

# Patógenos de animales acuáticos de interés en salud pública y acuicultura

Carmen Amaro González

Dpto. Microbiología y Ecología, Universidad de Valencia

Nuestro equipo de investigación existe como grupo independiente desde el año 2004 y está formado, en la actualidad, por Carmen Amaro (CA), profesora titular, Belén Fouz (BF), profesora contratada doctora, Eva Sanjuan (ES), investigadora post-doctoral, Francisco J. Roig (FJR), técnico superior de investigación, Amparo Llorens (ALI) y Ricardo García (RG), técnicos medios de investigación y David Pajuelo (DP) y Agnes Canyol (AC), becarios de investigación (Figura 1). Nuestro equipo incluye, además, a dos investigadores de la Universidad de Tainan en Taiwan que participan en nuestros proyectos, la catedrática de Universidad Lien-I Hor y el investigador post-doctoral Chung-Te Lee. Llevamos a cabo dos líneas de actuación, una de investigación básica y otra de investigación aplicada a las necesidades de las empresas de acuicultura.

**Investigación básica:** La investigación básica que realizamos tiene como principal objetivo desentrañar los mecanismos de patogenicidad que permiten a las bacterias patógenas de peces producir enfermedades y cómo los peces se defienden mediante la actuación del sistema inmunitario. Hemos escogido como modelo para el estudio de la relación hospedador patógeno la anguila (*Anguilla anguilla*) y *Vibrio*

*vulnificus*. La anguila es una especie de especial interés en nuestra Comunidad Autónoma que se encuentra, en la actualidad, en peligro de extinción. *V. vulnificus* es una bacteria acuática que causa epizootias o brotes de una septicemia hemorrágica con altos índices de mortandad que ha ocasionado el cierre de piscifactorías en todo el mundo (Figura 2). Esta especie es, además, capaz de infectar al ser humano y causar su muerte por septicemia, generalmente tras el consumo de marisco crudo, o infecciones graves en heridas expuestas a la interacción con peces o con el agua de mar (Figura 3). Es, por tanto, una especie zoonótica, lo que aumenta el interés de su estudio.

Nuestras aportaciones al conocimiento del patógeno y de su relación con la anguila son las siguientes:

**Filogenia<sup>1</sup>.** La especie *V. vulnificus* es fenotípicamente muy heterogénea y está dividida en tres biotipos y múltiples serovariedades. Las cepas virulentas para peces se clasifican en el biotipo 2, que se creía tenía características fenotípicas que lo distinguían del resto. El estudio filogenético de la especie mediante la secuenciación parcial de genes *housekeeping* y de virulencia, todos ellos cromosómicos, revela que ésta se

**Figura 1.** Grupo de investigación. De izquierda a derecha, AC, BF, DP, CA, RG, FRM, ALI y ES.



divide en tres linajes que no se corresponden con los biotipos. Las cepas del biotipo 2 aparecen en los árboles filogenéticos en el linaje I distribuidas en subgrupos relacionados con la serovariedad y estando, en cada subgrupo, más relacionadas con cepas de biotipo 1 de piscifactoría que con el resto de cepas del mismo biotipo. Este resultado sugiere que el biotipo 2 es polifilético y que, presumiblemente, ha aparecido por adquisición de nueva información por transferencia genética horizontal (TGH), lo que apoya su reclasificación como patovar que agrupa las cepas de *V. vulnificus* con potencial para infectar y desarrollar vibriosis en peces.

