
SISTEMA INMUNE Y VACUNACIÓN DE PECES

Immune System And Vaccination In Fish

GIOVANNY PENAGOS¹, MV; PAOLA BARATO¹, MV;
CARLOS IREGUI¹, DVM.

¹Laboratorio de Patología Veterinaria, Grupo de Patobiología
Veterinaria, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá D.C. -
Colombia.

Correspondencia: Giovanni Penagos: lgpenagosc@unal.edu.co

Presentado 11 de diciembre de 2007, aceptado 23 de febrero de 2008, correcciones 19 de julio de 2008.

RESUMEN

Los peces poseen un sistema inmune con muchas de las células y sustancias humorales presentes en vertebrados superiores, pero cuentan también con componentes y funciones especiales, como los centros melanomacrófagos y la capacidad fagocítica de los enterocitos por citar solo algunas de ellas, que difieren profundamente con sus similares en otras especies y que aún hoy son pobremente comprendidas. Sumado a esto, el ambiente acuático y más, el ambiente acuático productivo, es de por sí complejo de manera que las posibilidades de las interacciones biológicas son enormes y los procesos difícilmente predecibles.

La vacunación es tal vez una de las herramientas más importantes para el control de enfermedades bacterianas en peces, no solo por su potencial preventivo y correctivo sino también por sus bondades con el ambiente y con la salud pública que contrastan notoriamente con los tratamientos antibióticos. El éxito de las vacunas en especies piscícolas depende en buena medida del conocimiento adecuado del sistema inmunológico de los peces, de las interacciones hospedero-ambiente-patógeno, así como de las particularidades de los sistemas productivos. Con todo, la vacunación en ambientes acuáticos se enfrenta a un sinnúmero de dificultades que deben ser abordadas antes que con un enfoque unilateral farmacológico, con una aproximación integral en la que se incluye el uso de herramientas epidemiológicas, clínicas, patológicas, microbiológicas, etc.

Palabras clave: vacunación, peces, inmunidad de peces, enfermedades infecciosas en peces.

ABSTRACT

The fish immune system possesses many of the cells and molecules found in higher vertebrates, but several other components and functions such as the melanomacrophage centers and the phagocytic activity of the epithelial enteric cells which are not found in higher vertebrates are described in fish, though their function is poorly understood. In addition, the aquatic environment, and even most, the productive systems

are very complex, so that, the possibilities of the biological interactions are enormous and the biological processes prediction, difficult.

Vaccination is perhaps one the most important tools for fish bacterial diseases control, not just for its preventive and corrective potential but also for its beneficial environmental and public health effects which contrast with those of the antibiotic therapy. A great deal of the success of a vaccine in piscine species depends on fish immune system understanding, on the host-environment-pathogen interactions, but also on the productive system particularities. Despite all these considerations, the vaccination in aquatic systems must be approached bearing in mind an integral perspective, where epidemiological, clinical, pathological and microbiological, etc. tools should be taken into account and not only the pharmacological therapy view.

Key words: vaccination, fish, immunity of fish, infectious diseases of fish.

INTRODUCCIÓN

En condiciones naturales, la enfermedad es un fenómeno inherente a cualquier ser vivo y se potencializa cuando el individuo es sometido a condiciones estresantes. La producción animal y más aun la producción intensiva de animales permite que se den las condiciones para que se altere el equilibrio ambiente-patógeno-hospedero y se llegue a enfermedad y mortalidad. En el ámbito mundial, la acuicultura es el sector de mayor crecimiento en la producción de alimento; actualmente es responsable de cerca del 50% de la oferta mundial de pescado (FAO, 2006) y se considera que será una de las principales actividades económicas del presente siglo. Como actividad de acelerada expansión comienza a evidenciar problemas serios que deben ser entendidos y asumidos por todas las partes involucradas. Uno de los principales problemas son las enfermedades y entre estas, las infecciosas representan anualmente pérdidas cuantiosas en la producción global (Shoemaker y Klesius, 1997; Georgiadis *et al.*, 2001; FAO, 2006).

El crecimiento acelerado de la producción y el incremento consecuente de las enfermedades infecciosas, muchas de ellas causadas por bacterias (Shoemaker y Klesius, 1997; Georgiadis *et al.*, 2001) precisa de soluciones viables encaminadas a minimizar los efectos causadas por las patologías, a ofrecer al consumidor un producto limpio, a disminuir las posibilidades de resistencia bacteriana y a mitigar el efecto de la producción sobre los sistemas ecológicos (Shao, 2001; Pelletier, 2004; FAO, 2006).

Diferentes sustancias químicas y antibióticas han sido usadas para controlar los agentes infecciosos, pero estos productos son poco deseables por sus efectos colaterales como acumulación del producto en el músculo del pez, desarrollo de resistencia bacteriana y contaminación de los ambientes acuáticos, sumado a los costos de implementación y al hecho de que estas sustancias se administran en el alimento y se utilizan en peces enfermos que tienen apetito reducido o nulo (Shao, 2001; Dixon, 1994; Heppell y Davis, 2000; Furushita *et al.*, 2003).

Una alternativa al uso de estas sustancias es la vacunación, una de las herramientas más valiosas para prevenir enfermedades en acuicultura y asegurar un producto limpio sin efectos sobre el ambiente (Shoemaker y Klesius, 1997; Gudding *et al.*, 1999; Shao, 2001; Bowden *et al.*, 2003a; FAO, 2006).

Tal vez el principal obstáculo en el desarrollo de vacunas ha sido el pobre conocimiento sobre el sistema inmune de los peces, amplificado por la gran variabilidad intra e interespecífica de los mecanismos de respuesta y la gran diversidad de los sistemas acuáticos tanto ecológicos como productivos.

El propósito de este documento es presentar el escenario en el que se enmarca la vacunación de los peces, particularmente contra las enfermedades bacterianas de los teleósteos, desde una breve evaluación comparativa del sistema inmune, pasando por los factores involucrados en la inmunidad, los métodos de inmunización, la respuesta inmune a la vacunación, el estado actual y las perspectivas de vacunación en el mundo, hasta la propuesta de vacunación de peces en Colombia.

MATERIALES Y MÉTODOS

Para la localización y selección del material bibliográfico utilizado en la presente revisión se consultaron las bases de datos PubMed, Science Direct, Blackwell Synergy, Springer Link, AquaTIC y Catálogo Bibliográfico de la Universidad Nacional de Colombia. Las palabras claves utilizadas fueron: *Fishes* [Mesh] or *Fishes/ immunology* [Mesh] and *Vaccination* [Mesh] (188 citaciones bibliográficas en PubMed), *Mass immunization and fish* (cinco citaciones bibliográficas en Science Direct), *All: vaccination and Keywords: fish* (18 citaciones bibliográficas en Blackwell synergy), *TITLE-ABSTR-KEY(streptococcus)* and *TITLE-ABSTR-KEY(tilapia)* (26 citaciones bibliográficas en Science Direct), *For* (Boolean) > *vaccination and su:(fish)* (65 citaciones bibliográficas en SpringerLink), *Materia= Peces - Enfermedades* (siete citaciones bibliográficas en el Catálogo Bibliográfico de la Universidad Nacional de Colombia), *Materia=Peces -- Enfermedades* (diez citaciones bibliográficas en el Catálogo Bibliográfico de la Universidad Nacional de Colombia) y *Materia= enfermedades de los peces* (tres citaciones bibliográficas en el Catálogo Bibliográfico de la Universidad Nacional de Colombia).

Teniendo en cuenta la amplitud del tema del que trata la revisión, se seleccionaron en orden de importancia aquellos artículos que tuvieran resultados originales de investigación, que fuera la referencia actual del tema y otros que aunque no son actuales, son la fuente de referencia disponible. En total se utilizaron 86 referencias bibliográficas.

INMUNIDAD DE PECES

Sistema inmune innato. La primera línea de defensa contra la infección en los peces, así como en otras especies, es el sistema inmune innato; este incluye las barreras físicas como las superficies mucosas y la piel con un amplio rango de sustancias asociadas como el moco por citar una sola de ellas, pero también una variedad de leucocitos (monocitos /macrófagos, granulocitos y células citotóxicas no específicas) y diversas sustancias humorales (p.e. lisozima, factores del complemento, interferón, proteína C reactiva, transferrina, antiproteasas, lectinas, eicosanoides) que inhiben indiferenciadamente el crecimiento de microorganismos infecciosos (Dalmo *et al.*, 1997; Heppell y Davis, 2000; Fernández *et al.*, 2002b).

