

Patogénesis y profilaxis de la infección por el virus de la enfermedad de linfocistis (LCDV-Sa) en doradas cultivadas (*Sparus aurata* L.)

Rocío de las Mercedes Leiva Rebollo
TESIS DOCTORAL
2019

Directores

M^a Dolores Castro López
Alejandro Manuel Labella Vera



Facultad de Ciencias
Universidad de Málaga
Programa de Doctorado en Biología Celular y Molecular





UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

AUTOR: Rocio Leiva Rebollo

 <http://orcid.org/0000-0001-9407-8084>

EDITA: Publicaciones y Divulgación Científica. Universidad de Málaga



Esta obra está bajo una licencia de Creative Commons Reconocimiento-NoComercial-SinObraDerivada 4.0 Internacional:

<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/legalcode>

Cualquier parte de esta obra se puede reproducir sin autorización
pero con el reconocimiento y atribución de los autores.

No se puede hacer uso comercial de la obra y no se puede alterar, transformar o hacer obras derivadas.

Esta Tesis Doctoral está depositada en el Repositorio Institucional de la Universidad de Málaga (RIUMA): riuma.uma.es





UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

FACULTAD DE CIENCIAS

PROGRAMA DE DOCTORADO EN BIOLOGÍA CELULAR Y MOLECULAR

**“Patogénesis y profilaxis de la infección por el virus de la
enfermedad de linfocistis (LCDV-Sa) en doradas cultivadas
(*Sparus aurata* L.)”**

TESIS DOCTORAL

Rocío de las Mercedes Leiva Rebollo

2019



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

FACULTAD DE CIENCIAS

PROGRAMA DE DOCTORADO EN BIOLOGÍA CELULAR Y MOLECULAR

**“Patogénesis y profilaxis de la infección por el virus de la
enfermedad de linfocistis (LCDV-Sa) en doradas cultivadas
(*Sparus aurata* L.)”**

Memoria presentada por
**D^a. Rocío de las Mercedes
Leiva Rebollo** para optar
al grado de Doctor en
Biología

Fdo. La doctoranda

FACULTAD DE CIENCIAS

PROGRAMA DE DOCTORADO EN BIOLOGÍA CELULAR Y MOLECULAR

Dña. **M^a DOLORES CASTRO LÓPEZ**, Profesora Titular del Departamento de Microbiología de la Universidad de Málaga, como **TUTORA** dentro del programa de doctorado “**BIOLOGÍA CELULAR Y MOLECULAR**” y **DIRECTORA** del trabajo de tesis realizado por la doctoranda.

D. **ALEJANDRO MANUEL LABELLA VERA**, Profesor Sustituto Interino del Departamento de Microbiología de la Universidad de Málaga y **DIRECTOR** del trabajo del trabajo de tesis realizado por la doctoranda.

INFORMAN:

Que la doctoranda **ROCÍO DE LAS MERCEDES LEIVA REBOLLO** ha realizado de forma satisfactoria y bajo nuestra supervisión las actividades de formación dentro del programa de doctorado arriba mencionado así como el trabajo investigador que se presenta y que lleva por título “**Patogénesis y profilaxis de la infección por el virus de la enfermedad de linfocistis (LCDV-Sa) en doradas cultivadas (*Sparus aurata* L.)**”. Este trabajo constituye su proyecto de Tesis para aspirar al Título de Doctora en Biología.

Y para que así conste, y tenga los efectos que correspondan, en cumplimiento de la legislación vigente, extendemos el presente informe en Málaga, a 11 de junio de 2019.

Fdo: La Tutora:

Mª Dolores Castro López

Fdo. Los directores: Mª Dolores Castro López

Alejandro Manuel Labella Vera



Parte de los resultados mostrados en esta Tesis Doctoral han sido publicados en:

Leiva, R., Labella, A.M., Castro, D., Borrego, J.J. (2018). Desarrollo de una vacuna DNA para el control de la enfermedad de linfocistis. IX Jornadas de Acuicultura en el Litoral Suratlántico. Huelva. (Póster)

Rocío Leiva., Juan José Borrego., Dolores Castro., Alejandro Labella. (2018). Desarrollo y evaluación de una vacuna DNA contra el virus de la enfermedad de linfocistis (LCDV). XVII Congreso de Taxonomía y XII Congreso Nacional de Microbiología del Medio Acuático. Barcelona. Comunicación premiada con el premio a la mejor comunicación oral. (Comunicación oral)

Alejandro Labella., Rocío Leiva., Juan José Borrego., Dolores Castro., Alí Alejo. (2018). Incidencia de los virus de la enfermedad de linfocistis (LCDV-Sa), papillomavirus (SaPV1) y poliomavirus (SaPyV1) en doradas cultivadas en el área mediterránea. XVII Congreso de Taxonomía y XII Congreso Nacional de Microbiología del Medio Acuático. Barcelona. (Comunicación oral)

R. Leiva-Rebollo, A. Labella, A. D. Castro, J.J. Borrego. (2019). Immune response of gilthead seabream (*Sparus aurata*) after experimental infection with lymphocystis disease virus (LCDV-Sa). 3rd International conference on fish and shellfish immunology. Gran Canarias. (Póster)

Rocío Leiva, Dolores Castro, Juan J. Borrego y Alejandro M. Labella (2019). Estudio de la protección conferida por una vacuna DNA frente a la infección por linfocistivirus (LCDV). XXVII Congreso Nacional de Microbiología. Málaga. (Póster)

Labella, A.M., Leiva-Rebollo, R., Alejo, A., Castro, D., Borrego, J.J. (2019). Lymphocystis disease virus (LCDV-Sa), polyomavirus 1 (SaPyV1) and papillomavirus 1 (SaPV1) in samples of Mediterranean gilthead seabream. *Dis. Aquat. Org.*, **132**: 151-156.

Leiva-Rebollo, R., Labela, A.M., Castro, D., Borrego, JJ. Immune response of Gilthead seabream (*Sparus aurata*) under experimental infection with lymphocystis disease virus (LCDV-Sa). *J. Appl. Microbiol.* Submitted.

Los estudios realizados durante el desarrollo de la Tesis Doctoral han sido subvencionados por el siguiente Proyecto:

Proyecto de Excelencia de la Junta de Andalucía “Infecciones por linfocistivirus en doradas cultivadas: patogénesis e implicación del sistema inmune en el curso de la infección. Desarrollo de medidas de profilaxis y control” (Ref. P12-RNM-2261).



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

ÍNDICE



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

INTRODUCCIÓN

1. LA ACUICULTURA ACTUAL.....	3
1.1. El cultivo de dorada	5
1.2. Patologías de origen microbiano	7
2. EL VIRUS DE LA ENFERMEDAD DE LINFOCISTIS (LCDV)	11
2.1. Clasificación, rango de hospedador y distribución geográfica	11
2.2. Características morfológicas estructurales y composición química	13
2.3. Multiplicación viral	16
3. LA ENFERMEDAD DE LINFOCISTIS.....	18
3.1. Sintomatología y patogénesis	18
3.2. Métodos de diagnóstico	20
3.2.1. Cultivos celulares	21
3.2.2. Técnicas serológicas	22
3.2.3. Técnicas moleculares	23
4. DESARROLLO DE MEDIDAS PROFILÁCTICAS ESPECÍFICAS	23
4.1. Antimicrobianos	24
4.2. Probióticos	25
4.3. Inmunoprofilaxis	26
5. PREVENCIÓN Y CONTROL DEL LCDV	26
5.1. Medidas zoonosanitarias	27
5.2. Medidas de higiene	28
5.3. Selección genética	30
5.4. Vacunas	31
5.4.1. Vacunas de virus atenuados	32
5.4.2. Vacunas de virus inactivados	32

5.4.3. Vacunas de péptidos sintéticos	33
5.4.4. Vacunas de DNA	33
6. MECANISMOS DE RESPUESTA INMUNE EN PECES	37
6.1. Sistema inmune innato en peces	38
6.1.1. Sistema interferón en peces	41
6.2. Sistema inmune adaptativo en peces	44
 OBJETIVOS	 51
 MATERIAL Y MÉTODOS	
 1. ESTUDIO DE LA CARGA VIRAL EN DORADAS INFECTADAS POR LCDV-Sa Y SU RELACIÓN CON EL CURSO DE LA INFECCIÓN	 55
1.1. Infección experimental	55
1.1.1. Aislado vírico	55
1.1.2. Determinación de la dosis infectiva	55
1.1.3. Mantenimiento de los peces y diseño experimental	56
1.1.4. Extracción de DNA y RNA, y síntesis de cDNA	57
1.1.5. Detección de LCDV-Sa mediante PCR y nested-PCR	58
1.1.6. Cuantificación de DNA vírico	59
1.2. Análisis de doradas procedentes de un brote de linfocistis	60
1.3. Análisis estadístico	60
 2. ESTUDIO DE LA RESPUESTA INMUNE DE DORADAS FRENTE A LA INFECCIÓN POR LCDV-Sa	 61
2.1. Diseño experimental	61
2.2. Extracción de DNA, RNA, y síntesis de cDNA	61
2.3. Cuantificación de DNA y de transcritos víricos	62
2.4. Análisis de expresión génica del hospedador	62
2.5. Análisis estadístico	65

3. DISEÑO DE UNA VACUNA DNA FRENTE A LCDV-Sa	66
3.1. Producción de la vacuna	66
3.2. Expresión <i>in vitro</i> del plásmido vacunal	68
3.2.1. Microscopía de fluorescencia	68
3.2.2. Immunoensayo dot blot	69
3.3. Distribución y expresión de la vacuna en doradas	69
3.3.1. Ensayo de vacunación	69
3.3.2. Detección de la vacuna y expresión del gen <i>mcp</i>	70
 4. DISEÑO Y EVALUACIÓN DE UNA VACUNA DNA CONTRA EL LCDV	 71
4.1. Diseño de un protocolo de qPCR para la cuantificación de LCDV-Sa	71
4.1.1. Clonación de un fragmento del gen codificante de la MMP	71
4.1.2. Ensayo de PCR a tiempo real	72
4.1.3. Curva estándar para la cuantificación de LCDV-Sa	72
4.1.4. Precisión y reproducibilidad del ensayo	72
4.2. Protección inducida por la vacunación	73
4.3. Evaluación de la respuesta inmune de doradas tras la vacunación	74
4.3.1. Diseño experimental	74
4.3.2. Análisis de la expresión de inmunogenes en respuesta a la Vacunación	74
4.3.3. Determinación de la producción de anticuerpos en doradas Vacunadas	75
4.3.3.1. Obtención de MCP recombinante	75
4.3.3.2. Ensayo inmunoenzimático indirecto (ELISA)	77
4.3.3.3. Ensayo de neutralización	78

RESULTADOS

1. ESTUDIO DE LA CARGA VIRAL EN DORADAS INFECTADAS POR LCDV-Sa Y SU RELACIÓN CON EL CURSO DE LA INFECCIÓN	81
1.1. Estudio del curso de la infección en doradas infectadas experimentalmente	81
1.2. Cuantificación viral en doradas procedentes de un brote de linfocistis	83
2. ESTUDIO DE LA RESPUESTA INMUNE EN DORADAS FRENTE A LA INFECCIÓN POR LCDV-Sa	85
2.1. Carga viral y expresión génica vírica	85
2.2. Expresión de genes relacionados con la respuesta inmune	87
3. CARACTERIZACIÓN DE LA VACUNA DNA FRENTE A LCDV-Sa	93
3.1. Expresión <i>in vitro</i> del plásmido vacunal	93
3.2. Distribución y expresión de la vacuna en dorada	95
4. EVALUACIÓN DE LA VACUNA DNA EN DORADA	97
4.1. Evaluación del ensayo de qPCR para la cuantificación de LCDV-Sa	97
4.2. Protección inducida por la vacunación	99
4.3. Evaluación de la respuesta inmune de doradas tras la vacunación	102
4.3.1. Expresión de inmunogenes en respuesta a la vacunación	102
4.3.1.1. Expresión del plásmido vacunal	102
4.3.1.2. Expresión de genes relacionados con el sistema inmune	104
4.3.2. Producción de anticuerpos en doradas vacunadas	113

DISCUSIÓN

- 1. ESTUDIO DE LA CARGA VIRAL EN DORADAS INFECTADAS
POR LCDV-Sa Y SU RELACIÓN CON EL CURSO DE LA
INFECCIÓN 117**
- 2. ESTUDIO DE LA RESPUESTA INMUNE DE DORADAS
FRENTE A LA INFECCIÓN POR LCDV-Sa.....119**
- 3. EVALUACIÓN DE UNA VACUNA DNA CONTRA EL LCDV-Sa
EN DORADAS 125**

CONCLUSIONES 135

BIBLIOGRAFÍA 139

INTRODUCCIÓN



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

1. LA ACUICULTURA ACTUAL

La Unión Europea define la Acuicultura como la cría o cultivo de organismos acuáticos con técnicas encaminadas a aumentar, por encima de las capacidades naturales del medio, la producción de los organismos en cuestión. Según la FAO (2016), la acuicultura es la cría de organismos acuáticos, comprendiendo peces, moluscos, crustáceos y plantas. Debido a que la creciente demanda mundial de pescado es cubierta con dificultad por la pesca extractiva, la acuicultura se perfila como la mejor alternativa de cara a cubrir esta demanda en el futuro. En España, a partir de los años noventa del siglo XX, con la incorporación de nuevas tecnologías y una mayor industrialización del sector, se incorporaron nuevas especies como el rodaballo en el norte de España y la dorada y lubina en el sur y levante de España y en Canarias.

La producción de animales acuáticos a nivel mundial ha crecido durante las tres últimas décadas (Figura 1) a un ritmo del 2,65% anual superando la tasa de crecimiento de la población mundial que fue de 1,6%.

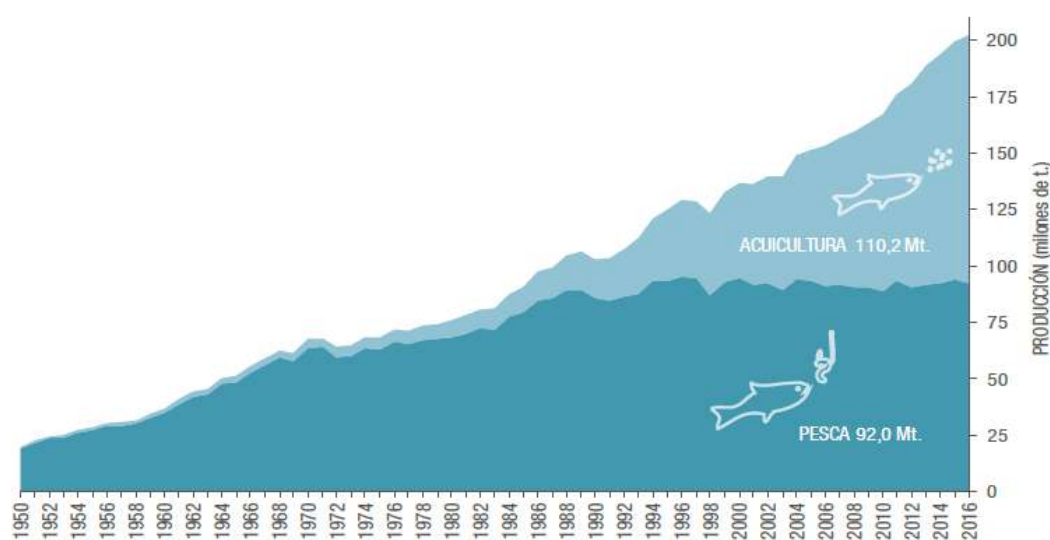


Figura 1. Evolución de la producción acuática mundial en el periodo 1950-2016 (APROMAR, 2018).

La acuicultura se ha convertido en uno de los sectores de mayor crecimiento en la producción de alimentos a nivel mundial. En la última década ha suministrado un tercio del total de pescado consumidos en todo el mundo (Reverter *et al.*, 2014). Casi la

mitad de la producción de la acuicultura mundial en 2016 se corresponde al cultivo de peces, con un 49,1%, pero el incremento de la producción ha tenido lugar en todos los grupos de especies. Del total, el 54,3% de la producción corresponde a especies marinas y el 45,7% aguas dulces (Figura 2) (APROMAR, 2018). En lo referente a la Unión Europea, la acuicultura representa más del 15% de la producción pesquera con un millón y medio de toneladas. España es el país de la Unión Europea con mayor volumen de producción en acuicultura, alcanzando el 22% del total. Sin embargo, cuando se refiere al valor de producción, ocupa la cuarta posición, por detrás de Reino Unido, Francia y Grecia, seguida de Italia (APROMAR, 2018).

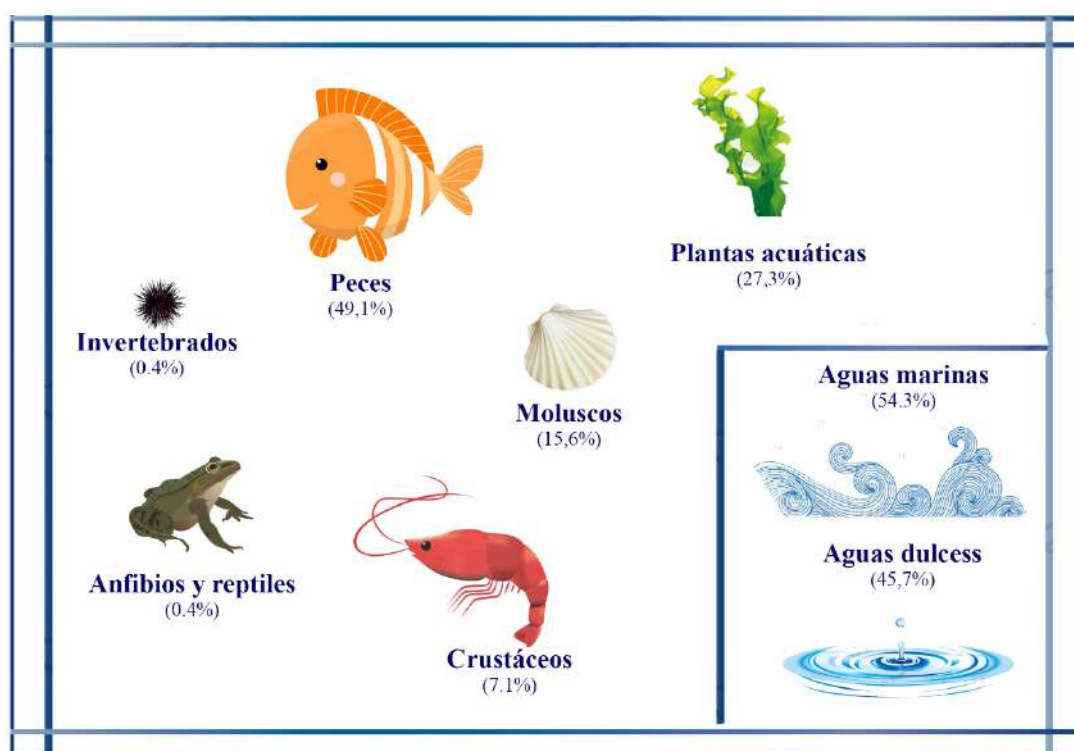


Figura 2. Distribución de la producción de acuicultura mundial en 2016 (modificada de APROMAR, 2018).

En cuanto a la acuicultura marina en España, la producción de peces marinos ha experimentado un crecimiento exponencial en los últimos años. Este crecimiento se debe principalmente a la producción de dorada (*Sparus aurata*), lubina (*Dicentrarchus labrax*) y rodaballo (*Psetta maxima*) (FAO, 2017). De las especies producidas en España, destacan en el contexto mundial la producción de trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*), con 814.091 t en total; mejillones europeos (*Mytilus*

galloprovincialis), con 282.285 t; la dorada, con 167.334 t; la lubina, con 163.131 t; y el rodaballo, con 69.196 t (APROMAR, 2018). Del conjunto de producción de peces marinos en España en la actualidad, las principales especies cultivadas son la lubina, lenguado (*Solea senegalensis*), dorada, corvina (*Argyrosomus regius*) y rodaballo (Figura 3).