**Plásmidos**<sup>2,3,4</sup>. Un 40 % de las cepas de biotipo 1 y un 100 % de las cepas de biotipos 2 y 3 poseen plásmidos de alto peso molecular, siendo uno de ellos de 70 Kb y exclusivo de las cepas de biotipo 2. La secuencia de éste plásmido revela que contiene un operón que codifica para una toxina de la familia de las MARTX (toxinas multifuncionales que se auto-procesan y que contienen regiones terminales con secuencias repetidas) y para un sistema de transporte y modificación de la toxina así como una mayoría de genes que codifican para proteínas hipotéticas o con baja homología con proteínas conocidas. La curación del plásmido implica la pérdida de virulencia para los peces y de la capacidad de resistir sus defensas innatas mientras que no se ven afectadas la virulencia para ratones y la resistencia al suero humano. Un 80 % de las cepas de biotipo 2 posee un segundo plásmido de 56 Kb que contienen un operón *tra* completo. Este plásmido es conjugativo y presenta dos regiones designadas ID1 e ID2 que son idénticas a dos regiones similares en el plásmido de virulencia. De hecho, ambos plásmidos recombinan y, de esta forma, el plásmido de virulencia se transmite entre cepas por conjugación. Este hallazgo apoya la hipótesis sobre el origen del biotipo 2 que habría surgido dentro de la especie por adquisición del plásmido de virulencia por TGH por parte de cepas de *V. vulnificus* de piscifactoría.

**Genes de virulencia**<sup>5,6,7,8</sup>. El gen plasmídico *rtxA1* codifica la toxina MARTX y está duplicado en el cromosoma. El análisis

bioinformático de la proteína revela que ésta es modular y que su estructura es diferente a la de los biotipos 1 y 3. El análisis filogenético pone de manifiesto que la historia de la toxina del biotipo 2 es completamente diferente a la de los biotipos 1 y 3 y que se trata de una proteína formada por módulos diferentes con historias también diferentes. Uno de estos módulos está duplicado y la duplicación probablemente fue anterior a la divergencia entre linajes filogenéticos lo que significaría que el plásmido fue adquirido antes de la división de las cepas de biotipo 2 en subgrupos. Las mutaciones en el gen plasmídico y cromosómico implican la pérdida de la virulencia de la bacteria y una reducción significativa de la resistencia de la bacteria a la fagocitosis por fagocitos de peces y por amebas de peces. Estos resultados sugieren que la toxina es esencial para la supervivencia de la bacteria tanto dentro como fuera del pez. El gen cromosómico *vvp* codifica una proteasa que también producen los otros biotipos. Las mutaciones en este gen provocan que las cepas de *V. vulnificus* pierdan la capacidad de colonizar las mucosas que cubren la superficie de los peces y de las algas al verse afectada la quimiotaxis y la capacidad para formar biofilmes. Al perder esta capacidad, se produce una disminución significativa del grado de virulencia para peces de las cepas de biotipo 2 usando la inmersión como modelo de infección. Finalmente, el gen cromosómico *gne*, que codifica para una epimerasa de azúcares, es esencial para la biosíntesis del antígeno O de las cepas de biotipo 2 de la serovariedad zoonótica (serovariedad E). Las mutaciones en este gen hacen que la bacteria pierda la virulencia tanto para peces como para ratón así como su capacidad para resistir la fagocitosis, la acción del complemento del suero de mamíferos y de peces y la resistencia a los péptidos microcidas. Este mutante es un candidato idóneo para ser evaluado como vacuna viva.

**Respuesta inmunitaria**<sup>9,10</sup>. Las anguilas responden a la infección con *V. vulnificus* y a la vacunación por inyección y baño desarrollando una protección en mucosas y sistémica basada en anticuerpos así como una cierta memoria inmunológica. El patrón de respuesta es muy repetitivo. Tras la



**Figura 2.** Vibriosis de la anguila causada por *V. vulnificus* mostrando hemorragias en la piel ano y aletas y una gran úlcera cerca de la cabeza (foto de la autora).

vacunación (mediante inmersión prolongada en tres dosis), los animales empiezan produciendo anticuerpos de mucosa en agallas, con un máximo a los 3 días, y en piel e intestino, con un máximo a los cinco, momento en que comienzan a elevarse los anticuerpos en sangre de forma significativa alcanzándose un máximo a los 7 días y manteniéndose los niveles significativamente superiores a los controles no vacunados durante más de un mes.

