



AquaTIC

ISSN: 1578-4541

igjaugar@upv.es

Universidad de Zaragoza

España

Fernández, Isabel; Pérez-Sánchez, T.; Fuertes, H.; Vendrell, D.; Ruiz-Zarzuela, I.;
Padrós, F.

Evaluación de la eficacia de tres vacunas frente a *Lactococcus garvieae* en trucha arcoíris
(*Oncorhynchus mykiss*) mediante reto por cohabitación

AquaTIC, núm. 47, 2017, pp. 10-19

Universidad de Zaragoza

Zaragoza, España

Disponible en: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=49453839002>

- Cómo citar el artículo
- Número completo
- Más información del artículo
- Página de la revista en redalyc.org

redalyc.org

Sistema de Información Científica

Red de Revistas Científicas de América Latina, el Caribe, España y Portugal

Proyecto académico sin fines de lucro, desarrollado bajo la iniciativa de acceso abierto

Evaluación de la eficacia de tres vacunas frente a *Lactococcus garvieae* en trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) mediante reto por cohabitación

Isabel Fernández¹, T. Pérez-Sánchez¹, H. Fuertes¹, D. Vendrell², I. Ruiz-Zarzuela¹ y F. Padrós³

¹Laboratorio de Ictiopatología, Facultad de Veterinaria, Universidad de Zaragoza, Zaragoza, España.

²Laboratorios Hipra, S.A., Amer, España.

³Servicio de diagnóstico patológico de peces, Facultad de Veterinaria, Universidad Autónoma de Barcelona, Bellaterra, España.

email: taniaper@unizar.es

Resumen

Lactococcus garvieae (*L. garvieae*) se considera un patógeno emergente por su potencial zoonótico para el ser humano (Meyburgh y cols., 2017), que afecta tanto a la acuicultura marina como a la continental y que puede llegar a provocar pérdidas económicas importantes sobre todo en verano, periodo en el cual el agua alcanza temperaturas elevadas (Vendrell y cols., 2006). Por este motivo, una vacunación adecuada y eficaz es la clave para minimizar el impacto de esta bacteria en aquellas especies de cultivo que son más susceptibles a sus efectos. En el presente estudio, se valoró la eficacia de tres vacunas frente a *L. garvieae* en trucha arcoíris, mediante el método de cohabitación 28 días post-vacunación. La que presentó una mayor protección fue la vacuna comercial (Icthiovac LG) frente a *L. garvieae* (RPS=87,50%), seguida de una vacuna experimental trivalente para *L. garvieae* y dos cepas de *Yersinia ruckeri* (RPS=81,25%) y por último una vacuna experimental tetravalente para *L. garvieae*, *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida* y dos cepas de *Y. ruckeri* (RPS=70,93%). Los resultados de supervivencia de cada grupo se compararon con los del grupo control, indicando un incremento significativo de la resistencia frente al patógeno en todos los grupos vacunados ($p<0,05$).

Palabras clave: *Lactococcus garvieae*, trucha arcoíris, vacuna, cohabitación, qPCR.

Summary

Efficacy's evaluation through cohabitation challenge of three *Lactococcus garvieae* vaccines in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*)

Lactococcus garvieae (*L. garvieae*) is considered an emergent pathogen because of its zoonotic potential, an emergent pathogen (Meyburgh y cols., 2017) both in marine and freshwater aquaculture, and it causes important economic losses in summer, when water temperature rises (Vendrell y cols., 2006). Because of this, an adequate vaccination is the key to minimize the impact of that bacterium in those cultivated species that are more susceptible to his effects. In the present study, the efficacy of three *L. garvieae* vaccines was evaluated with a cohabitation infection 28 days post-vaccination. A commercial vaccine (Icthiovac LG) showed the best results with a RPS=87.50%, followed by an experimental trivalent vaccine (*L. garvieae* and two *Y. ruckeri* strains) with a RPS=81.25% and finally an experimental tetravalent vaccine (*L. garvieae*, two *Y. ruckeri* strains and *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida*) with a RPS=70.93%. The mortality results of each group was compared with those to the control group, indicating an increase of the immunity to this pathogen in all vaccinated groups ($p<0.05$).

Key words: *Lactococcus garvieae*, rainbow trout, vaccine, cohabitation, qPCR.

Introducción

El agente etiológico de la lactococosis es *Lactococcus garvieae*, un patógeno cosmopolita incluido dentro de la familia de los estreptococos. Esta bacteria es un coco gram positivo, anaerobio facultativo e inmóvil, no esporulado, α -hemolítico y con un rango de crecimiento de temperatura (°C) que puede variar de los 4 °C a los 45 °C. A pesar de ello, su temperatura óptima de crecimiento es de 37 °C (Vendrell y cols., 2006).

Lactococcus garvieae afecta a un amplio rango de animales acuáticos, entre los que se incluye la trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) objeto de este estudio, siendo además la más sensible de las especies a esta enfermedad. Se transmite de manera horizontal vehiculizada por el agua, la cual entra a través de posibles heridas del pez o bien por vía oral (Vendrell y cols., 2006). El microorganismo también se elimina a través de las heces, siendo detectable a las 72 horas en infecciones experimentales mediante inoculación intraperitoneal (IP) (Múzquiz y cols., 1999). En el caso de la trucha arcoíris, los ejemplares más susceptibles de padecer la enfermedad son los peces a partir de 80 g pero también se puede reproducir experimentalmente en animales más pequeños (Vendrell y cols., 2006).

