

Estimulación de la fagocitosis en juveniles de *Oncorhynchus mykiss* inmunizados con fracciones de membrana externa de una cepa nativa de *Flavobacterium psychrophilum* - Phagocytosis stimulation in *Oncorhynchus mykiss* juveniles immunized with outer membrane fractions from a *Flavobacterium psychrophilum* native strain

Colona Vallejos, E.¹, Mayanga Herrera, A.¹, de Amat Herbozo, C.¹, Alzamora Gonzales, L.¹, Elías Paredes, J.¹, Echevarría Del Valle, R.¹, Jiménez Espinoza, A.¹, Cabello Napuri, M.¹, Martínez Álvarez, J.L.² y Woll Toso, P.³.

(1) Laboratorio de Inmunología. Facultad de Ciencias Biológicas. Universidad Nacional mayor de San Marcos. Correo electrónico: ecolonav@unmsm.edu.pe o ecolonav@gmail.com

(2) Profesor Honorario de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos.

(3) Laboratorio de Bioquímica. Facultad de Ciencias Biológicas. UNMSM.

Resumen

El objetivo del presente trabajo fue evaluar la estimulación de la fagocitosis en juveniles de *Oncorhynchus mykiss* (trucha arco iris) inmunizados con fracciones de membrana externa (FME) de la cepa nativa de *Flavobacterium psychrophilum* USM-3 y desafiados con la cepa estándar *Flavobacterium psychrophilum* 1947^T.

Se inmunizaron por la vía intraperitoneal 15 especímenes con 10 µg de FME en 0.1 ml y 15 especímenes con 0.1 ml de agua bidestilada estéril (grupo control). Posteriormente los dos grupos fueron desafiados con la cepa estándar de *F. psychrophilum* 1947^T. Después de 21 días de la primera inmunización se determinaron la actividad fagocítica y el índice fagocítico.

El promedio de la actividad fagocítica en los peces inmunizados fue 22.4 % mientras que en el control fue de 0.5 % (p<0.05). El porcentaje del₁

índice fagocítico en los peces inmunizados y el control fue 32.5 % y 0.5 % respectivamente ($p < 0.05$).

Se concluye que las fracciones de la cepa nativa USM3 estimula la fagocitosis en juveniles de *O. mykiss* infectados con la cepa estándar de *F. psychrophilum* 1947^T.

Palabras Clave: Fracciones de membrana externa | *Flavobacterium psychrophilum* | Fagocitosis | *Oncorhynchus mykiss* | inmunidad.

Abstract

The aim of this study was to evaluate phagocytosis stimulation in *Oncorhynchus mykiss* (rainbow trout) juveniles immunized with outer membrane fraction (OMF) from *Flavobacterium psychrophilum* USM-3 native strain and challenged with *Flavobacterium psychrophilum* 1947^T standard strain.

Fifteen specimens were immunized intraperitoneally with 10 µg of OMF and fifteen specimens with 0.1ml of bidistilled water. Afterwards, both groups were challenged with *Flavobacterium psychrophilum* 1947^T standard strain. After 21 days from first immunization, phagocytic activity and index were determined.

Mean phagocytic activity in immunized fish was 22.4% mean while in control group it was 0.5% ($p < 0.05$). Phagocytic index percentage in immunized fish and control group was 32.5% and 0.5% ($p < 0.05$) respectively.

It was concluded that outer membrane fraction from *Flavobacterium psychrophilum* USM-3 native strain stimulates phagocytosis in *Oncorhynchus mykiss* juveniles infected with *F. psychrophilum* 1947^T.

Keywords: Outer membrane fraction | *Flavobacterium psychrophilum* | phagocytosis | *Oncorhynchus mykiss* | immunity.

Introducción

En los peces, el sistema inmune está bien desarrollado y en condiciones normales responde y controla en forma eficiente a los agentes infecciosos que toman contacto con el huésped.