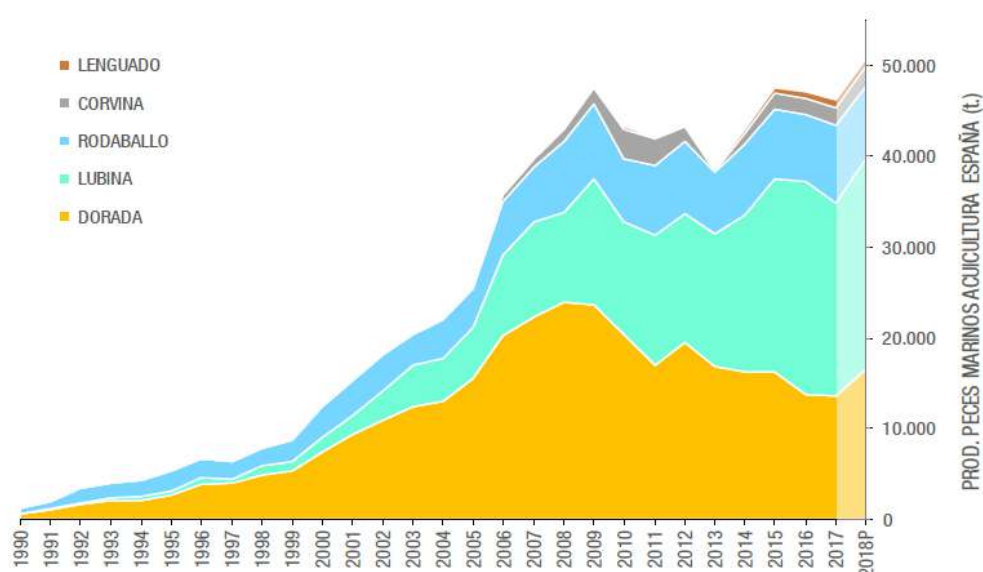


Figura 3. Evolución de la producción de peces marinos en España en el periodo 1990-2018 (APROMAR, 2018)

En la zona del Cantábrico y Galicia se lleva a cabo la producción de especies de agua fría como el rodaballo, mientras que en el área sur-atlántica y mediterránea, zonas más templadas, se realizan la producción en conjunto de doradas y lubinas (FAO, 2017).

1.1. El cultivo de dorada

La dorada es un miembro de la familia *Sparidae*, y constituye una de las especies de peces marinos más importantes en los países del sur de Europa. Se encuentra distribuida por la zona mediterránea y mar Negro, y a lo largo de las costas del Atlántico desde Gran Bretaña a Senegal (Sola *et al.*, 2007; Fernandes *et al.*, 2017). La dorada es una especie muy apreciada en la acuicultura extensiva mediterránea debido a su buen precio de mercado, hábitos de alimentación y su alta tasa de supervivencia, convirtiéndola así en la especie más común de la cuenca mediterránea (FAO, 2005). El

comienzo del cultivo de dorada en España se remonta a principios de los años ochenta, empleándose las salinas del sur como zonas de cultivo intensivo a gran escala de juveniles de doradas, seguida de las zonas del delta del Ebro y zonas de Valencia (Labarta, 2007). El cultivo comercial de esta especie en los últimos años ha sido una actividad muy arraigada en más de 20 países europeos, con una producción total en 2017 de 207.167 t (APROMAR, 2018). Turquía, Grecia, Egipto y España representan más del 70% de la producción total de doradas (Sola *et al.*, 2007), aunque Grecia es la principal productora de dorada, la producción en España se ha duplicado en la última década, y se estima que la producción aumente un 32% en el 2018 (FAO, 2017; APROMAR, 2018). Las exportaciones de dorada han evolucionado con una tendencia expansiva continuada durante la última década. El mercado de destino es el comunitario, y los principales clientes son Portugal y Francia (FAO, 2017). En lo referente al estatus actual, el mercado convencional para la dorada se ha saturado. Para el crecimiento futuro, la industria de la acuicultura mediterránea necesitará adoptar métodos de comercialización más sofisticados. La dorada debiera estar disponible no solo como un artículo de consumo sino también como un producto de valor añadido, esto último junto con el desarrollo de mercados alternativos posiblemente conducirá a mayores requerimientos de calidad controlada (FAO, 2005). Por lo cual, la industria de la dorada podría describirse como un sector maduro, pero que necesita de sistemas de producción más eficientes y el desarrollo de nuevas tecnologías. Con el desarrollo de las nuevas tecnologías se busca minimizar el potencial impacto de las prácticas de acuicultura en las áreas costeras (escapes de peces cultivados que diluyen el acervo genético, transferencia de enfermedades entre peces cultivados y salvajes, introducción de especies alóctonas en comunidades locales, etc.).

El cultivo de dorada en toda el área Mediterránea está experimentando etapas de altibajo debido a la aparición de enfermedades que afectan a su cultivo. Además, al igual que ocurre con el cultivo intensivo de otras especies de peces, el estrés da lugar a episodios de inmunosupresión aumentando la susceptibilidad a microorganismos patógenos oportunistas, disminuyendo su capacidad para hacer frente a las infecciones (Tort *et al.*, 1998). La dorada es una especie de importancia económica a nivel europeo, y es necesario un correcto equilibrio entre el ambiente y el organismo, a fin de evitar la

influencia de factores ambientales estresantes que puedan afectar y/o alterar la sanidad, crecimiento y supervivencia del pez (Faggio *et al.*, 2014 a;b). En particular, el cultivo de dorada sufre la denominada “Enfermedad o Síndrome de invierno” que causa mortalidades crónicas durante los meses fríos y episodios de mortalidad aguda cuando las temperaturas aumentan (Gallardo *et al.*, 2003). Por tanto, el crecimiento y la viabilidad de los cultivos piscícolas se optimizan como se define previamente un rango estable de temperatura, siendo para doradas de 11°C en invierno y de 23°C en verano (Faggio *et al.*, 2014a). La propia actividad del cultivo intensivo junto al aumento de densidad de población en las instalaciones acuícolas hace que estos cultivos presenten un alto riesgo de aparición de epizootias de origen infecciosos (Segner *et al.*, 2011). Las enfermedades infecciosas de origen microbiano son el principal impedimento para el desarrollo eficiente de la acuicultura y, frecuentemente, son la causa principal de pérdidas económicas (Plant & LaPatra, 2011), evitando, por tanto, el desarrollo tanto social como económico de los países productores. Algunas de las enfermedades más frecuentes que afectan a doradas son infecciones bacterianas (vibriosis y fotobacteriosis), víricas (lymphocystivirus) e infecciones parasitarias (Monogenea) (FAO, 2005). Por consiguiente, los impactos ambientales de operaciones de cultivo, la seguridad de los productos cultivados para el consumo humano y el bienestar de los peces, son factores determinantes para la correcta sostenibilidad de la acuicultura (Noga, 2010).

1.2. Patologías de origen microbiano

Debido a su cultivo intensivo, las poblaciones de dorada sufren diversas patologías que se traducen en pérdidas económicas para el sector productivo de la acuicultura. Estas patologías también afectan a las doradas salvajes, y son provocadas por malas condiciones fisiológicas durante el estadio del desarrollo del pez, condiciones ambientales adversas y/o a factores genéticos potenciales.

Muchas de las enfermedades que causan graves problemas en peces cultivados son provocadas por patógenos exóticos, que se introducen en una región a través de peces infectados de otras áreas geográficas. Por tanto, un programa de bioseguridad efectivo es vital para mantener un estatus saludable en el cultivo de peces y reducir el

riesgo de adquirir enfermedades (Borrego *et al.*, 2017). Subasinghe *et al.* (2004) puntualizaron que el desarrollo de métodos estandarizados para el diagnóstico de enfermedades, así como la evaluación periódica de la efectividad y comparación de métodos de diagnóstico debía ser un aspecto prioritario para establecer un correcto programa de bioseguridad.

Las **enfermedades parasitarias** son producidas por microorganismos eucarióticos. Estos microorganismos pueden afectar a una gran variedad de especies acuícolas, pero en muchos de ellos no causan enfermedad, si no que provocan estrés e inmunodepresión y, como consecuencia, pueden desarrollarse ulteriores infecciones secundarias por otros patógenos con graves consecuencias. Los parásitos más frecuentes que afectan al cultivo de dorada son *Amyloodinium* spp., *Cryptocarion* spp., *Ichthyobodo* spp., y *Trichodina* spp. (Bahri, 2012). Estos parásitos son buenos indicadores de la contaminación de los ecosistemas acuáticos, de hecho, el 80% de las infestaciones y tasas de mortalidad en el cultivo de dorada se corresponde con la presencia de contaminantes orgánicos e inorgánicos (Sarasquete *et al.*, 2013).

En las **enfermedades bacterianas**, *Vibrio* spp. ha sido el microorganismo más frecuente aislado y responsable de desarrollar enfermedades en los de cultivos de dorada por toda el área Mediterránea. Las situaciones de mortalidad en estos cultivos son causadas principalmente por *V. alginolyticus*, *V. parahaemolyticus*, *V. vulnificus*, *V. harveyi*, *V. ordalii*, *V. salmonicida* y *V. anguillarum* (Colorni & Padros, 2011). La vibriosis se caracteriza por producir una septicemia hemorrágica sistémica. La manifestación de los signos externos de esta patología se caracteriza por el oscurecimiento de las aletas, exoftalmia, branquias pálidas (anemia), petequias en la piel y base de las aletas, inflamación y aparición de úlceras. A nivel interno, la vibriosis provoca constricción de los vasos sanguíneos viscerales, hemorragias intestinales y acumulación de líquido ascítico en la cavidad abdominal (Rigos *et al.*, 1998; Ina-Salwany *et al.*, 2018). El tratamiento de la vibriosis se basa en el uso de antimicrobianos adicionados a los piensos, que pueden ser efectivos si se realiza en las etapas iniciales del desarrollo de la enfermedad. Como medida preventiva se emplea la vacunación, la cual confiere una protección del 100% durante el periodo de actuación de la vacuna (Borrego *et al.*, 2017).

La fotobacteriosis está provocada por dos subespecies de *Photobacterium damsela*, una de ellas es *P. damsela* subsp. *piscicida* agente causal de la pseudotuberculosis. Se han registrado altas tasas de mortalidad en cultivo de dorada de las áreas mediterráneas y atlánticas provocadas por esta subespecie (Magariños *et al.*, 1995; Essam *et al.*, 2016). La otra subespecie, *P. damsela* subsp. *damsela*, provoca úlceras en la piel, y es una enfermedad sistémica en un amplio rango de especies de peces, incluyendo a doradas (García-Rosado *et al.*, 2007; Labella *et al.*, 2011; Labella *et al.*, 2013).

Otras patologías bacterianas descritas en doradas cultivadas en el área mediterránea incluyen a infecciones provocadas por *Pseudomonas anguilliseptica* asociada a una septicemia hemorrágica llamada “Enfermedad de invierno”. Esta enfermedad se considera un problema multifactorial, en el que intervienen las alteraciones fisiológicas, inmunológicas y metabólicas asociadas a la baja tolerancia del cultivo de doradas en aguas con temperaturas inferiores a 15°C. No obstante, el constante aislamiento de *P. anguilliseptica* en peces afectados por la enfermedad de invierno revelan un papel relevante de este microorganismo en el desarrollo de la enfermedad (Tort *et al.*, 2004). Otra enfermedad, la epitlocistis es provocada por la bacteria intracelular *Chlamydia*. Parece ser una enfermedad estacional en las instalaciones acuícolas mediterráneas de cultivo de dorada, para la cual no hay tratamiento establecido, como alternativa los métodos usados se basan en disminuir los factores estresantes, y aumentar la calidad del agua de cultivo (Miyaki *et al.*, 1998).

En lo referente a las **enfermedades víricas**, la principal patología de origen viral descrita en doradas es la enfermedad de linfocistis, causada por el virus de la enfermedad de linfocistis, perteneciente a la familia *Iridoviridae*, que se manifiesta por la aparición de pequeños nódulos similares a tumores por la superficie corporal y aletas. Esta enfermedad no da lugar a episodios de alta mortalidad, pero la aparición de los síntomas impide la comercialización de los peces. provocado pérdidas económicas en las industrias acuícolas (Borrego *et al.*, 2015). La necrosis nerviosa viral (VNN) o encefalopatía y retinopatía viral, es la enfermedad provocada por el virus de la necrosis nerviosa (VNNV), perteneciente a la familia *Betanodaviridae*. Este virus tiene efecto a nivel del sistema nervioso, provocando daños en tejido cerebral y en la retina del pez,

resultando en la pérdida del equilibrio, natación errática, coordinación deficiente, hiperexcitabilidad a la luz y al ruido. La mortalidad puede alcanzar tasas del 100% en etapas larvarias y juveniles (Bitchava *et al.*, 2007; García-Rosado *et al.*, 2007). Las doradas parecen ser también susceptibles a otros virus (como aquareovirus y birnavirus), pero las infecciones suelen cursar de forma asintomática, actuando como portadores del virus (Castric *et al.*, 2001; Cherif *et al.*, 2009).

Finalmente, sólo algunas **infecciones fúngicas** se han publicado que afectan a los cultivos de dorada de la cuenca mediterránea. La infección por *Ichthyophonus* spp. provoca la aparición de úlceras y lesiones granulomatosas en órganos internos altamente vascularizados. Esta enfermedad cursa de forma crónica y su prevalencia parece estar relacionada con la edad del hospedador (Eletta, 2013). Las especies de hongos detectados más frecuentemente en el cultivo de dorada en Egipto son *Aspergillus*, *Cladosporium* y *Fusarium* (Abdel-Latif *et al.*, 2014).

Todas estas enfermedades han demostrado un papel primordial en la limitación de la eficiencia de la producción de cultivo intensivo de dorada en la zona mediterránea. Por ello, es importante conocer la etiología y epizootia de estas patologías para establecer medidas adecuadas para su prevención y control. En los últimos años, se ha logrado controlar muchas de las enfermedades infecciosas más graves mediante el uso de antimicrobianos, métodos físicos y el uso de vacunas. Debido al complejo conjunto de interacciones que facilita la propagación de la enfermedad es necesario las intervenciones a distintos niveles, mejorando las medidas de diagnóstico precoces y tratamiento, lo cual ayuda a abordar la relación patógeno-hospedador y permite mejorar la gestión de las instalaciones para controlar el sistema patógeno-medioambiente.

2. EL VIRUS DE LA ENFERMEDAD DE LINFOCISTIS (LCDV)

2.1. Clasificación, rango de hospedador y distribución geográfica

Los primeros estudios sobre la enfermedad de linfocistis (LCD) se remontan a 1904, cuando Woodcock hacía referencia al *Lymphocystis johnstonei* por confundir los huevos de este parásito con las células hipertrofiadas, signo característico de la enfermedad. Una década más tarde, Weissenberg determinó que el agente causal de esta enfermedad era un virus (citado por Wolf, 1988). La naturaleza vírica de la enfermedad fue confirmada por Walker (1962) empleando la microscopía electrónica, y los primeros aislados víricos se obtuvieron en cultivos celulares por Wolf *et al.* (1966). El agente etiológico de esta enfermedad es el virus de la enfermedad de linfocistis (LCDV), miembro del género *Lymphocystivirus*, que constituye uno de los seis géneros que conforman la familia *Iridoviridae*. Los géneros restantes son *Ranavirus* y *Megalocytivirus* (que infectan a anfibios, reptiles y peces), que consituyen junto a *Lymphocystivirus* la subfamilia *Alphairidovirinae*, y los tres géneros incluidos en la subfamilia *Betairidovirinae*, *Iridovirus*, *Chloriridovirus* y *Decapodiridovirus* (primariamente insectos y crustáceos) (Jancovich *et al.*, 2012; Chinchar *et al.*, 2017).

En el género *Lymphocystivirus* se han descrito hasta la fecha tres especies: *Lymphocystis disease virus 1* (LCDV1), aislado de platija europea (*Platichthys flesus*), *Lymphocystis disease virus 2* (LCDV-C), aislado de platija japonesa (*Paralichthys olivaceus*), y *Lymphocystis disease virus 3* (LCDV-Sa), aislado de dorada. Esta división, realizada por el Comité Internacional de Taxonomía Vírica (ICTV), se basa en diferentes características, como el tamaño del virión, perfiles proteicos, rango de hospedación, histopatología, análisis de la secuencia del DNA, entre otros (Jancovich *et al.*, 2012; Chinchar *et al.*, 2017). En el género también se incluyen otros virus candidatos como LCDV2, aislado de lenguadina (*Limanda limanda*), LCDV-RF, aislado de pez roca coreano (*Sebastes schlegeli*) o LCDV-PF, aislado de pez paraíso (*Macropodus opercularis*).

En la Figura 4 se muestran las relaciones filogenéticas entre los miembros de la Familia *Iridoviridae* (no incluye el género *Decapodiridovirus*, ya que, al ser de muy reciente creación, no existen secuencias genómicas disponibles).

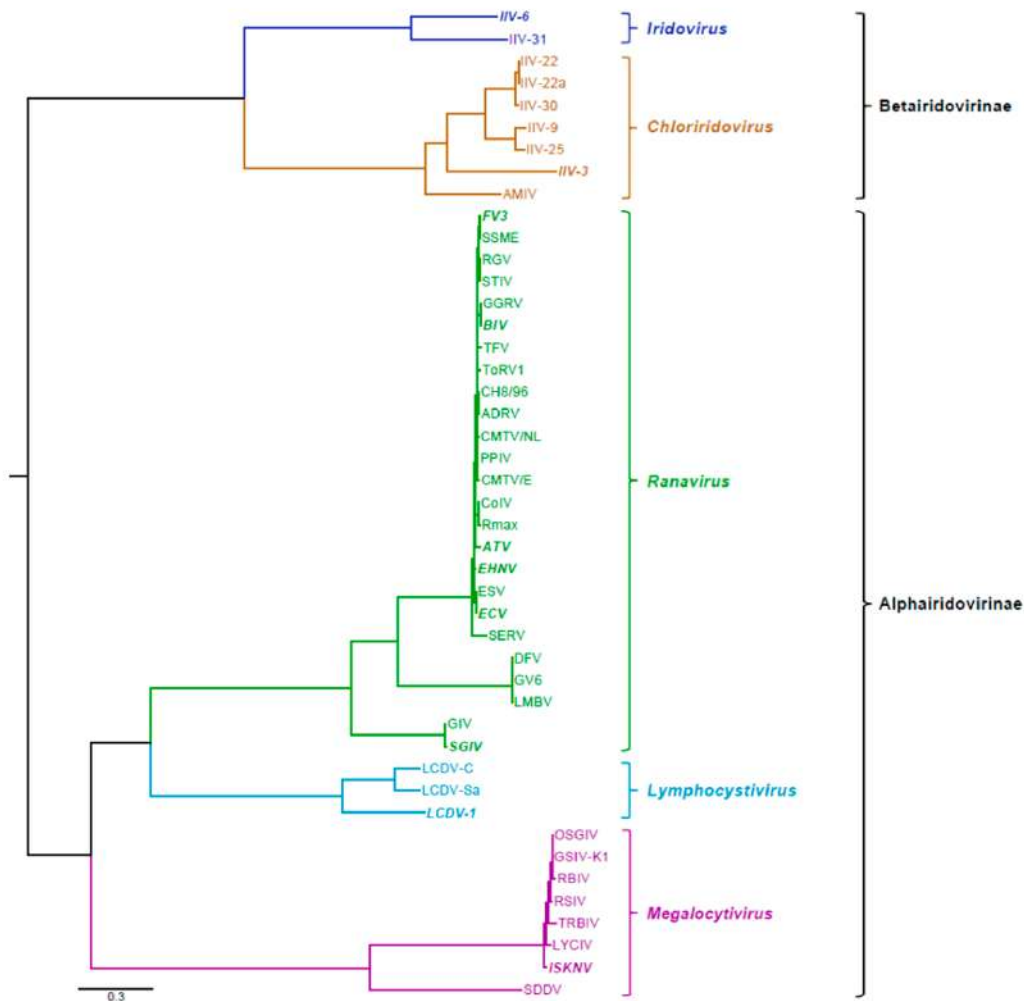


Figura 4. Filograma que representa las relaciones entre los miembros de la familia *Iridoviridae* que afectan vertebrados (subfamilia *Alphairidovirinae*) e invertebrados (subfamilia *Betairidovirinae*). Aparecen representadas las 3 especies reconocidas dentro del género *Lymphocystivirus*. Todos los nodos diferencian las dos subfamilias y los cinco géneros (modificada de ICTV, 2018).