La presentación de la lactococosis en trucha arcoíris está muy relacionada con el rango térmico del agua. La enfermedad no se desarrolla a temperaturas inferiores a 14-15 °C y a partir de que la temperatura supera los 18 °C, las mortalidades pueden llegar a alcanzar el 85% (Royo, 1999). De la misma manera, la calidad del agua también influye en su expresión desarrollándose brotes con mayor facilidad en aguas con baja calidad y especialmente cuando las concentraciones de oxígeno son bajas (Vendrell y cols., 2006). La infección por *L. garvieae* provoca una septicemia hemorrágica aguda causada por una afectación del endotelio vascular, que da lugar a una extravasación de la sangre a los tejidos.

Diversos son los sistemas de administración vacunal que pueden utilizarse (baño, oral o inoculada). Actualmente, sólo se han conseguido niveles de protección adecuados frente a *L. garvieae* mediante la inoculación de la vacuna IP (Bercovier y cols., 1997) por lo que sigue siendo el método utilizado para este tipo de vacuna. El protocolo habitual para valorar la eficacia de las vacunas en peces es la inoculación IP de la misma bacteria utilizada en la vacuna (conocido como reto o *challenge*) a peces que han sido previamente inmunizados un mes antes con la vacuna correspondiente y a peces control no inmunizados. Esta metodología, aunque permite la repetibilidad y estandarización, es bastante extrema y no necesariamente emula las condiciones de patogenia y generación del brote infeccioso, dado que introducimos de forma artificial directamente el patógeno en el animal. Esta forma de entrada no ocurre de forma natural en la realidad de una explotación acuícola ya que cada enfermedad infecciosa tiene su propia epidemiología y forma de transmisión. Además, inoculando el patógeno sobrepasamos las barreras naturales del individuo, tales como la piel o las mucosas (Nordmo, 1997) infravalorando la propia capacidad de los animales para resistir al patógeno. Por esta razón, si bien el reto por inoculación IP es una forma estandarizada y aceptada para comprobar la eficacia de las vacunas, existen otros métodos que se asemejan más a las condiciones de campo para poner a prueba la efectividad real de las vacunas en animales acuáticos, siendo una de las más importantes la cohabitación (Chettri y cols., 2015).

El objetivo de esta experiencia fue la puesta a punto de la infección experimental con *L. garvieae* para determinar la eficacia de tres vacunas frente a dicho patógeno, a través del método de cohabitación.

Materiales y métodos

Animales

Para la realización del estudio se utilizaron ejemplares de trucha arcoíris de 40 ± 3 g, procedentes de una de las piscifactorías perteneciente a la Agrupación de Defensa Sanitaria Ganadera Acuícola de Aragón, en la cual se realizan periódicamente varios controles sanitarios, lo que garantiza que las instalaciones están libres de *L. garvieae*. Una vez que los animales fueron introducidos en la nave experimental, se llevó a cabo

un periodo de aclimatación de una semana. Para verificar aún más la ausencia de este patógeno en los peces introducidos en la nave experimental, se realizó una reacción en cadena de la polimerasa (PCR) de tipo convencional y a tiempo real a partir de muestras de hígado, bazo, riñón y cerebro procedentes de una submuestra de 10 truchas, siguiendo los protocolos habituales del Laboratorio de Ictiopatología (ver apartado de técnicas analíticas). La alimentación que recibieron los mismos durante todo el experimento fue a razón de 1,5% del peso vivo de un pienso comercial, de acuerdo a la temperatura y recomendaciones del fabricante.

Instalaciones

El estudio se realizó en la piscifactoría experimental del Laboratorio de Ictiopatología de la Facultad de Veterinaria de la Universidad de Zaragoza. Ésta dispone de cinco tanques, cada uno con una capacidad de 1000 litros y equipados con sistemas de refrigeración y oxigenación. El suministro de agua proviene de la red municipal que, previa introducción en los tanques, es descalcificada, clorada y sometida a un filtro de rayos ultravioleta. Una vez en los tanques, el agua pasa por un circuito de recirculación que la devuelve al tanque en forma de cascada para favorecer la oxigenación. Aun así, se añadieron a cada uno de los tanques aireadores suplementarios para incrementar la saturación de oxígeno en el agua dado que, en primavera y en verano, la temperatura del agua es más elevada. Por este motivo, los equipos de refrigeración estuvieron funcionando desde el inicio de la experiencia, de la misma manera que los sistemas de aire acondicionado de la nave. Así mismo, la renovación del agua fue de un 20% diario. La limpieza se realizó retirando las heces y los restos de comida mediante sifonado del fondo diariamente, salvo en los días posteriores al reto para favorecer la transmisión de la enfermedad. Durante toda la experiencia se tomaron mediciones diarias tanto de temperatura como de oxígeno del agua. Los valores medios de temperatura durante el experimento fueron de $19,9 \pm 0,39$ °C y los de oxígeno disuelto de $6,7 \pm 0,3$ mg/L.