La inmunidad innata, es particularmente importante en los animales poiquilotermos, aunque en los peces poco se sabe sobre su mecanismo de acción contra distintos patógenos. Puede ser dividido en dos tipos: innato o inespecífico y adquirido o específico, ambos compuestos por una parte humoral y celular (Olabuenaga, 2000). En condiciones naturales ambos tipos de inmunidad actúan simultáneamente; sin embargo, estudios realizados indican que en peces la inmunidad innata tiene una especial preponderancia en los mecanismos defensivos ante un agresor (Ortega y col., 1999).

Dentro de la inmunidad innata, la fagocitosis es uno de los procesos más importantes en la defensa de animales poiquilotermos, porque es el menos influenciado por la temperatura (Fernández y col., 2002).

Recientes estudios han determinado la presencia de *Flavobacterium psychrophilum* en nuestro país (Alzamora y col., 2007; León y col., 2009) el cual es el agente etiológico de la enfermedad del agua fría y del síndrome del alevín de trucha arco iris; dos infecciones bacterianas comunes en salmónidos de piscigranjas y de vida libre (Ekman y col., 1999).

Se ha demostrado la existencia de diversidad antigénica entre especies; las cuales difieren dependiendo de la técnica de tipificación, antígenos superficiales, origen geográfico y el pez hospedero sobre el cual las cepas son colectadas (Mata y col. 2002). Madetoja y col., (2001), determinaron la presencia de variantes de *F. psychrophilum* en su comportamiento bioquímico que se traducía en un patrón antigénico diferente, lo que hace suponer que podría variar su patogenicidad; motivo por el cual trabajamos con la cepa nativa *F. psychrophilum* USM-3 aislada de una piscigranja de Puno..

La estimulación de la actividad fagocítica ha sido estudiada en trucha arco iris utilizando diferentes cepas de *F. psychrophilum* y sus metabolitos (Lammens y col., 2000). Otros investigadores han utilizado para el mismo fin potenciadores naturales de la inmunidad innata, productos comerciales, probióticos, bacterias y componentes microbianos demostrando el incremento de la fagocitosis (Ortega y col., 2001; Brunt y Austin 2005; Brunt y col., 2007; Ispir y col., 2009).

En el presente estudio nos propusimos evaluar la estimulación de la inmunidad celular innata mediante la actividad fagocítica de leucocitos de bazo en juveniles de trucha arco iris con fracciones de membrana externa (FME) de la cepa nativa USM-3 *Flavobacterium psychrophilum*.

Material y Métodos

- a. Peces. Se emplearon 30 juveniles de trucha arco iris procedentes de una piscigranja de la provincia de Canta, departamento de Lima, Perú donde nunca se a registrado un brote de la enfermedad del agua fria, de un tamaño promedio de 10 cm de longitud y divididos en dos grupos de 15 especimenes cada uno correspondientes al grupo de peces inmunizados con FME y el grupo control.
- b.



Figura 1. Juveniles de truchas arco iris (*Oncorhynchus mykiss*) de 10 cm de tamaño aclimatándose a condiciones de laboratorio.

b. Cepa Nativa. La cepa de *F. psychrophilum* USM-3 aislada de truchas procedentes de piscigranjas de Puno en el año 2006 (datos no publicados) fue proporcionada por la Blga. Veronica Kojagura G. El cultivo se realizó en 100 ml de caldo cytophaga modificado, a pH 7.2 por 24 horas a 15 °C en agitación constante.

c. Obtención de Fracciones de Membrana Externa (FME).- El cultivo de *F. psychrophilum* USM-3 se centrifugó a 3000 xg por 10 minutos a temperatura ambiente; el pellet obtenido se lavó dos veces con Tris-HCl 10 mM pH 7.3. Luego las células se resuspendieron en Tris-HCl 10 mM pH 7.3 y fue sonicado 8 veces a 60W por 1 minuto en baño de hielo. El lisado se centrifugó a 17800 xg por 1 minuto a 4°C para eliminar las₄