Los estudios filogenéticos basados en la secuencia del gen que codifica para la proteína principal de la cápside (MCP) han demostrado la existencia de variabilidad genética dentro del género *Lymphocystivirus*, estableciéndose 9 genotipos que están relacionados con el rango de hospedador (Hossain *et al.*, 2008; Cano *et al.*, 2010; Palmer *et al.*, 2012).

2.2. Características morfológicas, estructurales y composición química

Los miembros del género *Lymphocystivirus* presentan viriones cuyo tamaño oscila entre 120-340 nm de diámetro (Paperna *et al.*, 2001; Bovo & Florio, 2008), constituyendo los virus de mayor tamaño de la familia *Iridoviridae*. Los diferentes aislados de LCDV presentan diferencias morfológicas que se han relacionado con la especificidad de hospedador (Berthiaume *et al.*, 1984). El LCDV es un virus icosaédrico (Figura 5), con una cápside bilaminar y un núcleo central (core) electrodenso de apariencia filamentosa (Madeley *et al.*, 1978) que muestra una simetría helicoidal (Heppell & Berthiaume, 1992). A microscopía electrónica, se puede observar que el núcleo central (core) electrodenso aparece separado de la cápside por la presencia de un material amorfo de menor densidad (10 a 20 nm de espesor), cuya función es desconocida (Berthiaume *et al.*, 1984). La estructura del virión la constituye una membrana interna de naturaleza lipoproteica (con un alto contenido en fosfolípidos) (Heppell & Berthiaume, 1992; Borrego *et al.*, 2015), y una cápside proteica constituida por subunidades de proteínas globulares dispuestas de manera lineal formando ángulos de 60-90° (Berthiaume *et al.*, 1984) (Figura 6).

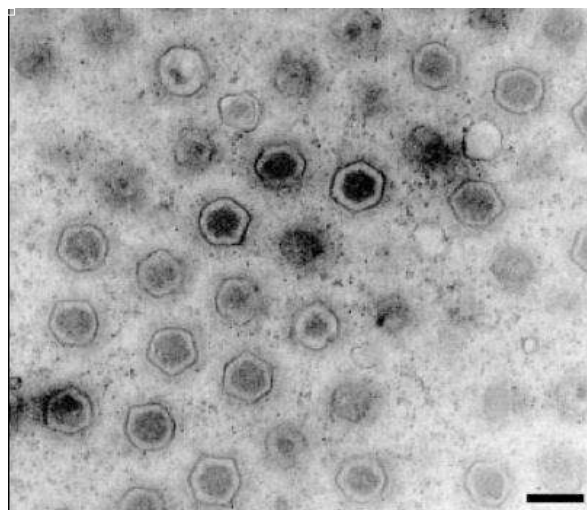


Figura 5. Micrografía a microscopía electrónica de transmisión de un aislado de dorada del virus de la enfermedad de linfocistis (LCDV-Sa) teñido con ácido fosfotúngstico (barra = 200 nm) (Alonso *et al.*, 2005).

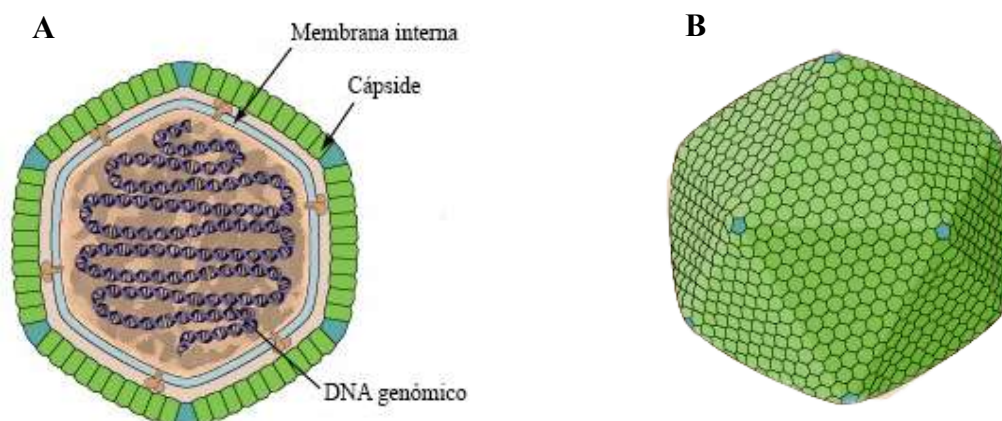


Figura 6. A: Organización estructural del virión de LCDV. B: Esquema tridimensional de un iridovirus (ViralZone, Swiss Institute of Bioinformatics).

Los viriones son termolábiles, y pueden ser inactivados con éter, glicerol, 5-iododesoxiuridina y tratamiento con luz UV. Sin embargo, son estables a un rango de pH 6-9 y resistentes a tratamientos con ultrasonidos (Iwamoto *et al.*, 2002; Borrego *et al.*, 2015). Están constituidos por un 42% de proteínas, un 17% de lípidos (un elevado porcentaje son fosfolípidos) y un 1,6% de ácido nucleico, estando el resto constituido por enzimas (Robin *et al.*, 1983; Borrego *et al.*, 2015). Mediante análisis electroforético en geles de poliacrilamida-SDS se ha descrito la presencia de 33 polipéptidos estructurales, con pesos moleculares que oscilan desde 4 hasta 220 kDa en viriones de LCDV1 aislados directamente de tumores de platija europea (Flügel *et al.*, 1982). Ahora bien, los viriones purificados procedentes de otras especies de peces mostraron un patrón electroforético distinto, constituido en el caso de los aislados de dorada (LCDV-Sa) por 23-31 polipéptidos de 30-210 kDa (García-Rosado *et al.*, 2004). Una característica común a todos los iridovirus es la presencia de una proteína estructural mayoritaria de unos 50 kDa, denominada proteína principal de la cápside (MCP), compuesta de 459 aminoácidos, que representa al menos el 40% del peso total de las proteínas víricas (Borrego *et al.*, 2015). La alta proporción de carbohidratos de los viriones sugiere la existencia de glucoproteínas, cuya presencia suele asociarse a virus con envuelta. Robin *et al.* (1986) identificaron al menos 10 glucoproteínas situadas tanto en la superficie como en zonas más internas de la estructura del virión. García-

Rosado *et al.* (2004) demostraron la presencia de 8 glucoproteínas en aislados de dorada, con pesos moleculares entre 76 y 210 kDa. Seis de estas glucoproteínas presentan un alto contenido en manosa, y las otras dos contienen una alta proporción de ácido siálico y N-acetilglucosamina, respectivamente. Aunque el virión de LCDV es una partícula sin envoltura, puede contener un 5-17% de lípidos que, al igual que ha sido descrito para otros iridovirus, se digieren fácilmente con un tratamiento con fosfolipasas (Chinchar *et al.*, 2005). Los lípidos que constituyen la estructura del virión no derivan de membranas celulares, sino que son producidos *de novo* durante la multiplicación intracelular del virus.

El genoma del LCDV está constituido por una molécula lineal de DNA de doble cadena de 102,6 kpb para LCDV1, 186,2 kpb para LCDV-C, y 208,5 kpb para LCDV-Sa, el mayor genoma conocido de iridovirus que infectan vertebrados. (Jancovich *et al.*, 2012; López-Bueno *et al.*, 2016). Este genoma se encuentra altamente metilado (hasta un 22%) en los residuos de citosina, presentando redundancia terminal, permutación circular y un contenido de GC entre el 27-33% (Darai *et al.*, 1983; Borrego *et al.*, 2015; López-Bueno *et al.*, 2016). Además, el DNA de LCDV1 presenta secuencias repetitivas e invertidas (Schnitzler & Darai, 1989). Los genomas de las tres especies reconocidas en el género están secuenciados. En cuanto a la capacidad codificante de estos genomas, se han descrito 195 marcos de lectura abierta (ORF) en LCDV1, mientras que LCDV-C presenta 240 ORFs, aunque solo 176 de ellos representan genes víricos putativos, y LCDV-Sa 183 ORFs (Jancovich *et al.*, 2012; López-Bueno *et al.*, 2016). Para el LCDV-1 hay una gran variedad de productos génicos que presentan homología con proteínas de función conocida, como enzimas y proteínas estructurales necesarias para la replicación y modificación del DNA, una DNA polimerasa (ORF 135R), una DNA metiltransferasa (ORF 005L), una endonucleasa de restricción específica para secuencias CCGG (ORF 178L), una endonucleasa estructural específica (ORF 191R), una ATPasa DNA dependiente (ORF 054R), dos ORFs (ORF 016L y ORF025L) que codifican para subunidades de la polimerasa vírica, y varias enzimas implicadas en el metabolismo de la célula hospedadora (ORF 027R, ORF 010L, ORF 080R, ORF 158L, ORF 137R, ORF 176L, ORF 136R y ORF 043R) (Essbauer *et al.*, 2004). En el caso de LCDV-C, Zhang *et al.* (2004) describieron 176 genes víricos putativos, de los cuales

103 presentan homología con ORFs correspondientes de LCDV1, y otros 73 no se encontraron en LCDV1 ni en otros iridovirus. Entre estos 73 genes, ocho muestran dominios conservados de proteínas celulares, como el dominio de reclutamiento de caspasas que participan en la señalización apoptótica (ORF 002L), la timidilato sintasa (ORF 011L), el dominio receptor del factor de necrosis tumoral (ORF 016L), o la transcriptasa inversa (ORF 051L). Muchos de los genes restantes no muestran ninguna homología significativa con secuencias registradas en las bases de datos (Borrego *et al.*, 2015). Por último, en el genoma de LCDV-Sa hay anotados 183 genes putativos, incluyendo ortólogos a los 26 genes que constituyen el core conservado del genoma de los iridovirus (Eaton *et al.*, 2007). De estos genes, 129 presentan homología con ORFs presentes en LCDV-C, mientras que tan solo diez eran similares a ORFs de LCDV1. También se han identificado cuatro ORF que codifican proteínas no identificadas hasta la fecha en ningún iridovirus, y que incluyen tres ORFs que presentan homología con genes de distintas especies de peces, como el ORF LCDV-Sa168L que muestra similitud con una proteína de función desconocida del *Cynoglossus semilaevis*, ORF LCDV-Sa179R similar a un factor de crecimiento similar a insulina de *Danio rerio*, y ORF LCDV-Sa017R que muestra similitud a un homólogo de Mcl-1 de *Notothenia coriiceps* (López-Bueno *et al.*, 2016).

2.3. Multiplicación viral

El mecanismo de replicación de LCDV no se conoce, aunque se ha podido determinar que la fase final de la morfogénesis de los viriones se lleva a cabo en el citoplasma celular (Williams *et al.*, 2000). No obstante, se ha propuesto al FV-3 (*Frogvirus 3*, especie tipo del género *Ranavirus*), como modelo de replicación de la familia *Iridoviridae* (Chinchar, 2002; Jancovich *et al.*, 2012). La entrada del virus al interior celular puede realizarse bien por fusión de la membrana lipídica del virión con la membrana plasmática celular, o por endocitosis mediada por receptor (Figura 7). El receptor celular para FV3 es desconocido, pero la entrada del virus se consigue mediante un proceso de endocitosis mediado por clatrina. En el caso del LCDV-C, se ha propuesto como receptor del virus a una proteína de 27,8 kDa asociada a beta-actina presente en la membrana plasmática de las células branquiales de la platija japonesa

(Wang *et al.*, 2011). Después del desnudamiento, el core vírico entra en el núcleo de la célula donde tiene lugar una transcripción temprana [transcritos tempranos inmediatos (IE) y transcritos tempranos retardados (DE)] mediante la acción de la RNA polimerasa II celular, y una primera replicación del DNA vírico. Los productos de los genes codificados por los transcritos víricos IE y DE incluyen tanto proteínas reguladoras como catalíticas, como la DNA polimerasa vírica y homólogos víricos a la RNA polimerasa II celular (Borrego *et al.*, 2015).

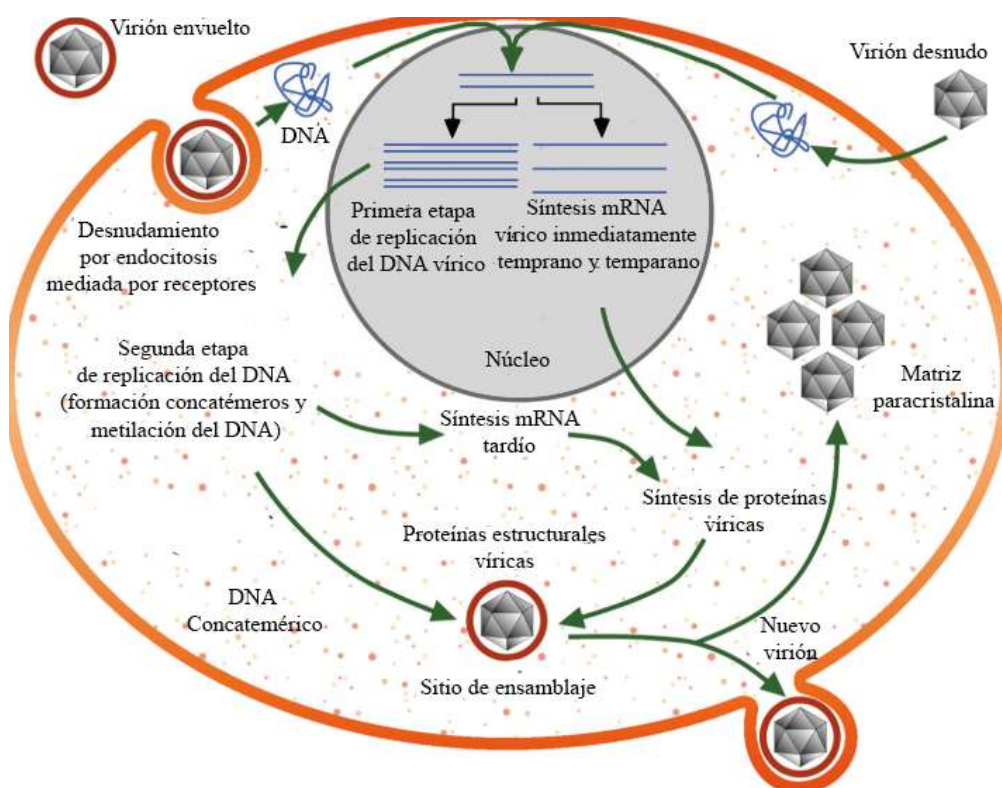


Figura 7. Ciclo de replicación de la familia *Iridoviridae*. El esquema corresponde al modelo propuesto para el FV-3 (*Ranavirus*) (Chinchar, 2002).

La DNA polimerasa vírica cataliza la primera ronda de síntesis de DNA vírico, y las moléculas de DNA que se han generado pueden servir de molde para nuevos ciclos de replicación de DNA y transcripción temprana, o bien ser transportadas al citoplasma donde se produce la segunda etapa de síntesis del DNA vírico. En el citoplasma, el DNA vírico se replica como largos concatémicos que posteriormente se procesan para dar lugar al DNA maduro durante su empaquetamiento (Chinchar, 2002). La metilación del

DNA vírico también ocurre en el citoplasma, por medio de una DNAmetiltransferasa codificada por el virus; y aunque su papel exacto es incierto, se ha sugerido que protege al DNA vírico de las endonucleasas celulares (Borrego *et al.*, 2015; Willis *et al.*, 1984). La transcripción de los genes víricos tardíos tiene lugar en el citoplasma y requiere la replicación previa del DNA. La morfogénesis de los viriones se realiza en sitios determinados del citoplasma. Después del ensamblaje, los viriones se acumulan en el citoplasma dentro de grandes matrices paracristalinas, liberándose posteriormente mediante lisis de la célula hospedadora o mediante gemación a través de la membrana plasmática celular (Chinchar, 2002).

3. LA ENFERMEDAD DE LINFOCISTIS

3.1. Sintomatología y patogénesis

La enfermedad de linfocistis (LCD) se ha descrito en más de 140 especies de teleósteos, pertenecientes a 42 familias y 9 órdenes diferentes, tanto peces de agua dulce como peces de agua marina (Anders, 1989; Cheng *et al.*, 2006; Borrego *et al.*, 2015). En cuanto a su distribución geográfica, también es bastante amplia, existiendo numerosos trabajos que describen su presencia en los cinco continentes (Weissenberg, 1965; Paperna, 1973; Anders, 1989; Wolf, 1988). En Europa, es una enfermedad endémica del Mar del Norte y del Mar Mediterráneo, afectando a peces salvajes y cultivados (Anders, 1989; García-Rosado *et al.*, 1999; Alonso *et al.*, 2005).

La LCD se caracteriza por la aparición de unos pequeños nódulos de color blanquecino localizados preferentemente en la superficie del cuerpo y aletas, que pueden aparecer de forma aislada o en forma de racimos, pudiendo cubrir todo el cuerpo del animal (Colorni & Diamant, 1995; Sarasquete *et al.*, 1998) (Figura 8). Estos nódulos también pueden aparecer en ojos, boca, branquias y, con menor frecuencia, en órganos internos como bazo, hígado, riñón, superficie intestinal, estómago y corazón (Wolf, 1988; Colorni & Diamant, 1995; Xing *et al.*, 2006). Es una enfermedad auto-limitada que, dependiendo de la especie hospedadora y de las condiciones ambientales, puede prolongarse por un tiempo variable (Williams *et al.*, 2000). Así, los peces de aguas

cálidas se recuperan generalmente después de varias semanas (Kvitt *et al.*, 2008; Cano *et al.*, 2009a). Cuando las lesiones remiten se aprecian cicatrices de color gris-azulado que acaban desapareciendo (García-Rosado, 2000). En aquellos individuos en los que han desaparecido los síntomas se ha observado que el virus persiste en el hospedador, detectándose antígenos y genomas víricos en dermis, riñón, bazo e hígado (Cano *et al.*, 2009a; Hossain *et al.*, 2009). También se ha demostrado que es muy frecuente que las infecciones por LCDV cursen de forma asintomática (Cano *et al.*, 2006; 2007; Ciulli *et al.*, 2015; Valverde *et al.*, 2016b).



Figura 8. Nódulos característicos de la enfermedad de linfocistis en (A) *Sparus aurata* (presente trabajo) y (B) *Paralichthy solivaceus* (Fuji *et al.*, 2006).