Técnicas analíticas

Las técnicas analíticas y diagnósticas se realizaron en el Laboratorio de Ictiopatología y en los laboratorios de la Unidad de Enfermedades Infecciosas y Epidemiología de la Facultad de Veterinaria de la Universidad de Zaragoza, los cuales disponen de los equipos necesarios para llevar a cabo las técnicas microbiológicas y moleculares utilizadas en el presente trabajo. La extracción del ADN se hizo mediante el kit comercial MO BIO Laboratories, Inc. Ultra Clean® Tissue & Cells DNA Isolation Kit siguiendo las instrucciones del fabricante.

Para la detección de *L. garvieae*, se utilizaron dos técnicas moleculares basadas en el mismo principio, la técnica de PCR convencional previamente descrita por Zlotkin y cols. (1998) y la PCR a tiempo real descrita por Jung y cols. (2010). La primera técnica molecular se realizó con el fin de detectar cualitativamente muestras positivas mientras que con la qPCR, además de realizar una detección cualitativa, sirvió también para cuantificar relativamente la carga bacteriana de dicho patógeno en las muestras analizadas. El cálculo de las copias de ADN de *L. garvieae* se realizó mediante la fórmula $2^{-\Delta\Delta CT}$ (Livak y cols., 2001).

La concentración de todos los cebadores seleccionados fue de 0,3 µmol/L, el volumen de ADN de 3 µL y el volumen total de la reacción fue de 20 µL en ambas técnicas. La enzima *Taq* polimerasa (ADN polimerasa) se utilizó en ambos tipos de PCR (Promega). El fluoróforo empleado en todas las técnicas fue SYBR Green I (GoTaq® Hot Start Green Master Mix, Promega). Todas las determinaciones se llevaron a cabo en un termociclador MJ Mini-Opticon™ (BIORAD).

Las condiciones de PCR convencional se basaron en desnaturalizar las hebras de DNA a 94 °C durante 3 minutos, seguida de 35 ciclos a 94 °C durante 30 segundos, 55 °C durante 30 segundos y 72 °C durante 80 segundos. Después de ello, se realizó una extensión final a 72 °C durante 10 minutos. Los amplicones de PCR convencional se confirmaron mediante electroforesis en un gel de agarosa (Agarosa E, Pronadisa) al 1,5%, adicionando Gel Red (Biotium) como tinte fluorescente de ácidos nucleicos.

El protocolo de qPCR abarcó un primer paso de desnaturalización a 95 °C durante 7 minutos, seguida de 44 ciclos a 94 °C durante 20 segundos, 60 °C durante 20 segundos y 72 °C durante 30 segundos. Por último, se realizó un paso adicional desde 60 °C hasta 95 °C en una ratio de 0,5 °C para observar la especificidad del amplicón obtenido (curva de fusión).

Para garantizar la fiabilidad de los resultados obtenidos, se realizó una reacción adicional para cada una de las muestras utilizando como control interno endógeno, el gen *housekeeping* Actina. En la Tabla 1 se pueden apreciar las características de los cebadores de este estudio.

Tabla 1. Características de los cebadores.

Nombre cebador	Secuencia	Gen estudiado	Amplificación (pb)	Tipo PCR	Referencia
pLG-1	5'-CATAACAATGAGAATCGC-3'	16S rDNA	1100	Convencional	Zlotkin y cols. (1998)
pLG-2	5'-GCACCCTCGCGGGTTG-3'				
CAU 12F	5'-ACTCGTGCTATCCTT-3'	16S rRNA	415	qPCR	Jung y cols. (2010)
CAU 12R	5'-TGGGTACTCCCAACTTCC-3'				
Actina F	5'-GCATCCTGACCCTCAAGTACC-3'	B_Actina	137	qPCR	Diseño propio
Actina R	5'-GGTGTGGTGCCAGATCTTC-3'				

Valoración de la eficacia de tres vacunas frente a *L. garvieae*

Se marcaron y vacunaron 40 peces con una vacuna comercial para *L. garvieae* (Ichthiovac-LG), 40 peces con una vacuna experimental trivalente y 40 peces con una vacuna experimental tetravalente, todas ellas desarrolladas por Laboratorios HIPRA, S.A. La cepa de *L. garvieae* incluida en las tres vacunas fue la misma y todas las vacunas fueron formuladas a la misma concentración (5×10^9 UFC/mL) y con el mismo adyuvante oleoso no mineral, denominado Aquamun, y desarrollado por Laboratorios Hipra, S.A.

La composición de las vacunas polivalentes fue: *L. garvieae* 5×10^9 UFC/mL, *Yersinia ruckeri* biotipo 1 (móvil) $2,5 \times 10^9$ UFC/mL y *Yersinia ruckeri* biotipo 2 (inmóvil) $2,5 \times 10^9$ UFC/mL para la trivalente y *L. garvieae* 5×10^9 UFC/mL, *Yersinia ruckeri* biotipo 1 (móvil) $2,5 \times 10^9$ UFC/mL, *Yersinia ruckeri* biotipo 2 (inmóvil) $2,5 \times 10^9$ UFC/mL y *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida* 5×10^9 UFC/mL para la tetravalente.

