipus d'antigen utilitzat, els procediments de la seva extracció i les dosis administrades.

La diferència dels resultats d'aquest treball amb els aportats per Anderson (1979) ve donada perquè aquest autor detecta una resposta quan injecta unes dosis altes de l'antigen (lipopolisacàrid) tals com 500 µgr/peix. No ho obté amb dosis baixes de 50 µg/peix. Cal afegir-hi que l'antigen injectat per Anderson és el lipopolisacàrid purificat mentre que aquí, en aquest treball, els antígens han estat cèl.lules completes inactivades,

situació tal vegada més pròxima a la natural. També és necessari indicar que Anderson utilitza Salmo gairdneri per als seus treballs i aquest estudi ha estat fet amb Salvelinus fontinalis, i hi podria haver diferent sensibilitat d'una espècie a l'altra.

Podem concloure que a partir dels resultats i aquestes observacions cal estudiar la resposta cel·lular induïda en altres òrgans (pronefrò,, mesonefrò, timus,...) i utilitzar d'altres tècniques més sensibles per a la seva detecció i seguiment.

4. CAPÍTOL III.

ESTUDI

DE LA PROTECCIÓ

ADQUIRIDA.

4.1. INTRODUCCIÓ.

Els primers intents de vacunació contra la furoncolosi se situen en la dècada dels 40 amb èxits més o menys discutibles (Smith, 1940; Duff, 1939). Els estudis de vacunació de Duff en 1942 encara tenen vigència en els nostres dies, i els seus resultats no han estat ni molt menys superats.

Krantz et al. (1963) estudien la immuno-resposta i valoren la protecció que presenten els exemplars vacunats. Tot i que aparentment els resultats semblaven prometedors, això cal relativitzar-ho pel que fa a l'ús d'una alta DL 50 en el "challenge". Això fa sospitar que la soca que utilitzaren era avirulenta.

Klontz & Anderson (1970) preparen una vacuna, FSA, per precipitació d'una toxina amb alum. Obtenen protecció treballant a nivell experimental però no la tenien a escala pilot. Paterson & Fryer (1974 b), amb cèl.lules completes inactivades i adjuvant (FCA), obtenen una bona protecció que persisteix com a mínim un any després de la immunització. No aconsegueixen, però, el mateix nivell quan no administren l'adjuvant.

Michel & Faivre (1982) en una sèrie de treballs per mesurar el títol d'aglutinines i la seva relació amb la protecció conferida per una vacuna, arriben a la

conclusió que el nivell d'aglutinines no implica necessàriament una protecció a la furoncolosi.

Spencer et al. (1965) i Cipriano (1982 b) intentaren immunitzar Salmònids passivament amb resultats més aviat poc esperançadors. No fou així pel que fa als treballs de McCarthy et al. (1983) que confereixen protecció de manera passiva a Oncorhynchus nerka si l'antisèrum injectat era contra una soca virulenta d'A. salmonicida inactivada amb formol.

Cipriano (1982 c) vacuna amb fraccions purificades dels productes extracel·lulars. La fracció que anomena IV confereix una alta protecció. Ara bé, el seu ús a escala superior no resulta viable per ésser cara la seva extracció i per obtenir-se en quantitats baixes.

Cipriano & Starlighter (1982) utilitzen una vacuna viva que és una soca avirulenta d'A. salmonicida sense aconseguir uns resultats positius.

Paterson & Fryer (1974 b) i Cipriano & Pyle (1985) veuen que, quan complementen les seves vacunes amb adjuvant tenen un títol d'aglutinació més alt i protegeixen la població vacunada. No ho aconsegueixen quan no administren l'adjuvant amb la vacuna.

Cipriano et al. (1983) indiquen que l'endotoxina i la fracció IV descrita per Cipriano (1982 c) són

immunògens necessaris per a conferir protecció a la furoncolosi.

D'altres intents de vacunació han estat fets amb l'ús d'una proteasa extracel.lular donada en dosis subletals (Shieh, 1984 i 1985). Aquests resultats contrasten amb els de Cipriano (1982 c) que no aconsegueix protecció amb la seva fracció II (proteasa).

Com es pot veure anteriorment, hi ha una sèrie d'experiències que unes amb altres entren en controvèrsia. Hi ha variacions considerables en els resultats segons la tècnica o mètode utilitzat en la preparació i administració de la vacuna. També, com ja s'ha discutit en el primer apartat de la memòria, existeixen diferents mètodes per induir una furoncolosi experimental segons els equips de recerca (Michel, 1980 a i b; McCarthy, 1983; Cipriano, 1982 a). Sembla que aquestes diferències podrien fer variar els resultats finals.

En aquest capítol s'avalua la protecció conferida per cada una de les dotacions antigèniques dels quatre grups classificats respecte a l'antigen-O i a la proteïna-A. També es compara si existeix alguna diferència en el nivell de protecció adquirida quan es vacuna utilitzant dues vies d'administració. El mètode d'inducció de la furoncolosi pel "challenge" és el de

Cipriano, 1982 a; on es mesuren les mortalitats
acumulatives durant dues setmanes.

4.2. MATERIAL I MÈTODES.

4.2.1. PEIXOS.

Els exemplars utilitzats eren de l'espècie Salvelinus fontinalis obtinguts de White Sulphur Springs National Fish Hatchery (West Virginia, USA). L'edat era de 5 mesos i el pes oscil·lava entre 15 - 20 g. L'estoc fou mantingut en piscines de 2,000 l amb circuit obert d'aigua de font a una temperatura de 12.5 C.

4.2.2. PREPARACIÓ DE LES VACUNES.

Les vacunes es prepararen utilitzant les soques representants dels quatre grups antigènics estudiats. Es va seguir el procés ressenyat en l'apartat 3.2.6 a excepció de la darrera centrifugació i resuspensió en PBS. Els cultius foren inactivats amb cloroform i s'injectaren o s'utilitzaren en el bany amb el medi de cultiu. L'esterilitat de les vacunes es confirmà per la manca de creixement en plaques de BHI-agar que s'havien sembrat amb cada una d'elles, i que s'incubaren 48 hores a 18 - 20 C.

4.2.3. VACUNACIÓ.

Un lot de 540 exemplars de Salvelinus fontinalis foren vacunats al mateix moment en què es feia el lot per l'estudi de l'eficàcia de les vies d'administració (veure apartat 3.2.7). Abans d'immunitzar el lot se separaren 60 exemplars que constituïren el grup control. La resta, 480, es dividiren en dos grups: un d'ells per ésser immunitzat per via intracelomàtica i l'altre per immersió. Per tant, per cada una de les vacunes hi havia 60 exemplars immunitzats per via intracelomàtica i 60 per immersió. Aquest grups de 60 foren repartits en 3 subgrups de 20, que es mantingueren en aquaris de 40 l amb fluxe d'aigua d'1 l/m a una temperatura constant de 12.5 C. Aquesta distribució permetia mesurar per triplicat, per cada vacuna i cada via d'administració, la protecció que conferien aquestes quan s'indueix experimentalment una furoncolosi (challenge).

Els peixos injectats foren prèviament anestesiats amb MS - 222 (Tricaine Methanesulfonate) en una concentració igual o inferior a 0.4 mg per litre d'aigua. S'utilitzaren agulles de 26 1/2 G i el volum injectat per cada peix fou 0.2 ml, essent aproximadament de 10^7 - 10^8 la dosi de cèl.lules inactivades injectades (Taula 12).

El lot vacunat per immersió no fou anestesiats i la

concentració del bany fou de $10^8 - 10^9$ CFU inactivats per mililitre. La durada del bany fou de 60 segons (Taula 12).

4.2.4. INDUCCIÓ D'UNA FURONCOLOSI EXPERIMENTAL.

El mètode utilitzat fou el d'immersió posat a punt i descrit per Cipriano, 1982 a. El procediment es descriu a continuació.

Es va inocular un tub de TSA inclinat amb l'aïllament d'Aeromonas salmonicida 3.75 procedent de la col·lecció del National Fish Health Research Laboratory. Aquest aïllament presenta l'antigen-O en el lipopolisacàrid i la proteïna-A en la capa-A, tal com es va determinar per gels de poliacrilamida tenyits amb nitrats de plata i amb CBB.

A les 24 hores de la incubació a 20°C es féu un rentat de la superfície inclinada amb PBS estèril. Després, el rentat s'ajusta a una suspensió cel·lular del 50 % de transmitància a 525 nm. Posteriorment es realitzà un banc de dilucions a partir de l'anterior suspensió, i pel mètode de Miles & Misra (1938) es calculà una concentració cel·lular de 4.4×10^7 CFU/ml.

S'injectaren 20 Salvelinus fontinalis amb 0.1 ml de la dilució 10^{-3} (aproximadament 10^3 CFU/peix), i es

manteniren en aquaris de 40 l amb un fluxe d'entrada d'aigua d'1 l/m i una temperatura constant de 12.5 C.