células intactas y el sobrenadante obtenido se centrifugó a 17800 xg por 60 minutos a 4°C. El precipitado se resuspendió en 750 ul de Tris-HCl 10 mM pH 7.3. Luego se añadió 750 ul de lauril sarcosinato de sodio al 1.2% (p/v) obteniendo una concentración final de 0.6% para solubilizar la membrana interna e incubado a 20°C durante 20 minutos. La suspensión fue centrifugada a 17800 xg por 30 minutos a temperatura ambiente. El pellet conteniendo las FME se resuspendió en 100 ul de agua bidestilada. Luego las proteínas fueron precipitadas con 3 volúmenes de acetona fría por 2 horas a 4°C; se centrifugó a 17800 xg por 15 minutos a 4°C y se resuspendió en 250 ul de agua bidestilada y se almacenó a menos 20 °C hasta su uso. La concentración de proteínas se determinó de acuerdo a las especificaciones del método de BIOQUANT® Proteínas Bradford.

d. Inmunización.- Se inocularon por la vía intraperitoneal 15 especímenes con 10 ug de FME en 0.1 ml y 15 especímenes con 0.1 ml de agua bidestilada estéril (grupo control) y fueron mantenidas a una temperatura de 15±2°C por tres semanas y alimentadas con hojuelas comerciales interdiario (1g/pez).

e. Infección Experimental.- Las truchas inmunizadas fueron inoculadas por vía intraperitoneal con un cultivo en fase log de la cepa estándar *F. psychrophilum* 1947^T a una densidad óptica de 0.2 a 520nm y diluido 1/10 en 0.5% CNa pH 7.2 (Madetoja y col., 2006) y evaluadas diariamente.

f) Fagocitosis in vitro.- Se demostró enfrentando 100 ul de células de bazo con 1 ul de GRC al 8% fijados con 0.03 % de glutaraldehído (GRCG) e incubados durante 6 horas a 15°C en microplacas de 96 pocillos. Los glóbulos rojos de carnero (GRC) se fijaron con 0.03% glutaraldehído por 17 horas y lavados tres veces en buffer fosfato salino (PBS). Se colocó una gota de cada muestra en una lámina para realizar el frotis y se procedió a teñir con Wright. Cada muestra se hizo por triplicado. La lectura se realizó al microscopio óptico con un aumento de 1000X. La actividad fagocítica y el índice fagocítico se calcularon mediante las siguientes relaciones: (Número de fagocitos con GRCG fagocitados/Número de fagocitos) x100 y (porcentaje de macrófagos conteniendo al menos un GRCG x el promedio de GRCG por célula positiva) respectivamente. Se realizó un recuento de 200 fagocitos por cada lámina (Anderson y col., 1993; Ispir y col., 2009)

g) Análisis estadísticos de los resultados.- Se aplicó los test de ANOVA para detectar diferencias significativas en cada grupo experimental;

considerandose diferencias estadísticamente significativas cuando $p \leq 0.05$. Se empleó el programa SPSS 17.0.

Análisis y Discusión

Las proteínas de membrana externa son importantes factores de virulencia que se relacionan con una respuesta inmunoprotectiva en el hospedero (LaFrentz, y col., 2004, Dumetz, y col., 2007; Högfors, y col., 2008).

Las células fagocíticas en peces tienen un rol muy importante en la protección contra agentes patógenos (Ispir y col., 2009). Estas células participan en las defensas innatas y adaptativas contra los microorganismos (Lammens, y col., 2000).

Los resultados de la actividad fagocítica en células de bazo de truchas estimuladas con fracciones de membrana externa de *F. psychrophilum* fueron estadísticamente significativos (22.4%) comparados con el grupo control (0.5%) (Figura 2).