Se optó por una concentración de $2,5 \times 10^9$ UFC/mL de cada una de las cepas de *Yersinia ruckeri* en su composición, para que no hubiese mayor concentración antigénica total de un patógeno sobre los demás y pudiese interferir en la respuesta inmunitaria del pez.

Tras la vacunación se esperaron 28 días antes de realizar las infecciones experimentales con el patógeno en estudio, siendo ésta una cepa de campo aislada recientemente y cuya DL50 corresponde a 1×10^3 UFC/mL de *L. garvieae*, basándonos en experiencias anteriores como en las de Vendrell y cols. (2008) o la realizada por Kubilay y cols. (2008).

El marcaje de los peces vacunados se realizó con un elastómero fluorescente de color rojo VIE (Visible Implant Elastomer Tags, Northwest Marine Technology, Inc.) en la zona

periocular de ambos ojos en el grupo vacunado con la trivalente. Los peces vacunados con la monovalente se marcaron en la zona abdominal y las truchas vacunadas con la tetravalente se dejaron sin marcar, de la misma manera que el grupo control positivo. El protocolo usado para inocular el elastómero fue el proporcionado por la misma marca (Northwest Marine Technology Inc.¹). Para diferenciar entre peces, el kit de marcaje incluye una linterna de rayos UV que permite visualizar con mayor claridad el elastómero.

Transcurridos los 28 días de margen para que los peces vacunados adquieran inmunidad, a cada grupo (incluido el grupo control positivo) se le incorporaron un 20% de peces que habían sido previamente inoculados con 0,1 mL de una solución 1×10^4 UFC/mL de *L. garvieae*. A los 24 días post-infección, se dio por terminada la experiencia. La eficacia de las vacunas se calculó el último día de la experiencia mediante la mortalidad acumulada y los porcentajes relativos de supervivencia (RPS) mediante la fórmula siguiente:

$$RPS = \left(1 - \left(\frac{\% \text{ muertos vacunados}}{\% \text{ muertos grupo control}} \right) \right) \times 100$$

Para comprobar que efectivamente el agente causal de la muerte de los peces receptores era *L. garvieae*, se sembraron directamente en agar sangre (Oxoid) o agar Man Rogosa y Sharpe (MRS, Pronadisa) muestras de hígado, bazo y riñón procedentes de 6 peces muertos por cohabitación (5 peces del grupo control positivo y 1 pez vacunado). Seguidamente, las placas fueron incubadas a 37 °C durante 24 horas, se resembraron e incubaron de nuevo a 37 °C durante 24 horas una muestra de las colonias crecidas, para finalmente corroborarlo por PCR.

Seguidamente se recogieron un total de 8 muestras de diferentes órganos (hígado, bazo y riñón), realizando 2 pools de 3 peces cada uno. Los dos primeros pertenecían a los vacunados con la vacuna experimental trivalente, los dos siguientes a la vacuna experimental tetravalente, el quinto y sexto pool correspondía a los no vacunados y los siguientes a los vacunados con la vacuna monovalente.

Análisis estadístico

Para el procesamiento de los datos se utilizó el programa SPSS versión 17.0. Las curvas de supervivencia se calcularon utilizando el método de Kaplan-Meier y posteriormente se compararon entre sí mediante el test de *log-rank*. El nivel de significancia se estableció con un valor de $p < 0,05$.

Resultados

Animales

A continuación se recogen en la Tabla 2, los datos de mortalidad referentes a los diferentes grupos evaluados.

Tabla 2. Porcentaje de animales muertos.

Grupos evaluados	Mortalidad (%)
Vacuna monovalente	5,00%
Vacuna trivalente	7,50%
Vacuna tetravalente	12,50%
Grupo control	40,00%

¹ http://www.nmt.us/products/vie/sistemas_manuales.pdf

Técnicas analíticas

La PCR convencional se realizó para descartar la presencia de *L. garvieae* en el lote de peces estudiados. Todas las muestras analizadas obtuvieron un resultado negativo frente a dicha bacteria. Además, se utilizó la PCR convencional para confirmar que la muerte de las truchas había sido debida por la infección producida por *L. garvieae*.

El resultado de los análisis de las muestras tomadas al final del experimento para determinar mediante PCR convencional si los peces de los diferentes grupos evaluados poseían restos de ADN de *L. garvieae*, dio un resultado positivo en todos los casos excepto en las muestras de ejemplares vacunados con vacuna tetravalente, tal y como se puede observar en la Figura 1. En ella, se reflejan las muestras analizadas agrupadas en *pools* en función del grupo objeto de estudio en cada uno de los casos.