Diàriament, es controlava l'aquari, i al cinquè dia hi haguè una mortalitat del 95 %. A partir dels peixos morts es prengueren mostres dels ronyons, i se sembraren en plaques de TSA incubant-les durant 48 hores a 20 C. Tambè amb les mostres de ronyò, es realitzà una immunofluorescència directa amb un conjugat de isotiocianat de fluoresceïna i un antiserum de conill contra un aïllament d'A. salmonicida que presentava la dotació antigènica completa. Les immunofluorescències donaren sempre positives.

La confirmació del diagnòstic de furoncolosi es feu per l'aïllament, tinciò GRAM i caracterització bioquímica de les colònies crescudes en TSA, en les quals, cal dir que nomès es va trobar A. salmonicida.

A partir d'un dels aïllaments procedents de les plaques de TSA i un cop classificat com A. salmonicida, se sembraren tres tubs de 5 ml de TSB, els quals servirien d'inòcul per als tres flascons de 1.5 l de TSB. Aquests, foren incubats a 20 C durant 48 hores amb una agitació de 150 r/m. Abans d'utilitzar-se com a medi de bany per a la inducció de la furoncolosi, es va treure una al·lquota per avaluar el títol del cultiu, i donà uns valors de 10⁹ CFU/ml (Taula 17). El motiu de tenir per

GRUP	DOSI (CFU/ml.)	% DE MORTALITAT
3. 10 I	1.0 x 10 ⁸	93.3
3. 64 I	1.0 x 10 ⁸	83.3
3.139 I	1.0 x 10 ⁸	96.6
3. 18 I	9.1 x 10 ⁸	95.0
3. 10 B	9.1 x 10 ⁸	96.6
3. 64 B	9.1 x 10 ⁸	98.3
3.139 B	9.1 x 10 ⁸	85.0
3. 18 B	9.1 x 10 ⁸	95.0
CONTROL	9.1 x 10 ⁸	93.3

Taula 17. Concentracions dels cultius de la soca virulenta d'*A. salmonicida* utilitzades en la inducció experimental de la furunculosi en cada grup vacunat de *Salvelinus fontinalis*. El temps d'exposició en la immersió fou de 60 segons. S'indica el percentatge de mortalitat acumulativa presentat per cada grup immunitzat i pel control als 14 dies de la inducció.

triplicat el cultiu fou perquè per cada tres grups de 60 peixos s'utilitzaria un d'ells, i així no es perdria títol per les successives immersions.

Els vuit grups de 60 S. fontinalis varen mantenir-se durant sis setmanes en les condicions anteriorment explicades abans de produir la infecció experimental. Durant aquest temps es va seguir la seva resposta humoral mitjançant les mostres que es prenen del lot immunitzat per comparar les vies d'administració (apartats 3.2.7 i 3.2.8), les quals foren portades a terme amb les mateixes condicions i en el mateix moment. D'aquesta manera es tenia informació de la cinètica de la immunoresposta i del nivell d'aglutinines en el moment de la infecció experimental.

La sisena setmana fou quan s'induí la furunculosi amb el cultiu per triplicat de l'A. salmonicida aïllada dels peixos infectats per la soca 3.75 com s'ha explicat anteriorment. El bany en el cultiu tingué una duració de 60 segons, retornant després els peixos al seu aquari d'origen. Es mantingueren els subgrups de 20 peixos i s'anotaren diàriament les mortalitats al llarg de 14 dies.

El percentatge de mortalitat per cada grup immunitzat i per al grup control fou la mitjana de la mortalitat acumulativa dels tres subgrups que constituïen

cada un d'ells. La furoncolosi induïda fou confirmada per una immunofluorescència directa a partir de mostres de ronyò dels peixos que anaven morint.

4.3. RESULTATS.

Les gràfiques de la figura 17 ens mostren que les primeres mortalitats en tots els grups esdevingueren pels volts del quart dia després del bany en el cultiu de la soca virulenta 3. 75. La mortalitat màxima fou entre el vuitè i desè dia.

En tots els aquaris els peixos presentaren furòncols per tot el cos (Figura 18). La mort per furoncolosi fou confirmada en tots els peixos morts per una immunofluorescència directa a partir de frotis de mostres de ronyò (Figura 19).

Els nivells de mortalitat foren de l'ordre de 85 - 95 % per a tots els grups que es mostraren no resistents a la furoncolosi (Taula 17). Cap dels grups presenta un nivell superior o inferior de protecció respecte als altres amb una $P < 0.01$ i D.F. = 26.

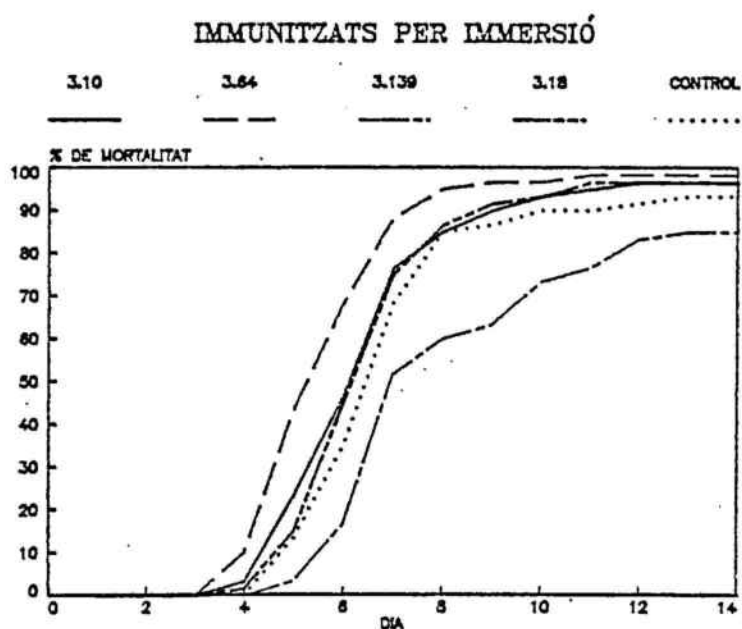
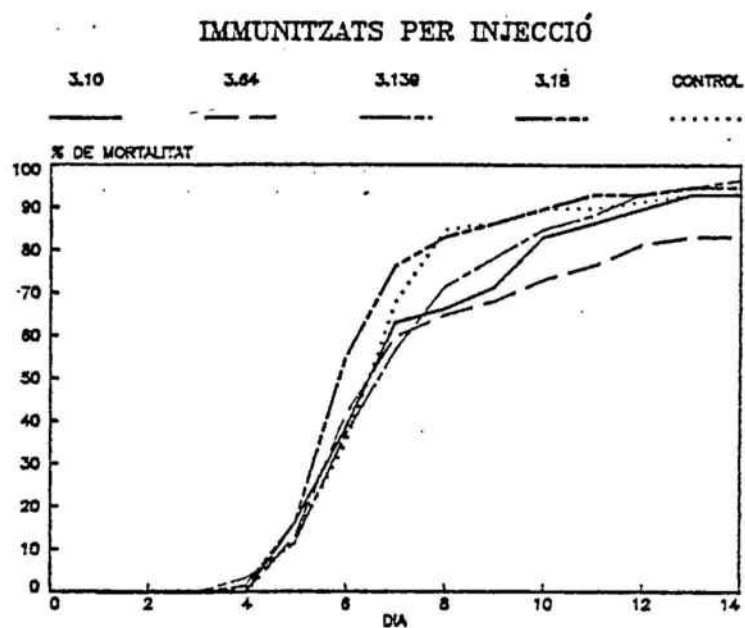


Figura 17. Percentatges de la mortalitat acumulativa durant 14 dies produïts per una furoncolosi induïda experimentalment en cada un dels grups vacunats i en el control.



Figura 18. En la fotografia es veuen tres exemplars de Salvelinus fontinalis afectats per una furunculosi experimental. S'observen els furòncols per tot el seu cos. (Fotografia gentilesa de R.C. Cipriano).