El componente celular principal en la respuesta inmune innata lo constituyen los macrófagos, además de su función como presentadores primarios de antígenos en la

respuesta inmune adquirida, son los principales fagocitos de los peces, secretan citoquinas proinflamatorias (Blazer, 1991; Dalmo *et al.*, 1997), aparecen en los eventos tempranos de inflamación en diferentes enfermedades y juegan un papel central en la patogénesis de algunas entidades particulares como la estreptococosis y la aeromoniasis entre otras, en las cuales son usados por los patógenos como vehículo para llegar a múltiples órganos y evitar ser destruidos (Zlotkin *et al.*, 2002; Pulido *et al.*, 2004; Ewart *et al.*, 2007). Por otra parte, también existen leucocitos granulares en peces, denominados al igual que en mamíferos: neutrófilos (heterófilos), eosinófilos (acidófilos) y basófilos según sus características tintoriales a pesar de que no aparecen siempre en las distintas especies y sus funciones biológicas no son idénticas. Los neutrófilos, al igual que sus análogos de mamíferos, tienen funciones fagocíticas, quimiotácticas y bactericidas, actividad de mieloperoxidasa (MPO), explosión respiratoria y poseen la capacidad de degranulación de gránulos primarios (Hine, 1992; Fernández *et al.*, 2002a; Fernández *et al.*, 2002b; Palic *et al.*, 2007). Recientemente se demostró la habilidad por parte de los neutrófilos de los peces de sintetizar “trampas” extracelulares (NETs) compuestas por gránulos de proteína y componentes nucleares que atrapan y destruyen bacterias (Palic *et al.*, 2007). Las funciones fagocíticas y bactericidas de los neutrófilos son reducidas en algunas especies y a pesar de encontrarse en algunos exudados fibrinosos, su participación en procesos agudos es muy inferior a la de mamíferos, lo que explicaría la tendencia de los peces a manifestar inflamaciones necróticohemorrágicas más que de licuefacción (Ellis, 1981; Ferguson, 2006). De otro lado, los eosinófilos de los peces denominados eosinófilos granulares homogéneos (EGHs) o células granulares eosinofílicas (CGEs) se encuentran asociadas al tejido conectivo especialmente en el tracto gastrointestinal y las branquias, pero también en piel, corazón y sistema nervioso central incluido el nervio óptico (Noya y Lamas, 1996; Ferguson, 2006). Su función no es clara, pero se encuentran fácilmente en procesos inflamatorios, en los cuales liberan su contenido granular, por lo que se han comparado con los mastocitos de mamíferos (Ferguson, 2006). Se ha demostrado que no poseen actividad de mieloperoxidasa ni de fosfatasa ácida, pero se movilizan en sangre y llegan al peritoneo y otros tejidos en respuesta a infecciones bacterianas (Noya y Lamas, 1996). Aunque se han descrito algunos CGEs con propiedades fagocíticas (Mainwaring y Rowley, 1985; Noya y Lamas, 1996), parece que su actividad es pinocítica y excretoria y su papel es de modulación de la respuesta inmune de superficies.

Centros melanomacrófagos (CMMs). Una característica particular del sistema inmune de los peces, es la presencia principalmente en el bazo, pero también en riñón, hígado, gónadas, tiroides y aun timo, de los denominados centros melanomacrófagos (CMMs) (Ferguson, 2006), estos se asemejan a los centros germinales del bazo y nódulos linfoides de los mamíferos, están constituidos por macrófagos, células reticulares, linfocitos y células plasmáticas. Reciben ese nombre porque dentro de los macrófagos que conforman los CMMs se producen y almacenan pigmentos como la lipofuchina, la melanina y la hemosiderina entre otros (Dalmo *et al.*, 1997; Agius y Roberts, 2003; Ferguson, 2006). El papel de los CMMs en respuesta a la infección es todavía especulativo, en infecciones por bacterias intracelulares resistentes a la fagocitosis como *Streptococcus*, *Mycobacterias* y *Renibacterias* en infestaciones por *Myxobolus* spp., en infecciones por nodavirus, los CMMs aumentan en número, sus macrófagos atrapan grandes cantidades de

antígeno o de bacterias completas y en su interior aumenta la cantidad de pigmentos (Agius y Roberts, 2003; Ferguson, 2006; Hernández *et al.*, 2008). Se reportan evidencias de la formación de complejos antigénicos (antígenos, IgM, factor de complemento 3) en los elipsoides esplénicos, de la movilización de estos complejos a CMMs (Ferguson, 2006), así como de la presentación de los mismos a linfocitos. Press *et al.*, 1996, demostraron que algunos elementos vacunales de *Aeromonas salmonicida* se acumulan preferiblemente en CMMs después de la inyección intraperitoneal.

Células Rodlet. Los peces teleosteos son los únicos vertebrados que poseen estas células. Son células ovaladas con un núcleo excéntrico, una cápsula fibrosa subyacente a la membrana celular y filamentos citoplasmáticos con forma de flechas que apuntan hacia el ápice (Pulido, 2000; Schmachtenberg, 2007). Aunque todavía algunos autores las consideran protozoarios, investigaciones recientes en múltiples especies las incluyen en el sistema de defensa de los peces óseos (Reite, 2005). Son células secretorias epiteliales presentes en grandes cantidades en la piel, branquias, intestino, ductos biliares, túbulos renales y bulbo arterioso, y en menor cantidad o ausentes en sangre, tejido conectivo, cerebro y bulbo olfatorio (Pulido, 2000; Reite, 2005; Ferguson, 2006; Schmachtenberg, 2007). Tienen gran habilidad para migrar a los epitelios y aumentar su número principalmente en infestaciones parasitarias y procesos irritantes (Reite, 2005; Schmachtenberg, 2007). En experimentos *in vitro* se demostró la capacidad de estas células de expulsar sus filamentos, pero el papel de estos en procesos inmunes o inflamatorios continúa sin resolver (Reite, 2005; Schmachtenberg, 2007). En tilapias cultivadas en Colombia, se han demostrado incidentalmente células rodlet asociadas a procesos inflamatorios ocasionados por *Streptococcus* en diferentes tejidos. A través de microscopía electrónica de transmisión (MET) se evidenciaron algunas interacciones de éstas con células vecinas, pero no fue posible determinar si tenían alguna relación con bacterias o con la enfermedad (Pulido, 2000).

Sistema inmune de mucosas. A pesar de que en los peces no existen ganglios linfáticos, placas de Peyer, ni tejidos linfoides asociados a mucosas (GALT y MALT) ampliamente caracterizados en mamíferos y aves, hay evidencias claras de un sistema inmune innato de mucosas desde los primeros estadios de vida de los peces (Olafsen y Hansen, 1992). Sumado al bajo pH gástrico y a la acción de las enzimas digestivas, de la bilis y del moco descritos en mamíferos, el sistema inmune de mucosas en los peces incluye otra serie de propiedades defensivas como la activación y aumento en número y tamaño de las células de moco branquiales e intestinales en respuesta casi siempre a infecciones bacterianas o irritantes presentes en el agua (Lodemel *et al.*, 2001), la producción y eliminación de anticuerpos en la bilis (St. Louis-Cormier *et al.*, 1984), la migración de células productoras de anticuerpos a las mucosas branquial e intestinal (St. Louis-Cormier *et al.*, 1984; Davidson *et al.*, 1993; Lin *et al.*, 2000; Fernández *et al.*, 2002b), la existencia de poblaciones bacterianas nativas asociadas al epitelio intestinal y pilórico que interfieren con la adhesión y posiblemente con el ingreso de bacterias patógenas a los tejidos del pez (Lodemel *et al.*, 2001; Ringø *et al.*, 2001), y por último, la facultad particular por parte de los enterocitos de hacer endocitosis de partículas intactas, macromoléculas (Dalmo *et al.*, 1997), y de bacterias y sus antígenos, tanto de la flora nativa (Lodemel *et al.*, 2001; Ringø *et al.*, 2001 y 2006) como de patógenos (Olafsen y Hansen, 1992; Lodemel *et al.*, 2001) en todos los segmentos intestinales de larvas y adultos.

INMUNIDAD ADQUIRIDA

La segunda línea de defensa es la inmunidad adquirida; aunque los peces no tienen médula ósea o nodos linfoides, el timo, el riñón y el bazo asumen este papel (Dalmo *et al.*, 1997). La inmunidad adquirida puede ser dividida en celular y humoral, y depende en gran medida de linfocitos T y B respectivamente (Fernández *et al.*, 2002a; Ruiz *et al.*, 2003a).

Similar a como ocurre en los mamíferos, la inmunidad humoral adquirida en peces involucra el reconocimiento y unión de antígenos solubles circulantes a células B diferenciadas en células de memoria y células plasmáticas que responden para producir y secretar anticuerpos antígeno-específicos. De otro lado, la inmunidad adquirida mediada por células involucra el reconocimiento de antígenos por las células T expuestas en la superficie de las células presentadoras de antígenos en asociación con moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC), que inducen la activación de linfocitos T citotóxicos (LTC, CD8⁺), células T ayudadoras (LTA, CD4⁺) secretoras de citoquinas y células supresoras (Heppell y Davis, 2000; Ruiz *et al.*, 2003a). En mamíferos, las células T CD4 y CD8 reconocen antígenos presentados por el MHC I y MHC II respectivamente, pero no es claro si esto es similar en los peces ya que no existen reactivos para identificar moléculas como CD4 y CD8 en teleósteos (Heppell y Davis, 2000; Shao, 2001; Vandenberg, 2004).

Los peces son capaces de producir únicamente un tipo de inmunoglobulinas, la IgM, que pueden aparecer como tetrámeros en teleósteos o como pentámeros o monómeros en peces cartilagosos; están compuestas por cadenas polipeptídicas pesadas y ligeras de gran heterogeneidad (Ambrosius *et al.*, 1982 en Stoskopf, 1993; Ruiz *et al.*, 2003a). Ahora se sabe que los peces tienen diferentes isotipos de anticuerpos, aunque la relevancia funcional de esta diversidad estructural no es clara y existen considerables variaciones entre especies (Ruiz *et al.*, 2003a; Vandenger, 2004).

Las inmunoglobulinas aparecen fundamentalmente en el plasma, el moco y la bilis y aumentan en estados de enfermedad (Davidson *et al.*, 1993; Lin *et al.*, 2000; Ruiz *et al.*, 2003b). En truchas, St. Louis-Cormier *et al.*, 1984, encontraron altos niveles de anticuerpos en el moco y la bilis en respuesta a infecciones en las que no se detectaron anticuerpos en suero; estos hallazgos fueron tal vez las primeras evidencias de la existencia de un sistema inmune de mucosas en los peces. Los anticuerpos ejercen su función en distintas formas: son capaces de unirse a la superficie de los virus e impedir así la infección celular, pueden unirse a las membranas de bacterias e inducir por la vía clásica del complemento la lisis bacteriana o pueden actuar como opsoninas y facilitar el reconocimiento por las células fagocíticas. Adicionalmente, como receptores de células B, participan en el reconocimiento de antígenos para la producción de anticuerpos (Ruiz *et al.*, 2003a).