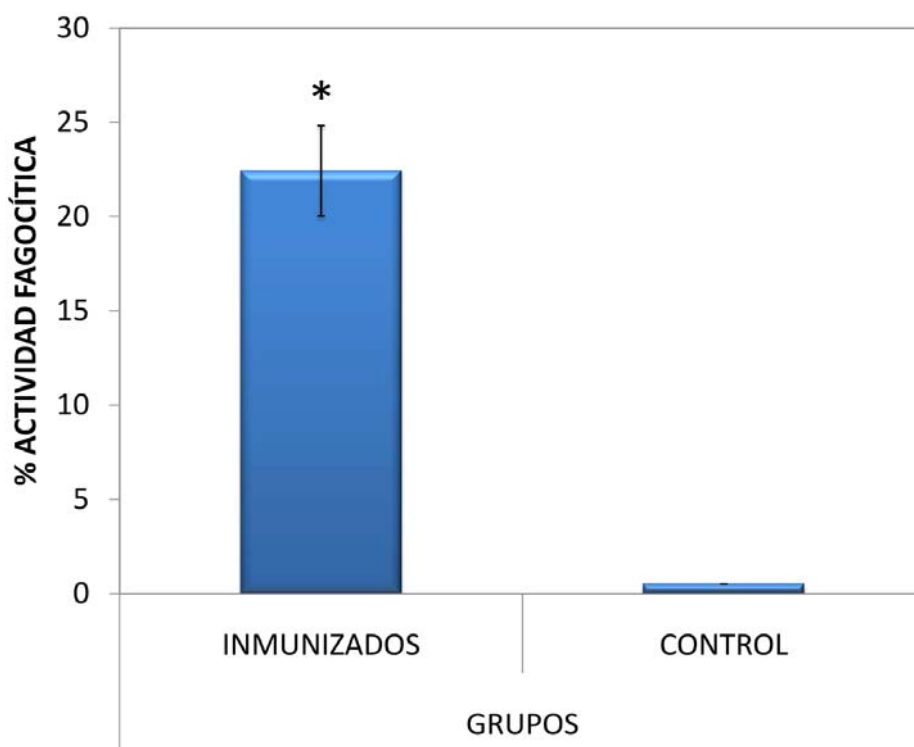


Figura 2. Porcentaje de la actividad fagocítica en truchas inmunizadas con FME y el grupo control. Los valores son promedios con desviaciones estándar representado con barras verticales. * representa diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$).

El porcentaje del índice fagocítico en los peces inmunizados y el control fue 32.5 % y 0.5 % respectivamente ($p < 0.05$) (Figura 3).