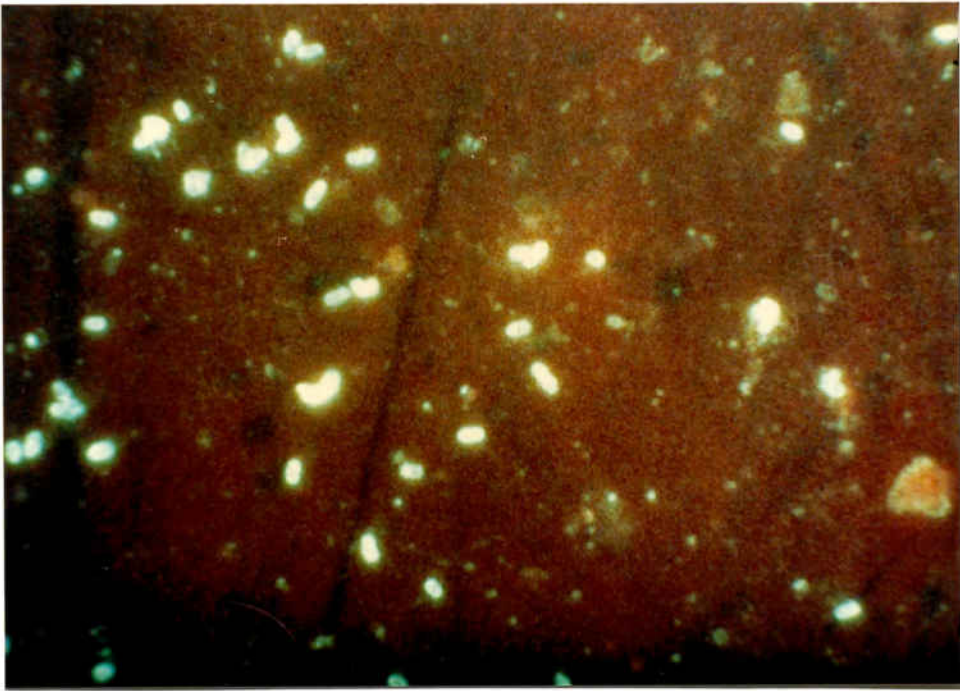


Figura 19. Immunofluorescència directa d'Aeromonas salmonicida. El conjugat utilitzat fou preparat amb isotiocianat de fluoresceïna i un antiserum de conill contra una soca d'A. salmonicida amb dotació antigènica completa (O-Ag +, ACE +).

4.4. D I S C U S S I Ó.

El mètode d'inducció experimental d'una furoncolosi descrit per Cipriano (1982 a) es mostra eficaç. La simptomatologia externa de la malaltia descrita en la introducció general d'aquesta memòria (apartat 1.2) apareixia a partir del quart dia.

L'aïllament d'A. salmonicida 3. 75 es manifestà virulent tal com es veu en provocar la furoncolosi en un primer passatge per Salvelinus fontinalis en una dosi de 10^3 CFU/ml. El reaïllament del bacteri del ronyò d'aquests peixos infectats fou positiu tal com es comprovà per una immunofluorescència directa, una tinciò GRAM i una caracterització bioquímica. La soca reaïllada era A. salmonicida subsp. salmonicida que presentava autoaglutinació, coloració blava en CBB-agar i per tant proteïna-A positiva, i el LPS amb l'antigen-O.

La mortalitat acumulativa al llarg dels 14 dies fou molt alta en tots els grups (Taula 17), la qual cosa indica que cap de les vacunes confereix protecció en Salvelinus fontinalis. La taula 16 ens mostra un increment del títol d'aglutinines en els exemplars vacunats amb 3.10, 3.64 i 3.139, i com es veu en la taula 17 cap d'aquests grups presenta protecció. Aleshores, es pot afirmar que per cap del dos antígens estudiats en

aquest treball no hi ha una estreta relació entre el nivell d'aglutinines i la protecció adquirida. Això no descarta la possibilitat que sí que es presenti certa relació quan s'estudien d'altres antígens. Alguns autors, utilitzant diferents vacunes contra la furoncolosi, també han considerat que no es poden tenir sempre les aglutinines com una bona mesura de la immunitat adquirida activament contra A. salmonicida (Michel, 1979; Cipriano, 1982c; McCarthy et al. 1983).

Per altra banda, en uns treballs de Paterson & Fryer (1974 b) en Oncorhynchus kisutch i uns de Cipriano & Starplier (1985) en Salvelinus fontinalis, es constata la dependència de l'ús d'un adjuvant per adquirir immunitat contra la furoncolosi, acompanyada d'un augment del títol d'aglutinació.

Queda doncs, una porta oberta per a propers estudis amb aquestes quatre vacunes cel·lulars utilitzades administrant-les amb o sense adjuvant, mesurant i comparant les diferències en la immuno-resposta i en la protecció que confereixen.

5. CONCLUSIONS.

1)- Les soques estudiades d'Aeromonas salmonicida poden separar-se en quatre grups de característiques antigèniques diferents respecte a la proteïna-A que constitueix la capa-A i l'antigen-O del lipopolisacàrid:

GRUP	O-Ag	ACE
I	+	-
II	-	+
III	+	+
IV	-	-

2)- La presència de la proteïna-A va relacionada amb la floculació de les suspensions cel.lulars en el brou de cultiu, amb una marcada hidrofobicitat i amb la coloració blava de les colònies crescudes en CBB-Agar.

3)- Al contrari, l'absència de la proteïna-A va relacionada amb l'estabilitat de les suspensions cel.lulars en el brou de cultiu, amb la pèrdua de la hidrofobicitat i amb la coloració blanca de les colònies crescudes en CBB-Agar.

4)- Existeix una homogeneïtat per al lipopolisacàrid dintre de l'espècie.

5)- El pes molecular calculat per a la proteïna-A és de 52,000 dàltons en tots dos grups on es presenta (II & III).

6)- Cada un dels quatre grups anteriors presenta una antigenicitat diferent tal com ho demostren els títols d'aglutinació i les immunotincions amb antisèrums específics de conill contra cèl.lules completes, contra el LPS i contra la proteïna-A.

7)- L'hemoaglutinació dels eritròcits de be marcats amb el lipopolisacàrid de les soques representants dels grups I i III, denota la presència de l'antigen-O en els seus LPS així com l'absència d'aquest en les soques dels grups II i IV.

8)- No es detecten cèl.lules productores d'anticòs (PFC) en la melsa contra el LPS de cap dels grups, quan la dosi injectada i.c. és de 10^9 CFU inactivades per peix. Caldria estudiar-ho en d'altres teixits hematopoiètics o utilitzar un test més sensible.

9)- La immuno-resposta mesurada pel títol d'aglutinines en el sèrum dels exemplars injectats amb les soques dels grups I, II i III, és positiva i estadísticament igual per a tots tres. Els peixos injectats amb la soca del grup IV i els del grup control no presenten una resposta humoral estadísticament significativa.

10)- No hi ha cap diferència significativa en la resposta humoral entre els lots de Salvelinus fontinalis immunitzats per injecció intracelomàtica i els lots immunitzats per immersió.

11)- Cap de les vacunes preparades amb cèl.lules completes i inactivades de cada grup presenta protecció davant d'una infecció experimental causada amb una soca virulenta d'Aeromonas salmonicida. Tampoc no es detecta cap diferència en la protecció segons la ruta d'administració.

12)- El nivell d'aglutinines obtingut pels dos antígens caracteritzats en les soques estudiades, no indica protecció contra la furunculosi. Ara bé, podria existir una dependència de l'acció d'un adjuvant o bé dependre d'altres antígens no caracteritzats en aquest estudi.

13)- Es suggereix un model de la membrana externa d'Aeromonas salmonicida per cada una de les soques mutants respecte la forma salvatge, basant-se en els resultats obtinguts i el model molecular donat per Evenberg et al. 1985.

6. RESUM.

Aeromonas salmonicida és l'agent causant de la furoncolosi en els cultius de Salmònids. Fou descrit per primer cop en 1890 per Emmerich & Weibel (Bullock et al., 1983) a Alemanya. En el "Bergey's Manual of Systematic Bacteriology" (1984) es classifica dintre la família de les Vibrionàcies, essent citocrom-oxidasa positiu, tè motilitat negativa, òptim creixement entre 22^o - 25^o C, és anaerobic facultatiu per la glucosa i gelatinasa positiu. Alguns aïllaments produeixen un pigment marrò fosc, soluble en aigua.

Ha estat també descrit com el responsable de diferents malalties en els Teleostis, totes elles de tipus septicèmic (Gayer et al., 1980; Shotts et al., 1980; Paterson et al., 1980; Flüchter, 1979; entre d'altres).

La simptomatologia externa associada a la furoncolosi és un enfosquiment epitelial, hemorràgies a la base de les aletes i aparició de furòncols. Tot això acompanyat d'una inapetència. Internament, s'observen hemorràgies a les parets abdominals, al tub digestiu i al cor, una melsa crescuda i de color roig viu, el teixit renal tou i el fetge pàl·lid amb possibles punts necròtics. El tub digestiu no conté restes de menjar i en el lumen s'hi troba una supuració formada per mucus, sang i cèl·lules epitelials.