Cuando en una piscifactoría aparece un brote de LCD se produce una elevada morbilidad, lo que puede ocasionar importantes pérdidas económicas ya que la desfiguración de los animales impide su comercialización (Iwamoto *et al.*, 2002). Aunque no suele ser una enfermedad letal, se han producido casos de elevada mortalidad debido a situaciones de asfixia o inanición de los animales, sobre todo en peces juveniles (Xing *et al.*, 2006). Además, los peces enfermos experimentan un descenso del crecimiento y anemia, aumentando su susceptibilidad a infecciones bacterianas secundarias o a situaciones de canibalismo dentro de la propia población, factores que pueden incrementar las tasas de mortalidad (Borrego *et al.*, 2015). El LCDV presenta especial tropismo por células fibroblásticas (Miyazaki & Oota, 2002; Wolf, 1988). A nivel microscópico, es posible determinar que los nódulos están conformados por fibroblastos y osteoblastos del tejido conectivo intersticial (Walker,

1962; Borrego *et al.*, 2015). La célula infectada por el virus deja de dividirse y se hipertrofia incrementando su volumen 50.000 a 100.000 veces (Wolf, 1989). Cada célula fibroblástica hipertrofiada se denomina célula linfocística o linfociste (Cano *et al.*, 2009a), presenta un diámetro de 0,1-2 mm y en su citoplasma tiene lugar la replicación vírica (Borrego *et al.*, 2015). El aumento del tamaño de los linfocistes es debido a un incremento en el volumen del núcleo, nucleolos y citoplasma, consecuencia del desarrollo de cuerpos de inclusión citoplasmáticos (Hossain *et al.*, 2007). En relación a la respuesta inmune frente a la infección por el LCDV, se ha propuesto que al ser un virus que replica principalmente a nivel dérmico, aquella se produciría tardíamente en el curso de la infección (Chinchar *et al.*, 2009). De esta forma, se ha observado una respuesta inflamatoria a nivel del tejido conectivo, produciéndose una invasión de macrófagos y células epitelioides alrededor de las células hipertrofiadas, siendo esta respuesta más frecuente en la etapa final de las lesiones (Borrego *et al.*, 2015). También se ha detectado una respuesta humoral, que coincide con el comienzo de la regresión de las lesiones, con producción de anticuerpos anti-LCDV, con títulos más elevados en individuos recuperados que en peces enfermos (Cano, 2004).

3.2. Métodos de diagnóstico

Aunque la enfermedad de linfocistis produce infecciones benignas y autolimitadas, es objeto de preocupación en las piscifactorías debido a que no se pueden comercializar los peces afectados. Por ello, es importante la utilización de técnicas de diagnóstico rápidas y sensibles que permitan controlar la propagación de esta infección viral. Los métodos de diagnóstico rápidos son necesarios para la detección viral durante el curso de un brote, mientras que se requieren métodos más sensibles para detectar infecciones asintomáticas en peces portadores (Borrego *et al.*, 2015).

3.2.1. Cultivos celulares

Para la detección de virus, el método oficial establecido por la Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE) es el aislamiento de los mismos mediante el uso de líneas celulares susceptibles, y, posterior confirmación con técnicas serológicas o moleculares (OIE, 2018b). En el caso del LCDV, el principal problema encontrado es

su elevada especificidad de hospedador, que se traduce en una replicación más productiva en líneas celulares homólogas o derivadas de especies próximas a la especie hospedadora original, lo que limita el número de líneas celulares susceptibles (Wolf & Quimby, 1973). La primera línea celular utilizada para el cultivo del LCDV fue la línea celular BF-2 (células fibroblásticas procedentes de pedúnculo del pez sol, *Lepomis macrochirus*). Posteriormente, se han desarrollado otras líneas celulares susceptibles para el cultivo de distintos aislados de LCDV procedentes de diferentes especies de peces (Tabla 1).

Tabla 1. Líneas celulares susceptibles a diferentes aislados del LCDV.

Línea celular	Origen	Referencia
BF-2	Pez sol (<i>Lepomis macrochirus</i>)	Wolf <i>et al.</i> (1966)
LBF-1	Lubina negra (<i>Micropterus salmoide</i>)	Wolf <i>et al.</i> (1966)
SAF-1	Dorada (<i>Sparus aurata</i>)	Bejar <i>et al.</i> (1997)
HINAE	Platija japonesa (<i>Paralichthys olivaceus</i>)	Iwamoto <i>et al.</i> (2002)
GCO, GCK	Carpa herbívora (<i>Ctenopharynx godonidella</i>)	Zhang <i>et al.</i> (2003)
FG-9307	Platija japonesa (<i>Paralichthys olivaceus</i>)	Hu <i>et al.</i> (2004)

En cultivos celulares se puede determinar la capacidad de replicación del virus mediante observación de la aparición de efectos citopáticos. Los efectos citopáticos típicos producidos por la infección por LCDV consisten en un redondeamiento de la célula y/o hipertrofia, así como la posible aparición de cuerpos de inclusión citoplasmáticos. Estos efectos pueden observarse entre los 2-21 d post-inoculación, variando el tiempo según la carga vírica, el origen del virus y la línea celular empleada (García-Rosado *et al.*, 2000). Para realizar la titulación de stock víricos se lleva a cabo el cálculo del 50% de la dosis infectiva en cultivos celulares (TCID₅₀), obteniéndose títulos que oscilan entre 10⁶ y 10⁸ TCID₅₀/ml (Wolf *et al.*, 1966; García-Rosado, 2000; Valverde *et al.*, 2016a) y entre 10³-10⁵ TCID₅₀/ml tras un primer pase por células (García-Rosado, 2000; Valverde *et al.*, 2016a). Una propagación sucesiva del virus por cultivos celulares provoca generalmente una disminución en la infectividad del mismo,

que parece deberse a una replicación parcial del virus y, por tanto, a un ensamblaje defectuoso (Peters & Schmidt, 1995; Walker & Hill, 1980).

El empleo de cultivos celulares para la detección vírica presenta limitaciones, ya que la replicación del virus puede disminuir si la carga de partículas víricas es baja, si los viriones están inactivados, o incluso, por la propia citotoxicidad del inóculo (Koutna *et al.*, 2003).

3.2.2. Técnicas serológicas

La detección de antígenos víricos es una forma de diagnóstico rápida y práctica que presenta como ventaja el no requerir la presencia de virus infectivos. Técnicas como el inmunoblot y el ELISA permiten procesar múltiples muestras y son de fácil interpretación, por lo que pueden considerarse como técnicas rápidas, específicas y sensibles para detectar e identificar diferentes virus de peces (Qin *et al.*, 2002). Para la confirmación del LCDV a partir de cultivos celulares se han diseñado técnicas serológicas basadas en la inmunofluorescencia indirecta, citometría de flujo o inmunoblot (García-Rosado *et al.*, 2002; Cano *et al.*, 2006). Entre estas técnicas, el ensayo mediante inmunoblot es el que presenta mayor sensibilidad, permitiendo también el diagnóstico de LCDV en homogenizados de tejidos, tanto de doradas enfermas como asintomáticas, si bien en este último caso se requiere una amplificación previa en cultivos celulares durante 5 d (Cano *et al.*, 2006). En el caso de la platija japonesa, se han desarrollado anticuerpos monoclonales que permiten la identificación de portadores asintomáticos mediante el empleo de diversos ensayos inmunoenzimáticos (Xing *et al.*, 2006; Sheng *et al.*, 2012).

3.2.3. Técnicas moleculares

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es una técnica sensible, rápida y específica para la detección de virus en peces, constituyendo una gran herramienta para el diagnóstico de infecciones producidas por iridovirus (Grizzle *et al.*, 2003). Presenta una mayor sensibilidad que la obtenida mediante el uso de cultivos celulares, llegando a detectar 0,01 y 0,1 TCID₅₀ (Mikalsen *et al.*, 2001). Para la detección de los virus de

la familia *Iridoviridae* se han usado cebadores específicos para varios genes, pero principalmente para aquellos que codifican para la MCP (He *et al.*, 2001). Los resultados de la PCR se pueden confirmar utilizando técnicas complementarias como la hibridación en blot, basado en el uso de sondas marcadas cuya secuencia diana se encuentre dentro del amplicón de interés (Cano *et al.*, 2007).

En el caso del LCDV, se han desarrollado diferentes técnicas basadas en la PCR que permiten la detección del virus en distintas especies piscícolas, demostrándose también su utilidad para la identificación de portadores asintomáticos (Xing *et al.* 2006; Cano *et al.*, 2007; Hossain *et al.* 2007; Sheng *et al.* 2007). Sin embargo, estas técnicas no aportan datos cuantitativos que pueden ser de utilidad en estudios epidemiológicos y patológicos. Para determinar la carga viral se han desarrollado protocolos de PCR a tiempo real (Palmer *et al.*, 2012; Ciulli *et al.*, 2015; Valverde *et al.*, 2016b).

4. DESARROLLO DE MEDIDAS DE CONTROL

Mejorar la resistencia a las enfermedades infecciosas en los animales resulta prioritario para el avance de la acuicultura. Para lograr el desarrollo de estrategias profilácticas y/o tratamientos antivirales efectivos, es necesario el profundo conocimiento de los procesos patológicos, así como de la respuesta inmune del hospedador. Por ello, es preciso conocer en detalle la interacción patógeno-hospedador que se produce durante la infección. En general, la capacidad de los virus de producir la enfermedad en un animal depende de tres factores: la virulencia del virus, las condiciones ambientales y la susceptibilidad del hospedador.

La prevención y control de enfermedades víricas se basa en la aplicación de medidas profilácticas específicas (vacunas), o en su defecto, el empleo de estrategias generales de control que eviten la introducción del virus en el sistema de producción o permitan su eliminación (Yoshimizu, 2003; OIE, 2018a). También resulta útil aplicar prácticas de cultivo tendentes a minimizar el impacto de la infección vírica sobre las poblaciones de peces, que pueden incluir mejoras en las condiciones nutricionales, reducción del estrés asociado a alta densidad o manejo de los animales (OIE, 2018a).

Hoy día no existen medidas profilácticas adecuadas para el control de la enfermedad de linfocistis que puedan utilizarse en la acuicultura mediterránea. Existen algunas vacunas experimentales frente al LCDV-C, basadas tanto en el empleo de virus inactivados como de vacunas DNA, que han demostrado su capacidad protectora frente a infecciones experimentales en platija japonesa (Zheng *et al.*, 2006; Tian & Yu, 2011; Xu *et al.*, 2011). Sin embargo, no son aplicables frente a la infección por LCDV-Sa en doradas o en otras especies piscícolas, ya que los agentes etiológicos muestran gran divergencia en la secuencia de los genes que codifican para la expresión de la MCP (Cano *et al.*, 2010), siendo antigénicamente diferentes. Por tanto, para el control del LCDV-Sa en las piscifactorías mediterráneas se requiere evitar la introducción del virus en el sistema de cultivo, fundamentalmente mediante la identificación de portadores y reservorios del LCDV, así como la utilización de medidas higiénico-sanitarias que permitan su eliminación en distintos puntos del sistema.

La desinfección es una herramienta de uso habitual para el control de enfermedades en acuicultura, que se debe utilizar en los programas de bioseguridad para erradicar o excluir enfermedades específicas en las instalaciones de cultivo, y como una medida sanitaria sistemática para reducir la incidencia de enfermedades infecciosas en las piscifactorías (OIE, 2018a).

4.1. Antimicrobianos

Los patógenos bacterianos producen las enfermedades más problemáticas que afectan a la sanidad de los organismos acuáticos, causando por ende importantes pérdidas económicas. Hay miembros de los géneros *Vibrio*, *Nocardia*, *Aeromonas* y *Streptococcus* que son ubicuos en el ambiente y son contaminantes frecuentes de compuestos utilizados en la acuicultura (Shi *et al.*, 2012; Granada *et al.*, 2016). El crecimiento expansivo de la acuicultura trajo deficiencias en las industrias piscícolas, destacando el aumento de densidad, la falta de barreras sanitarias y la capacidad de aislar animales infectados, dando lugar a una rápida propagación de las infecciones. Todo esto llevó a que el uso de medidas profilácticas y tratamientos terapéuticos con antimicrobianos hayan aumentado a nivel mundial, a menudo para suplir la falta de adecuadas medidas sanitarias (Zheng *et al.*, 2012). El objetivo del empleo de

antimicrobianos es eliminar o disminuir el crecimiento bacteriano. Este grupo de compuestos naturales o sintéticos entran al medio ambiente (a través de las heces o restos en el pienso) provocando su acumulación en lagos, sedimentos marinos y peces salvajes (WHO, 2006; Sapkota *et al.*, 2008). El uso abusivo e inadecuado de antimicrobianos tiene asociado el problema del desarrollo de resistencias por parte de los microorganismos patógenos, situación muy preocupante no solo relacionada con la salud animal (Alcaide *et al.*, 2005), sino también con el riesgo potencial de transferencia de resistencia a patógenos humanos (Schnick, 2001; Huys *et al.*, 2007). Como alternativa, existen métodos inmunoprolácticos (vacunas) para algunos patógenos que provocan importantes enfermedades, sin embargo, muchas de esas medidas no son totalmente eficientes o para algunos casos no han sido desarrolladas (Granada *et al.*, 2016). En Europa, Norteamérica y Japón, las regulaciones sobre el uso de antimicrobianos en acuicultura son muy estrictas (Leston *et al.*, 2011), debido no solo a evitar resistencia a estos compuestos, sino también para evitar su acumulación en tejidos del pez, o a la depresión de su sistema inmune (Tu *et al.*, 2008). Todo esto ha dado lugar al desarrollo de estrategias alternativas para el control de enfermedades en la acuicultura (Gatlin, 2002).

4.2. Probióticos

La emergente crisis por la resistencia a antimicrobianos por microorganismos patógenos ha dado lugar al empleo de forma esporádica de los probióticos para el cultivo de doradas (Salinas *et al.*, 2008). El uso de probióticos permite desarrollar inmunocompetencia en los peces ayudándoles a combatir las enfermedades bacterianas y también a inhibir la colonización de patógenos potenciales en el tracto digestivo mediante exclusión por competencia (Austin & Austin, 2007). Los probióticos son adicionados al pienso, y tras su consumo modulan la respuesta inmune en los peces, favoreciendo la inducción de citoquinas pro-inflamatorias, estimulando la actividad de las células NK, incrementando la producción de anticuerpos a nivel sistémico y de mucosa, y activando la actividad fagocítica, lisosomal y del complemento (Matsuzaki & Chin, 2000). Hay estudios que han mostrado que el uso de una dieta rica en Lactobacil de forma individual o mezclado con Sporolac es efectivo en el control del LCDV en

platija japonesa, mejorando el estatus del sistema inmune, ya que aumenta e incrementa la respuesta inflamatoria y fagocítica (Harikrishnan *et al.*, 2010). Sin embargo, los probióticos son poco inmunogénicos y sensibles a determinadas condiciones de temperatura y salinidad, por lo que su uso puede verse limitado (Borrego *et al.*, 2017).

4.3. Inmunoprofilaxis

Desarrollar y promover métodos de producción que reduzcan o eliminen la necesidad de antimicrobianos, pesticidas y otros productos químicos, que pueden tener un gran impacto en hombres y peces y en la homeostasis ambiental, es necesario para conseguir una práctica sostenible de la acuicultura (Borrego *et al.*, 2017). Entre estos métodos, la vacunación es un sistema establecido, rentable y avanzado para controlar determinadas enfermedades dentro del sistema de la acuicultura marina. Esto permite disminuir la gravedad de las pérdidas provocadas por el desarrollo de las enfermedades. Además, reduce la necesidad del uso de antimicrobianos, no deja residuos y no induce la aparición de resistencia en microorganismos patógenos (Sommerset *et al.*, 2005).

5. PREVENCIÓN Y CONTROL DEL LCDV

En la acuicultura, al igual que en el sector ganadero, es importante disponer de medidas de control e higiene para prevenir la aparición de enfermedades, sobre todo las que son transmisibles. Para conseguir esto, es importante generar un buen nivel de inmunización, aumentando la resistencia frente a patógenos mediante el uso de vacunas, mejora genética, y práctica de medidas higiénicas y de desinfección. En el cultivo de peces, debe tener más importancia el desarrollo de medidas de prevención que las medidas terapéuticas, ya que son más económicas e impiden problemas de toxicidad del medio ambiente y de aportes de residuos de los cultivos al medioambiente (Martínez Milán & Fontanillas Pérez, 2017).

En el caso del virus de la enfermedad de linfocistis no existen tratamientos eficaces para su control. Además, los peces portadores asintomáticos y ciertos vectores (artemias y rotíferos) se comportan como reservorios del virus, favoreciendo la

aparición de brotes y su transmisión (Cano *et al.*, 2013; Valverde *et al.*, 2019). Por tanto, es importante establecer medidas de prevención a la exposición de los mismos, así como la detección precoz del virus mediante la aplicación de metodologías sensibles de detección, y la aplicación óptima de vacunas como métodos profilácticos (Larsen & Pedersen, 1997; Sommerset *et al.*, 2005).

Se han propuesto diferentes medidas para controlar el virus del linfocistis: zoonosanitarias, higiénicas, selección genética y vacunación.

5.1. Medidas zoonosanitarias

Se basan en la realización de un control y certificación de calidad e inocuidad del producto piscícola para evitar la propagación de enfermedades en las exportaciones/importaciones comerciales. Es una forma de evitar la transmisión de la enfermedad a otras zonas que puedan afectar a diversas especies piscícolas. En general, se adoptan muestreos en granjas para el diagnóstico de la enfermedad para poder realizar un certificado veterinario internacional conforme con los modelos aprobados por la OIE (OIE, 2018a), impidiéndose el comercio de animales afectados o supuestamente afectados por una determinada enfermedad. En el caso de las infecciones por LCDV estas medidas deben basarse en la utilización de técnicas de detección específicas y sensibles como se ha propuesto recientemente (Borrego *et al.*, 2015; Valverde *et al.*, 2016b; 2017b). También resulta útil aplicar prácticas de cultivo tendientes a minimizar el impacto de la infección vírica sobre las poblaciones de peces como, por ejemplo, reduciendo la densidad poblacional, cuyo efecto se traduce en una mejora de la inmunocompetencia debida a la disminución de la situación de estrés (Borrego *et al.*, 2001; 2015).

5.2. Medidas de higiene

En piscifactorías, cuando se produce un brote infeccioso la mejor opción para la erradicación completa de la enfermedad y evitar una recidiva se basa en la destrucción de las poblaciones infectadas, desinfección de todo el equipo e instalaciones y renovación de peces previamente verificados como libres de virus. En lo relacionado a

las medidas higiénicas se basan en: uso de indumentaria establecida para trabajar, establecer protocolos de desinfección tanto para visitantes como para trabajadores, establecer cuarentena de peces recién llegados, desinfección de los huevos, procesos de filtración y tratamiento del agua de cultivo, etc.

La gama de productos químicos comercializados como desinfectantes para uso en acuicultura (cuyos principios activos son básicamente peróxidos, yodóforos, hipoclorito sódico, hidróxido de sodio, amonios cuaternarios, y cloramina T) no es muy amplia, existiendo también procedimientos físicos como la luz ultravioleta o la ozonización, sólo aplicables a la desinfección del agua en sistemas de cultivo con recirculación (por ejemplo, en el cultivo larvario), la utilización de desinfectantes puede extenderse a los fomites de las propias instalaciones y al agua de cultivo, pero también es factible su aplicación a los huevos y al alimento vivo, siempre que su actividad sea compatible con la viabilidad de los organismos en tratamiento.

Para asegurar el éxito de los cultivos en las piscifactorías es clave introducir agua libre de patógenos. Para ello, el agua debe ser sometida a distintos tratamientos antes de ser incorporada a las instalaciones. De manera rutinaria se realizan procesos de filtración y clarificación del agua, basados en el empleo de filtros con tamaño de poro decreciente (OIE, 2018), que posteriormente puede someterse a tratamientos con luz UV y ozono que reducen la presencia de patógenos (Kasai *et al.*, 2002). Se ha comprobado que los miembros de la familia *Iridoviridae* (*Megalocytyivirus*, *Iridovirus*, *Ranavirus* y *Lymphocystivirus*) son sensibles a la luz UV y a procesos de ozonización del agua (Kasai *et al.*, 2002; Yoshimizu, 2003; Yoshimizu *et al.*, 2005).