Reconocimiento de lipopolisacárido en peces. Atención especial merece el tema de reconocimiento del lipopolisacárido (LPS) de bacterias Gram negativas por parte de las células y componentes del sistema inmune y el efecto de esta molécula en la inmunidad de los peces. En mamíferos, la respuesta inmune al LPS y el fenómeno de *shock* endotóxico son mediados secuencialmente por la proteína de unión de LPS (LBP), la transferencia del complejo LBP-LPS a CD14, la activación del sistema de reconocimiento *toll-like* receptor 4 (TLR4) en leucocitos y la liberación en cascada de sustancias entre las

que vale la pena destacar las citoquinas proinflamatorias factor de necrosis tumoral (TNF)- α , interleuquina (IL)-1 β , IL-12 y los interferones antivirales tipo I (Iliev *et al.*, 2005a). En los peces existen diferencias marcadas, las proteínas homólogas a la LBP no transfieren proteínas al CD14 lo cual conduce a la neutralización del LPS e interfiere con la activación de TLR4. Además, se cree que la habilidad de TLR4 para iniciar una respuesta inmune completa solo la tienen los vertebrados superiores y depende de la evolución de moléculas accesorias (CD14 y LY96) y moléculas adaptadoras (TICAM2) las cuales no se han encontrado en los peces. La falta de las moléculas de submembrana TICAM2 impide la expresión de genes proinflamatorios y evita la liberación de las citoquinas mencionadas en los mamíferos. Por otro lado, los leucocitos son activados solo en altas concentraciones de LPS posiblemente a través de la formación de agregados de LPS en concierto con un mecanismo dependiente de las beta-2 integrinas (Iliev *et al.*, 2005a). En relación con el efecto biológico en especies de consumo (salmón, carpa, trucha, flounder japonés, *catfish*, entre otras) y en el pez cebra como modelo de investigación, la inoculación de dosis de LPS que serían letales para cualquier mamífero, en la mayoría de los casos no inducen cuadros clínicos (Cahill, 1990; Dalmo y Bogwald, 1996; Iliev *et al.*, 2005a). En el salmón del atlántico (*Salmo salar*) se inocularon dosis de LPS de 2 mg/kg y 50 mg/kg por las vías intraperitoneal (i.p) e intragástrica respectivamente y a pesar de la movilización de la molécula por diferentes tejidos internos y de superficie, no se evidenció ningún tipo de signos clínicos, lesiones histopatológicas o mortalidad (Dalmo y Bogwald, 1996). Se menciona que la inoculación de 200 mg/kg de LPS en carpas no produjo muerte ni signos clínicos y que el *Salmon coho* (*Oncorhynchus kisutch*) y la trucha arco iris (*Salmo gairdneri*) son insensibles al LPS de *E. coli* y de *Aeromonas salmonicida* (revisado por citado por Dalmo y Bogwald, 1996). En estudios *in vitro*, se necesitaron dosis extremadamente altas ($\mu\text{g/ml}$) de LPS para estimular respuesta de leucocitos y concentraciones de LPS 1.000 veces más grandes que las requeridas en mamíferos para inducir en los fagocitos mononucleares la regulación de la producción de TNF (Zou *et al.*, 2003; Hirono *et al.*, 2004). Estos hallazgos han llevado a afirmar que los peces son resistentes o insensibles al LPS (Cahill, 1990; Dalmo y Bogwald, 1996; Iliev *et al.*, 2005a).

Sin embargo, a pesar de que el LPS en los peces tiene poco potencial proinflamatorio, las células y componentes del sistema inmune tanto sistémicos como de superficie (intestinal y branquial) se activan y movilizan en respuesta a esta molécula (Cahill, 1990; Dalmo y Bogwald, 1996; Press *et al.*, 1996). Después de administrarlo por las vías intravenosa (i.v) e i.p en bacalaos, el LPS se detectó en corazón, bazo y riñón a lo largo de 168 horas. Después de la inoculación oral, se encontró en gran cantidad en intestino y en menor cantidad en órganos internos. En el turbot, luego de la inoculación intravenosa, el LPS se encontró en bazo, hígado y riñón, y en bazo e hígado cuando se hizo por la vía oral. En varias especies marinas, los macrófagos del riñón y del bazo y los elipsoides esplénicos, acumulan grandes cantidades de LPS. También se detectó LPS en tejido conectivo intestinal y branquial y en células del epitelio intestinal y lámina propia después de la inoculación i.p y oral respectivamente (Dalmo *et al.*, 1998).

Sumado a la movilización hacia diferentes tejidos, el LPS purificado o como parte de soluciones vacunales luego de ser tomado por células linfoides y del sistema reticuloen-

dotelial (Dalmo *et al.*, 1996; Dalmo *et al.*, 1997; Press *et al.*, 1996), estimula la activación y movilización de macrófagos, neutrófilos y CMMs (Agius y Roberts, 2003) y activa linfocitos B aún en bajas temperaturas (Le Morvan, 1998). La inoculación de extractos purificados de LPS o bacterinas que incluyen LPS inducen altas respuestas de anticuerpos protectivos y estimulan protección en inmunizaciones contra patógenos diversos y en diferentes especies piscícolas de agua dulce y salada, entre las que se cuentan: *Vibrio salmonicida* y *Vibrio anguillarum* en salmones (Bogwald *et al.*, 1991), *Edwardsiella ictaluri* en *catfish* (Saeed y Plumb, 1986) y *Aeromonas hydrophila* en carpa (Selvaraj *et al.*, 2004) por lo que se le sigue utilizando como inmunoestimulante o como componente de vacunas (Shao, 2001; Bowden *et al.*, 2003b). En conclusión, a pesar de su bajo potencial proinflamatorio, el LPS tiene excelentes propiedades inmunógenas (Dalmo *et al.*, 1998) que validan su utilización como adyuvante o antígeno para la inmunización de peces (Shao, 2001; Bowden *et al.*, 2003a).

FACTORES QUE AFECTAN LA RESPUESTA INMUNE

La respuesta inmune se ve afectada por numerosos procesos que dependen del hospedero, del medio o del patógeno *per se*. Entre los factores que dependen del hospedero se presentan diferencias en la respuesta inmune humoral y celular que son propios de la especie y que pueden variar entre individuos de una misma población (Ruiz *et al.*, 2003b). La edad es tal vez uno de los factores más importantes. Existen evidencias de aparición de células de defensa entre los 5-28 días post-eclosión (DPE) en varias especies de teleósteos (flounder japonés: *Paralichthys olivaceus*, bacalao del Atlántico: *Gadus morhua*, turbot: *Scophthalmus maximus*, seabream: *Sparus aurata*, seabass: *Dicentrarchus labrax*, carpa: *Cyprinus carpio*, cebra: *Danio rerio*), pero la inmunocompetencia de esas células no ha sido evaluada certeramente en casi ninguna de estas especies y se cree que no son inmunológicamente competentes hasta varias semanas después de la eclosión (Klesius *et al.*, 2004; Mulero *et al.*, 2007). Aunque esto está ligado estrechamente con la especie en cuestión, es posible que se establezca tolerancia inmunológica si existe exposición al antígeno en los estados larvarios (Mulero *et al.*, 2007).

El fenómeno de tolerancia al LPS ha sido ampliamente estudiado en mamíferos, no así en peces. Zapata *et al.*, 1997, hipotetizaron que la tolerancia en peces jóvenes puede ser únicamente a antígenos T-dependientes y solo a antígenos inyectados, pero no a aquellos administrados por inmersión. Algunos autores sostienen que las células B de la trucha arco iris pueden ser estimuladas por antígenos T-independientes (p.e LPS) cuando los alevinos tienen cuatro semanas de edad (0,13 g; revisado por Zapata *et al.*, 1997). Las truchas desarrollarían memoria inmunológica luego de ocho semanas (0,26 g) y memoria a largo plazo solo cuando superan los 4 g de peso.

Hay varios reportes que describen la inmunización con LPS y bacterias completas de alevinos, juveniles (Dalmo y Bogwald, 1986; Press *et al.*, 1996; Dalmo *et al.*, 1998; Selvaraj *et al.*, 2004) o incluso de larvas (Dalmo *et al.*, 2000). En esos estudios los antígenos fueron administrados i.p o por inmersión e indujeron respuestas inmunes específicas o en algunos casos, aumento en la protección frente al reto con el microorganismo que descartan la posibilidad de respuestas de inmunotolerancia.

En contraste, Guttvick *et al.*, 2002, en alevinos de salmón (*Salmo salar*) alimentados desde los 2 g con una dieta que incluía LPS, encontraron altas mortalidades después

del reto con *Aeromonas salmonicida* y *Vibrio anguillarum*, ellos creen que las mortalidades pudieron presentarse por tolerancia al LPS, por delección de componentes del complemento causado por la repetida exposición a la sustancia o por los niveles excesivos de LPS administrados.

Otro de los factores intrínsecos determinantes en la respuesta inmunológica es estrés. Se ha descrito en los peces un síndrome de adaptación (estrés) o de huida similar al de los mamíferos, estimulado en los peces por hipoxia, altas densidades, manipulación, temperatura, tóxicos (contaminantes acuáticos), y modulado en los teleósteos principalmente por los niveles de cortisol (Wendelaar, 1997). A pesar de que el síndrome de estrés no ha sido adecuadamente caracterizado y existe contraposición entre los resultados de supresión y estimulación de las células y funciones inmunes (Wendelaar, 1997), los efectos más relevantes sobre el sistema inmune tienen que ver con alteraciones de los tejidos superficiales del pez y depresión de la respuesta leucocitaria, algunos de ellos son: incremento de la permeabilidad epitelial, incremento en el recambio celular y a su vez desarreglo estructural en piel y branquias, incremento en los neutrófilos circulantes en contraste con los bajos niveles plasmáticos de linfocitos y macrófagos ocasionado por la extravasación de estas células en las branquias, la piel y el intestino (Wendelaar, 1997), disminución de los linfocitos de memoria B y T, aumento en la fagocitosis y la explosión respiratoria de los leucocitos renales (Wendelaar, 1997, Ruiz *et al.*, 2003b), alteración de la migración, fagocitosis y presentación de antígenos por parte de los macrófagos que son como ya se dijo la célula principal en la respuesta inmune primaria y disminución de la actividad de MPO y la producción de NETs por parte de los neutrófilos (Palic *et al.*, 2007). Todos estos efectos se traducen en la susceptibilidad a enfermedades principalmente de tipo infeccioso y particularmente de origen bacteriano (Ndong *et al.*, 2007).