En 1935, Mackie et al. caracteritzen histopatològicament la furunculosi com una leucopènia i proteolisi aguda de determinats teixits. Uns anys més tard Duff (1937 i 1939) fa els primers estudis antigènics i parla de la presència d'un antigen indeterminat en alguns aïllaments que aniria relacionat amb la morfologia colonial i la virulència. La classificació d'aquest autor no va estar del tot encertada. Durant un període de 40 anys es va considerar una homogeneïtat serològica dintre d'A. salmonicida. Diversos autors, però, detectaren reaccions antigèniques creuades d'aquesta espècie amb Aeromonas hydrophila. Tot i així, es continuà parlant d'homogeneïtat (Liu, 1961; Spence et al., 1965; Bullock, 1966). No fou fins al 1977 que Udey va demostrar l'existència d'un antigen addicional en la membrana externa d'alguns aïllaments, i va anomenar-lo "A-layer" (capa-A). Aquest embolcall proteic conferia la morfologia colonial rugosa, el caràcter hidrofòbic, l'autoaglutinació i la virulència a les soques que el presentaven (Udey & Fryer, 1978). La capa-A es perd, a vegades, al mantenir les soques en medi de creixement en el laboratori. Llavors la morfologia colonial és llisa, no autoaglutinen i es perd el caràcter hidrofòbic i la virulència. Més recentment, Aoki & Trust (1984) i Pyle &

Cipriano (1986) han comprovat l'homogeneïtat serològica del lipopolisacàrid en A. salmonicida, trobant en els seus estudis reaccions serològiques creuades d'aquesta espècie amb A. hydrophila però causades per antigens comuns extracel·lulars.

Diferents estudis han estat realitzats pel coneixement de la capa-A. Així en 1980, Hubbert & Brain indiquen que la capa-A està formada per unes subunitats tetragonals disposades en una estructura de xarxa i d'una mida de 7.5 - 11 nm. En 1981, Kay et al. purifiquen la proteïna constituent de la capa-A (proteïna-A) i li calculen un pes molecular de 49,000 dàltons. Paral·lelament, Evenberg et al. (1982 I) i Evenberg & Lugtenberg (1982 II) realitzen un estudi complet sobre la proteïna-A. Li calculen un pes molecular de 54,000 dàltons, i també constaten la seva estructura de subunitats tetragonals. Corroboren l'estreta relació amb la seva presència, l'autoaglutinació, l'adhesió al mucus de l'epidermis dels peixos o a la superfície de les cèl·lules de línies de cultiu i a la virulència. Finalment, estudien la seva composició d'aminoàcids i elaboren un model molecular de la capa-A (Evenberg et al., 1985). Aquests autors i també Kay et al. (1986) assenyalen que la proteïna-A (ACE: Additional Cell Envelope) està associada al lipopolisacàrid i en concret

a l'antigen-O, essent aquest darrer essencial per a mantenir la integritat de la capa-A. Indiquen que mutants no posseïdors de l'antigen-O són invariablement ACE negatius. Ara bé, els mutants antigen-O positius i ACE negatius són possibles i fàcils d'obtenir perquè els aïllaments perden la capa-A després de diversos subcultius en medis de creixement en el laboratori. En 1981, Hamilton et al. veuen que es pot inhibir la formació de la capa-A incorporant un 0.25 % de clorur de liti en el medi de cultiu. Ishiguro & Trust (1981) aconseguen el mateix quan cultiven A. salmonicida a temperatures més altes de les òptimes.

La presència de la capa-A també confereix resistència a l'acció del complement del sèrum (Cipriano, 1987), a la digestió proteolítica i a l'absorció dels macròfags. També dona una protecció física completa pels components de la membrana externa davant l'acció dels bacteriòfags (Kay et al., 1980). Phipps et al. (1983) conclouen que la proteïna-A no presenta activitat enzimàtica però és una barrera refractària macromolecular que és essencial per a la virulència.

D'altres factors de virulència no cel·lulars i de tipus enzimàtic han estat estudiats des de bon principi. La presència de proteases (Shieh & McLean, 1975; Sakai,

1977; Cipriano, 1981; Sakai, 1985), fosfolipases (MacIntyre et al., 1979 i 1980; Buckley et al., 1982), hemolisines (Titball & Munn, 1981; Nomura & Saito, 1982) i leucocidines (Fuller et al., 1977; Cipriano et al., 1981) en els productes extracel.lulars d'*A. salmonicida* ha estat estudiada per diversos autors amb diferents valoracions en el rol que tenen en la virulència del bacteri així com la seva funció com a factors d'agressió.

Des de la dècada dels 30 s'han realitzat intents de vacunació contra la furunculosi. En 1942, Duff portà a terme una immunització i obtingué uns resultats que encara avui tenen vigència. Al llarg dels anys, s'han provat diferents combinacions antigèniques per administrar-les com a vacunes. L'extracció i purificació d'aquests antigens és laboriosa i d'un cost considerable quan es planifica el seu ús a una escala comercial (Paterson & Fryer, 1974 a; Cipriano 1982 c i 1983 a). Per altra banda l'ús de cèl.lules completes inactivades com una vacuna econòmica i de fàcil obtenció no ha facilitat uns nivells de protecció satisfactoris dintre les poblacions tractades (Krantz et al., 1963; Klontz & Anderson, 1970; Udey & Fryer, 1978; Michel, 1979; Smith et al., 1980; entre d'altres). La utilització de soques avirulentes com a vacunes vives atenuades tampoc no ha donat resultats positius (Cipriano & Starlighter, 1982).

Diferents autors han seguit la immunoresposta provocada per A. salmonicida en diverses espècies mitjançant el nivell d'aglutinines en el sèrum. Tal i com anota Michel (1979), el títol d'aglutinació no indica necessàriament una protecció davant la furunculosi.

Tambè s'han valorat les vies d'administració de les vacunes ja que aquest pot ésser un factor econòmic important a l'hora de vacunar poblacions de gran nombre d'exemplars. Cipriano (1983 a), amb una vacuna constituïda pels productes extracel.lulars d'una soca virulenta, prova tres rutes d'administració: la injecció intracelomàtica, un bany d'immersió i la via oral. El nivell d'aglutinines obtingut fou, de més gran a més petit, en el mateix ordre que s'han citat. L'autor considera la immersió com més viable a escala comercial, ja que dóna una bona immunoresposta i resulta practicable en poblacions nombroses.

Aquesta memòria se centra en l'estudi dels factors de virulència cel.lulars: l'antigen-O i la proteïna-A. S'han estudiat 61 aïllaments d'A. salmonicida realitzant una caracterització i classificació antigènica. Abans però, i com estudi previ, ha estat constatada la relació que hi ha entre la presència de la proteïna-A, l'autoaglutinació, el caràcter hidrofòbic i la coloració

colonial blava en medi CBB-Agar (Udey, 1982). Les soques proteïna-A negatives no autoaglutinen, donen suspensions estables en medi de cultiu i han perdut el seu caràcter hidrofòbic. Les seves colònies són blanques quan creixen en CBB-Agar. A partir d'aquests resultats es diferenciaren 74 soques d'A. salmonicida per a continuar l'estudi.

Utilitzant antisèrums específics de conill contra el lipopolisacàrid, contra la proteïna-A i contra les cèl.lules completes del tipus O-Ag + i ACE +, s'han classificat els aïllaments en quatre grups antigènics. Això s'ha fet a partir dels resultats aportats per microaglutinacions i gels de poliacrilamida tenyits amb nitrat de plata per l'estudi del lipopolisacàrid i amb CBB per l'estudi de la composició proteica de la membrana externa. Aquests grups es defineixen com:

<u>Grup</u>	<u>O-Ag</u>	<u>ACE</u>
I	+	-
II	-	+
III	+	+
IV	-	-

Com es pot apreciar han estat trobats els mutants

O-Ag negatiu i ACE (proteïna-A) positiu que d'altres autors no consideraven possibles per a la dependència estructural suposada entre aquests dos antigens (Evenberg et al., 1985; Kay et al., 1986). També es va realitzar una immunodetecció de la composició antigènica de cada un dels grups transferint les soques corregudes en els gels de poliacrilamida a paper de nitrocel.lulosa (Western Blot), i utilitzant aquests en una immunotinciò amb els antisèrums específics (Immuno-Blot).

A partir d'aquests resultats i del model molecular donat per Evenberg et al. (1985), s'han elaborat els models corresponents a cada un dels quatre grups antigènics assenyalats (Fig. 1). Cal indicar que es va trobar una homogeneïtat serològica pel que fa a la constitució del lipopolisacàrid. El pes molecular calculat per la proteïna-A fou de 52,000 dàltons aproximadament.