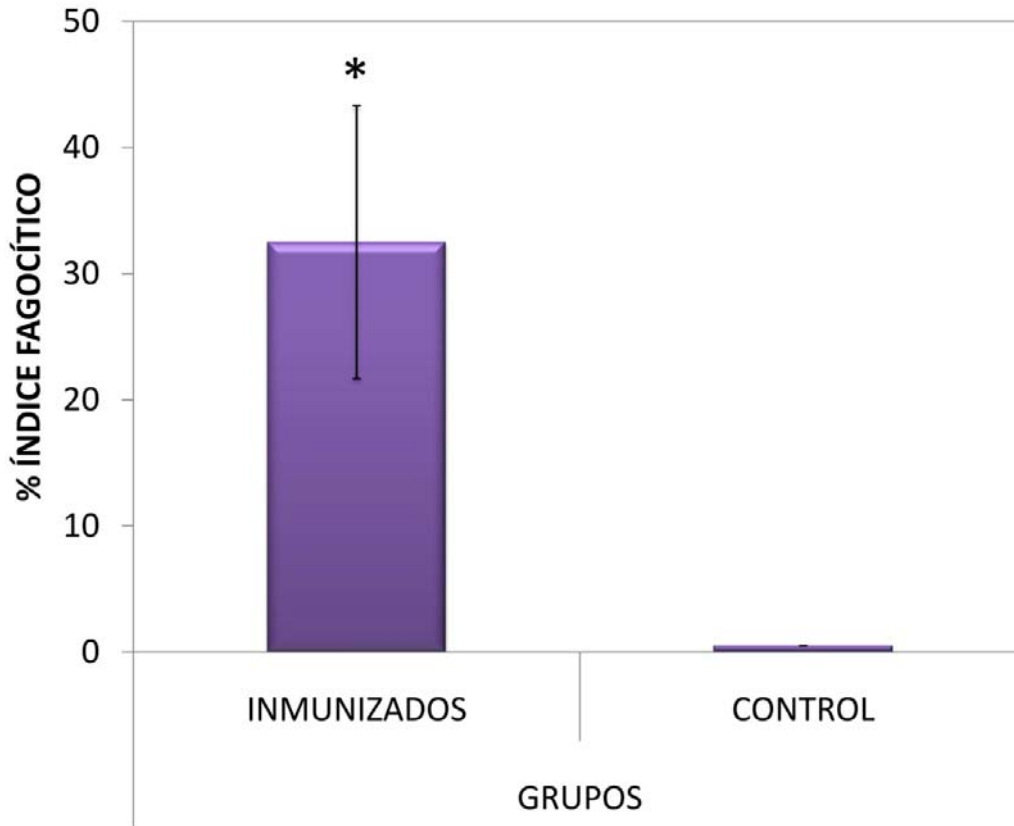


Figura 3. Porcentaje del índice fagocítico en truchas inmunizadas con FME y el grupo control. Los valores son promedios con desviaciones estándar representado con barras verticales. * representa diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$).

Se observó un mayor número de glóbulos rojos de carnero fijados con glutaraldehído fagocitados en el grupo de truchas inmunizadas que en el grupo control (Figura 4).