La higienización de los huevos de los peces es también práctica común en muchas piscifactorías. Para el tratamiento de los huevos se utilizan generalmente compuestos yodados, peróxido de hidrógeno (H₂O₂), formalina, glutaraldehído o bromopol (Birkbeck *et al.*, 2006; Can *et al.*, 2010; El-Dakour *et al.*, 2015), siendo muy importante determinar la concentración y tiempo de exposición óptimos de los desinfectantes para asegurar la viabilidad de los huevos de cada especie (El-Dakour *et al.*, 2015). En el caso del LCDV, se ha constatado la eficacia del tratamiento con yodo

recomendado por la FAO (50 mg/l durante 10 min) (Moretti *et al.*, 1999) para la desinfección de huevos de dorada contaminados (Cano *et al.*, 2013).

El uso de rotíferos y artemias como presas vivas para la alimentación de los peces supone un riesgo importante de introducción de microorganismos infecciosos en los cultivos larvarios de los mismos, ya que actúan como reservorios, favoreciendo la propagación de los patógenos microbianos, entre ellos el LCDV (Cano *et al.*, 2009b; Valverde *et al.*, 2019). Diversos estudios han demostrado que el H₂O₂ constituye un buen desinfectante en acuicultura para tratar el alimento vivo (Gimenez *et al.*, 2006; Valles *et al.*, 2015).

Las medidas anteriormente comentadas están encaminadas a la obtención de un ambiente libre de patógenos en las piscifactorías. Sin embargo, los procesos de desinfección son igualmente necesarios para la erradicación del patógeno una vez que se ha producido un brote infeccioso en las instalaciones. El tratamiento de los efluentes previa su descarga al medio es vital para evitar una contaminación ambiental (Yoshimizu *et al.*, 2005). Para tratar esos vertidos se emplean soluciones de hidróxido de sodio y detergentes biodegradables, como por ejemplo el Teepol®, muy empleado en instalaciones que tienen circuitos de recirculación de agua (OIE, 2018). Por último, todo el material empleado en las instalaciones acuícolas (tanques, superficies de trabajo, equipos, vestimenta del personal, etc.) debe ser también objeto de desinfección. Para lograr tal fin, se pueden utilizar diversos desinfectantes como el hidróxido sódico, que se emplea para desinfectar la indumentaria y el equipo del personal; el hipoclorito sódico, utilizado para la desinfección de sistema de canales de cemento y tanques no porosos; los amonios cuaternarios, útiles en la desinfección de superficies de plástico, o los compuestos de peróxido como el Virkon, que permite la desinfección de todo tipo de superficies, equipos, pediluvios, etc. (OIE, 2018). El compuesto comercial Virkon presenta en su composición componentes peroxigenados (una sal triple de monopersulfato potásico, sulfato monopotásico y sulfato potásico), un detergente aniónico (dodecilbencenosulfonato sódico), ácidos orgánicos y estabilizantes inorgánicos, y es efectivo frente a un amplio rango de microorganismos patógenos, mostrando actividad bactericida, virucida y fungicida (Bryan *et al.*, 2009; Saklou *et al.*, 2016). En general, el rango de aplicaciones de cada producto suele ser especificado por

las propias casas comerciales. Sin embargo, los desinfectantes deben evaluarse para los agentes patógenos de interés y las condiciones de aplicación pertinentes (incluyendo temperatura, pH o presencia de materia orgánica) (Verner-Jeffreys *et al.*, 2009; OIE, 2018). Con respecto al LCDV no existe información de su susceptibilidad frente a agentes desinfectantes de uso en acuicultura, a excepción de su sensibilidad *in vitro* a la luz ultravioleta y al ozono (Yoshimizu, 2003), y a su eliminación en quistes comerciales de artemia mediante el proceso de descapsulación, que supone el uso de una mezcla de dos desinfectantes, hipoclorito sódico e hidróxido sódico (Cano *et al.*, 2009b).

5.3. Selección genética

Una posible estrategia para el control de las enfermedades infecciosas es la mejora genética de peces para aumentar la resistencia natural de los mismos. Básicamente, consiste en seleccionar estirpes de peces menos susceptibles al virus, por medio de investigación genética y análisis de ligamiento. Para ello se localizan e identifican loci de carácter cualitativo para la resistencia a la enfermedad de interés. Incluso la propia genética de los animales tiene efecto en la capacidad de actuación de los tratamientos profilácticos (Ramstad & Midtlyng, 2008). La selección asistida por marcadores (MAS) y/o la introgresión genética asistida por marcadores (MAI) usando marcadores de DNA permite mejorar los programas de cultivos en las piscifactorías. Hay numerosos estudios que han contribuido a programas de mejora genética mediante la identificación de loci que influyen en los caracteres cuantitativos de animales y cultivos (Elouafi *et al.*, 2001; Kwon *et al.*, 2001). Para determinar loci de forma individual que presentan importancia económica en el sector acuícola es necesario construir mapas de ligamiento genéticos basados en el uso de marcadores moleculares en un gran número de sitios del genoma (Fuji *et al.*, 2006). Estos mapas de ligamiento han facilitado el análisis de locus de un carácter cuantitativo que controlan características complejas como resistencia a enfermedades, crecimiento, fertilidad, etc. En el estudio realizado por Fuji *et al.* (2006) encontraron un locus asociado a la resistencia frente a la enfermedad de linfocistis en platija japonesa.

5.4. Vacunas

El uso de vacunas se ha planteado como alternativa a los tratamientos químicos en la lucha contra epizootias. Las vacunas con o sin inmunoestimulantes, estas últimas se emplean como adyuvantes para potenciar la acción de las vacunas, buscan aumentar los mecanismos inmunológicos de los peces confiriendo una protección específica a largo plazo contra una determinada infección antimicrobiana (Sommerset *et al.*, 2005). Esta estimulación del sistema inmune se basa en potenciar la inmunidad innata y aumentar la capacidad de respuesta de la inmunidad adaptativa en animales inmunocompetentes para evitar o controlar la infección, y conseguir la eliminación de los virus en peces portadores. Existen varios factores determinantes para la formulación de una vacuna ideal antiviral en peces (Leong & Fryer, 1993):

1. Que sean económicamente viables.
2. Que proporcione inmunoprotección adecuada en las condiciones de cultivo intensivo y cuando más susceptibles son a la enfermedad.
3. Conferir una rápida protección y de larga duración.
4. Proteger frente a variantes serológicas del agente etiológico de la enfermedad.
5. Que sean de fácil administración.
6. Ser seguras y de bajo coste de producción.

El desarrollo de una acuicultura sostenible depende del desarrollo y aplicación de planes de vacunación contra las enfermedades más predecibles (Brudeseth *et al.*, 2013). Un punto clave que se pretende abordar con la aplicación de vacunas frente al LCDV es la reducción y/o eliminación de los animales portadores, los cuales son los principales responsables de recidivas y de la transmisión vertical en el caso de los reproductores.

5.5.1. Vacunas de virus atenuados

Estas vacunas se desarrollan por la atenuación de una cepa salvaje del virus en condiciones especiales de cultivo *in vitro* o utilizando cepas no patogénicas o poco virulentas. El uso de vacunas de virus atenuados presenta una serie de ventajas con respecto a la de virus inactivados. Se puede administrar empleando como ruta de

administración el agua, esto permite disminuir las condiciones de estrés y los costes. Además, una vez administrada en el pez, este sufre procesos de replicación vírico, por lo cual la dosis requerida para conferirle protección es menor (Lorenzen & LaPatra, 2005). Estas vacunas tienen la ventaja de comportarse como infecciones naturales a la hora de estimular el sistema inmune, ya que una vez que replican tienden a estimular la producción de anticuerpos de larga duración. Sin embargo, aunque ha sido ensayada su efectividad en peces (Ronen *et al.*, 2003), las vacunas de virus atenuados pueden revertir a cepas virulentas y ocasionar enfermedades. Además, su liberación al medio ambiente no es compatible con las estrategias de control ambiental, ya que el virus atenuado puede ser avirulento para la especie que se vacuna, pero extremadamente virulento para otras especies de peces salvajes (Leong & Fryer, 1993; Biering *et al.*, 2005; Sommerset *et al.*, 2005). Por esas razones, la UE prohíbe el uso comercial de vacunas víricas atenuadas.

5.5.2. Vacunas de virus inactivados

Dado que estos virus deben replicarse en líneas celulares de peces, el coste de las vacunas de virus inactivados es elevado, tanto que esta estrategia generalmente no es económicamente viable (Lorenzen & LaPatra, 2005). El virus se inactiva empleando formalina, urea, tri-N-butilofosfato o 3-propiolactona en condiciones que aseguren la inactivación de la actividad replicativa. El desarrollo de estas vacunas requiere precaución en la metodología para asegurarse que no queden viriones infectivos que puedan desarrollar un proceso infeccioso. Además, el uso de estas vacunas no es práctico ya que confieren inmunidad a corto plazo y los anticuerpos no previenen de infecciones posteriores, lo que lleva a la necesidad de vacunación repetidas (“boosters”), que pueden provocar reacciones adversas en los peces vacunados (Leong & Fryer, 1993; Rodríguez Saint-Jean *et al.*, 2003). En lo referente al desarrollo de vacunas de virus inactivados frente al LCDV incluye una serie de problemas relacionados con la utilización de líneas celulares de peces susceptibles y por las diferencias existentes entre las especies que conforman el género *Lymphocystivirus* (Yoshimizu & Iwamoto, 2001; Iwamoto *et al.*, 2002; Zhang *et al.*, 2004). Para LCDV-C se han ensayado diferentes vacunas inactivadas con formalina o calor, que han demostrado cierta eficacia en la

prevención de LCD en platija japonesa (Yoshimizu & Iwamoto, 2001; Jang *et al.*, 2011; Xu *et al.*, 2011).

5.5.3. Vacunas de péptidos sintéticos

El uso de este tipo de vacunas presenta una serie de ventajas comparada con las anteriores ya comentadas, ya que son más estables y de fácil producción mediante el empleo de la tecnología de DNA recombinante o síntesis de péptidos. Además, se pueden diseñar para tener mayor estabilidad y aumentar la interacción con los receptores de las células T y B. En general, se producen a partir de la síntesis de péptidos identificados como esenciales para desencadenar la respuesta inmunológica. Esta tecnología permite la construcción de vacunas frente a virus cuando se identifican los epítopos reconocidos por las células T y B de los peces (Leong & Fryer, 1993). Estas vacunas no son muy empleadas en acuicultura ya que se requiere más información sobre la respuesta inmune en teleósteos y el papel de las células inmunitarias (Rodríguez Saint-Jean *et al.*, 2003).

5.5.4. Vacunas DNA

Se basan en el uso de un plásmido de expresión en el que se clona uno o varios genes víricos que codifican proteínas inmunogénicas del patógeno. El resultado es el mismo que en una infección natural, ya que se produce una proteína correctamente plegada y glicosilada por las células del hospedador, y la presencia del inmunógeno induce una respuesta inmune específica. En comparación con las vacunas convencionales, las vacunas DNA tiene muchas más ventajas. En primer lugar, poseen capacidad intrínseca inmunoestimulante porque son ricas en secuencias CpGs (Coombes & Mahony, 2001). Segundo, permite el desarrollo de vacunas multivalentes, proporcionando resistencia a varios patógenos por la construcción de un vector que contenga varios antígenos diana. Tercero, se pueden producir en grandes cantidades y dirigirlas a enfermedades concretas (Heppell & Davis, 2000). En definitiva, las vacunas DNA, además de no provocar efectos secundarios negativos, son de fácil producción, muy estables y económicas (Manoj *et al.*, 2004).

Los ensayos realizados en peces indican que las vacunas DNA desencadenan una respuesta inmune defensiva en los peces vacunados, y que rara vez se integran en el genoma del hospedador, y además tienen baja probabilidad de producir tumores (Lorenzen & LaPatra, 2005; Tian & Yu, 2011). De hecho, estas vacunas DNA son protectoras cuando se utiliza en pequeñas dosis, son eficaces muy precozmente, entre los 4 y 8 d post-vacunación, y pueden desencadenar una memoria inmunológica hasta 2 años post-vacunación (Kurath, 2005).

Se está debatiendo problemas asociados al uso de estas vacunas, como el tiempo de duración de la protección, la presencia de un plásmido DNA y su distribución en el organismo del hospedador, así como la dosis necesaria a administrar para producir el efecto deseado, o los conflictos éticos con las calificación y diferenciación entre organismo modificados genéticamente y los vacunados con DNA (Gillund *et al.*, 2004; Lorenzen & LaPatra, 2005).

Las vacunas DNA son las que *a priori* mejor pueden utilizarse para prevenir infecciones víricas, ya que la expresión de la proteína vírica se produce dentro de la célula. Las células presentadoras del antígeno que contienen el plásmido DNA pueden transcribir y traducir el transgen para producir las proteínas inmunogénicas, esto simulará la infección de un patógeno intracelular y permitirá la presentación del antígeno por parte de los MHC de clase I. Estas células también pueden captar antígenos solubles liberados por otras células, procesarlo y presentarlo a través de MHC tipo II, dando lugar a una respuesta inmune protectora que implica la activación de células T cooperadoras tipo Th0 (CD 4+) y las células T citotóxicas (CD 8+) específicas (Heppell & Davis, 2000; Takano *et al.*, 2004; Tonheim *et al.*, 2008b). En general, su efecto sería el mismo que el que produce las vacunas de virus atenuados, pero sin los problemas asociado a las situaciones de reversión vírica (Jiménez *et al.*, 2005). En determinados estudios sobre la vacunación DNA en peces se ha podido determinar que esta forma de vacunación estimula la inmunidad vía interferón tipo I (Verjan *et al.*, 2008; Chico *et al.*, 2009), además de la expresión de citoquinas como las interleuquina 1 β , el factor de crecimiento transformante β , el receptor de células T $\gamma/\beta/\alpha$, IFN- γ , factor de necrosis tumoral α e interleuquina 6 entre otros (Chico *et al.*, 2009; Ortega-Villaizan *et al.*,

2009). Una de las características de las vacunas DNA es su capacidad de estimular tanto las respuestas inmunes celulares como humorales.

Los principales criterios aplicables al desarrollo de una vacuna DNA para enfermedades de origen viral de especies acuáticas deben incluir los siguientes criterios (Tonheim *et al.*, 2008b; Evensen & Leong, 2013):

1. La identificación de un antígeno vírico inmunogénico como el antígeno inmunoprotectivo.
2. La expresión del antígeno en el sitio de inyección y/o órganos inmunocompetentes.
3. El correcto procesamiento de la proteína vírica.
4. La identificación y caracterización de un promotor.
5. Duración de la expresión.
6. Facilidad en la administración, sobre todo, en peces de pequeño tamaño.
7. Dosis mínima requerida para dar lugar a la inmunización.
8. Persistencia de la vacuna en animales vacunados.
9. Ausencia de la integración de la vacuna DNA dentro del material genético del pez vacunado.
10. Duración de la inmunidad.
11. Inocuidad para el consumo humano.
12. Identificar actividades de reactividad cruzada de diferentes serotipos del virus patógeno.

Hasta hace poco no se conocía el destino del plásmido DNA una vez administrado. Sin embargo, recientes estudios (Tonheim *et al.*, 2008a) han podido determinar que la distribución puede dividirse en cuatro compartimentos corporales tras la inyección intramuscular. El plásmido DNA pasa al medio extracelular desde el punto de administración, aquí puede ser degradado localmente o transferirse al sistema circulatorio y distribuirse a otros órganos y tejidos. También, desde el sitio de administración puede ser absorbido por las células adyacentes, y una vez ahí puede ser degradado o redistribuirse a otros órganos y tejidos a través de la migración celular (Figura 9).

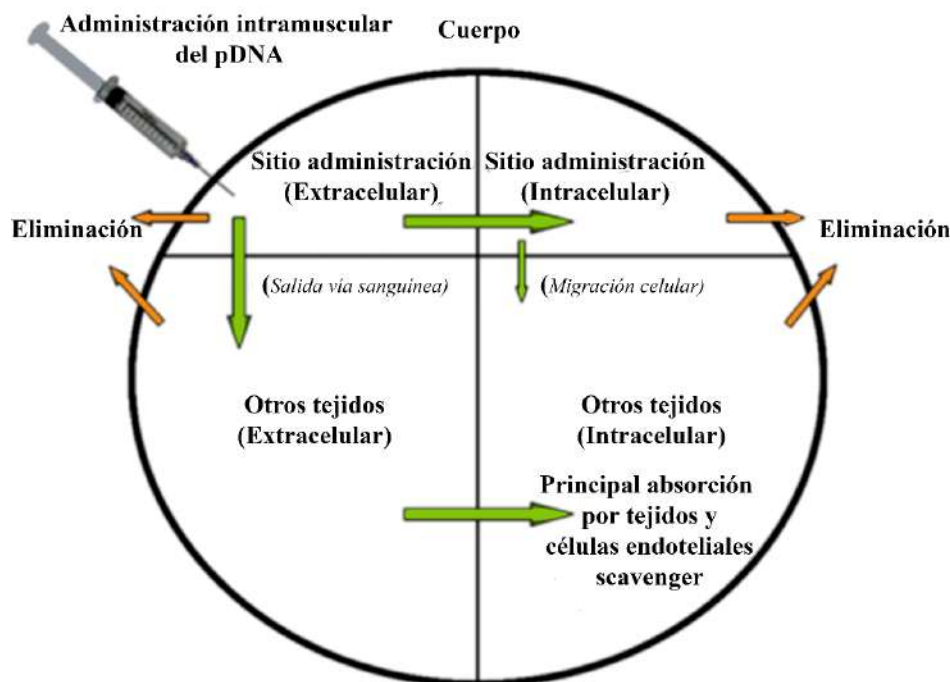


Figura 9. Posibles rutas de distribución del plásmido vacunal tras su administración mediante inyección intramuscular (modificada de Tonheim *et al.* 2008a).

Las primeras vacunas DNA para peces se diseñaron frente al IHNV en salmón atlántico. El plásmido contiene un gen que codifica la proteína G del virus, regulado por el promotor temprano del citomegalovirus y se administran por vía intramuscular (Salonius *et al.*, 2007). En el caso del virus de la enfermedad de linfocistis se han desarrollando vacunas DNA para la prevención de la LCD en platija japonesa que contienen el gen que codifica para la MCP del LCDV-C (Zheng *et al.*, 2006; Tian *et al.*, 2008). El estudio y desarrollo de métodos de administración de las vacunas DNA será un punto importante, buscando combinar las ventajas y beneficios de estas vacunas con sistemas de administración adecuados para el uso más cómodo y eficaz en las instalaciones acuícolas (Hølvold *et al.*, 2014).

6. MECANISMO DE RESPUESTA INMUNE EN PECES

El sistema inmune es el responsable de la eliminación de patógenos capaces de causar enfermedades en los hospedadores. Para ello, es necesaria la coordinación de los componentes del sistema inmune innato (SIIn) y adaptativo (SIAd). El SIIn consta de mecanismos de reconocimientos no específicos propios de la especie, por tanto heredable, que actúan de forma inmediata pero son de corta duración (Alvarez-Pellitero, 2008). En lo referente al SIAd, la especificidad de su acción se produce somáticamente durante la ontogenia, es decir, que no es heredable y refleja la experiencia inmune de cada uno de los individuos. La activación del SIAd es más lenta y requiere de la síntesis de proteínas, la proliferación celular y la selección de determinados receptores (Randelli *et al.*, 2008).