Posteriorment, es va escollir una soca representant de cada grup. Cada una d'elles es va preparar com a vacuna de cèl.lules completes inactivades amb cloroform. Cada una per separat fou injectada intracelomàticament a lots de Salvelinus fontinalis per estudiar la resposta humoral i cel.lular durant les vuit primeres setmanes. El títol d'aglutinació i el nombre relatiu de cèl.lules productores d'anticòs en la melsa

(PFC: Plaques Forming Cells) varen servir com a mesures de la immuno-resposta. Aquesta, aparegué a partir de la segona setmana tal com es pot veure en el títol d'aglutinines en la figura 11, i fou significativa a partir de la quarta. Resultà positiva per als grups I, II i III mentre que el grup IV i el grup control es mantingueren en uns nivells significativament baixos al llarg de les vuit setmanes. No va ésser possible determinar l'especificitat de les aglutinines per cada un dels antigens estudiats a causa de les característiques serològiques dels Teleostis. L'estudi de la resposta cel·lular va resultar negatiu per la baixa sensibilitat mostrada en el test utilitzat (Passive Haemolytic Plaque Assay. Anderson, 1978). Això contrasta amb els resultats obtinguts per Anderson en 1979. Aquest autor detecta uns nivells alts de PFC, però cal indicar que aquest autor utilitza com antigen el lipopolisacàrid purificat i a unes dosis molt elevades.

Més tard, es realitzà una comparació de la immuno-resposta en Salvelinus fontinalis quan s'injectaven les vacunes per injecció intracelomàtica o per immersió en un bany de 60 segons. Els resultats foren els mateixos que els de l'experiència anterior pel que fa al nivell i cinètica de la resposta. No es va constatar cap

diferència entre aquestes dues vies d'administració.

Per finalitzar, es valorà la protecció activament adquirida per Salvelinus fontinalis amb cada una de les vacunes i per cada una de les vies. Cap d'elles conferia protecció a una furoncolosi experimental portada a terme tal com descriu Cipriano, 1982. a. Les mortalitats començaven a aparèixer a partir del quart dia, i arribaven al màxim entre el vuitè i desè dia. Aleshores, es pot afirmar que per cap dels dos antigens estudiats en aquest treball no hi ha una estreta relació entre el nivell d'aglutinines i la protecció adquirida enfront de la furoncolosi. D'altres autors també ho han observat en diferents estudis d'immunització (Michel, 1979; Cipriano, 1982 c; McCarthy et al., 1983). Ara bé, això no descarta que la relació pugui existir en d'altres antigens.

Per altra banda, Paterson & Fryer (1974 b) i Cipriano & Starplier (1985) constaten la necessitat d'utilitzar un adjuvant quan s'immunitza amb cèl.lules completes inactivades o amb només el lipopolisacàrid d'A. salmonicida; per a obtenir uns nivells de protecció satisfactoris contra la furoncolosi. Queda així, doncs, una porta oberta per a valorar el títol d'aglutinació i la protecció que confereixen aquestes quatre vacunes cel.lulars, quan s'administren complementades o no amb un adjuvant.

7. REFERÈNCIES BIBLIOGRÀFIQUES.

ALEXANDER, J.B.; BOWERS, A.; INGRAM, G.A. & SMAMSHOOM, S.M. 1982. The portal of entry of bacteria into fish during hyperosmotic infiltration and the fate of antigens. En "Immunology and Immunization of Fish". Develop. & Compar. Immu., Supplement 2: 41 - 46.

ANDERSON, D.P. 1978. Passive Haemolytic Plaque Assay as a means of detecting antibody producing cells in rainbow trout immunized with the O-antigen of enteric redmouth bacteria. Ph. D. Thesis. Dept. Microbiology. University of Maryland.

ANDERSON, D.P.; ROBERSON, B.S. & DIXON, O.W. 1979. Induction of antibody-producing cells in rainbow trout, Salmo gairdneri Richardson; by flush exposure. J. Fish Biol. 15: 317 - 322.

AOKI, T. & TRUST, T.J. 1984. Electrophoretic analysis of the lipopolysaccharide from Aeromonas salmonicida strains isolated in Japan. Bull. Jap. Soc. Sci. Fish. 50: 1789.

BERGEY'S MANUAL OF SYSTEMATIC BACTERIOLOGY". 1984. Vol. 1. Editat per N.R. Krieg & J.G. Holt. Williams & Wilkings. Baltimore/London.

BLAKE, I.J.F. & ANDERSON, E.J.M. 1930. The identification of Bacillus salmonicida by the complement fixation test - a further contribution to the study of furunculosis of the Salmonidae. Fish. Board Sctol., Salmo Fisheries. 1. HMSO. Edinburgh: 10 pp.

BLANCH, A.R.; ANDERSON, D.P.; DIXON, O.W. & CIPRIANO, R.C. 1986. Humoral antibody responses in rainbow trout to different bacterins of Aeromonas salmonicida. 10th Annual FHS/AFS & 11th Annual E.F.H.W.S. Martinsburg. West Virginia. USA.

BOOTSMA, R.; FIJAN, N. & BLOMMAERT, J. 1977. Isolation and preliminary identification of the causative agent of carp erythrodermatitis. Veterinarski Archiv. 47 (6): 291 - 302.

BOWERS, A. & ALEXANDER, J.B. 1981. Hyperosmotic infiltration: immunological demonstration of infiltrating bacteria in brown trout, Salmo trutta L. J. Fish Biology 18: 9 - 13.

BUCKLEY, J.T.; HALASA, L.N. & MacINTYRE, S. 1982. Purification and partial characterization of a bacterial phospholipid: cholesterol acyltransferase. J. Biological Chemistry 257 (6): 3320 - 3325.

BULKLEY, R.V. 1969. A furunculosis epizootic in clear lake yellow bass. Proc. Ann. Conf. Bull. Wildlife Disease Associa. Vol. 5: 322 - 327.

BULLOCK, G.L. 1966. Precipitin and agglutinin reactions of Aeromonas isolated from fish and other sources. Bull. Off. Int. Epiz. 65 (5 - 6): 805 - 824.

BULLOCK, G.L. & STUCKEY, H.M. 1975. Aeromonas salmonicida: Detection of asymptotically infected trout. The Progressive Fish-Culturist 37 (4): 237 - 239.

BULLOCK, G.L. & STUCKEY, H.M. 1977. Ultraviolet treatment of water for destruction of five gram-negative bacteria pathogenic to fishes. J. Fish. Res. Board Can. 34 (8): 1244 - 1249.

BULLOCK, G.L.; CIPRIANO, R.C. & SNIESZKO, S.F. 1983. Furunculosis and other diseases caused by Aeromonas salmonicida. Fish Disease Leaflet 66. U.S. Fish & Wildlife Service.

CHART, H.; SHAW, D.H.; ISHIGURO, E.E. & TRUST, T.J. 1984. Structural and immunochemical homogeneity of Aeromonas salmonicida lipopolysaccharide. J. Bacteriology 158: 16 - 22.

CIPRIANO, R.C.; GRIFFIN, B.R. & LIDGERDING, B.C. 1981. Aeromonas salmonicida: relationship between extracellular growth products and isolate virulence. Can. J. Fish Aquat. Sci. 38: 1322 - 1326.



CIPRIANO, R.C. 1982 a. Furunculosis in brook trout: Infection by contact exposure. The Progressive Fish-Culturist 44 (1): 12 - 14.

CIPRIANO, R.C. 1982 b. Immunization of brook trout (Salvelinus fontinalis) against Aeromonas salmonicida: immunogenicity of virulent and avirulent isolates and protective ability of different antigens. Can. J. Fish. Aq. Sci. 39 (1): 218 - 221.

CIPRIANO, R.C. 1982 c. Immunogenic potential of growth products extracted from cultures of Aeromonas salmonicida for brook trout (Salvelinus fontinalis). Can. J. Fish. Aq. Sci. 39 (11): 1512 - 1518.

CIPRIANO, R.C. & STARLIPER, C.E. 1982. Immersion and injection vaccination of salmonids against furunculosis with an avirulent strain of Aeromonas salmonicida. The Progressive Fish-Culturist 44 (4): 167 - 169.

CIPRIANO, R.C. 1983 a. Furunculosis: Pathogenicity, mechanisms of bacterial virulence, and the immunological response of fish to Aeromonas salmonicida. En "Bacterial & Viral Diseases of Fish". Ed. Crosa. University of Washington. Seattle. USA: 41 - 60.

CIPRIANO, R.C. 1983 b. Resistance of Salmonids to Aeromonas salmonicida: relation between agglutinins and neutralizing activities. Transactions American Fish. Soc. 112: 95 - 99.

CIPRIANO, R.C. 1983 c. Comparative susceptibility of three species of trout to furunculosis with reference to their immune and secretory response. Research Information Bulletin 83-53. U.S. Fish & Wildlife Service.

CIPRIANO, R.C.; MORRISON, J.K. & STARLIPER, C.E. 1983. Immunization of Salmonids against the fish pathogen, Aeromonas salmonicida. J. World Mariculture Soc. 14: 201 - 211.