El estado nutricional también afecta el sistema inmunológico de los peces; las deficiencias de las vitamina C y E alteran el funcionamiento de los macrófagos y el complemento (Blazer, 1991); los desbalances de ácidos grasos pueden alterar la fagocitosis fundamentalmente por modificación de las características de la membrana celular de leucocitos (Blazer, 1991) y disminuir marcadamente la flora normal del intestino y a su vez la resistencia a la adhesión y translocación bacteriana (Ringø *et al.*, 2001).

En lo que concierne a los factores extrínsecos, la temperatura es trascendental en los peces cuando debe responder a un agente patógeno (Le Morvan, 1998; Ferguson, 2006). La temperatura del agua afecta la respuesta inmune en mayor o menor medida según la especie del pez y la adaptación previa a la misma. Se han denominado temperaturas no permisivas (Le Morvan, 1998; Ferguson, 2006) a las temperaturas en las cuales el sistema inmune prácticamente no responde: se reportan 4 °C para los salmónidos y especies de agua fría, 14 °C para las carpas y en promedio 12-14 °C para las especies de aguas templadas o cálidas, con algunas excepciones como en el *catfish* en cuyo caso la temperatura no permisiva es 22 °C (Ellis, 1981; Le Morvan, 1998; Ferguson, 2006). Los efectos de las bajas temperaturas sobre el sistema inmune son principalmente sobre el componente celular; se reporta la disminución de la respuesta mediada por linfocitos, particularmente sobre la función de las células T helper sin afectar las funciones de procesamiento de antígeno y producción de IL-1 por parte de las células presentadoras de antígeno (Le Morvan, 1998). Además, se describe la alteración

de la fagocitosis y de la citotoxicidad (Ellis, 1981, Le Morvan, 1998), el bloqueo de la activación de las células T y B, y la disminución de la respuesta primaria de anticuerpos (Miller y Clem, 1984). Estudios *in vitro* han demostrado que la respuesta linfoproliferativa del *catfish* (*Ictalurus punctatus*) a concanavalina A (ConA) y fitohemaglutinina se reduce en temperaturas bajas (<22 °C). Algunos autores coinciden en que las temperaturas bajas suprimen la respuesta primaria de anticuerpos, pero la respuesta secundaria es adecuada a temperaturas bajas siempre y cuando la memoria inmunológica se establezca en temperaturas confortables para la especie (Miller y Clem, 1984; Le Morvan, 1998). Por otro lado, las temperaturas bajas cambian la relación entre ácido oleico y esteárico a favor del primero y de este modo aumentan la rigidez de la membrana celular y disminuyen o impiden la fagocitosis, la migración transepitelial y otras funciones de leucocitos (Le Morvan, 1998). Adicionalmente, la activación de la proteína quinasa C y la síntesis de otros componentes de la membrana plasmática tales como proteínas y glúcidos (principalmente ácido siálico) son afectados *in vitro* por las temperaturas bajas (Le Morvan, 1998). Las fluctuaciones de temperatura tienen un efecto doble en relación con la presentación de enfermedades infecciosas, por un lado altera en el pez los mecanismos de respuesta y por el otro, presiona el crecimiento de los patógenos en el ambiente (Le Morvan, 1998). Los principales problemas se presentan cuando se producen fluctuaciones súbitas de temperatura, y casi siempre en estos casos, la enfermedad y la mortalidad se asocian a procesos de origen bacteriano (Ferguson, 2006; Ndong *et al.*, 2007).

Algunos metales pesados como mercurio, cadmio y cobre, insecticidas como los organoclorados y organofosforados, pero también el amoníaco, los nitritos y el cianuro en dosis subletales, tienen efecto sobre componentes celulares y humorales del sistema inmune, ya sea en forma directa, o como consecuencia de su efecto estresante, pero los mecanismos involucrados en esas reacciones no han sido clarificados (Zapata *et al.*, 1992).

Por otra parte, los factores que dependen del patógeno son diversos, dependen de las características biológicas de cada agente, de las particularidades de sus antígenos y de sus interacciones con el sistema inmune. Algunos componentes físicos, químicos o funcionales de las bacterias patógenas y su relación con la respuesta inmune de los teleosteos serán tratados adelante en respuesta inmune a la vacunación.

MÉTODOS DE VACUNACIÓN

Los principales métodos de vacunación en los peces son: inmersión en una solución vacunal, inyección intraperitoneal (requiere que el animal tenga más de 15 g de peso), inyección intramuscular (principalmente para vacunas de ADN) y administración oral (Heppell y Davis, 2000; Shao, 2001; Bowden *et al.*, 2003a; Klesius *et al.*, 2004). Otros métodos que se han investigado son: el baño, en el cual los peces se exponen a la vacuna por inmersión en el mismo sitio de cultivo, la infiltración anal y el método de spray (Press *et al.*, 1996; Shao, 2001; Bowden *et al.*, 2003a).

Vacunación por inmersión. Es un método ideal para vacunar gran número de peces pequeños (Bowden *et al.*, 2003a; Klesius *et al.*, 2004; Evans *et al.*, 2004; Pasnick *et al.*, 2005). En la vacunación por inmersión los peces son sumergidos en una solución vacunal concentrada, este método es más usado que la vacunación oral y normalmente

provee mejor protección, posiblemente por la mejor absorción del antígeno a través de la piel y/o las branquias, porque se evita la degradación de la vacuna en el estómago y además porque algunos antígenos bacterianos ingresan a través de la mucosa gastrointestinal (Lin *et al.*, 2000; Shao, 2001; Bowden *et al.*, 2003a; Klesius, 2004). Se ha propuesto utilizar esta vía combinada con inmersiones previas en soluciones hiperosmóticas, con exposición de los peces a ultrasonografía o infligiendo pequeñas lesiones cutáneas por medio de un instrumento de punción múltiple que ha sido ampliamente usado para la vacunación de humanos contra la tuberculosis. Experimentalmente, estas modificaciones mejoran la penetración de inmunógenos a través de la piel en la vacunación por inmersión (Nakanishi *et al.*, 2002; Zhou *et al.*, 2002a; Zhou *et al.*, 2002b; Navot *et al.*, 2004). Entre las desventajas de este método se cuentan: la necesidad de proteger los antígenos que se puedan degradar en el agua, los bajos niveles de protección que induce frente a patógenos particulares como el *Streptococcus agalactiae* (Evans *et al.*, 2004) y la dificultad del estrés que implica el traslado de los peces al recipiente de vacunación (Shao, 2001; Bowden *et al.*, 2003a).

Administración oral de vacunas. La vacunación oral es el método ideal de inmunización en acuicultura por la facilidad del procedimiento, por los relativos costos bajos y porque no causa ningún tipo de estrés a los peces, sumado a la posibilidad de vacunar grandes poblaciones de peces pequeños en corto tiempo (Shao, 2001; Bowden *et al.*, 2003a; Romalde *et al.*, 2004; Vanderverg, 2004). Otra ventaja adicional, es la estimulación de inmunidad en las mucosas (Lin *et al.*, 2000; Vanderverg, 2004). Sus principales inconvenientes son la dificultad para determinar la dosis consumida por cada pez, los niveles bajos de protección alcanzados por estas vacunas cuando se comparan con los de inyección (Heppell y Davis, 2000) y la necesidad de recubrir los antígenos para evitar que sean destruidos en el agua o en el estómago del pez (Shao, 2001; Bowden *et al.*, 2003a; Romalde *et al.*, 2004; Vanderverg, 2004).

Vacunación intraperitoneal. Es la ruta más efectiva para inducir protección, asegura una dosis idéntica en todos los individuos y permite la adición de adyuvantes que estimulan protección por más tiempo (Midtlyng, 1996; Gudding *et al.*, 1999; Klesius *et al.*, 2000; Bowden *et al.*, 2003a; Evans *et al.*, 2004). Sin embargo, los costos y las dificultades de implementación, el estrés excesivo que induce en los peces, sumado a la poca viabilidad en peces pequeños, y a la estimulación deficiente de inmunidad de superficies, hacen que la inyección de vacunas se limite a ciertas especies de peces, a patógenos determinados y a sistemas de producción particulares, como es el caso de la vacunación de salmónidos contra la furunculosis (Midtlyng, 1996). La incorporación de adyuvantes oleosos prolonga la duración de la protección y sirve como inmunostimulante, pero su aplicación puede resultar en adherencias a la pared abdominal que dificultan el proceso de eviscerado o pueden llevar al rechazo del producto (Midtlyng, 1996; Shao, 2001; Bowden *et al.*, 2003b).