Los teleósteos son el grupo de vertebrados más ancestral que tienen el sistema inmune y hematopoyéticos bien desarrollados (Flajnik, 1996). Estudios de la respuesta inmune en el hospedador frente a la infección por virus, sugiere que los mamíferos y peces son más o menos similares en lo referente a los principales mecanismos de la respuesta inmune innata y adaptativa. Como todos los vertebrados, los peces tienen una respuesta inmune celular y humoral, pero dependen completamente de su inmunidad innata para la defensa de patógenos debido a que su sistema inmune adaptativo es muy limitado (Esteban *et al.*, 2005). Ambas respuestas inmunes están medidas por una variedad de células y compuestos secretados, tales como linfocitos, fagocitos (macrófagos, neutrófilos y eosinófilos), células auxiliares (basófilos y mastocitos) y citoquinas. El desarrollo de esa interacción virus-hospedador dependerá de la capacidad del hospedador de inducir una fuerte respuesta inmune, y de la capacidad del virus de poseer unos factores de virulencia que le permitan replicar antes de que se produzca la respuesta inmune, o, la presencia de mecanismo de evasión que les permita replicar una vez activada la respuesta inmune (Workenhe *et al.*, 2010). Las branquias de los peces están continuamente expuestas al agua, sirviendo como vehículo de transmisión de muchos virus. Casi todas las familias de virus excepto *Bunyaviridae*, *Flaviviridae*, *Parvoviridae* y *Poxviridae* infectan a peces teleósteos (Essbauer & Ahne, 2001), sin embargo, la severidad de la enfermedad, la importancia del impacto económico y la tasa de mortalidad varían entre los diferentes virus.

Los teleósteos, a diferencia de los vertebrados superiores, no presentan médula ósea ni ganglios linfáticos como órganos linfoides primarios y secundarios. La mielopoyesis en teleósteos ocurre a nivel de riñón cefálico y/o bazo. En peces, el timo, el riñón y el bazo son considerados los principales órganos linfoides (Rombout *et al.*, 2005). El riñón en términos de morfología y funcionamiento es similar a la médula ósea de mamíferos, teniendo un papel importante en la hematopoyesis, y junto con el timo son los órganos primarios de la producción de linfocitos T y B. Además, el riñón actúa como órgano linfoide secundario implicado en procesos de fagocitosis y procesamiento de antígeno y es un sitio importante en la producción de anticuerpos (Meseguer *et al.*, 1995; Whyte, 2007). El bazo también está implicado en la eliminación de antígenos y complejos inmunitarios de la sangre, además de desempeñar un papel en la presentación de antígenos y en el inicio de la respuesta inmunitaria adaptativa (Secombes & Wang, 2012; Whyte, 2007). A pesar de las diferencias en el sistema inmune de mamífero y peces, sobre todo por la menor complejidad funcional de estos últimos, la persistencia en el medio acuático de los peces está relacionado con el éxito de su sistema inmunológico (Tort *et al.*, 2003).

6.1. Sistema inmune innato en peces

Es el mecanismo de primordial importancia en la respuesta defensiva de los peces. Se encuentra dividido en compartimentos que constan de la barrera epitelial/mucosa, los componentes humorales y los elementos celulares. La barrera epitelial y la mucosa de la piel, branquias y tracto digestivo desempeñan un papel importante en la protección de los peces frente a infecciones, ya que se encuentran en contacto continuo con medios donde proliferan agentes microbianos que pueden resultar ser potencialmente patógenos. El mucus de los peces aparte de conferir una protección física y mecánica aportan elementos inmunes defensivos como péptidos antimicrobianos, inmunoglobulinas y componentes del sistema complemento (Subramanian *et al.*, 2007; 2008).

Los componentes humorales se expresan como receptores moleculares o compuestos solubles de secreción. Entre estos compuestos se encuentra el sistema complemento, con las vías clásicas, alternativa y lectina, encargándose de la activación

de la fagocitosis por opsonización de patógenos, determina el ataque a membranas y lisis celular, y la activación en última instancia del SIAd (Boshra *et al.*, 2006). Otros de los componentes de la respuesta humoral innata son las lectinas, con actividad antibacteriana, que actúan como opsoninas (Russell & Lumsden, 2005), y las pentraxinas (proteína C reactiva y amiloide P sérico), que son proteínas de reconocimiento de patógenos y componentes de la respuesta de fase aguda (Bayne & Gerwick, 2001). Hay otros elementos como los péptidos antimicrobianos e inhibidores de proteasas que bloquean las enzimas líticas de los patógenos, y junto con la transferrina actúan conjuntamente para ralentizar o bloquear el crecimiento bacteriano (Stafford & Belasevic, 2003). En lo referente a los mecanismos antivíricos, el mecanismo más importante es el sistema interferón, que es el único que actúa de manera específica contra infecciones víricas (Fernandez-Trujillo *et al.*, 2008a). Por tanto, el SIIn es el responsable de la detección temprana de los patrones moleculares asociados a virus (VAMPs) empleando un conjunto de receptores de reconocimiento de los patrones (PRRs) (Takeuchi & Akira, 2007; Thompson & Locarnini, 2007). Los principales VAMPs de los virus son el RNAbc, RNAmc y las glicoproteínas víricas (Randall & Goodbourn, 2008). La producción y presentación de los VAMPs puede ocurrir en cualquiera de las múltiples etapas del ciclo de replicación/infectivo viral (Thompson & Locarnini, 2007). La unión de VAMPs a PRRs desencadenan una transcripción en las células infectadas (Boltaña *et al.*, 2011).

Otros tipos de PRRs muy importantes son los asociados a membranas, conocidos como receptores Toll-like (TLRs). Los TLRs de teleósteos poseen similar organización, expresión y característica de ligando a la de los mamíferos (Bricknell & Dalmo, 2005). La especificidad de TLR2, 3 y 5 se conserva entre mamíferos y peces, reconociendo lipopéptidos, RNA bc y flagelina, respectivamente (Ribeiro *et al.*, 2010; Matsuo *et al.*, 2008). Además, se ha demostrado que el TLR22 específico de peces reconoce el RNA bc y PolyI:C (Matsuo *et al.*, 2008). Estas similitudes no se mantienen con algunos de los componentes humorales ya comentados, como el caso de las proteínas del sistema complemento, o proteínas C reactivas, que presentan una mayor diversidad estructural y funcional (Sunyer *et al.*, 1997; Gisladdottir *et al.*, 2009). Esta diversidad puede ser determinante del aumento de la capacidad de reconocimiento del SIIn en peces. El

reconocimiento de los VAMPs o PAMPs (en el caso de bacterias) por los PRRs y la interacción entre los diferentes receptores, permite al SIIIn diferenciar entre distintas clases de patógenos y formar la respuesta inmune adecuada a través de una cascada de señales que desencadenan la activación de citoquinas inflamatorias, quimiocinas y moléculas con actividad antiviral y antimicrobianas (Akira & Takeda, 2004).

Las citoquinas están implicadas en las respuestas inflamatorias y comprende una amplia familia de proteínas secretadas por diversos tipos celulares (células endoteliales, macrófagos, células NK, neutrófilos y células epiteliales). En mamíferos, el factor de necrosis tumoral α (TNF α) y la interleuquina-1 β (IL-1 β) son las principales moléculas implicadas en la iniciación y regulación de este proceso. El TNF α interviene en la resistencia frente a patógenos víricos, bacterianos y parásitos (Secombes *et al.*, 2001), mientras que, la IL-1 β , actúa a nivel de la regulación de la respuesta inmune, iniciando y/o incrementando la expresión de una gran variedad de genes asociados a los procesos de inflamación. Hay estudios que demuestran que la respuesta por parte del TNF α frente a PAMPs (LPS bacterianos) da lugar a la estimulación de la producción de citoquinas en peces (Boltana *et al.*, 2016). Otras citoquinas importantes identificadas en peces son las IL-6, IL-2, IL-8 y los interferones. La IL-6 constituye una de las citoquinas más pleiotrópicas de la respuesta inmune, tanto innata como adaptativa, mientras que las IL-2 e IL-8 son necesarias para la diferenciación de linfocitos T durante la respuesta inmune adaptativa (Huising *et al.*, 2004; Secombes *et al.*, 2001).

En los teleósteos, las principales células efectoras del SIIIn son los granulocitos y el sistema monocito/macrófago (actividad fagocítica). Además, también poseen células citotóxicas no específicas (NSCC) que actúan contra células infectadas por virus (Ellis, 2001). Los fagocitos son estimulados por la unión a VAMPs o PAMPs mediante receptores específicos, o bien, por la liberación de especies reactivas de oxígeno u óxido nítrico que resultan de la infección de células por microorganismos. La activación de estas células inducirá la respuesta de las citoquinas, factores claves en la respuesta inmune (Figura 10).

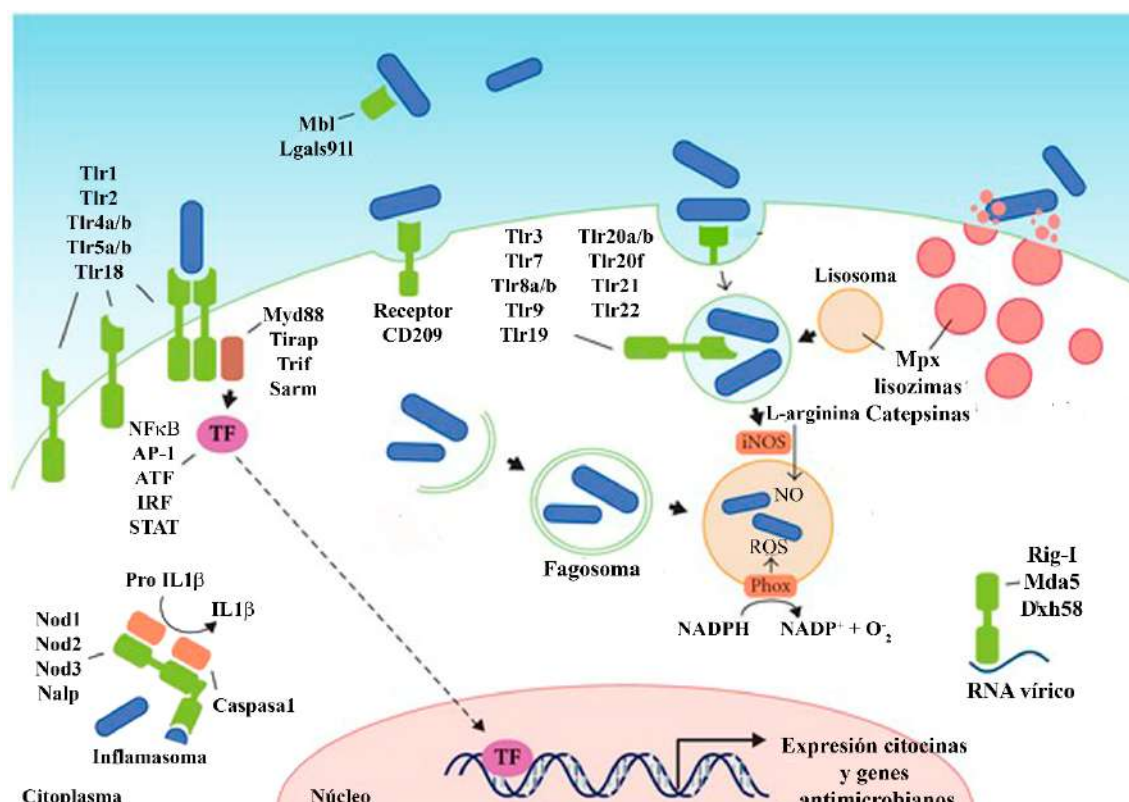


Figura 10. Receptores de reconocimiento de patrones (PRRs) y mecanismos efectores del sistema inmune innato (modificada de Van Der Vaart *et al.*, 2012).

6.1.1. Sistema interferón en peces

El SIIIn de los vertebrados presenta un mecanismo muy efectivo de respuesta antiviral mediado por interferón (IFN). El IFN tipo I, incluye IFN- α/β , se induce por la infección viral en la mayoría de tipos celulares, mientras que el IFN tipo II (IFN- γ) es producido por las células NK estimuladas por las citoquinas IL-2 y/o IL-8 (Shtrichman & Samuel, 2001). Las dos familias de IFN, tipo I y tipo II, se diferencian en base a la secuencia, estructura proteica y propiedades funcionales (Pestka *et al.*, 2004). El IFN tipo II desempeña un papel importante en la inmunidad adaptativa celular, en la que es producido por los linfocitos Th1 (helper), y linfocitos T citotóxicos CD8+ en respuesta a los antígenos presentados por el MHC. En algunos estudios, se ha demostrado que el IFN tipo I de algunas especies de teleósteos induce un estado antiviral tanto *in vivo* como en cultivos celulares. Al clonar genes del interferón de dorada se observó que existía tanto una inducción de estos genes por infección víricas, como por elementos

estimuladores de IFN (poli I:C u oligodesoxinucleótidos CpG) (Robertsen *et al.*, 2006; 2008; Kileng *et al.*, 2007; McBeath *et al.*, 2007; Buonocore *et al.*, 2011).

La acción antiviral del IFN tipo I en mamíferos está mediada por una cascada de señales que se inicia con el reconocimiento de antígenos víricos a cargos de diversos PRRs (Figura 11). Los principales sensores virales de la mayoría de células nucleadas de mamíferos son las RNA helicasas citoplasmáticas RIG-1 y Mda-5, y se basan en el reconocimiento de RNA mc y bc (Takeuchi & Akira, 2007). La unión del RNA a los receptores hace que el dominio de reclutamiento de caspasas (CAD) interactúe con el estimulador-1 del promotor del IFN- β (IPS-1), denominado también como MAVS, y el cual transmitirá la señal a través de distintos componentes hasta producir la activación de factores de crecimiento como el factor regulatorio de interferón 3 y 7 (IRF-3 y IRF-7) y factor nuclear kappa B (NF- κ B). Estos componentes se translocarán al núcleo donde como resultado final activarán la transcripción del gen *ifn- β* (Workenhe *et al.*, 2010). Varios estudios han podido determinar la existencia de secuencias EST similares a RIG-1 y Mda-5 en doradas, salmónidos y carpa dorada (Zhang *et al.*, 2007; Biacchesi *et al.*, 2009). En lo concerniente a IPS-1, se ha demostrado que esta proteína mitocondrial es ortóloga a la MAVS de mamíferos, y que la sobre-expresión en las células de pez da lugar a una inducción constitutiva de IFN y otros genes inducidos por interferón (ISG), conllevando a una protección frente a infecciones por virus RNA (Biacchesi *et al.*, 2009).

Otro grupo de PRRs que reconocen patrones moleculares asociado a patógenos víricos son los TLRs (Figura 11). Algunos de estos receptores pueden aparecer en vesículas citoplasmáticas como los endosomas o en el retículo endoplasmático, llevando a cabo el reconocimiento de ácido nucleicos víricos (Uematsu & Akira, 2007). De los distintos TLRs que reconocen a los virus, los TLR3 presentes en macrófagos se encargan de detectar el RNAbc, mientras que los TLR7 y TLR9, presentes en células dendríticas plasmocitoides, reconocen RNAmc y DNA no metilado rico en CpG (Takeuchi & Akira, 2007). En este caso, tras el reconocimiento del RNA bc por parte del TLR3 se inicia una cascada de señales que lleva a la activación coordinada de IRF-3 y NF- κ B (Workenhe *et al.*, 2010). Sin embargo, el reconocimiento de los VAMPs por parte de los TLR7 y TLR9 llevan a la activación del IRF-7 a través de la vía MyD88,

resultando en la activación final de genes de *ifn- α/β* , y de citoquinas pro-inflamatorias (Bonjardim *et al.*, 2009; Workenhe *et al.*, 2010). Existen otros TLRs asociados a superficie celular (TLR2 y TLR4) que son capaces de reconocer proteínas de la envuelta de los virus (Kurt-Jones *et al.*, 2004). También se ha descrito que existe el TLR5, el cual reconoce flagelina, producto del gen *fliC* componente principal del filamento helicoidal del flagelo bacteriano. Esto evidencia un prototipo de inmunidad humoral que se encuentra conservada en peces (Randon-Barragan, 2009).

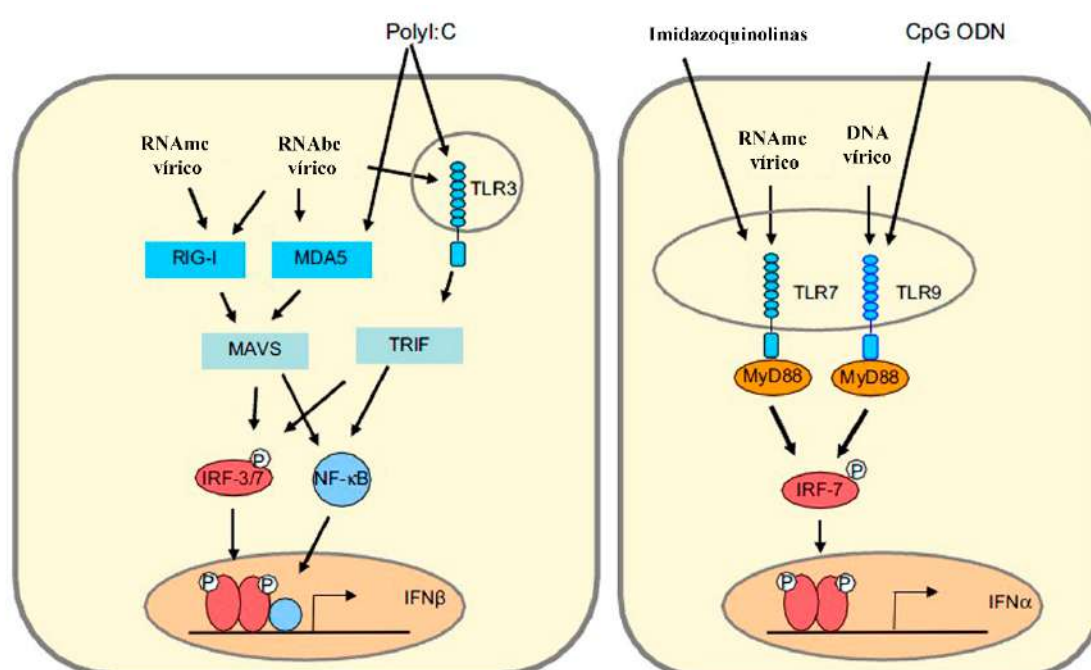


Figura 11. Sensores virales y cascada de señalización que conduce a la activación de la expresión de los genes codificantes del IFN tipo I en células de mamíferos (modificada de Robertsen, 2008).

La secreción de IFN- α/β por parte de las células infectadas tiene como misión activar la transcripción de un conjunto de más de 200 genes, algunos de los cuales codifican proteínas antivíricas. En lo referente a los ISG en peces, los que presentan una potencial actividad antivírica son la proteína Mx, la proteína quinasa dependiente de RNA (PKR) (Zhang *et al.*, 2007), la proteína Vig-1 (similar a viperina de células humanas), la ISG-15 (proteína similar a ubiquitina) (Wang *et al.*, 2007; Sun *et al.*, 2011), y la proteína antiviral (GBP) (Sun *et al.*, 2011).

La proteína Mx es una de las proteínas inducidas por IFN más estudiadas, ya que su actividad antiviral se ha demostrado de forma directa en especies tan importantes para la acuicultura como es la platija japonesa (*P. olivaceus*), el salmón atlántico, la lubina barramundi (*Lates calcarifer*), el lenguado senegalés y la dorada (Fernandez-Trujillo *et al.*, 2008a; 2010; Wu & Chi, 2007). En dorada, hay tres tipos diferentes de Mx (Mx1, Mx2 y Mx3) que demuestran tener actividad antivírica diferencial frente a betanodavirus y al virus de la necrosis pancreática infecciosa (Fernandez-Trujillo *et al.*, 2011a; 2011b).