CIPRIANO, R.C. & PYLE, S.W. 1985. Adjuvant-dependent immunity and the agglutinin response of fishes against Aeromonas salmonicida, cause of furunculosis. Can. J. Fish. Aq. Sci. 42 (7): 1290 - 1295.

CIPRIANO, R.C. 1987. Aeromonas salmonicida: relationships among isolate virulence, antigenicity, and serum resistance using Coomassie Blue Agar. 11th Annual FHS/AFS, 12th Annual EFHWS & 18th Annual AMFHW. pg. 1. Abstr.

COLBERG, P.S. & LINGG, A.J. 1978. Effect of ozonation on microbial fish pathogens, ammonia, nitrate, nitrite, and BOD in simulated reuse hatchery water. J. Fish. Res. Board Can. 35 (10): 1290 - 1296.

DUFF, D.C.B. 1932. Furunculosis on the Pacific Coast. Transactions American Fish. Soc. 62: 249 - 255.

DUFF, D.C.B. 1937. Dissociation in Bacillus salmonicida, with special reference to the appearance of a G form of culture. J. of Bacteriology 34: 49 - 67.

DUFF, D.C.B. 1939. Some serological relationships of the S, R and G phases of Bacillus salmonicida. J. of Bacteriology 38 (1): 91 - 100.

DUFF, D.C.B. 1942. The oral immunization of trout against Bacterium salmonicida. J. of Immunology 44 (1): 87 - 94.

EHLINGER, N.F. 1964. Selective breeding of trout for resistance to furunculosis. N.Y. Fish & Game Journal 11 (2): 78 - 90.

ELLIOTT, D.G. & SHOTTS, E.B. 1980 a. Aetiology of an ulcerative disease in goldfish Carassius auratus (L.): microbiological examination of diseased fish from seven locations. J. Fish Diseases 3 (2): 133 - 143.

ELLIOTT, D.G. & SHOTTS, E.B. 1980 b. Aetiology of an ulcerative disease in goldfish, Carassius auratus (L.): experimental induction of the disease. J. Fish Diseases 3 (2): 145 - 151.

ELLIS, A.E.; HASTINGS, T.S. & MUNROFAFS, A.L.S. 1981. The role of Aeromonas salmonicida extracellular products in the pathology of furunculosis. J. Fish Diseases 4: 41 - 51.

EMMERICH, R. & WEIBEL, E. 1890. Über eine durch bakterien verursachte infektiöskrankheit der forellen. Allg. Fish. Ztg. 15: 73 - 77, 85 - 92.

EURELL, T.E.; LEWIS, D.H. & GRUMBLES, L.C. 1979. Stained bacterial antigens for use in microagglutination procedures. The Progressive Fish-Culturist 40 (2): 55 - 57.

EVELYN, T.P.T. 1971. An aberrant strain of the bacterial fish pathogen Aeromonas salmonicida isolated from a marine host, the sablefish (Anoplocoma fimbria), and from two species of cultured Pacific Salmon. J. Fish. Res. Board Can. 28: 1629 - 1634.

EVENBERG, D.; VAN BOXTEL, R.; LUGTENBERG, B.; SCHURER, F.; BLOMMAERT, J. & BOOTSSMA, R. 1982 I. Cell surface of the fish pathogenic bacterium Aeromonas salmonicida. I. Relation and the presence of a major cell envelope protein. Biochimica et Biophysica Acta, 684: 241 - 248.

EVENBERG, D. & LUGTENBERG, B. 1982 II. Cell surface of fish pathogenic bacterium Aeromonas salmonicida. II. Purification and characterization of a major cell envelope protein related to autoagglutination, adhesion and virulence. Biochimica et Biophysica Acta, 648: 249 - 254.

EVENBERG, D.; VERSLUIS, R. & LUGTENBERG, B. 1985. Biochemical and immunological characterization of the cell surface of the fish pathogenic bacterium Aeromonas salmonicida. Biochimica et Biophysica Acta, 815: 233 - 244.

EWING, W.H.; HUGH, R. & JOHNSON, J.G. 1961. Studies on the *Aeromonas* Group. U.S. Dpt. of Health, Education & Welfare. Public Health Service. Atlanta. Georgia. USA.

FIELD, J.B.; GEE, L.L.; ELVEHJEM, C.A. & JUDAY, CH. 1944. The blood picture in furunculosis induced by *Bacterium salmonicida* in fish. Archives of Biochemistry 3 (3): 277 - 284.

FINDLEY, A. 1983. Studies on the extracellular protease of *Aeromonas salmonicida*. Ph.D. Thesis. University of Nottingham: 194 pp.

FLUCHTER, J. 1979. Identification and treatment of diseases in the common sole (*Sole sole* L.). Aquaculture 16 (3): 271 - 274.

FULLER, D.W.; PILCHER, K.S. & FRYER, J.L. 1977. A leukocytolytic factor isolated from cultures of *Aeromonas salmonicida*. J. Fish. Res. Board Can. 34: 1118 - 1125.

GAYER, E.K.; BEKESI, L. & CSABA, G. 1980. Some aspects of the histopathology of carp erythrodermatitis (CE). En "Fish Diseases". Editor W. Ahne. Third COPRAQ-Session. Springer-Verlag. Berlin, Heidelberg, N.Y.: 127 - 136.

GRIFFIN, P.J. 1954. The nature of bacteria pathogenic to fish. transactions American Fish. Soc. 83: 241 - 253.

GRISLEY, M.S.; ELLIS, A.E.; HASTING, T.S. & MUNRO, A.L. 1983. An alpha-migrating anti-protease in normal salmonid plasma and its relationship to the neutralization of *Aeromonas salmonicida* toxins. En "Fish Diseases. Enfermedades de los Peces". 4th COPRAQ Session. Ed. Aquigrup. Madrid.: 77 - 82.

GUTSELL, J.S. 1947. the value of certain drugs, especially sulfa drugs, in the treatment of furunculosis in brook trout, *Salvelinus fontinalis*. Transactions American Fish. Soc. 74: 186 - 199.

HAHNEL, C.B.; GOULD, R.W. & BOATMAN, E.S. 1983. Serological comparison of selected isolates of Aeromonas salmonicida. J. Fish Diseases 6: 1 - 11.

HAMILTON, R.C.; KALMINS, H.; ACKLAND, N.R. & ASHBURNER, C.D. 1981. An extra layer in the surface layers of an atypical Aeromonas salmonicida isolated from Australian Goldfish. J. of Gen. Microbiology 122: 363 - 366.

HANSON, R.S. & PHILLIPS, J.A. 1981. Lipopolysaccharides isolation (17.4. Cell Wall Polymers). Manual of Methods for General Bacteriology. Ed. P. Gerhardt (Am. Soc. for microbiology. Washington D.C.): pg. 328.

HASTEIN, T.; SLTVEIT. & ROBERTS, R.J. 1978. Mass mortality among minnows Phoxinus phoxinus (L.) in Lake Tveitevatn, Norway, due to an aberrant strain of Aeromonas salmonicida. J. Fish Diseases 1: 241 - 249.

HASTINGS, T.S. & ELLIS, A.E. 1985. Differences in the production of haemolytic and proteolytic activities by various isolates of Aeromonas salmonicida. Fish & Shellfish Pathology. Ed. A.E. Ellis. Acad. Press: 69 - 77.

HERMAN, R.L. 1970. Prevention and control of fish diseases in hatcheries. En "A Symposium on diseases of fishes and shellfishes". Ed. S.F. Snieszko. American Fish. Soc.. Spec. Public. # 5: 3 - 15.

HITCHCOCK, P.J. & BROWN, T.M. 1983. Morphological heterogeneity among Salmonella lipopolysaccharide chemotypes in silver-stained polyacrylamide gels. J. of Bacteriology 154 (1): 269 - 277.

HOEFER SCIENTIFIC INSTRUMENTS. 1986. Basic techniques and exercises in electrophoresis. HSI. Instruments for Biochemical Research: 96 - 159.

HUBBERT, R.M. & BRAIN, A.P.R. 1980. Studies on the ultrastructure of Aeromonas salmonicida subsp. achromogenes. Bamidgeh, 32: 101 - 106.

ISHIGURO, E.E. & TRUST, T.J. 1981. Differentiating characteristics of virulent and attenuated strains of Aeromonas salmonicida. Int. Symp. Fish Biol.: Serodiagnostics & Vaccines. Leetown. West Virginia. USA. Develop. Biol. Standard: 163 - 188.

ISHIGURO, E.E.; KAY, W.W.; AINSWORTH, T.; CHAMBERLAIN, J.B.; AUSTEN, R.A.; BUCKLEY, J.T. & TRUST, T.J. 1981. Loss of virulence during culture of Aeromonas salmonicida at high temperature. J. of Bacteriology 148: 333 - 340.