Vacunación intramuscular. La vacunación intramuscular en peces a excepción de algunos trabajos experimentales con bacterinas (Klesius *et al.*, 2000) se limita a la evaluación de vacunas basadas en tecnología de DNA. La investigación en vacunas recombinantes se ha enfocado en la estimulación de protección contra agentes virales. Actualmente, la única vacuna recombinante aprobada para peces es la fabricada contra el virus de la pancreatitis necrótica infecciosa (IPNV; Gudding *et al.*, 1999). Para

los organismos acuáticos, así como para otros animales de granja, las vacunas de DNA ofrecen varias ventajas sobre las vacunas clásicas. Desde el punto de vista práctico, las primeras son poco costosas y relativamente fáciles de producir, se pueden fabricar sin muchas complicaciones vacunas polivalentes, se mantienen viables por mucho tiempo debido a la estabilidad del DNA y además por la facilidad de clonaras se pueden modificar si se requiere (Heppell y Davis, 2000). También tienen ventajas inmunológicas sobre otros tipos tradicionales de vacunas. Como se ha demostrado en mamíferos, pueden inducir una respuesta humoral y celular fuerte y prolongada sin riesgo de infecciones inadvertidas como ocurre con las vacunas vivas modificadas. En peces es poco lo que se sabe acerca de la respuesta inmune después de la inyección de plásmidos, pero no hay evidencias de que sea distinta a la observada en mamíferos (Heppell y Davis, 2000). Con excepción del caso de los organismos genéticamente modificados en los que el DNA extraño ha sido integrado en el genoma del animal, los genes externos liberados por inmunización con DNA no se insertan al genoma del animal y dejan de expresarse después de algún tiempo (Heppell y Davis, 2000; Ramos *et al.*, 2005). Las desventajas de este tipo de vacunas en los sistemas piscícolas son fundamentalmente: la necesidad de inoculación intramuscular y la posibilidad de reacciones autoinmunes, aunque estas últimas no han sido demostradas en peces (Ferguson, 2006).

Otras vías de inmunización. La intubación anal ha arrojado muy buenos resultados de protección debido a que los antígenos no son afectados en su paso por el tracto digestivo como ocurre con las vacunas orales, pero de la misma forma que las vacunas intraperitoneales, no serían viables técnica ni económicamente en la mayoría de sistemas productivos piscícolas (Bowden *et al.*, 2003a).

RESPUESTA INMUNE A LA VACUNACIÓN CONTRA BACTERIAS

A pesar de encontrarse algunas similitudes en la respuesta a la vacunación, por ejemplo entre especies que crecen en el mismo rango de temperatura, es imposible extrapolar los resultados de la inmunización de una especie a otra. Los niveles de respuesta y/o protección dependerán de los factores intrínsecos y extrínsecos mencionados, de las particularidades del agente patógeno, del tipo de vacuna y del método de vacunación utilizado.

Como se mencionó en: Factores que afectan la respuesta inmune, no existe claridad en el tiempo en el que el pez se hace inmunocompetente (Mulero *et al.*, 2007). Se ha concluido que la edad mínima en la que el catfish inicia la inmunocompetencia es a los 28 días posteclosión (DPE), pues en esta edad se consiguió la mejor respuesta inmune humoral en peces vacunados parenteralmente con bacterinas. Sin embargo, varios autores demostraron que siete DPE es la edad mínima para obtener una inmunización exitosa con vacunas administradas por inmersión en el catfish (revisado por Klesius *et al.*, 2004).

En tilapias vacunadas contra *Streptococcus iniae* se producen altos niveles de anticuerpos sin importar la vía de administración vacunal (Klesius *et al.*, 2000) y el pico de respuesta de anticuerpos contra *Streptococcus iniae* y *Streptococcus agalactiae* se da entre los 30-65 días, debido a esto, los desafíos bacterianos en experimentos de inmunización se hacen en ese periodo (Klesius *et al.*, 2000; Evans *et al.*, 2004; Pasnick *et al.*, 2005). A pesar de esto, se han encontrado diferencias marcadas entre el nivel de anticuerpos postvacu-

nales y la protección frente a algunos patógenos como el *Streptococcus agalactiae* sp. o la *Edwardsiella tarda* (Swain *et al.*, 2002), diferencias que tendrían que ver, en los primeros con su permanencia intracelular y su capacidad de transportarse viables dentro de macrófagos bloqueando los procesos de fagocitosis presentación de antígenos y memoria inmunológica (Zlotkin *et al.*, 2002; Pulido *et al.*, 2004; Ewart *et al.*, 2007), y en los segundos con cierta deficiencia en la producción de anticuerpos por parte de las larvas y pequeños alevinos. Este hecho hace pensar en la necesidad de evaluar protección frente a determinados microorganismos a través de pruebas distintas a las serológicas o en sitios diferentes a la sangre como el moco y la bilis (St. Louis-Cormier *et al.*, 1984; Davidson *et al.*, 1993; Lin *et al.*, 2000; Ruiz *et al.*, 2003b).

En relación con el peso, a pesar de que algunas investigaciones arrojan resultados adecuados de protección contra *Edwardsiella tarda* en larvas, alevinos y dedinos de carpa (Swain *et al.*, 2002), la protección contra *S. agalactiae* en tilapias de 5 g es notablemente menor que en peces de 30 g sin importar la vía de inmunización (inmersión o i.p; Evans *et al.*, 2004).

La tasa de inducción de la respuesta inmune es más rápida en especies de aguas templadas o cálidas, por ejemplo el *seabass* (*Dicentrarchus labrax*) inicia la producción de anticuerpos a la semana postinmunización y alcanza el pico hacia las dos semanas, mientras que el salmón del atlántico, especie de agua fría, invierte seis semanas para iniciar la producción de anticuerpos y alcanza el pico hasta las diez semanas post vacunación. De esta forma, si es necesario movilizar peces a una área endémica, deben ser vacunados previamente teniendo en cuenta estas diferencias marcadas entre especies y entre temperaturas de cultivo (Bowden *et al.*, 2003a).

A pesar de que la inclusión de LPS o sus componentes en vacunas no es una práctica común en sistemas de producción piscícola (Shao, 2001; Bowden *et al.*, 2003a), se recomienda determinar para cada especie de interés productivo las dosis de LPS que tendrían efecto inmunoestimulante y la fase de desarrollo del pez a la cual se debe iniciar la inmunización con esta molécula, particularmente los estadios de saco vitelino y de alevinaje temprano que suponen deficiencias en las funciones inmunes (Guttvick *et al.* 2002).

La ruta de inmunización es fundamental a la hora de estimular protección contra bacterias. Es necesario conocer específicamente los tejidos por los que ingresa el patógeno para asegurar estimulación del sistema inmune en esos sitios (Mydthling, 2005). La mayoría de las bacterias que causan enfermedad en los peces, ingresan preferiblemente por el tracto gastrointestinal (*Aeromonas* sp., *Vibrio* sp., *Edwardsiella* sp., *Lactococcus*, diferentes especies de *Streptococcus*, entre otras) y para actuar contra ellas sería indicada la vacunación oral, pero algunas como las flavobacterias y también varios *Streptococcus*, entre ellos el *S. iniae* y las *Aeromonas* en la forma cutánea de la enfermedad, penetran fácilmente por la piel y/o las branquias en cuyo caso adquiere peso el método de inmersión. Como vemos, algunos patógenos tendrían potencial para estimular respuesta inmune por las dos vías (oral e inmersión) y la elección de la vía se determinará entonces por la viabilidad técnica y económica del proceso; por ejemplo la vacuna contra vibriosis y pseudotuberculosis (pasteurellosis) es altamente efectiva cuando se administra por inmersión, y esta ruta es la más utilizada en la mayoría de las especies marinas (Bowden *et al.*, 2003a). Sin embargo, se le debe prestar especial cuidado a la vacunación contra algunos patógenos, por ejemplo contra el *S. agalactiae*. En experimentos de inmersión,

los peces retados con esta bacteria no presentan el más leve signo clínico (Rasheed y Plumb, 1984) y las tilapias nilóticas vacunadas por inmersión tienen niveles de protección dos veces menores que los obtenidos por la vía i.p (Evans *et al.*, 2004). Adicionalmente, se tienen evidencias contundentes de que el *S. agalactiae* ingresaría a los peces a través del estómago y el intestino (Comas e Iregui, 2005). Teniendo en cuenta estas particularidades, la única vía plausible de vacunación contra este patógeno sería la oral. A pesar de que algunos autores consideran que en acuicultura una única vacunación es suficiente para inducir protección hasta que los peces son cosechados (Heppell y Davis, 2000; Bowden *et al.*, 2003a), y esto puede tener validez luego de inmunizaciones vía i.p, la vacunación de poblaciones de cientos de miles de individuos requiere de métodos masivos de inmunización (inmersión y oral) los cuáles requieren en la mayoría de los casos, revacunación (Romalde *et al.*, 2004; Vandenberg, 2004). En algunos peces se alcanzan niveles adecuados de protección únicamente cuando se utilizan vacunas vivas modificadas, es el caso de la vacuna contra *Edwardsiella ictaluri* en cultivos de catfish de los Estados Unidos (Shoemaker *et al.*, 2002).

A pesar de la aparente seguridad de las bacterinas, la vacunación de peces recibió una alerta en el 2001, cuando en una explotación de trucha arcoíris (*Onchorhynchus mykiss*) en Israel, la utilización de una bacterina contra la estreptococosis indujo la aparición de un isotipo de mayor virulencia, con modificaciones en las proteínas de membrana, capaz de enfermar y matar a los peces vacunados (Bachrach *et al.*, 2001).