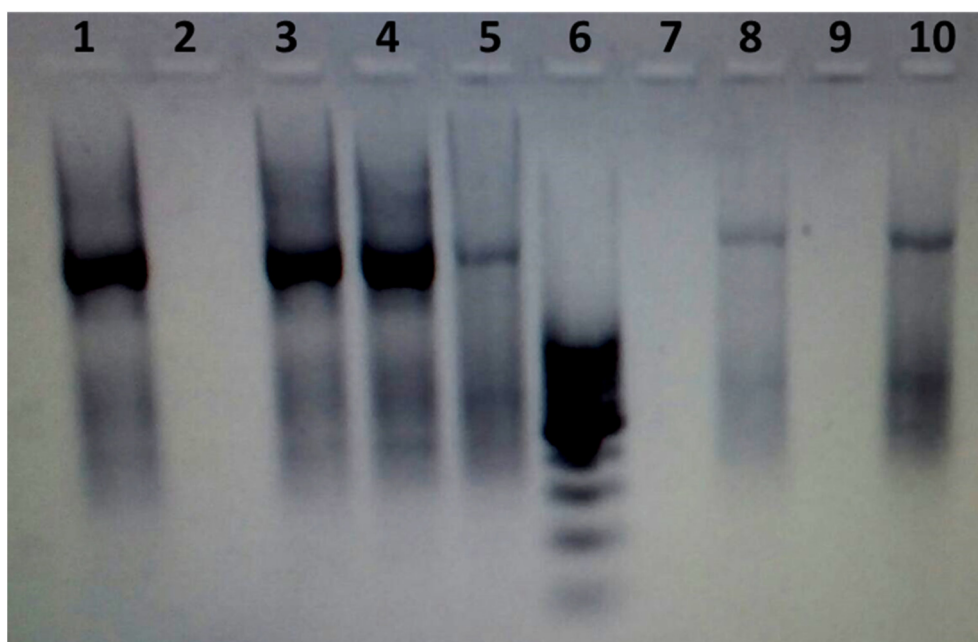


Figura 1. Resultados obtenidos mediante PCR. Leyenda: 1 (unión *pool* 1-2, animales vacunados con autovacuna trivalente), 2 (unión *pool* 1-2, animales vacunados con autovacuna tetravalente), 3 (unión *pool* 1-2, animales sin vacunar), 4 (unión *pool* 1-2, animales vacunados con vacuna monovalente), 5 (control positivo tejido), 6 (peso molecular, 1100 pb), 7 (control negativo), 8 (control positivo CLFP LG 33), 9 (control negativo) y 10 (control positivo CLFP LG 25).

Por otra parte, se realizó una qPCR en los diferentes *pools* de los distintos experimentos. Los resultados obtenidos revelaron la presencia de ADN de *L. garvieae* en todas ellas como se observa en la Tabla 3. En la misma tabla, se pueden observar la media de los ciclos de cuantificación (*Cq*) de los dos *pools* analizados dentro de cada grupo, además de los controles negativos y positivos.

Tabla 3. Resultados obtenidos mediante qPCR.

Referencia_muestra	<i>Cq</i> media Lotes \pm DS*	Media copias ADN <i>L. garvieae</i> Lotes \pm DS*
Autovacuna Trivalente	28,37 \pm 0,74	6,75E+04 \pm 3,32E+04
Autovacuna Tetravalente	32,12 \pm 0,78	5,05E+03 \pm 2,62E+03
Sin vacunar	29,29 \pm 1,18	3,95E+04 \pm 2,90E+04
Autovacuna Monovalente	27,79 \pm 0,33	9,55E+04 \pm 2,05E+04
Negativo	-	-
Control Positivo	11,50	7,6E+09

DS*: desviación estándar

Valoración de la eficacia de tres vacunas frente a *L. garvieae*

Una vez transcurridos los 24 días post-infección se prosiguió con el sacrificio de los peces supervivientes. A partir de las mortalidades derivadas de la infección por cohabitación (Fig. 2), se calcularon los RPS de los tres grupos vacunados. Los resultados se pueden apreciar en la Tabla 4.

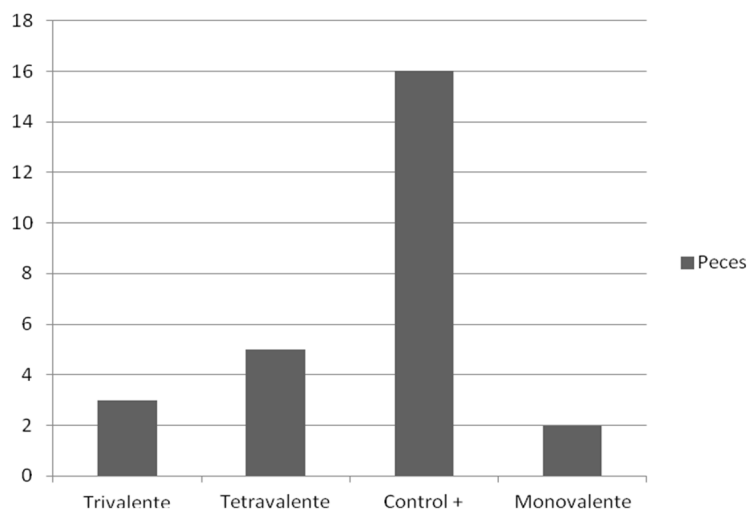


Figura 2. Número final de peces muertos por tanque debido a la infección por cohabitación.