ISHIGURO, E.E.; AINSWORTH, T.; HARKNESS, R.E.; KAY, W.W. & TRUST, T.J. 1984. A temperate bacteriophage specific for strains of Aeromonas salmonicida possessing A-layer, a cell surface virulent factor. Current Microbiology 10: 199 - 202.

JOHNSON, K.A. & AMEND, D.F. 1984. Potential for immersion vaccination against Aeromonas salmonicida. J. Fish Diseases 7: 101 - 105.

KARLSSON, K.A. 1962. Studies on the haemolysis of Aeromonas salmonicida. 9th Nordic Veterinary Congress. Section H, 6: 4 - 5.

KARLSSON, K.A. 1964. Serologische studien von Aeromonas salmonicida. Zentralblatt Bakt., Parst., Infek. und Hygiene 1: 73 - 80.

KAY, W.W.; BUCKLEY, J.T.; ISHIGURO, E.E.; PHIPPS, B.M.; MONETTE, J.P.L. & TRUST, T.J. 1981. Purification and disposition of a surface protein associated with virulence of Aeromonas salmonicida. J. of Bacteriology 147: 1077 - 1084.

KAY, W.W.; ISHIGURO, E.E.; PHIPPS, B.M.; BELLAND, R.J. & TRUST, T.J. 1986. Properties, organization and role in virulence of the surface protein array of Aeromonas salmonicida. European Aquaculture Society. Spc. Public. # 9. Bredene. Belgium. Pathology in Marine Aquaculture. C.P. Vivarès, J.r. Bonami & E. Jaspers, Editors.

KLONTZ, G.W.; YASUTAKE, W.T. & ROSS, A.J. 1966. Bacterial diseases of the salmonidae in the western United States: pathogenesis of furunculosis in rainbow trout. Am. J. Vet. Res. 27 (120): 1455 - 1460.

KLONTZ, G.W. & ANDERSON, D.P. 1968. Fluorescent antibody studies of isolates of Aeromonas salmonicida. Bull. Off. Int. Epiz. 69 (7 - 8): 1149 - 1157.

KLONTZ, G.W. & ANDERSON, D.P. 1970. Oral immunization of salmonids: a review. En "Symposium on Diseases of Fishes and Shellfishes". Ed. S.F. Snieszko. Am. Fish. Soc.. Spc. Public. # 5: 16 - 20.

KRANTZ, G.E.; REDDECLIFF, J.M. & HEIST, C.E. 1963. Development of antibodies against Aeromonas salmonicida in trout. J. of Immunology 91 (6): 757 - 760.

LAEMMLI, V.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T 4. Nature 227: 680 - 685.

LETENDRE, G.C.; SCHNEIDER, C.P. & EHLINGER, N.F. 1972. Net damage and subsequent mortality from furunculosis in small mouth bass. N.Y. Fish & Game Journal. 19 (1): 73 - 82.

LIU, P. 1961. Observations on the specificities of extracellular antigens of the genera Aeromonas and Serratia. J. Gen. Microbiol. 24: 145 - 153.

MacINTYRE, S.; TRUST, T.S. & BUCKLEY, J.T. 1979. Distribution of glycerophospholipid-cholesterol acyltransferase in selected bacterial species. J. of Bacteriology 139 (1): 132 - 136.

MacINTYRE, S.; TRUST, T.J. & BUCKLEY, J.. 1980. Identification and characterization of outer membrane fragments released by Aeromonas sp. Can. J. Biochem. 58: 1018 - 1025.

MACKIE, T.J.; ARKWRIGHT, J.A.; PRYCE-TANNATT, T.E.; MOTTRAM, J.C. & JOHNSTONE, W.P. 1935. Interim, second and final reports of the Furunculosis Committee (1930, 1933 & 1935). HMSO. Edinburgh.

McCARTHY, D.H. 1975. Fish furunculosis, caused by Aeromonas salmonicida var. achromogenes. J. Wildlife Diseases 11: 489 - 493.

McCARTHY, D.H. & RAWLE, C.T. 1975. The rapid serological diagnosis of fish furunculosis caused by "smooth" and "rough" strains of Aeromonas salmonicida. J. of General Microbiology 86 (1): 185 - 187.

McCARTHY, D.H. 1977. Some ecological aspects of the bacterial fish pathogen Aeromonas salmonicida. Aquatic Microbiology 6: 299 - 324.

McCARTHY, D.H. & WHITEHEAD, P. 1977. An immuno-India ink technique for rapid laboratory diagnosis of fish furunculosis. J. Appl. Bact. 42: 429 - 431.

McCARTHY, D.H. & ROBERTS, R.J. 1980. Furunculosis of fish - the present state of our knowledge. Advances in Aquatic Microbiology. Vol. 2: 293 - 341. Ed. M.R. Droop & H.W. Jannasch.

McCARTHY, D.H. 1983. An experimental model for fish furunculosis caused by Aeromonas salmonicida. J. Fish Diseases 6 (3): 231 - 232.

McCARTHY, D.H.; AMEND, D.F.; JOHNSTONE, K.A. & BLOOM, J.V. 1983. Aeromonas salmonicida: detection of an antigen associated with protective immunity and evaluation of an experimental bacterin. J. Fish Diseases 6: 155 - 174.

McFADDEN, T.W. 1970. Furunculosis in non-salmonids. J. Fish. Res. Board Can. 27 (12): 2365 - 2370.

MELLERGAARD, S. 1983. Purification and characterization of new proteolytic enzyme produced by Aeromonas salmonicida. J. Applied Bacteriology 54: 289 - 294.

MICHEL, C. 1979. Furunculosis of salmonids: vaccination attempts in rainbow trout (Salmo gairdneri) by formalin-killed germs. Ann. Rech. Vét. 10 (1): 33 - 40.

MICHEL, C. 1980 a. Development of bacteria in fish and in water during a standardized experimental infection of rainbow trout (Salmo gairdneri) with Aeromonas salmonicida. En "Fish Diseases". 3th COPRAQ-Session. Ed. W. Ahne. Spinger-Verlag. Berlin: 94 - 97.

MICHEL, C. 1980 b. A standardized model of experimental furunculosis in rainbow trout (Salmo gairdneri). Can. J. Fish. Aq. Sci. 37: 746 - 750.

MICHEL, C. & FAIVRE, B. 1982. Occurrence and significance of agglutinating antibodies in experimental furunculosis of rainbow trout, Salmo gairdneri Richardson. J. Fish Diseases 5: 429 - 432.

MILES, A.A. & MISRA, S.S. 1938. The estimation of the bacteriocidal power of the blood. J. of Hygiene 38: 732 - 749.

MUNN, C.B.; ISHIGURO, E.E.; KAY, W.W. & TRUST, T.J. 1982. Role of surface components in serum resistance of virulent Aeromonas salmonicida. Infection & Immunity 36 (3): 1069 - 1075.

MUNRO, A.L.S.; HASTINGS, T.S.; ELLIS, A.E. & LIVERSIDGE, J. 1980. Studies of an ichthyotoxic material produced extracellularly by the furunculosis bacterium Aeromonas salmonicida. En "Fish Diseases". 3th COPRAQ-Session. Ed. W. Ahne. Springer-Verlag. Berlin: 98 -106.

MUNRO, A.L.S. 1984. A furunculosis vaccine illusion or achievable objective. O.I.E. Symposium on Fish Vaccination. Paris 20-22 February: 97 - 120.

NEALE, N.L. & CHAVIN, W. 1971. Lymphocytic tissue alterations during the primary immune response of the goldfish (Carassius auratus L.). Mich. Acad. 3: 23.

NEWMAN, S.G. & MAJNARICH, J.J. 1985. Immunization of Salmonids against furunculosis. Fish Pathology 20 (213): 403 - 411.

NOMURA, S. & SAITO, H. 1982. Production of the extracellular hemolytic toxin by an isolated strain of Aeromonas salmonicida. Bull. J. Soc. Sci. Fish. 48 (11): 1589 - 1597.

PALMER, R. & SMITH, P.R. 1980. Studies on vaccination of Atlantic Salmon against furunculosis. En "Fish Diseases". 3th COPRAQ-Session. Ed. W. Ahne. Springer-Verlag. Berlin: 107 - 112.

PARKER, N.D. & MUNN, C.B. 1985. Cell surface properties of virulent and attenuated strains of Aeromonas salmonicida. Fish & Shellfish Pathology. Ed. A.E. Ellis. Acad. Press: 97 - 105.

PATERSON, W.D. & FRYER, J.L. 1974 a. Effect of temperature and antigen dose on the antibody response of juvenile coho salmon (Oncorhynchus kisutch) to Aeromonas salmonicida endotoxin. J. Fish. Res. Board Can. 31 (11): 1743 - 1749.

PATERSON, W.D. & FRYER, J.L. 1974 b. Immune response of juvenile coho salmon (Oncorhynchus kisutch) to Aeromonas salmonicida cells administered intra-peritoneally in Freund's Complete Adjuvant. J. Fish. Res. Board Can. 31 (11): 1751 - 1755.