Algunos componentes estructurales esenciales para la sobrevivencia de los microorganismos denominados genéricamente patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs), así como la interacción de estos con el sistema inmune innato a través de los receptores de reconocimiento de patrón del sistema inmune (PRRs), han comenzado a tenerse en cuenta en la búsqueda de mejores respuestas vacunales en peces (Robertsen, 1999; Iliev *et al.*, 2005a). Los PAMPs y sus respectivos PRRs han sido estudiados de manera amplia en mamíferos, especialmente lo concerniente al grupo más importante de los últimos, los llamados receptores *Toll-like* (TLR). En relación con patógenos bacterianos, los principales PAMPs reconocidos por el sistema TLR incluyen además del LPS y su componente activo el Lípido A por TLR₄, los lipopéptidos diacilados de los micoplasmas por TLR₆/TLR₂, los lipopéptidos triacilados de mycobacterias y otras bacterias por TLR₁/TLR₂, el ácido lipoteicoico (LTA) de los *Streptococcus* del grupo B por TLR₆/TLR₂, el peptidoglicán (PG) y su componente activo muramil dipéptido (MDP) de las eubacterias por TLR₂, las porinas de las Neisserias por TLR₂, el lipoarabinomano de las mycobacterias por TLR₂, la flagelina de las bacterias flageladas por TLRs y los dinucleótidos CpG-DNA de las mycobacterias y otras bacterias por TLR₉ (Akira *et al.*, 2006). Después de la estimulación por diferentes PAMPs incluyendo zimosan, MDP, β glucanos y RNA de doble cadena (dsRNA), los monocitos de truchas modularon la producción de citoquinas proinflamatorias con la misma sensibilidad que la observada en células de mamíferos, pero en el caso del LPS, la producción del TNF₂ solo se dio cuando las células se expusieron a 1.000 veces la concentración usada en monocitos de mamíferos (Iliev *et al.*, 2005b).

El LPS es conocido como uno de los más potentes moduladores de las funciones inmunes de los mamíferos. La molécula está compuesta de un polisacárido unido al lípido A y se encuentra enganchada en la membrana externa. El lípido A consiste de

dos glucosaminas sustituidas con fosfatos y un número variable de ácidos grasos, está presente en todas las bacterias sin importar su cepa y patogenicidad pero es pobremente reconocida por el sistema inmune (Robertsen, 1999; Iliev *et al.*, 2005a; Iliev *et al.*, 2005b; Akira *et al.*, 2006). Se ha demostrado que el lípido A es responsable de la mayoría de los efectos inmunomodulatorios del LPS (Robertsen, 1999; Iliev *et al.*, 2005a; Iliev *et al.*, 2005b).

Las vacunas (bacterinas) contra vibriosis (*V. anguillarum* y *V. salmonicida*) y contra yersiniosis (*Yersinia ruckerii*) contienen como antígeno protector al LPS y han dado muy buenos resultados en la piscicultura marina del salmón, *seabass*, turbot, *seabream* y *halibut*. En forma similar, el LPS en conjunto con la proteína de capa A de la *Aeromonas salmonicida* induce niveles protectivos contra la furunculosis del salmón (Shao, 2001; Bowden *et al.*, 2003a). El PG demostró que puede amplificar la resistencia de la trucha arcoíris contra *Vibrio anguillarum* y la del *yellowtail* contra *Enterococcus seriolicida* aun cuando se administraron en el alimento de los peces. El MDP administrado por la vía i.p aumentó la resistencia del salmón coho y de la trucha arcoíris contra la infección por *Aeromonas salmonicida* (Robertsen, 1999).

Adicionalmente, algunos productos extracelulares (PECs) de las bacterias se prueban con discutibles resultados en la vacunación de peces contra *Streptococcus*. Klesius *et al.*, 2000, Evans *et al.*, 2004 y Pasnik *et al.*, 2005, compararon en tilapias (*Oreochromis niloticus*) el efecto protector de bacterinas convencionales y bacterinas adicionadas con PECs contra *Streptococcus iniae* y *Streptococcus agalactiae* y encontraron niveles de protección adecuados únicamente cuando las vacunas eran adicionadas con los PECs concentrados.

Por su parte, las vacunas de DNA se consideran las más eficaces para inducir protección y respuesta del sistema inmune en los peces por disparar mecanismos inmunológicos innatos (activación de genes de leucocitos) y adaptativos (expresión del antígeno intacto) que aseguran respuestas efectivas tanto humorales como celulares (Heppell y Davis, 2000).

ESTADO ACTUAL DE LA VACUNACION DE PECES

El uso de vacunas en acuicultura, si se compara con los adelantos en humanos y en animales de granja, está aún en un estado temprano de desarrollo; con todo, en los últimos años se han hecho grandes avances en vacunación de peces, especialmente de salmónidos. La primera vacuna comercial fue producida en Colorado, EUA, en 1976, después del descubrimiento de que cultivos de *Y. ruckeri* y *V. anguillarum* inactivados con formalina podían ser efectivos para proteger a los peces de la enfermedad entérica de la boca roja (ERM) y contra vibriosis a través de una simple inmersión (Bowden *et al.*, 2003a). En la maricultura del salmón del atlántico, la vacunación ha sido muy exitosa para controlar enfermedades bacterianas (Gudding *et al.*, 1999). En contraste, la vacunación de especies de aguas cálidas, particularmente de tilapias es aún reducida y casi todas las vacunas producidas son experimentales (Klesius *et al.*, 2000; Swain, 2002; Evans *et al.*, 2004).

La mayoría de vacunas usadas en acuicultura, a la fecha, han sido vacunas inactivadas (Gudding *et al.*, 1999). Se dispone comercialmente de bacterinas inactivadas con formalina contra las Gram negativas *Vibrio anguillarum*, *Vibrio ordalii*, *Vibrio salmonicida*,

Yersinia ruckerii, *Aeromonas hydrophila*, entre otras, y contra las Gram positivas *Lactococcus garviae*, *Streptococcus iniae* y *Streptococcus agalactiae* (Klesius *et al.*, 2000; Evans *et al.*, 2004; Pasnik *et al.*, 2005). La única vacuna viva modificada permitida es la desarrollada contra *Edwardsiella ictaluri* para la inmunización de *catfish* de cultivo en Norteamérica (Shoemaker *et al.*, 2002; Klesius *et al.*, 2004).

Debido a que los antígenos administrados oralmente son destruidos o desnaturalizados en el estómago e intestino anterior, se investigan diversas sustancias que atenúen los efectos digestivos (Bowden *et al.*, 2003a), por ejemplo, las microesferas de poli DL-lactidoco-glicólido han demostrado eficacia en el transporte de la gama globulina humana (HGG) administrada experimentalmente vía oral y capacidad para protegerla y llevarla intacta al intestino posterior y a la sangre de truchas (Shao, 2001). Romalde *et al.*, 2004, lograron porcentajes de protección más altos en truchas inmunizadas vía oral contra *Lactococcus garviae* cuando encapsularon las bacterias en micropartículas de alginato. Se estudia también la posibilidad de usar vacunas de DNA por la vía oral incorporando genes encapsulados en quitosán, un polisacárido natural que protege los antígenos de las enzimas gástricas y adicionalmente incrementa el transporte paracelular y transcelular a través de las células epiteliales (Ramos *et al.*, 2005). Un nuevo acercamiento a la vacunación oral es la reducción temporal de los procesos digestivos mediante la coadministración de vacunas con antiproteasas y aumentadores de la permeabilidad de membrana para permitir que la vacuna escape de la hidrólisis digestiva (Vandenberg, 2004). Otra opción en estudio es la administración de vacunas bioencapsuladas, es decir incorporar el antígeno en alimento vivo para incrementar la resistencia a la degradación digestiva (Bergh *et al.*, 2001; Vandenberg, 2004), por ejemplo, los nauplios de *Artemia* se prueban como una opción para vehicular bacterinas contra *Vibrio anguillarum* y serían una alternativa para la vacunación de larvas de peces (Bergh *et al.*, 2001).

Situación nacional. En Colombia, similar a la tendencia mundial, la cadena de la piscicultura ha crecido aceleradamente en sus dos cortas décadas de existencia (MADR, 2005). En 2004 se produjeron más de 40.000 Ton; la tilapia se consolidó como la principal especie de cultivo con 27.953 Ton y el país se ubicó entre los diez principales productores de tilapia en el mundo (FAO, 2006). El grueso del volumen nacional lo producen, los sistemas superintensivos de la represa de Betania (Huila) y los piscicultivos del departamento del Meta (MADR, 2005). En contraste con el crecimiento del sector, las medidas de control de enfermedades continúan siendo pobres; no se ha creado un sistema sanitario piscícola para afrontar científica y técnicamente los problemas que afectan a la piscicultura, y las pérdidas por agentes infecciosos, casi siempre mal estimadas, continúan creciendo. Después de iniciar un inventario sanitario en las principales especies de cultivo, Iregui *et al.*, 2004, encontraron que las patologías bacterianas que afectan las tilapias de nuestro país son ocasionadas principalmente por *Aeromonas hydrophila*, *Edwardsiella tarda* y *Streptococcus* (Rey *et al.*, 2003; Iregui *et al.*, 2004).

En años recientes, se caracterizó clínica y patológicamente la estreptococosis, una de las enfermedades más prevalentes en los sistemas superintensivos de tilapia de nuestro país (Pulido *et al.*, 2004; Hernández *et al.*, 2008). La bacteria inductora de la enfermedad ha sido clasificada como *Streptococcus agalactiae* no hemolítico (Hernández *et al.*, 2009). A través de histopatología, inmunohistoquímica y PCR se ha detectado

el *S. agalactiae* en cultivos de tilapia del Huila, Tolima, Meta, Casanare, Córdoba, Cundinamarca y Valle del Cauca (Iregui *et al.*, 2004; Jiménez *et al.*, 2007).

Existe un interés creciente en la comunidad internacional por el uso de herramientas epidemiológicas para el entendimiento de la interacción entre los agentes patógenos, sus hospederos y las distintas condiciones ambientales que permiten el desencadenamiento de problemas sanitarios en organismos acuáticos (Hedrick, 1998). Sin el conocimiento de los factores de riesgo, es imposible predecir los patrones de las enfermedades y diseñar aproximaciones a su prevención y control (Hedrick, 1998; Georgiadis, 2001). La propuesta de abordaje de las enfermedades de peces en nuestro país se ha basado en estos preceptos (Iregui *et al.*, 2004), se ha venido proponiendo una aproximación integral al fenómeno de enfermedad en los peces haciendo uso de herramientas epidemiológicas y estudios de patogénesis que busquen los factores de riesgo asociados a la enfermedad natural y las interrelaciones de la bacteria con las superficies del pez, con miras a diseñar estrategias y protocolos de prevención que se sostengan en el tiempo y que sean acordes con las políticas y regulaciones sanitarias y comerciales.