Tabla 4. Porcentajes de supervivencia de las tres vacunas evaluadas.

Vacunas evaluadas	RPS
Vacuna monovalente	87,50%
Vacuna trivalente	81,25%
Vacuna tetravalente	70,93%

Análisis estadístico

Se aplicó el estimador de supervivencia de Kaplan-Meier (Fig. 3) para verificar si existían diferencias significativas entre cada una de las tres vacunas con el control positivo, siendo significativo en los tres casos ($p < 0,05$).

Discusión

En la actualidad, se considera que la manera más eficaz de proteger frente a la lactococosis en peces es a través del uso de vacunas. Esto es debido al importante coste económico que conlleva el uso de antibióticos, las posibles resistencias que se puedan llegar a desarrollar frente a los mismos, así como las barreras legales o la imposibilidad de su administración vía oral a causa de la anorexia derivada de la enfermedad. Es por ello que se hace necesaria la prevención mediante inmunoprolácticos (Vendrell y cols., 2006) y que la formulación de éstos, además de la pauta vacunal utilizada, sean lo más eficaces posibles. En el presente estudio, los resultados de protección frente a *L. garvieae* mediante reto por cohabitación que proporcionaron la vacuna monovalente, la vacuna trivalente y la vacuna tetravalente fue respectivamente del 87,50%, 81,25% y del 70,93%, pudiendo concluir que la vacunación con cualquiera de las tres genera un nivel de inmunidad más que aceptable frente a la bacteria. El hecho de que algunos procesos inmunológicos tales como las reacciones cruzadas, la competición entre los distintos antígenos o la concentración de cada antígeno que podemos inocular a través de una

vacuna polivalente pueden afectar severamente la actividad de los anticuerpos (Nikoskelainen y cols., 2007), concurda con que la vacuna con mayor efectividad fuera la monovalente. No obstante, se han formulado vacunas polivalentes que inducen una buena estimulación del sistema inmune en salmónidos, en algunos casos incluso más que las monovalentes (Hoel y cols., 1997; Nikoskelainen y cols., 2007).

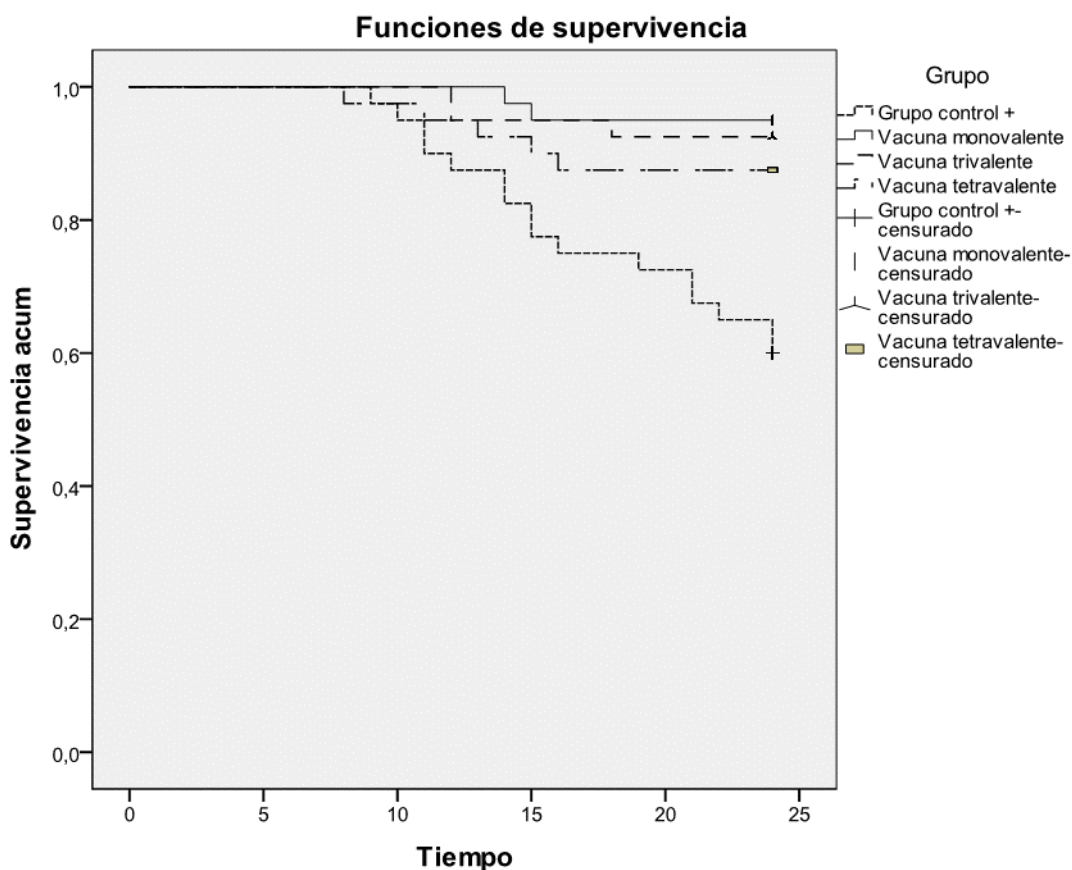


Figura 3. Función de supervivencia de las tres vacunas estudiadas y el grupo control positivo.