PATERSON, W.D.; DOVEY, D. & DESAUTELS, D. 1980. Relationships between selected strains of typical and atypical Aeromonas salmonicida, Aeromonas hydrophila and Haemophilus piscium. Can. J. of Microbiology 26: 588 - 598.

PHIPPS, B.M.; TRUST, T.J.; ISHIGURO, E.E. & KAY, W.W. 1983. Purification and characterization of the cell surface virulent A-protein from Aeromonas salmonicida. Biochemistry 22: 2934 - 2939.

PONTIUS, H. & AMBROSIUS, H. 1972. Beiträge zur Immunobiologie poikilothermer Wirbeltiere. IX. Untersuchungen zur zellulären Grundlage humoraler Immunreaktionen der Knochenfische am Beispiel des Flussbarsches (Perca fluviatilis L.). Acta Biol. Med. Germ. 29: 319.

POPOFF, M. 1969. A study of Aeromonas salmonicida I. Biochemical and antigenic characteristics. Ann. Rech. Vétér. 3: 49 - 57.

PYLE, S.W. & SCHILL, W.B. 1985. Rapid serological analysis of bacterial lipopolysaccharides by electrotransfer to nitrocellulose. J. of Immunological Methods 85: 371 - 382.

PYLE, S.W. & CIPRIANO, R.C. 1986. Specificity of lipopolysaccharide antigens of Aeromonas salmonicida. Microbios Letters 31: 149 - 155.

RABB, L.; CORNICH, J.W. & McDERMOTT, L.A. 1964. A macroscopic-slide agglutination test for the presumptive diagnosis of furunculosis in fish. The Progressive Fish-Culturist 26: 118 - 120.

RIJKERS, G. T.; FREDERIX-WOLTERS, E. M. H. & VAN MUISWINKEL, W. B. 1980. The immune system of cyprinid fish. Kinetics and temperature dependence of antibody-producing cells in carp (Cyprinus carpio). Immunology 41: 91 - 97.

SAKAI, D. K. 1977. The causative factor of Aeromonas salmonicida furunculosis in salmonids: extracellular protease. Hokkaido Fish Hatchery Sci. Repp. 32: 61 - 89.

SAKAI, D. K. 1985. Loss of virulence in a protease-deficient mutant of Aeromonas salmonicida. Infection & Immunity 48 (1): 146 - 152.

SAKAI, D. K. & KIMURA, T. 1985. Relationship between agglutinative properties of Aeromonas salmonicida strains isolated from fish in Japan and their resistance to mechanisms of host defense. Fish Pathology 20 (1): 9 - 21.

SAKAI, D. K. 1987. Transmission of protease genes into a protease deficient mutant of Aeromonas salmonicida in river sediments. J. Fish Diseases 10: 171 - 179.

SANDVIK, O. & HAGEN, O. 1968. Serological studies on proteinases produced by Aeromonas salmonicida and other Aeromonads. Acta Vet. Scand. 9: 1 - 9.

SHEERAN, B. & SMITH, P. R. 1981. A second extracellular proteolytic activity associated with the fish pathogen Aeromonas salmonicida. Microbiology Letters 11: 73 - 76.

SHEERAN, B.; DRINAN, E. & SMITH, P. R. 1984. Preliminary studies on the role of extracellular proteolytic enzymes in the pathogenesis of furunculosis. En "Fish Diseases. Enfermedades de los Peces". 4th COPRAQ-Session. Ed. Aquagroup. Madrid: 89 - 100.

SHIEH, H. S. & MacLEAN, J. R. 1975. Purification and properties of an extracellular protease of Aeromonas salmonicida, the causative agent of furunculosis. J. Biochem. 6: 653 - 656.

SHIEH, H.S. & MacLEAN, J.R. 1976. Blood changes in brook trout induced by infection with Aeromonas salmonicida. J. Wildlife Diseases 12: 77 - 81.

SHIEH, H.S. 1978. Changes of blood enzymes in brook trout induced by infection with Aeromonas salmonicida. J. Fish Biology 12: 13 - 18.

SHIEH, H.S. 1982. Lethal toxicity of Aeromonas salmonicida protease to Atlantic Salmon. Microbios Letters 20: 137 - 139.

SHIEH, H.S. 1984. Vaccination of Atlantic Salmon against furunculosis with protease of a virulent strain of Aeromonas salmonicida. Microbios Letters 25: 131 - 134.

SHIEH, H.S. 1985. Vaccination of Atlantic Salmon, Salmo salar L., against furunculosis with protease of an avirulent strain of Aeromonas salmonicida. J. Fish Biology 27: 97 - 101.

SHOTTS, E.B.; TALKINGTON, F.D.; TALKINGTON, J.R.; ELLIOT, D.G. & McCARTHY, P.H. 1980. Aetiology of an ulcerative diseases in goldfish, Carassius auratus (L.): characterization of the causative agent. J. Fish Diseases 3: 181 - 186.

SMITH, P.D.; McCARTHY, D.H. & PATERSON, W.D. 1980. Further studies on furunculosis vaccination. En "Fish Diseases". 3th COPRAQ-Session. Ed. W. Ahne. Springer-Verlag.: 113 - 119.

SMITH, W.W. 1940. Production of anti-bacterial agglutinins by carp and trout at 10 C. Proc. Soc. Expl. Biol. Med. 45: 726 - 729.

SNIESZKO, S.F. & FRIDDLE, S.B. 1949. Prophylaxis of furunculosis in brook trout (Salvelinus fontinalis) by oral immunization and sulfamerazine. The Progressive Fish-Culturist 11: 161 - 168.

SNIESZKO, S.F. & WOOD, E.M. 1954. The effect of some sulfonamides on the growth of brook trout, brown trout and rainbow trout. - Transactions Am. Fish. Soc. 84: 86 - 92.

SPENCE, K.D.; FRYER, J.L. & PILCHER, H.S. 1965. Active and passive immunization of certain salmonid fishes against Aeromonas salmonicida. Can. J. Microbiology 11: 397 - 405.

STARKEY, P.M. & BARRETT, A.J. 1977. Alfa2-macroglobulin, a physiological regulator of proteinase activity. En "Research Monographs in Cell and Tissue Physiology". Ed. A.J. Barrett. North-Holland. Vol. 2: 663 - 696.

STARKEY, P.M.; FLETCHER, T.C. & BARRETT, A.J. 1982. Evolution of alfa2-macroglobulin: the purification and isolation of a protein homologous with human alfa-macroglobulin from plaice (Pleuronectes platessa L.) plasma. Biochemical Journal 205: 97 - 104.

TATNER, M.F.; JOHNSON, C.M. & HORNE, M.T. 1984. The tissue localization of Aeromonas salmonicida in rainbow trout, Salmo gairdneri Richardson, following three methods of administration. J. Fish Biology 25: 95 - 108.

TITBALL, R.W. & MUNN, C.B. 1981. Evidence for two haemolytic activities from Aeromonas salmonicida. Microbiology Letters 12: 27 - 30.

TITBALL, R.W. & MUNN, C.B. 1985. Interrelationships of extracellular products from Aeromonas salmonicida. Fish & Shellfish Pathology. Ed. A.E. Ellis. Acad. Press: 61 - 68.

TOWBIN, H.; STAHELIN, T. & GORDON, J. 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. Proc. Ntl. acad. Sci. USA 76 (9): 4350 - 4354.

TRUST, T.J.; HAWARD, P.S.; CHAMBERLAIN, J.B.; ISHIGURO, E.E. & BUCKLEY, J.T. 1980. Additional surface protein in agglutinating strains of a typical *Aeromonas salmonicida*. FEMS. Microbiology Letters 9: 35 - 38.

TSAI, C.M. & FRASCH, C.E. 1982. A sensitive silver stain for detecting lipopolysaccharides in polyacrylamide gels. Analytical Biochemistry 119: 115 - 119.

UDEY, C.R. & FRYER, J.L. 1978. Immunization of fish with bacterins of *Aeromonas salmonicida*. Marine Fisheries Review 40: 12 - 17.

WEDEMEYER, G.A. & NELSON, N.L. 1977. Survival of two bacterial fish pathogens (*Aeromonas salmonicida* and the enteric redmouth bacterium) in ozonated, chlorinated, and untreated waters. J. Fish. Res. Board Can. 34: 429 - 432.

WESTPHAL, D. & JAHN, K. 1965. Bacterial lipopolysaccharides. En "Methods in Carbohydrate Chemistry". Ed. R.L. Whistler. Acad. Press. N.Y. & London: 83 - 91.

WILLIAMSON, I.J.F. 1928. Furunculosis of the Salmonidae. Fishery Board for Scotland Salmon Fisheries 5: 19 pp.