En lo referente a los factores reguladores de interferón (IRFs) son una amplia familia de factores transcripcionales que están involucrados en una gran variedad de procesos celulares (respuesta antiviral, activación de linfocitos, regulación del crecimiento celular y señalización de citoquinas). IRF-1, IRF-3 e IRF-7 son factores de transcripción implicados en la regulación del IFN tipo I e ISG. En peces, hay estudios que evidencian el papel de IRF-1 en la regulación positiva de la respuesta inmune temprana, que puede actuar como primera línea de defensa frente a infecciones víricas (Phelan *et al.*, 2005; Rodríguez *et al.*, 2005).

6.2. Sistema inmune adaptativo en peces

La respuesta inmune adaptativa se inicia a partir de las citoquinas que, además de estar involucradas en el proceso de inflamación, regulan las células presentadoras de antígeno (APC) y su migración, para activar los linfocitos e iniciar así la respuesta. Esta respuesta está mediada por dos grupos de linfocitos, células B y T. Los linfocitos B median la respuesta de anticuerpos (Abs), siendo los Abs el principal componente que caracteriza al SIAd, que pueden ser expresados como receptores de linfocitos B o bien ser secretados al plasma uniéndose específicamente a los antígenos víricos, bloqueando la entrada viral a las células y marcando al virus para su eliminación. Los linfocitos T organizan la respuesta mediada por células, reaccionando frente a un antígeno presentado previamente por las APC a través del complejo principal de histocompatibilidad (MHC) (Secombes & Wang, 2012).

La presencia de un antígeno específico, ya se encuentre de forma soluble o asociado al MHC en las APC, activa a las células B para que proliferan y se diferencien en células memorias o plasmocitos específicos que secretaran anticuerpos específicos frente a los antígenos inductores. Los linfocitos B, reconocen a los antígenos a través de sus receptores de inmunoglobulina, activando una primera señal en las células, si se produce un segundo reconocimiento, se desencadenará la proliferación de las células B y la producción y secreción de anticuerpos dirigidos contra el patógeno. Los linfocitos B de peces presentan actividad fagocítica, cosa que no ocurre en mamíferos, lo que indicaría su papel múltiple en el sistema inmune de estos animales (Magnadottir *et al.*, 2009).

Los anticuerpos son glicoproteínas heterodiméricas pertenecientes a la superfamilia de Ig. A nivel estructural, consiste en dos cadenas pesadas (H) y dos ligeras (L), con un dominio variable N-terminal (VH o VL) y un dominio constante C-terminal (CH o CL). El reconocimiento del antígeno ocurre a través del dominio variable, mientras que, los dominios constantes, median las funciones efectoras del anticuerpo (Mashoof & Criscitiello, 2016). Los dominios variables contienen tres regiones hipervariables, denominadas regiones determinantes de complementariedad (CDR), que crean el sitio de unión al antígeno. Las combinaciones de estas regiones con los dominios variables provocan variaciones en el sitio de unión al antígeno, permitiendo reconocer una amplia gama de antígenos (Secombes & Wang, 2012).

En peces cartilaginosos se han descrito tres isotipos de Igs (IgM, IgD/W e IgNAR), mientras que, en peces teleósteos, se han identificado la IgM, IgD e IgT/Z, aunque no todas las clases de Igs se expresan en todos los peces estudiados. El repertorio de anticuerpos presente en peces es más limitado, debido a su menor dotación genética, menor tasa metabólica, falta de centros germinales, etc. (Magnadottir, 2010; Kaattari *et al.*, 2002). La IgM es la Ig predominante en todos los peces, siendo la principal proteína presente en el suero, tanto en peces cartilaginosos como teleósteos (Scapigliati *et al.*, 2018). Esta Ig se encuentra en mayor proporción que el resto de Igs descritas y, además, presenta una estructura tetramérica. La IgM puede expresarse en la superficie de las células B o ser secretada (Randelli *et al.*, 2008). A su vez, contribuye a la inmunidad innata y adaptativa de los peces, ya que está involucrada en la activación del

complemento, aglutinación, procesos de fagocitosis y citotoxicidad celular (Mashoof & Criscitiello, 2016). La IgM puede expresarse en peces desde etapas muy tempranas del desarrollo y, en peces adultos, la IgM es el isotipo dominante en aspectos generales, exceptuando algunas situaciones (Zhang *et al.*, 2011). La Ig D/W se encuentra sólo en peces cartilaginosos y probablemente estaba presente en los primeros gnóstostomados. La IgNAR se encuentra en un tipo de tiburón (tiburón enfermera) y se encuentra en forma de dímero en el suero del pez. La Ig D, presente en peces teleósteos, se puede encontrar en riñón cefálico, bazo y branquias (Mashoof & Criscitiello, 2016), pero poco se sabe acerca de su papel fisiológico en los peces (Scapigliati *et al.*, 2018). La Ig T/Z es específica de peces teleósteos (Vega-Ramírez *et al.*, 2010; Mashoof & Criscitiello, 2016), se identificó por primera vez en la trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) (IgT) y en el pez cebra (*Danio rerio*) (IgZ), siendo descrito posteriormente en la mayoría de peces teleósteos. Esta Ig aparece como monómero en el suero y en la mucosa intestinal aparece en forma de tetrámero (Zhang *et al.*, 2011) (Figura 12).

Por otro lado, los linfocitos T solo reconocen al patógeno a través de su receptor específico (TCR) únicamente en el contexto de las MHC presente en la superficie de las APC (Figura 12). Este reconocimiento concluye en la producción de células T de memoria, que persistirán después de la infección. Las células T expresan el co-receptor CD8 o CD4, que estabiliza la interacción TCR/MHC, mejorando la activación de la ruta de CD3, a través de la cual la interacción antígeno-TCR promueve la activación celular. El tipo de co-receptor que exprese determinará la especificidad de los antígenos presentados por MHC-I o MHC-II, dividiendo las células T en dos subpoblaciones: células T citotóxicas (Tc) y células T cooperadoras (Th) (Secombes & Wang, 2012). Por tanto, los linfocitos T CD8 (Tc) reconocen los péptidos asociados con las MHC-I, capaces de destruir las células infectadas. Por el contrario, los CD4 (Th) reconoce a los antígenos asociados con MHC-II. El complejo MHC-I aparece en la mayoría de células nucleadas, mientras que las APC muestran el complejo MHC-II. Se ha visto que las moléculas MHC en peces presentan una codificación genética que dependen de cromosomas diferentes a los que codifican en mamíferos, por lo que da lugar a una línea de evolución separadas de los mecanismos de defensas contra infecciones víricas (clase I) e infecciones bacterianas (clase II) (Van Muiswinkel *et al.*, 1999).

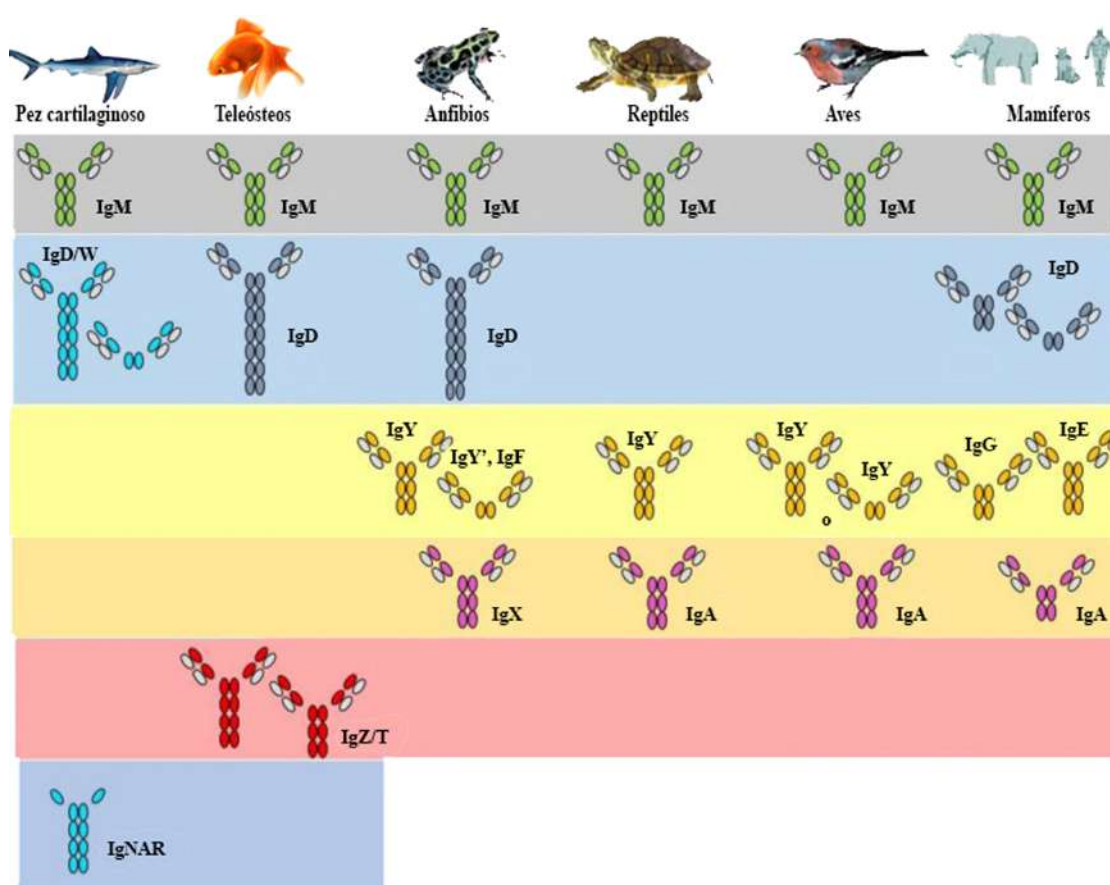


Figura 12. Isotipos de inmunoglobulinas presente en peces y en otros grupos de vertebrados (modificada de Mashoof & Criscitiello, 2016).

Finalmente, con respecto los TCR, las células reconocen a los antígenos a través del complejo CD3/TCR expresado en la superficie celular. Existen dos variantes, la $\alpha\beta$, que se muestra en la mayoría de las células T maduras en los órganos linfoides secundarios, y $\gamma\delta$, presente en las células T de las capas epiteliales de las mucosas, como la piel y epitelio intestinal, que constituyen la primera línea de defensa (Buonocore *et al.*, 2012). Por tanto, el SIAd permite una respuesta altamente específica, muy efectiva contra infecciones y con memoria inmunológica.



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA



OBJETIVOS



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

Los estudios relacionados con la enfermedad de linfocistis (LCD) en dorada (*Sparus aurata*) se han centrado recientemente en el esclarecimiento de diversos aspectos relacionados con la patogénesis del *Lymphocystis disease virus 3* (LCDV-Sa), incluyendo ruta de transmisión, determinación del tropismo tisular y celular del virus, o la caracterización de la histopatología asociada a la enfermedad. Sin embargo, el estudio de la interacción patógeno-hospedador incluye aspectos relacionados con el curso de la infección que solo pueden dilucidarse en una infección experimental. Por otra parte, no existen métodos eficaces para prevenir las infecciones por LCDV-Sa en doradas, aunque los estudios realizados con vacunas DNA para la prevención de la LCD en platija japonesa son prometedores. Por tanto, el **objetivo principal** de esta Tesis doctoral fue profundizar en el estudio de la patogénesis del LCDV-Sa en doradas y desarrollar una vacuna DNA para la prevención de esta infección viral.

Los **objetivos parciales** planteados fueron:

1. Estudiar el curso de la infección por LCDV-Sa en doradas infectadas experimentalmente, analizando la carga viral y su relación con el desarrollo de la enfermedad y con el establecimiento de infecciones asintomáticas.
2. Estudiar la respuesta inmune de dorada frente a la infección por LCDV-Sa mediante el análisis de la expresión de diversos inmunogenes.
3. Diseñar y evaluar una vacuna DNA para la prevención de las infecciones por LCDV-Sa en dorada. Dicha evaluación implicará el estudio de la distribución y persistencia de la vacuna en peces, un ensayo para determinar la protección inducida por la vacuna frente a la infección por LCDV-Sa y la evaluación de la respuesta inmune inducida en doradas tras la vacunación.



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

MATERIAL Y MÉTODOS





UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

1. ESTUDIO DE LA CARGA VIRAL EN DORADAS INFECTADAS POR LCDV-Sa Y SU RELACIÓN CON EL CURSO DE LA INFECCIÓN

1.1. Infección experimental

En el presente estudio se realizó una infección experimental con el fin de estudiar el curso de la infección por LCDV-Sa en doradas juveniles, analizando a lo largo del tiempo la carga viral y la presencia de transcritos víricos y su relación con la aparición de la sintomatología característica de la enfermedad.

1.1.1. Aislado vírico

El aislado de LCDV-Sa utilizado en este estudio se obtuvo a partir de ejemplares juveniles de dorada procedentes de un brote de la enfermedad de linfocistis ocurrido en 2016 en una piscifactoría de la costa atlántica andaluza. Para la obtención del aislado se recogieron los quistes situados en aletas y piel de los peces afectados y se suspendieron (20%, p/v) en medio Leibovitz (L-15) (Gibco) suplementado con un 2% de L-glutamina (Sigma-Aldrich) y un 1% de penicilina-estreptomicina (P/S) (Sigma-Aldrich) (medio de inoculación). Las suspensiones se homogenizaron y posteriormente se sometieron a rotura mediante ultrasonido durante 20 min a 40 W. Además, se sometieron a dos ciclos de congelación en nitrógeno líquido y descongelación a temperatura ambiente. Tras centrifugar dos veces para eliminar los restos tisulares y celulares (10000 x g, 5 min a 4 °C), el sobrenadante se trató con penicilina (100 µl/ml) toda la noche a 4 °C. Tras el periodo de incubación se volvió a centrifugar (10000 x g, 5 min a 4 °C), y el sobrenadante se dividió en alícuotas y se conservó a -80 °C hasta su uso.

1.1.2. Determinación de la dosis infectiva vírica

Para determinar el título infectivo de las suspensiones víricas se usó el ensayo de dilución final de efecto citopático (CPE) en cultivos celulares, utilizando monocapas semiconfluentes de células SAF-1 (ECACC 00122301) en placas de 24 pocillos (Nunc, Thermo Fisher Scientific). Las células se inocularon por triplicado con

diluciones decimales seriadas del stock vírico en medio de inoculación, utilizando un inóculo de 200 µl por pocillo. Tras un periodo de adsorción de 2 h a 20 °C, se retiró el inóculo y se añadió 1 ml por pocillo de medio de mantenimiento [medio de inoculación suplementado con un 2% de suero fetal bovino (FBS, Gibco)], incubándose finalmente a 20 °C, y observándose diariamente para la detección de CPE hasta los 15 días post-inoculación (dpi) (Garcia-Rosado *et al.*, 1999). El título vírico, expresado como el 50% de la dosis infectiva en cultivos celulares por unidad de volumen (TCID₅₀/ml), se calculó empleando el método descrito por Reed & Muench (1938).

1.1.3. Mantenimiento de los peces y diseño experimental

Los ejemplares de dorada utilizados en los distintos experimentos recogidos en la presente memoria procedían de una misma población de peces criados en el Centro El Toruño del IFAPA (El Puerto de Santa María, Cádiz), una instalación sin historial previo de brotes de linfocistis. Todos los procedimientos se realizaron siguiendo las normas básicas recogidas en la legislación española para la protección de los animales utilizados en experimentación (RD 53/2013, de 1 de febrero), y fueron autorizados por el Comité Ético de Experimentación de la Universidad de Málaga, con el número de expediente 2013-0027-A.

En las infecciones experimentales descritas a continuación se utilizaron ejemplares de dorada de 5-10 g de peso que se aclimataron durante una semana en nuestras instalaciones antes de comenzar el experimento. Previamente, se comprobó que los peces no eran portadores asintomáticos de LCDV-Sa mediante el análisis por PCR anidada (nested-PCR) de muestras de aleta caudal de cinco ejemplares, siguiendo la metodología especificada en los siguientes apartados. Se utilizaron acuarios de 43 l de agua de mar en circuito cerrado, con filtros de carbón activado externos y renovación parcial del agua periódica. Se mantuvieron bajo condiciones de fotoperiodo natural y con parámetros físico-químicos controlados, con una temperatura de 22 ± 1 °C y una salinidad de 35-37 g/l. Los peces se alimentaron con pellets comerciales (Skretting) administrados una vez al día a razón de un 1% de la biomasa total.

Los peces se separaron en dos grupos, se anestesiaron con MS-222 (Sigma-Aldrich) (50 mg/ml) y se inyectaron intraperitonealmente con 100 μ l de tampón fosfato salino 20 mM, pH 7,3 (PBS) (grupo control) o con 100 μ l de la suspensión vírica diluida en el mismo tampón a una dosis final de 10^6 TCID₅₀ por pez (grupo infectado). Tras 21 d, los peces recibieron una nueva inyección idéntica a la administrada anteriormente. Posteriormente, y a distintos tiempos, se recogieron al azar tres peces de cada grupo y se sacrificaron con una sobredosis de anestésico (150 mg/ml de MS-222). Tras observar cuidadosamente los peces bajo una lupa binocular para detectar la presencia de linfocistes, se procedió a la obtención de la aleta caudal y el cerebro en condiciones asépticas. Las muestras se congelaron inmediatamente en nitrógeno líquido y se conservaron a -80 °C hasta su uso. Los tiempos de muestreo en la primera parte del experimento fueron 2, 4, 7, 11 y 16 dpi. Tras la segunda inyección, se tomaron muestras cuando aparecieron los primeros signos de enfermedad (10 d tras la re-inoculación, es decir, 31 dpi), 8 d después (39 dpi), tras la desaparición de los síntomas (43 dpi) y 14 d después (57 dpi).

1.1.4. Extracción de DNA y RNA, y síntesis de cDNA

Las muestras de cerebro (40-60 mg) y parte de la aleta caudal (10-20 mg) se utilizaron para la extracción de DNA mediante el uso del kit E.Z.N.A. Tissue DNA (Omega BIO-TEK), siguiendo las instrucciones suministradas por la casa comercial. El DNA obtenido se resuspendió en un volumen de 100 μ l de tampón de elución libre de DNasas y se cuantificó mediante espectrofotometría a 260 nm, utilizando el sistema ND 1.000 (NanoDrop, Thermo Fisher Scientific). Finalmente, el DNA se conservó a -20 °C hasta su utilización.

La extracción de RNA total se realizó a partir de muestras de aleta caudal (10-20 mg) utilizando el sistema comercial E.Z.N.A. Total RNA Kit (Omega BIO-TEK). El RNA se eluyó en 50 μ l de agua tratada con dietilpirocarbonato (DEPC, Sigma-Aldrich), determinándose su concentración espectrofotométricamente. Para digerir el DNA genómico, las muestras de RNA se trataron con DNasa I libre de RNasas (Roche) (10 μ g de RNA y 5 U de DNasa I en un volumen final de 50 μ l), incubándose a 37 °C durante 30 min. Tras inactivar la DNasa I, el RNA se utilizó para realizar una

transcripción inversa utilizando 1 µg de RNA y el sistema comercial Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit (Roche) con cebadores arbitrarios, siguiendo el protocolo suministrado por la casa comercial. El cDNA resultante se conservó a -20 °C hasta su uso.

1.1.5. Detección de LCDV-Sa mediante PCR y nested-PCR

La detección de genoma y transcritos víricos se realizó mediante PCR o nested-PCR utilizando como diana el gen que codifica para la MCP del LCDV-Sa. La PCR se realizó en un volumen final de 50 µl, con una mezcla de reacción constituida por 10 µl de Green GoTaq Flexi Buffer 5x (Promega), 5 µl de deoxinucleósidos trifosfato (dNTPs, Roche), 5 µl de MgCl₂ 25 mM, 2 µl (15 pmol/µl) de cada cebador específico (Tabla 2), 0,5 µl de GoTaq DNA Polymerase (Promega), y 5 µl de DNA de la muestra a analizar a una concentración de 100 ng/µl. En el caso de detección de transcritos víricos, se utilizó cDNA generado a partir de 500 ng de RNA total. El perfil de amplificación constó de un paso de desnaturalización a 95 °C durante 5 min, 35 ciclos con desnaturalización de 1 min a 95 °C, alineamiento durante 30 s a 50 °C y extensión de 1 min a 72 °C, y un paso de extensión final a 72 °C durante 10 min.