En este marco, se inició la caracterización epidemiológica y de patogénesis de la estreptococosis en el país, teniendo en cuenta el comportamiento de la bacteria en los peces, en el agua de los cultivos y en el producto que llega al consumidor (Jiménez *et al.*, 2007), se investigan las posibles vías de entrada de la bacteria a los tejidos de tilapias (Comas e Iregui, 2005) y apoyados en esos resultados y manteniendo el enfoque integral de la enfermedad se iniciaron los estudios para la vacunación de tilapias contra la estreptococosis producida en Colombia por el *S. agalactiae* (Penagos *et al.*, 2005).

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional de Colombia.

BIBLIOGRAFÍA

AGIUS C, ROBERTS R. Melano-macrophage centres and their role in fish pathology. *J Fish Dis.* 2003;26:499-509.

AMBROSIUS H, FIEBIG H, SCHERBAUM I. Phylogenetic aspects of fish immunoglobulins and lymphocyte receptors. *Dev Comp Immunol.* 1982; Suppl. 2: 3-13. En: Stoskopf MK. *Fish Medicine.* W.B. Saunders Company; 1993. p. 150-152.

AKIRA S, UEMATSU S, TAKEUCHI O. Pathogen recognition and innate immunity. *Cell.* 2006;124:783-801.

BACHRACH G, ZLOTKIN A, HURVITZ A, EVANS D, ELDAR A. Recovery of *Streptococcus iniae* from Diseased Fish Previously Vaccinated with a *Streptococcus* Vaccine. *Appl Envir Microbiol.* 2001;67(8):3756-3758.

BERGH Ø, VIKANES L, MAKRIDIS P, SKJERMO J, KNAPPSKOG D, RODSETH OM. Uptake and processing of a *Vibrio anguillarum* bacterin in *Artemia franciscana* measured by ELISA and immunohistochemistry. *Fish Shellfish Immunol.* 2001;11:15-22.

BLAZER VS. Piscine macrophage function and nutritional influences: A review. *J Aquat Anim Health.* 1991;3:77-86.

BOWDEN T, BRICKNELL I, ELLIS AE. Fish Vaccination, an overview. Industry report IntraFish. 2003a;5-20.

BOWDEN T, ADAMSON K, MACLACHLAN P, PERT C, BRICKNELL I. Long term study of antibody response and injection-site effects of oil adjuvants in Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus* L.). *Fish Shellfish Immunol.* 2003b;14:363-369.

CAHILL M. Virulence factors in motile *Aeromonas* species. *J Appl Bacteriol.* 1990;69:1-16.

COMAS J, IREGUI C. Replicación de la estreptococcosis en tilapias y su evaluación a través de microbiología e inmunoperoxidasa indirecta (IPI). Memorias V seminario Internacional de Acuicultura. II Congreso de Investigaciones Acuícolas. Universidad Nacional de Colombia. Bogotá D.C; 2005.

DALMO R, BOGWALD J. Distribution of intravenously and perorally administered *Aeromonas salmonicida* lipopolysaccharide in atlantic salmon, *Salmo salar*. *Fish Shellfish Immunol.* 1996;6:427-441.

DALMO R, INGEBRIGTSEN K, BOGWALD J. Non-specific defenses mechanisms in fish, with particular reference to reticuloendothelial system (RES). *J Fish Dis.* 1997;20:241-273.

DALMO RA, SETERNES T, ARNESEN SM, JOERGENSEN TO, BOGWALD J. Tissue distribution and cellular uptake of *Aeromonas salmonicida* lipopolysaccharide (LPS) in some marine fish species. *J Fish Dis.* 1998;21:321-334.

DALMO R, KJERSTAD A, ARNESEN S, TOBIAS P, BØGWALD J. Bath exposure of Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus* L.) yolk sac larvae to bacterial lipopolysaccharide (LPS): Absorption and distribution of the LPS and effect on fish survival. *Fish Shellfish Immunol.* 2000;10:107-128.

DAVIDSON G, ELLIS A, SECOMBES C. Route of immunization influences the generation of antibody secreting cells in the gut of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Dev Comp Immunol.* 1993;17:373-6.

DIXON B. Antibiotic Resistance of Bacterial Fish Pathogens. *J World Aquaculture Soc.* 1994;25(1):60-63.

ELLIS A. Stress and the modulation of defence mechanisms in fish. En: Pickering AD. *Stress and Fish.* Academic Press. Londres. 1981. p. 147-169.

EVANS JJ, KLESIOUS PH, SHOEMAKER CA. Efficacy of *Streptococcus agalactiae* (group B) vaccine in tilapia (*Oreochromis niloticus*) by intraperitoneal and bath immersion administration. *Vaccine.* 2004;22:3769-3773.

EWART KV, WILLIAMS J, RICHARDS RC, GALLANT JW, MELVILLE K, DOUGLAS SE. The early response of Atlantic salmon (*Salmo salar*) macrophages exposed *in vitro* to *Aeromonas salmonicida* cultured in broth and in fish. *Dev Comp Immunol.* 2008;32:380-390.

FAO. State of world aquaculture: FAO Fisheries Technical paper; 2006.

FERGUSON HW. *Systemic Pathology of Fish.* Second Edition. Scotian Press; 2006.

FERNÁNDEZ AB, RUIZ I, DE BLAS I. El sistema inmune de los teleósteos (I): Células y órganos. *Revista AquaTIC* [serial online]. 2002a [Disponible 29 octubre 2007]; 16: [24 pantallas]. Disponible en: URL: <http://www.revistaaquatic.com/aquatic/art.asp?t=h&c=146>

FERNÁNDEZ AB, RUIZ I, DE BLAS I. El sistema inmune de los teleósteos (II): Respuesta inmune inespecífica. Revista AquaTIC [serial online], 2002b [Disponible 29 de octubre de 2007]; 17:[15 pantallas]. Disponible en: URL: <http://www.revistaaquatic.com/aquatic/art.asp?t=h&c=154>

FURUSHITA M, SHIBA T, MAEDA T, YAHATA M, KANEOKA A, TAKAHASHI Y, *et al.* Similarity of Tetracycline resistance genes isolated from fish farm bacteria to those from clinical isolates. Appl Environ Microbiol. 2003;69:5336-5342.

GEORGIADIS MP, GARDNER IA, HEDRICK RP. The role of epidemiology in the prevention, diagnosis, and control of infectious diseases of fish. Prev Vet Med. 2001;48:287-302.

GUDDING R, LILLEHAUG A, EVENSEN Ø. Recent developments in fish vaccinology. Vet Immunol Immunopathol. 1999;72:203-212.

HEDRICK RP. Relationships of the host, pathogen, and environment: implications for diseases of cultured and wild fish populations. J Aquat Animal Health. 1998;10:107-111.

HEPPELL J, DAVIS HL. Application of DNA vaccine technology to aquaculture. Adv Drug Deliv Rev. 2000;43:29-43.

HERNÁNDEZ E, FIGUEROA J, IREGUI C. Streptococcosis on a red tilapia (*Oreochromis spp.*) fish-farm: Case study. J Fish Dis. 2008;32:247-252.

HINE PM. The granulocytes of fish. Fish Shellfish Immunol. 1992;2:79-88.

HIRONO I, TAKAMI M, MIYATA M, MIYAZAKI T, HAN HJ, TAKANO T, *et al.* Characterization of gene structure and expression of two toll-like receptors from Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus*. Immunogenetics. 2004;56:38-46.

ILIEV D, LIARTE C, MACKENZIE S, GOETZ F. Activation of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) mononuclear phagocytes by different pathogen associated molecular pattern (PAMP) bearing agents. Mol Immunol. 2005a;42:1215-1223.

ILIEV D, ROACH JC, MACKENZIE S, PLANASD J, FREDERICK W. Endotoxin recognition: In fish or not in fish? FEBS Lett. 2005b;579:6519-6528.

IREGUI C, HERNÁNDEZ E, JIMÉNEZ A, PULIDO A, REY AL, COMAS J, *et al.* Primer Mapa Epidemiológico de las lesiones y enfermedades de los peces en Colombia. Universidad Nacional de Colombia. Ministerio de Agricultura. Pronatta. Bogotá. Colombia; 2004.

JIMÉNEZ A, REY A, PENAGOS L, ARIZA M, FIGUEROA J, IREGUI C. *Streptococcus agalactiae*: Hasta ahora el único *Streptococcus* patógeno de tilapias cultivadas en Colombia. Rev Med Vet Zoot. 2007;54:285-294.

KLESIOUS P, SHOEMAKER A, EVANS J. Efficacy of single and combined *Streptococcus iniae* isolate vaccine administered by intraperitoneal and intramuscular routes in tilapia (*Oreochromis niloticus*). Aquaculture. 2000;188:237-246.

KLESIOUS P, EVANS J, SHOEMAKER C. Warmwater fish vaccinology in catfish production. Anim Health Res Rev. 2004;5:305-311.

LE MORVAN C, TROUTAUD D, DESCHAUX P. Differential effects of temperature on specific and nonspecific immune defences in fish. J Exp Biol. 1998;201(2):165-168.

LIN S, DAVIDSON G, SECOMBES C, ELLIS A. Use of a emulsion lipid emulsion carrier for the immunization of dab (*Limanda limanda*) by bath and oral routes: an assessment of systemic and mucosal antibody responses. Aquaculture. 2000;181:11-24.