En el estudio realizado por Araújo y cols. (2015) frente a esta misma enfermedad, con una dosis infectiva de *L. garvieae* de 10^4 (0,1 mL de 10^5 UFC/mL) empleada para los peces donantes, el resultado en la mortalidad del grupo control fue del 72,5%, muy superior al obtenido en la presente experiencia. En cambio Pérez-Sánchez y cols. (2011), obtuvo unos resultados similares a los obtenidos en el grupo control, siendo en éste la mortalidad del 32,5%. El rango de mortalidad que se puede obtener en una infección por cohabitación es mucho más amplio que si la infección experimental se realiza IP, donde la mortalidad ronda el 80-100% (Vendrell y cols., 2008; Bastardo y cols., 2012), ya que en él pueden concurrir más variables (densidad, temperatura, diseño de los tanques, etc.) que a su vez pueden afectar al desarrollo de la infección. A pesar de que la normativa vigente sobre la eficacia y el uso de las vacunas exige que el desafío experimental de éstas sea por vía IP, en nuestro estudio hemos querido reproducir también las condiciones de campo, considerando que la cohabitación es la opción que más se ajusta a la realidad, ya que las vías naturales de defensa del pez no se sobrepasan (Nordmo, 1997). Es por ello que estos desafíos de cohabitación, aunque no contemplados como obligatorios, pueden considerarse como complementarios para demostrar la efectividad de los productos vacunales.

Durante el desarrollo de la experiencia se decidió marcar sólo dos de los cuatro grupos en estudio con el VIE como consecuencia de la dificultad que comportó este tipo de marcaje según las localizaciones seleccionadas (por ejemplo, el abdomen). Además, las inoculaciones del elastómero resultaban lentas debido a la falta de experiencia y a las condiciones de estrés a las que estaban sometidas las truchas, que impedían tener a los animales demasiado tiempo anestesiados y fuera del agua. Por tanto, una persona con relativa experiencia práctica con el VIE, manipulará los peces sin que su supervivencia y desarrollo se vean comprometidos (Hohn y Petrie-Hanson, 2013). Este método de marcaje resultó ser menos traumático para los animales que otros métodos de diferenciación que implican el corte de aletas. Asimismo, se trata de un método alternativo de marcaje individual rápido, eficaz y económico en relación a otros existentes en el mercado, tales como el microchipado.

Por lo general, se trata de un sistema que causa unos niveles de mortalidad bajos (1,25% Dewey y Zigler, 1996; 0% Bruyndoncx y cols., 2002; 7% Griffiths, 2002; 0% Astorga y cols., 2005; 0% Hohn y Petri-Hanson, 2013; 0% Featherstone y cols., 2016). Según la especie que se desee marcar, el color a elegir para el marcaje puede ser distinto y se escogió el rojo, ya que según el fabricante es el que mejor se distingue en la trucha arcoíris. A pesar de los inconvenientes anteriormente citados, se considera que el marcaje con elastómero puede ser una buena herramienta que permita mejorar aquellos procedimientos de identificación en los ensayos de vacunación, o de otro tipo, en los cuales sea recomendable necesario el marcaje de los peces.

En vista a los resultados obtenidos sobre la detección de antígeno de *L. garvieae* en los diferentes grupos mediante qPCR, consideramos que sería recomendable llevar a cabo estudios complementarios en los que se pudiera determinar la permanencia del ADN vacunal de la vacuna Icthiovac LG en los diferentes tejidos (hígado, riñón anterior y bazo). Resultaría ser una experiencia muy útil en caso de brotes naturales de enfermedad asociados a episodios recientes de vacunación, con el objetivo de poder disponer de valores de referencia que puedan ayudar a discernir si un resultado positivo por PCR se debe a la vacuna o bien a la propia enfermedad.

En conclusión, las tres formulaciones vacunales testadas en el presente estudio han demostrado ser también suficientemente eficaces para el control y prevención de la lactococosis de la trucha arcoíris utilizando el método de reto por cohabitación. Estos resultados parecen también aconsejar que para este tipo de formulaciones vacunales y para el caso concreto de la lactococosis, la inclusión de un menor número de antígenos en los productos vacunales parece ser más recomendable para obtener un mayor grado de protección frente a esta enfermedad.

Bibliografía

1. Araújo, C., Muñoz-Atienza, E., Pérez-Sánchez, T., Poeta, P., Igrejas, G., Hernández, P.E., Herranz, C., Ruiz-Zarzuela, I., Cintas, L.M. (2015). Nisin Z Production by *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* WA2-67 of Aquatic Origin as a Defense Mechanism to Protect Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum) Against *Lactococcus garvieae*. *Mar. Biotechnol.*; 17: 820–830.
2. Astorga, N., Afonso, J.M., Zamorano, M.J., Montero, D., Oliva, V., Fernández, H., Izquierdo, M.S. (2005). Evaluation of visible implant elastomer tags for tagging juvenile gilthead seabream (*Sparus auratus* L.); effects on growth, mortality, handling time and tag loss. *Aquac. Res.*; 36: 733–738.
3. Bastardo, A., Ravelo, C., Castro, N., Calheiros, J., Romalde, J.L. (2012). Effectiveness of bivalent vaccines against *Aeromonas hydrophila* and *Lactococcus garvieae* infections in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). *Fish Shellfish Immunol.*; 32: 756–761.
4. Bercovier, H., Ghittino, C., Eldar, A. (1997). Immunization with bacterial antigens: infections with streptococci and related organisms. *Dev. Biol. Stand.*; 90: 153–160.