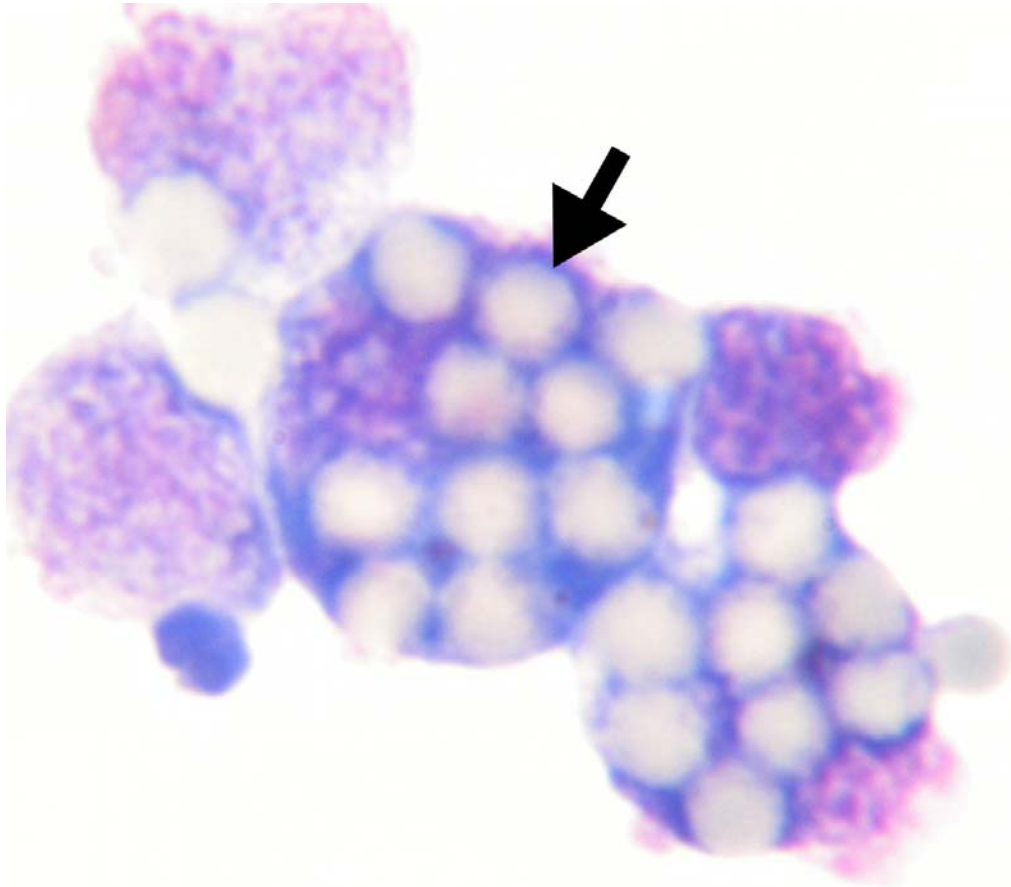


Figura 4. Células fagocíticas de bazo de truchas inmunizadas con FME con numerosos glóbulos rojos de carnero fijados con glutaraldehído (→). Tinción Wright (100x).

Lammens, y col., 2000, determinaron el efecto estimulante al utilizar diferentes cepas de *F. psychrophilum* y sus metabolitos en la actividad oxidativa de los fagocitos de riñón en *Oncorhynchus mykiss*.

Existe una asociación en la interacción de los macrófagos de las truchas con la virulencia de las cepas de *Flavobacterium psychrophilum* y mayor actividad microbiana en macrófagos de riñón anterior que en macrófagos de bazo (Nematollahi, y col., 2005). Aunque no se ha realizado una comparación entre las actividades fagocíticas de ambos macrófagos, nosotros hemos encontrado una elevada actividad en fagocitos de bazo de truchas inmunizadas con fracciones de membrana externa.

Ispir, y col., 2009, demostraron un incremento en la actividad fagocítica e índice fagocítico en grupos de truchas que fueron inoculadas con el antígeno O y en grupos de truchas inmunizadas con bacterias fijadas con formalina (BMF) de *Yersinia ruckeri* en relación al grupo control.⁸

En este trabajo la actividad fagocítica e índice fagocítico en truchas tratadas con el antígeno O y BMF no mostraron diferencias significativas después de 30 días de la primera inmunización.

En este estudio demostramos la actividad estimulante de las fracciones de membrana externa en la inmunidad celular innata de *Oncorhynchus mykiss*; aunque es necesario seguir realizando investigaciones en relación a la dosis; número de inmunizaciones y condiciones adecuadas que eviten el estrés de los animales.

Conclusión

Las fracciones de membrana externa de la cepa nativa de *Flavobacterium psychrophilum* produjeron un incremento de la actividad fagocítica en juveniles de *Oncorhynchus mykiss*.

Referencias Bibliográficas

1. Alzamora L. Alvarado, D.; Ramírez, P.; García, R.; Woll, P.; Rojas, N.; Diestro, A.; Marcelo, A.; Chanco, M.; Cereceda, M.; Colona, E.; Kojagura, V.; Quispe, J.; Martínez, J.L.; Valenzuela, L.; Cabello, M.; Leon, I.; Carvallo, C.; Mananita, E.; Pedrozo, P.; Montenegro, D. y Paico H. 2007. "Desarrollo de un modelo de infección experimental para la caracterización de la respuesta inmune de juveniles de *Oncorhynchus mykiss* (trucha arco iris) frente a la cepa nativa de *Flavobacterium psychrophilum*, agente causal de la enfermedad del agua fría". Informe Final del Proyecto de Investigación. Consejo Superior de Investigación (Cod. CSI 071001011, R.R N° 00914-R-07). Universidad Nacional Mayor de San Marcos.
2. Anderson, D.P. y Jeney, G. 1992. Immunostimulants added to injected *Aeromonas salmonicida* bacterin enhance the defense mechanisms and protection in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 34:379-383.
3. Brunt, J. and Austin, B. 2005. Use of a probiotic to control lactococcosis and streptococcosis in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). *J. Fish Dis.*, 28: 693-701.
4. Brunt, J., Newaj -Fyzul, A. y Austin, B. 2007. The development of probióticos for the control of multiple bacterial diseases of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). *J. Fish Dis.*, 30: 573-579.
5. Dumetz, F., LaPatra, S.-E., Duchaud, E., Claverol, S. and Le Hénaff, M. 2007. The *Flavobacterium psychrophilum* OmpA, an outer membrane glycoprotein, induces a humoral response in rainbow trout. *J. App. Micro.*, 103: 1461-1470.