En la actualidad, nuestros principales objetivos en investigación básica son:

1. Secuenciación de genomas de nuevas cepas bacterianas y del transcriptoma de la anguila. Este apartado se realiza en colaboración con el Dr. Simon Mackenzie de la Universidad de Barcelona.
2. Seleccionar genes/islas de virulencia mediante el análisis comparado de los genomas de la misma especie y cepas de otras bacterias patógenas de peces y del hombre.
3. Obtención de mutantes deficientes en genes/islas candidatos y valoración de su virulencia *in vivo* e *in vitro* mediante el uso de líneas celulares y otros modelos de simulación de la interacción patógeno-hospedador.
4. Obtención de proteínas recombinantes y caracterización de su función mediante el uso de modelos *in vitro* adecuados.
5. Filogenia de los plásmidos de *V. vulnificus*
6. Diseño de micromatrices (*microarrays*) para el estudio de la interacción patógeno hospedador mediante el uso de modelos *in vitro* seleccionados. Este apartado se realiza en colaboración con el Dr. Simon Mackenzie de la Universidad de Barcelona.

**Investigación aplicada.** El grupo realiza trabajos de investigación en colaboración directa con administraciones y empresas nacionales e internacionales vinculadas al sector de la acuicultura con el objetivo de esclarecer y prevenir



**Figura 3.** Vibriosis humana causada por *V. vulnificus*. (A). Tejido necrótico y ulcerado. (B). Origen de la infección, un pinchazo con un pez espinoso. (C). Tinción de Gram de una muestra de sangre de paciente con septicemia mostrando células de *V. vulnificus* en cultivo puro (tomado de [textbookofbacteriology.net](http://textbookofbacteriology.net)).

patologías diversas causadas por bacterias y/o virus en diferentes especies de peces cultivados, tanto clásicas como de nueva introducción (anguila, dorada, lubina, corvina, rodaballo, lenguado, trucha...). Estos trabajos incluyen:

- Detección y tipado de patógenos bacterianos y/o víricos clásicos y emergentes, incluidos algunos zoonóticos (*V. vulnificus*, *Listonella anguillarum*, *Photobacterium damsela*, *Mycobacterium marinum*, *Edwardsiella tarda*, *Lactococcus garvieae*, *Yersinia ruckeri*, virus de la necrosis pancreática infecciosa, betanodavirus, herpesvirus...) y diagnóstico de enfermedades<sup>11,12,13</sup>.
- Terapia antibacteriana: minimización del uso de antibióticos efectivos.
- Profilaxis: optimización de estrategias de inmunestimulación y de prevención de enfermedades, desarrollando nuevas alternativas nutricionales, respetuosas con el medio ambiente, y nuevas vacunas y protocolos de administración adaptados a las diferentes fases del ciclo productivo del animal.
- Epizootiología de enfermedades: vías de transmisión, búsqueda de reservorios y hospedadores susceptibles.
- Control de la calidad microbiológica del agua.

El trabajo de investigación aplicada que hemos realizado en *V. vulnificus* ha consistido en el desarrollo de:

- Un método molecular de diagnóstico de la vibriosis de la anguila y de detección de portadores sanos, de interés en acuicultura y también en salud pública porque permite determinar si el agente causal de la vibriosis pertenece a la serovariedad zoonótica<sup>14</sup>.
- Un método molecular de detección de cepas/muestras (fundamentalmente ostras) peligrosas en salud pública por contener cepas de *V. vulnificus* con potencial para infectar al ser humano<sup>15</sup>.
- Una vacuna y un procedimiento de vacunación a gran escala que protege a las anguilas de la vibriosis duran-

te todo el periodo que permanecen en la piscifactoría. El protocolo consiste en una inmunización triple por inmersión prolongada a intervalos de 15 días<sup>16</sup>.

Entre las empresas con las que colaboramos, cabe destacar Valenciana de Acuicultura S.A, TROUW España S.A., Culmarex S.A., PHARMAQ AS y ARC Skretting (Noruega).