LODEMEL J, MAYHEW T, MYKLEBUST R, OLSEN R, ESPELID S, RINGO E. Effect of three dietary oils on disease susceptibility in Arctic charr (*Salvelinus alpinus* L.) during cohabitant challenge with *Aeromonas salmonicida* ssp. *Salmonicida*. *Aquac Res* 2001;32(12):935-945.

MINISTERIO DE AGRICULTURA Y DESARROLLO RURAL (MADR). Observatorio Agrocadenas Colombia. La cadena de la piscicultura en Colombia. Una mirada global de su estructura y dinámica 1991-2005. Bogotá: MADR; 2005.

MAINWARING G, ROWLEY A. Studies on granulocytic heterogeneity in elasmobranchs. In: Manning MJ, Tatner MF Editors. *Fish immunology*. Academic press London; 1985. p. 57-69.

MILLER NW, CLEM LW. Temperature mediated processes in teleost immunity: differential effects of temperature on catfish *in vitro* antibody responses to thymus-dependent and thymus-independent antigens. *J Immunol*. 1984;133:2356-2359.

MULERO I, GARCÍA-AYALA A, MESEGUER J, MULERO V. Maternal transfer of immunity and ontogeny of autologous immunocompetence of fish: A minireview. *Aquaculture*. 2007;268:244-250.

MIDTLYNG PJ. A field study on intraperitoneal vaccination of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) against furunculosis. *Fish Shellfish Immunol*. 1996;6(8):553-565.

MIDTLYNG PJ. Critical assessment of regulatory standards and tests for fish vaccines. *Dev Biol Basel*. 2005;121:219-226.

NAKANISHI TA, KIRYU I, OTOTAKE M. Development of a new vaccine delivery method for fish: percutaneous administration by immersion with application of a multiple puncture instrument. *Vaccine*. 2002;20:3764-3769.

NAVOT N, KIMMEL E, AVTALION RR. Enhancement of antigen uptake and antibody production in goldfish (*Carassius auratus*) following bath immunization and ultrasound treatment. *Vaccine*. 2004;22:2660-2666.

NDONG D, CHEN Y, LIN Y, VASEEHARAN B, CHEN J. The immune response of tilapia *Oreochromis mossambicus* and its susceptibility to *Streptococcus iniae* under stress in low and high temperatures. *Fish Shellfish Immunol*. 2007;22:686-694.

NOYA M, LAMAS J. Response of eosinophilic granule cells of gilthead seabream (*Sparus aurata*, Teleostei) to bacteria and bacterial products. *Cell Tissue Res*. 1996;287(1):223-230.

OLAFSEN JA, HANSEN GH. Intact antigen uptake in intestinal epithelial cells of marine fish larvae. *J Fish Biol*. 1992;40:141-156.

PALIC D, OSTOJI J, ANDREASEN C, ROTH J. Fish cast NETs: Neutrophil extracellular traps are released from fish neutrophils. *Dev Comp Immunol*. 2007;31:805-816.

PASNIK D, EVANS JJ, PANANGALA VS, KLESIUS PH, SHELBY RA, SHOEMAKER CA. Antigenicity of *Streptococcus agalactiae* extracellular products and vaccine efficacy. *J Fish Dis*. 2005;28:205-212.

PELLETIER N. Going organic- a new wave in aquaculture. *AAC. Spec Pub*. 2004;8.

PENAGOS L, FIGUEROA J, IREGUI C. Estudios preliminares para la elaboración de una vacuna, evaluación de su eficacia y diseño de un plan de vacunación contra la estreptococcosis. Proyecto Proceal Ltda. -Federación Nacional de Cafeteros- Universidad Nacional de Colombia, Código del proyecto UN:201010005530; 2005.

PRESS C, EVENSEN O, REITAN LJ, LANDSVERK T. Retention of furunculosis vaccine components in Atlantic salmon, *Salmo salar* L., following different routes of administration. J Fish Dis. 1996;19:215-224.

PULIDO A. Evaluación clínica y fisiopatológica de un caso de Streptococcosis en la represa de Hidro Prado - Tolima [trabajo de grado]. Bogotá: Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia, Universidad Nacional de Colombia; 2000.

PULIDO E, IREGUI C, FIGUEROA J, KLESIUS P. Estreptococosis en tilapias (*Oreochromis* spp.) cultivadas en Colombia. Revista AquaTIC. 2004;20:97-106.

RAMOS EA, RELUCIO JL, TORRES-VILLANUEVA CAT. Gene Expression in Tilapia Following Oral Delivery of Chitosan-Encapsulated Plasmid DNA Incorporated into Fish Feeds. Mar Biotechnol. 2005;7:89-94.

RASHEED V, PLUMB JA. Pathogenicity of a non-haemolytic group B *Streptococcus* sp. in gulf killifish (*Fundulus grandis* Baird and Girard). Aquaculture. 1984;37(2):97-105.

REITE OB. The rodlet cells of teleostean fish: their potential role in host defence in relation to the role of mast cells/eosinophilic granule cells. Fish Shellfish Immunol. 2005;19:253-267.

REY A, IREGUI C, VERJAN N. Diagnóstico Clínico patológico de brotes de enfermedad en tilapia roja (*Oreochromis* spp.). Rev Med Vet Zoot. 2003;49:13-21.

RINGØ E, LØDEMEL JE, MYKLEBUST R, KAINO T, MAYHEW TM, OLSEN RE. Epithelium-associated bacteria in the gastrointestinal tract of Arctic charr (*Salvelinus alpinus* L.). An electron microscopical study. J. Appl. Microbiol. 2001;90:294-300.

RINGØ E, MIKKELSEN H, KAINO T, OLSEN RE, MAYHEW TM, MYKLEBUST, R. Endocytosis of indigenous bacteria and cell damage caused by *Vibrio anguillarum* in the foregut and hindgut of spotted wolffish (*Anarhichas minor* Olafsen) fry: an electron microscopical study. Aquac. Res. 2006;37(6):647-651.

ROBERTSEN B. Modulation of the non-specific defence of fish by structurally conserved microbial polymers. Fish Shellfish Immunol. 1999;9:269-290.

ROMALDE JL, LUZARDO-ALVÁREZ A, RAVELO C, TORANZO AE, BLANCO-MÉNDEZ J. Oral immunization using alginate microparticles as a useful strategy for booster vaccination against fish lactococcosis. Aquaculture. 2004;236:119-129.

RUIZ I, FERNÁNDEZ AB, DE BLAS I. El sistema inmune de los teleósteos (III): Respuesta inmune específica. Revista AquaTIC. 2003a;18:33-38.

RUIZ I, FERNÁNDEZ AB, DE BLAS I. El sistema inmune de los teleósteos (IV): Factores que afectan la respuesta inmune. Revista AquaTIC. 2003b;19:1-7.

SAEED MO, PLUMB JA. Immune response of channel catfish to lipopolysaccharide and whole cell *Edwardsiella ictaluri* vaccines. Dis Aquat Org. 1986;2:21-25.

SELVARAJ V, SAMPATH K, SEKAR V. Extraction and Characterization of Lipopolysaccharide from *Aeromonas hydrophila* and Its Effects on Survival and Hematology of the Carp, *Cyprinus carpio*. Asian Fish Sci. 2004;17:163-173.

SHAO Z.J. Aquaculture pharmaceuticals and biologicals: current perspective and future possibilities. Adv Drug Deliv Rev. 2001;50:229-243.

SHOEMAKER C, KLESIUS P. Streptococcal diseases problems and control: a review. In: Fitzsimmons K. Tilapia Aquaculture. Proc. Fourth international symposium on tilapia in aquaculture. Florida. USA. 1997;2:671-680.

ST. LOUIS-CORMIER EA, OSTERLAND CK, ANDERSON PD. Evidence for a cutaneous secretory immune system in rainbow trout (*Salmo gairdneri*). Dev Comp Immunol. 1984;8:71-80.

SCHMACHTENBERG O. Epithelial sentinels or protozoan parasites? Studies on isolated rodlet cells on the 100th anniversary of an enigma. Rev Chil Hist Nat. 2007;80:55-62.

SWAIN P, NAYAK SK, SAHU A, MOHAPATRA BC, MEHER PK. Bath immunisation of spawn, fry and fingerlings of Indian major carps using a particulate bacterial antigen. Fish Shellfish Immunol. 2002;13:133-140.

VANDENBERG GW. Oral vaccine for finfish: academic theory or commercial reality?. Anim Health Res Rev. 2004;5:301-304.

WENDELAAR BONGA SE. The stress response in fish. Physiol Rev. 1997;77(3):591-625.

ZAPATA AG, VARAS A, TORROBA M. Seasonal variations in the immune system of lower vertebrates. Immunol Today. 1992;12:142-147.

ZAPATA AG, TORROBA M, VARAS A, JIMÉNEZ AV. Immunity in fish larvae. Dev Biol Stand. 1997;90:23-32.

ZLOTKIN A, CHILMONCZYK E, EYNGOR M, HURVITZ A, GHITTINO C, ELDAR A. Trojan Horse effect: Phagocyte-Mediated *Streptococcus iniae* infection of fish. Infect Immun. 2003;71(5):2318-2325.

ZHOU Y-C, HUANG H, WANG J, ZHANG B, SU Y-Q. Vaccination of the grouper, *Epinephelus awoara*, against vibriosis using the ultrasonic technique. Aquaculture. 2002a;203:229-238.

ZHOU Y-C, WANG J, ZHANG B, SU Y-Q. Ultrasonic immunization of sea bream, *Pagrus major* (Temminck & Schelegel), with a mixed vaccine against *Vibrio alginolyticus* and *V. anguillarum*. J Fish Dis. 2002b;25:325-331.

ZOU J, SECOMBES CJ, LONG S, MILLER N, CLEM LW, CHINCHAR VG. Molecular identification and expression analysis of tumor necrosis factor in channel catfish (*Ictalurus punctatus*). Dev Comp Immunol. 2003;27:845-858.