6. Ekman, E., Borjeson, H. y Johansson, N. 1999. *Flavobacterium psychrophilum* in Baltic salmon *Salmo salar* brood fish and their offspring. *Dis. Aquat. Org.*, 37: 159–163.
7. Fernández, A.B.; Ruiz, I. y De Blas, I. 2002. El sistema inmune de los teleósteos (II): Respuesta inmune inespecífica. *Revista AquaTIC* nº 17, Octubre.
8. Högfors, E.; Pullinen, K.R.; Madetoja, J. and Wiklund, T. 2008. Immunization of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), with a low molecular mass fraction isolated from *Flavobacterium psychrophilum*. *J. Fish Dis.*, 31: 899–911.
9. Ispir U., Bayram H., Ozcan M., Dorucu M. y Saglam N. 2009. Immune response of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) to selected antigens of *Yersinia ruckeri*. *Acta Vet. Brno.*, 78:145-150.
10. LaFrentz, BR.; Lapatra, SE.; Jones, GR. y Cain, KD. 2004. Protective immunity in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* following immunization with distinct molecular mass fractions isolated from *Flavobacterium psychrophilum*. *Dis. Aquat. Org.*, 59:17–26..
11. Lammens, M.; Decostere, A. y Haesebrouck, F. 2000. Effect of *Flavobacterium psychrophilum* strains and their metabolites on the oxidative activity of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* phagocytes. *Dis. Aquat. Org.*, 41:173-179
12. León, J.; Avalos, R. y Ponce, M. 2008. *Flavobacterium psychrophilum* y su patología en alevines de *Oncorhynchus mykiss* del centro piscícola El Ingenio, Huancayo. *Rev. Peru. Biol.*, 15(2):117-124
13. Madetoja J, Lonnstrom L-G, Bjorkblom C, Ulukoy G, Bylund G, Syvertsen C, Gravningen K, Norderhus y Wiklund T. 2006. Efficacy of injection vaccines against *Flavobacterium psychrophilum* in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum) *Journal of Fish Diseases* 29:9-20.
14. Nematollahi, A.; Pasmans, F.; Haesebrouck, F. y Decostere, A. 2005. Early interactions of *Flavobacterium psychrophilum* with macrophages of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *Dis Aquat Org.*, 64: 23–28.
15. Olabuenaga S.E. 2000. Sistema Inmune en Peces. *Gayana (Concep.)* v.64 n.2. Concepción..
16. Ortega, C.; Ania, S.; Ruiz, I.; Muzquiz, J.L. y Girones, O. 2001. Estudio experimental de la estimulación de la inmunidad en trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*) inoculada con *Lactococcus garvieae*. *Med. Vet.*, 18(5): 420-429.
17. Rahman, MH.; Kuroda, A.; Dijkstra, JM.; Kiryu, I.; Nakanishi, T. y Ototake, M. 2002. The outer membrane fraction of *Flavobacterium psychrophilum* induces protective immunity in rainbow trout and ayu. *Fish Shellfish Immunol.*, 12:169–79.

REDVET: 2013, Vol. 14 N° 1

Recibido 10.06.2012 / Ref. prov. ENE1207B_RED VET / Revisado 09.09.2012
Aceptado 22.12.2012 / Ref. def. 011305_RED VET / Publicado: 01.01.2013

Este artículo está disponible en <http://www.veterinaria.org/revistas/redvet/n010113.html>
concretamente en <http://www.veterinaria.org/revistas/redvet/n010113/011305.pdf>

REDVET® Revista Electrónica de Veterinaria está editada por Veterinaria Organización®.
Se autoriza la difusión y reenvío siempre que enlace con Veterinaria.org® <http://www.veterinaria.org> y con REDVET®-
<http://www.veterinaria.org/revistas/redvet>