5. Bruyndoncx, I., Knaepkens, G., Meeus, W., Bervoets, I., Eens, M. (2002). The evaluation of passive integrated transponder PIT tags and visible implant elastomer VIE marks as new marking techniques for the bullhead. *J. Fish Biol.*; 60: 260-262.
6. Chettri, J.K., Skov, J., Jaafar, R.M., Krossøy, B., Kania, P.W., Dalsgaard, I., Buchmann, K. (2015). Comparative evaluation of infection methods and environmental factors on challenge success: *Aeromonas salmonicida* infection in vaccinated rainbow trout. *Fish Shellfish Immunol.*; 44: 485-495.
7. Dewey, M.R., Zigler, S.J. (1996). An evaluation of Fluorescent Elastomer for Marking Bluegills in Experimental Studies. *Prog. Fish Cult.*; 58: 219-220.
8. Featherstone, Z.L., Turnbull, J.F., Auchinachie, N.A., Crumlish, M. (2016). Evaluation of visible implant elastomer tags for pathogenesis research in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Aquac. Res.*; 47: 2419-2425.
9. Griffiths, S.P. (2002). Retention of visible implant tags in small rockpool fishes. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*; 236: 307-309.
10. Hoel, K., Saloni, K., Lillehaug, A. (1997). Vibrio antigens of polyvalent vaccines enhance the humoral immune response to *Aeromonas salmonicida* antigens in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Fish Shellfish Immunol.*; 7: 71-80.
11. Hohn, C., Petrie-Hanson, L. (2013). Evaluation of visible implant elastomer tags in zebrafish (*Danio rerio*). *Open Biol.*; 000: 1-5.
12. Jung, M.Y., Chang, Y.H., Kim, W. (2010). A real-time PCR assay for detection and quantification of *Lactococcus garvieae*. *J. App. Microbiol.*; 108: 1694-1701.
13. Kubilay, A., Altun, S., Ulukoy, G., Ekici, S., Diler, O. (2008). Immunization of Rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) against *Lactococcus garvieae* using vaccine mixtures. *Is. J. Aquacult-Bamid.*; 60(4): 268-273.
14. Livak, K.J., Schmittgen, T.D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{-ΔΔCT} method. *Meth.*; 25: 402-408.
15. Meyburgh, C.M., Bragg, R.R., Boucher, C.E. (2017). *Lactococcus garvieae*: an emerging bacterial pathogen of fish. *Dis Aquat Org.*; 123: 67-79.
16. Múzquiz, J.L., Royo, F.M., Ortega, C., De Blas, I., Ruiz, I., Alonso, J.L. (1999). Pathogenicity of streptococcosis in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): dependence of age of diseased fish. *B. Eur. Assoc. Fish Pat.*; 19: 114-119.
17. Nikoskelainen, S., Verho, S., Järvinen, S., Madetoja, J., Wiklund, T., Lilius, E. (2007). Multiple whole bacterial antigens in polyvalent vaccine may result in inhibition of specific responses in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Fish Shellfish Immunol.*; 3: 206-217.
18. Nordmo, R., Ramstad, A. (1997). Comparison of different challenge methods to evaluate the efficacy of furunculosis vaccines in Atlantic salmon, *Salmo salar* L. *J. Fish Dis.*; 20: 119-126.
19. Pérez-Sánchez, T., Balcázar, J.L., Merrifield, D., Carnevali, O., Gioacchini, G., De Blas, I., Ruiz-Zarzuela, I. (2011). Expression of immune-related genes in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) induced by probiotic bacteria during *Lactococcus garvieae* infection. *Fish Shellfish Immunol.*; 31: 196-201.
20. Royo, F.M. (1999). *Estudio de la estreptococosis de la trucha arco iris (Oncorhynchus mykiss); factores implicados en su virulencia y patogenicidad. Aplicaciones para su control.* Tesis Doctoral. Universidad de Zaragoza, España.
21. Vendrell, D., Balcázar, J.L., Ruiz-Zarzuela, I., De Blas, I., Gironés, O., Múzquiz, J.L. (2006). *Lactococcus garvieae* in fish: A review. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.*; 29: 177-198.
22. Vendrell, D., Balcázar, J.L., Ruiz-Zarzuela, I., De Blas, I., Gironés, O., Múzquiz, J.L. (2008). Safety and efficacy of an inactivated vaccine against *Lactococcus garvieae* in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Prev. Vet. Med.*; 80: 222-229.
23. Zlotkin, A., Eldar, A., Ghittino, C., Bercover, H. (1998). Identification of *Lactococcus garvieae* by PCR. *J. Clin. Microbiol.*; 36: 983-985.