## BIBLIOGRAFÍA

1. Sanjuan E, González-Candelas F, and Amaro C. Sequence based typing reveals a polyphyletic origin of *Vibrio vulnificus* biotype 2. *Appl. Env. Microbiol.* (en prensa).
2. Lee CT, Amaro C, Wu KM, Valiente E, Chang YF, Tsai SF, Chang CH, and Hor LI. 2008. A common virulence plasmid in biotype 2 *Vibrio vulnificus* and its dissemination aided by a conjugal plasmid. *J Bacteriol.* 190:1638-48.
3. Roig FJ, Amaro C. Plasmid diversity in *Vibrio vulnificus* biotypes. 2009. *Microbiology.* 155(Pt 2):489-97.
4. Valiente E, Lee CT, Lamas J, Hor L and Amaro C. 2008. Role of the virulence plasmid pR99 and the metalloprotease Vvp in resistance of *Vibrio vulnificus* serovar E to eel innate immunity. *Fish Shellfish Immunol.* 24(1):134-41.
5. Roig, FR, González-Candelas F, and Amaro C. MARTX of *Vibrio vulnificus*: domain organization and evolution. *Appl. Env. Microbiol.* (en prensa).
6. Valiente E, Lee CT, Hor LI, Fouz B and Amaro C. 2008. Role of the metalloprotease Vvp and the virulence plasmid pR99 of *Vibrio vulnificus* serovar E in surface colonization and fish virulence. *Environ Microbiol.* 10:328-38.
7. Valiente E, Padrós F, Lamas J, Llorens A and Amaro C. 2008. Microbial and histopathological study of the vibriosis caused by *Vibrio vulnificus* serovar E in eels: The metalloprotease Vvp is not an essential lesional factor. *Microb Pathog.* 45(5-6):386-93.
8. Valiente E, Jiménez N, Merino S, Tomás J, and Amaro C. 2008. *Vibrio vulnificus* biotype 2 serovar E *gne* but not *galE* is essential for lipopolysaccharide biosynthesis and virulence. *Infect Immun.* 76:1628-38.
9. Esteve-Gassent MD, and Amaro C. 2004. Immunogenic antigens of the eel pathogen *Vibrio vulnificus* serovar E. *Fish Shellfish Immunol.* 17(3):277-91.
10. Esteve-Gassent MD, Fouz B, and Amaro C. 2004. Efficacy of a bivalent vaccine against eel diseases caused by *Vibrio vulnificus* after its administration by four different routes. *Fish Shellfish Immunol.* 16(2):93-105.
11. Sanjuán E, and Amaro C. 2004. Protocol for specific isolation of virulent strains of *Vibrio vulnificus* serovar E (biotype 2) from environmental samples. *Appl Environ Microbiol.* 70(12):7024-32.
12. Fouz, B., J. L. Larsen, and C. Amaro. 2006. *Vibrio vulnificus* serovar A: an emerging pathogen in European anguilliculture. *Journal of Fish Diseases* 29:285-291.
13. Hodneland K, García R, Balbuena J.A., Zarza C, and Fouz B. A real-time RT-PCR assay for sensitive detection of betanodavirus in fish. *J.Fis. Dis.* (en prensa).
14. Fouz, B., C. Zarza, and C. Amaro. 2006. First description of non-motile *Yersinia ruckeri* serovar I strains causing disease in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), cultured in Spain. *Journal of Fish Diseases* 29:339-346.
15. Roig FJ, Sanjuán E, Llorens A, Amaro C. 2010. *pilF* Polymorphism-based PCR to distinguish *Vibrio vulnificus* strains potentially dangerous to public health. *Appl Environ Microbiol.* 76(5):1328-33.
16. Esteve-Gassent, M. D., R. Barrera, and C. Amaro. 2004. Vaccination of market-size eels against vibriosis due to *Vibrio vulnificus* serovar E. *Aquaculture* 241:9-19.