Tabla 2. Secuencia de los cebadores usados en los ensayos de detección y cuantificación de LCDV-Sa.

Ensayo	Cebadores	Secuencia (5' → 3')	Tamaño amplicón	Referencia
PCR	LCDVs-F	YTGGTTCAGTAAATTACCRG	609 pb	Kitamura <i>et al.</i> , 2006
	LCDVs-R	GTAATCCATACTTGHACRTC		
nPCR	RT-LCDV-F	ACGTTTCTCGAGGCGGAGAT	238 pb	Valverde <i>et al.</i> , 2016a
	RT-LCDV-R2	ACGCGTTTAGAACCGCACAT		
qPCR	RT-LCDV-F	ACGTTTCTCGAGGCGGAGAT	150 pb	Valverde <i>et al.</i> , 2016b
	RT-LCDV-R	CGGACGTTTGCTTGACCAA		

Para la realización de la nested-PCR (nPCR) el volumen final de reacción fue también de 50 µl, consistentes en 10 µl de Green GoTaq Flexi Buffer 5x (Promega), 5

μl de dNTPs (Roche), 3 μl de MgCl₂ 25 mM, 2 μl (15 pmol/μl) de cada cebador específico (Tabla 2) y 0,25 μl de GoTaq DNA Polymerase (Promega), usando como DNA molde 2 μl del producto de PCR. El programa de amplificación fue el siguiente: 2 min a 95 °C, 35 ciclos con 30 s a 95°C, 30 s a 60 °C y 45 s a 72 °C, y 5 min a 72 °C.

Los productos amplificados se separaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 2% en tampón Tris-acetato-EDTA (Tris-acetato 40 mM, EDTA 1mM, pH 8,3) (TAE), se tiñeron con bromuro de etidio (Sigma-Aldrich) (0,5 μg/ml en TAE) y se visualizaron bajo luz UV. Como marcador de peso molecular se utilizó GeneRuler 100 bp DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific).

1.1.6. Cuantificación de DNA vírico

La cuantificación de DNA vírico en muestras de aleta caudal se realizó por PCR a tiempo real (qPCR) siguiendo el procedimiento descrito por Valverde *et al.* (2016b), que se basa en la amplificación de un fragmento de 150 pares de bases (pb) del gen *mcp* de LCDV-Sa (Tabla 2). Los ensayos se realizaron en un termociclador LightCycler 96 (Roche Life Science), en un volumen final de 25 μl que contenía 12,5 μl de FastStart Essential DNA Green Master (Roche Life Science), 2 μl de cada cebador específico (10 pmol/μl) y 200 ng de DNA. Las condiciones de amplificación fueron: 95 °C durante 10 min, seguidos de 42 ciclos a 95 °C durante 10 s, 62 °C durante 10 s y 72 °C durante 10 s. La presencia de productos de amplificación inespecíficos se descartó mediante el análisis de las curvas de disociación de los productos de qPCR, usando el siguiente perfil: 95 °C durante 10 s, 65 °C durante 1 min y 97 °C durante 1s. Todas las reacciones se llevaron a cabo por triplicado. El número de copias de DNA vírico se calculó a partir del valor de Ct (valor umbral del ciclo) de cada muestra (media de las tres réplicas) interpolando en una curva estándar (Ct vs logaritmo del número de copias). La carga viral se expresó como número de copias de DNA vírico por mg de tejido.

1.2. Análisis de doradas procedentes de un brote de linfocistis

Para determinar la carga viral asociada a infecciones naturales por LCDV-Sa, se muestreó una población de doradas juveniles (peso medio $29,9 \pm 4,7$ g) que estaban estabuladas en un centro de investigación localizado al suroeste de la Península Ibérica. Las muestras se tomaron durante un brote de LCD, a las 3 semanas de observarse los primeros animales con la sintomatología característica. Se recogieron un total de 40 peces, 20 con linfocistis visibles y 20 asintomáticos. Los animales se sacrificaron con una sobredosis de anestésico (apartado 1.1.3), obteniéndose de forma aséptica una porción de la aleta caudal de aproximadamente 1 cm². Las muestras se congelaron inmediatamente a -20 °C y se enviaron al laboratorio congeladas en nieve carbónica. Una vez en el laboratorio se procedió a la extracción de DNA a partir de 100 mg de tejido, utilizando la metodología especificada en el apartado 1.1.4, y a estimar la carga viral mediante qPCR (apartado 1.1.6).

1.3. Análisis estadístico

Los datos de cuantificación de DNA vírico mediante qPCR se transformaron logarítmicamente para conseguir la normalidad y homogeneidad de la varianza, realizándose una prueba de Shapiro-Wilk para confirmar la normalidad de los mismos. Posteriormente, se analizaron estadísticamente usando un ANOVA de una vía seguido de una prueba HSD de Tukey para determinar si existen diferencias significativas en la carga viral de los animales infectados experimentalmente o recogidos en una población afectada por un brote de linfocistis en relación al tiempo pi o a la presencia de signos característicos de la enfermedad. Los análisis estadísticos se realizaron utilizando el programa XLSTAT para Microsoft Excel versión 2019.

2. ESTUDIO DE LA RESPUESTA INMUNE DE DORADAS FRENTE A LA INFECCIÓN POR LCDV-Sa

2.1. Diseño experimental

Para la realización de la infección experimental se utilizaron ejemplares de dorada de 70-100 g de peso procedentes del Centro El Toruño del IFAPA. Antes de iniciar el experimento se analizaron mediante qPCR muestras de aleta caudal de 10 individuos, confirmando que los peces no estaban infectados por LCDV-Sa (apartado 1.1.6). Los peces se aclimataron durante una semana en tanques de 150 l de agua de mar, manteniéndose durante el experimento en las mismas condiciones especificadas en el apartado 1.1.3.

Los animales se separaron en dos grupos, y, una vez anestesiados, se inocularon por vía intramuscular, aproximadamente 1 cm por debajo de la aleta dorsal, con 100 µl de PBS o 100 µl de la suspensión vírica (apartado 1.1.1) (10^5 TCID₅₀/pez) (grupos control e infectado, respectivamente). Se muestrearon cinco peces por grupo a 1, 3 y 8 dpi y se sacrificaron por sobredosis de anestésico. Los órganos seleccionados, aleta, riñón cefálico e intestino, se obtuvieron en condiciones asépticas y se congelaron inmediatamente en nitrógeno líquido conservándose posteriormente a -80 °C.

2.2. Extracción de DNA, RNA y síntesis de cDNA

La extracción de DNA a partir de las distintas muestras (30-50 mg) se realizó como se especificó en el apartado 1.1.4.

En cuanto a la extracción de RNA total, se realizó homogeneizando las muestras de los distintos órganos (30-70 mg) en 1 ml de TRI Reagent (Sigma-Aldrich) utilizando un molino mezclador MM 400 (Retsch) con un programa de 20 f/s durante 5 min. Tras homogeneizar, las muestras se dejaron 5 min a temperatura ambiente y a continuación se añadieron 100 µl de 1-bromo-3-cloropropano (Applchem), agitándose durante 15 s. Tras incubar a temperatura ambiente durante 5 min, se centrifugaron a 12000 x g durante 14 min a 4 °C, recuperándose la fase acuosa que

contenía el RNA, a la que se añadió un volumen de etanol al 75%. A continuación, las muestras se transfirieron a columnas del sistema comercial RNeasy mini kit (Qiagen) y la extracción se continuó de acuerdo a las instrucciones del fabricante. El RNA se eluyó finalmente en 50 µl de agua libre de nucleasas (Qiagen) y se cuantificó por espectrofotometría a 260 nm. Todas las muestras se trataron con DNasa (apartado 1.1.4), y la integridad del RNA obtenido se comprobó mediante electroforesis en gel de agarosa con bromuro de etidio.

El cDNA se sintetizó a partir de 2 µg de RNA total utilizando el sistema comercial High Capacity cDNA Reverse Transcription kit (Applied Biosystems) con cebadores arbitrarios. El cDNA se almacenó a -20 °C hasta su posterior uso.

2.3. Cuantificación de DNA y de transcritos víricos

La cuantificación de DNA vírico se realizó mediante qPCR siguiendo el procedimiento descrito en el apartado 1.1.6. Las reacciones de qPCR se realizaron por triplicado. La carga viral se expresó como número copias de DNA por mg de tejido.

La expresión del gen estructural vírico *mcp* se analizó en paralelo como indicador de una infección productiva. La cuantificación de los transcritos se llevó a cabo mediante RT-qPCR siguiendo el protocolo antes mencionado, pero utilizando un volumen de reacción de 20 µl y cDNA producido a partir de 100 ng de RNA total. Estas reacciones de qPCR se realizaron por duplicado. Los niveles de expresión relativa de *mcp* normalizados para cada muestra se calcularon aplicando la siguiente fórmula (Segarra *et al.*, 2014): $F = \log [(E + 1)^{40 - C_t} / N]$, donde E es la eficiencia de amplificación de la qPCR, Ct es el valor del ciclo umbral de la muestra, N es el máximo número de copias de DNA vírico/mg de tejido detectado menos el número de copias de DNA vírico/mg de tejido determinado para esa muestra, y 40 corresponde arbitrariamente al Ct de una muestra negativa para la detección de genoma vírico.

2.4. Análisis de expresión génica del hospedador

Para el estudio de expresión génica en respuesta a la infección por LCDV-Sa se seleccionaron 23 genes relacionados con el sistema inmune de dorada (Tabla 3) que

se analizaron en muestras de riñón cefálico e intestino. La cuantificación de la expresión de dichos genes se realizó mediante RT-qPCR tal y como se especificó en el apartado anterior, usando 20 µl de reacción, cDNA producido a partir de 100 ng de RNA total y 2 µl de cada cebador específico (10 pmol/µl) (Tabla 3). Las condiciones de amplificación fueron las siguientes: una desnaturalización inicial a 95 °C durante 10 min, seguidos de 42 ciclos de amplificación a 95 °C durante 10 s, 58 °C durante 10 s, y 72 °C durante 10 s. Las reacciones de qPCR se realizaron por duplicado.

La expresión relativa de los genes analizados se calculó usando el método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (Schmittgen and Livak 2008), y los datos se expresaron como fold change (FC) (media $\pm$ SEM). Los genes que codifican el factor de elongación 1 alfa (*ef1a*) y la actina beta (*actb*) se utilizaron como genes de referencia para la normalización de la expresión génica, utilizándose como calibrador las muestras del grupo control (no infectado).

Tabla 3. Cebadores utilizados para los análisis de expresión génica mediante RT-qPCR.

Símbolo	Nombre del gen	Secuencia (5'-3')	Tamaño amplicón	Referencia/Número acceso GenBank*
<i>mcp</i>	Proteína principal de la cápside, <i>Lymphocystis disease virus 3</i>	F ACGTTTCTCGAGGCGGAGAT R CGGACGTTTGCTTGACCAA	150	Valverde <i>et al.</i> , 2016b
<i>tlr5</i>	Receptor Toll-like 5	F CTTCCTGAGCCAACTTGAGG R TCAGCTTCTGGACGTCCTTT	128	KF857324
<i>tlr9</i>	Receptor Toll-like 9	F CATCCTTTGCCAGCTTCTTC R GGGACACGTTTGAGTGGTCT	117	AY751798
<i>ifn</i>	Interferon (IFN) tipo I	F ATGGGAGGAGAACACAGTGG R GGCTGGACAGTCTCTGGAAG	244	Valero <i>et al.</i> , 2015
<i>irf1</i>	Factor 1 regulador del interferón	F GAGGAAGAGGACAGCGACAC R CGGAGCCACAAATGAGAAAT	123	AY962254
<i>irf3</i>	Factor 3 regulador del interferón	F TCAGAATGCCCAAGAGATT R AGAGTCTCCGCCTCAGATG	107	Valero <i>et al.</i> , 2015
<i>irf9</i>	Factor 9 regulador del interferón	F GTTTTAAACAGTCATGGCAGGAG R GCGGAACATGGTTTTAGCAT	130	AM920661
<i>pkrr</i>	Proteín-quinasa dependiente RNA	F TCCTTTGGAACCTCCCTACC R TCGAGGGGGAAATGTTGTAA	100	Valero <i>et al.</i> , 2015
<i>mx1</i>	Proteína Mx1 de unión a GTP inducida por interferón	F AGGAGACGGTGGTTGACATC R TCTCTTCCGTTGCCTCAGT	127	FJ490556
<i>mx2</i>	Proteína Mx2 de unión a GTP inducida por interferón	F AAGAGGAGGACGAGGAGGAG R TTCAGGTGCAGCATCAACTC	148	FJ490555
<i>mx3</i>	Proteína Mx3 de unión a GTP inducida por interferón	F GGTGATCCGCTACCAGATGT R TCTGGGTGCCGATATCAAAA	125	FJ652200
<i>isg15</i>	Gen 15 estimulado por interferón	F GTGAGCTCCCTGAAGCAACT R GACCGTTTACAAACACCAGC	79	Álvarez-Torres <i>et al.</i> , 2018

Tabla 3. (Continuación).

<i>tnfa</i>	Factor de necrosis tumoral alfa	F TTCCGACTGGTGGACAATAAG R GAGATCCTGTGGCTGAGAGG	143	AJ413189
<i>il1β</i>	Interleucina 1 beta	F AGCGCAGTAGAAGAGCGAAC R CACTCGGACTAAGTGCCTCTG	117	AJ277166
<i>il6</i>	Interleucina 6	F CCAGATCCCTCAAGATTCA R AAGGTGTCGGAGCTGTCG	144	EU244588
<i>il10</i>	Interleucina 10	F CAGGCCATGAACAACATCC R TGGACGTCAGATTGAGCTG	143	JX976621
<i>casp1</i>	Caspasa 1	F TCGAAGAGACGGACAGTGTG R CGTTGATGGGAACTCATCT	123	AM490060
<i>ck3</i>	CC quimiocina 3	F AAAAGACCCTCTGAAACATCTCAC R ACGATGCTGACCTCAGTGC	149	GU181394
<i>ck10</i>	CC quimiocina 10	F TGTCGGTCAAAAACCAAACA R AGTCACTCCTGGTCACCAAAAT	111	GU181390
<i>c3</i>	Componente C3 del complemento	F AAAGGCCGATACCACACAAG R TTGACATCCACCAAACAGA	146	HM543456
<i>nccrp1</i>	Proteína 1 del receptor de células citotóxicas no específicas	F ACCGCAACTGTCTGATGTACC R CTGAGGCAGTTGACAGACCA	145	AY651258
<i>tcrb</i>	Receptor de células T, cadena beta	F AAGTGCATTGCCAGCTTCTT R TTGGCGGTCTGACTTCTCTT	131	AM261209
<i>ighm</i>	Cadena pesada mu de inmunoglobulinas	F AGCCTCGAGAAGTGGAACA R TACCCGATGGACCTGACAA	101	AM493677
<i>mhcIIa</i>	Complejo principal de histocompatibilidad clase II, cadena alfa	F AGATGATGGTGGTCCTCGTC R TTCACCATCCAGACCGTACA	125	DQ019401
<i>β actin</i>	Actina beta	F ATCACCATCGGCAATGAGA R ACAGGTCCTACGGATGTCG	139	AF384096
<i>tcrb</i>	Receptor de células T, cadena beta	F AAGTGCATTGCCAGCTTCTT R TTGGCGGTCTGACTTCTCTT	131	AM261209

* Los cebadores se diseñaron con el programa Primer3web versión 4.1.0 (<http://bioinfo.ut.ee/primer3/>).

Se analizó la eficiencia de las qPCR para cada pareja de cebadores utilizados, tanto de los genes diana como de los de referencia. Para ello se realizaron curvas estándar usando diluciones decimales seriadas del cDNA retrotranscrito a partir de 100 a 0,1 ng de RNA total (3 replicas por dilución). En todos los casos la eficiencia fue superior al 95%. Por último, no se observaron diferencias en los valores de Ct para los genes de referencia entre los grupos control e infectado en el transcurso de la infección en los dos órganos analizados (prueba de Kruskal-Wallis, $p > 0,11$ y $p > 0,13$ para *eflα* y *actβ*, respectivamente).

Se realizó un análisis clúster de las muestras en base a la expresión relativa de los genes analizados [expresados como $\log_2(FC)$], utilizando la opción Expression Heat Map en el servidor web Heatmapper (<http://www2.heatmapper.ca/>) (Babicki et

al., 2016), con distancia euclídea como medida de asociación y “complete linkage” como método de agrupamiento. Los genes expresados también se analizaron utilizando los mismos parámetros.

Para determinar los genes diferencialmente expresados (DEG) implicados en la respuesta de la dorada frente a la infección por LCDV-Sa, y cuales de ellos presentan una activación o una inhibición con respecto al grupo control en cada órgano a diferentes tiempos p_i , se realizó una representación de los genes (Volcano plot) según su expresión diferencial [$\log_2(FC)$] y significación estadística [$-\log(p\text{-valor})$], utilizando el programa informático en línea ShinyVolcanoPlot (<https://paolo.shinyapps.io/ShinyVolcanoPlot/>). Como umbral para establecer los DEG se usó un $p\text{-valor} < 0,05$ y un límite de variación del $\log_2(FC)$ de $\pm 0,5$.

2.5. Análisis estadístico

Los datos de qPCR se transformaron logarítmicamente como se especificó en el apartado 1.3. Para determinar si existen diferencias significativas en la carga viral o en la expresión génica entre órganos y tiempos p_i , se realizó un ANOVA de dos vías seguido de una prueba de Bonferroni para comparaciones múltiples. Cuando se realizaron comparaciones para un órgano específico a distintos tiempos, o para diferentes órganos en un tiempo determinado, se utilizó un ANOVA de una vía seguido de una prueba de LSD de Fisher. Las diferencias se consideraron significativas cuando $p < 0,05$. Las pruebas estadísticas se realizaron utilizando el programa XLSTAT.

3. DISEÑO DE UNA VACUNA DNA FRENTE A LCDV-Sa

3.1. Producción de la vacuna

Para la construcción de la vacuna DNA se procedió a la clonación del gen *mcp* del LCDV-Sa en el vector de expresión eucariota pcDNA3.1/NT-GFP-TOPO (Invitrogen). Este plásmido permite la expresión de la MCP vírica como proteína de fusión de la proteína verde fluorescente (GFP) bajo el control del promotor temprano del citomegalovirus.

Se amplificó mediante PCR el marco de lectura (ORF) completo codificante de la MCP vírica usando como molde DNA total obtenido a partir del aislado vírico de LCDV-Sa (apartado 1.1.1), utilizando la metodología especificada en el apartado 1.1.4. Los cebadores usados para la PCR (Tabla 4) se diseñaron a partir de la secuencia del ORF LCDVSa062R del aislado SA9 de LCDV-Sa (GenBank número de acceso KX643370.1), utilizando el programa Primer3web versión 4.1.0. La PCR se realizó en un volumen final de 50 µl (apartado 1.1.5). El programa de amplificación fue el siguiente: 5 min a 95 °C, 35 ciclos con 1 min a 95 °C, 30 s a 62 °C y 90 s a 72 °C, con un paso final de 10 min a 72 °C.

El producto amplificado se separó mediante electroforesis en gel de agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio y la banda correspondiente al fragmento de interés se recortó y purificó utilizando el sistema Illustra GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit (GE Healthcare), siguiendo el protocolo suministrado por la casa comercial. El DNA purificado se envió al servicio de secuenciación de la empresa StabVida (Caparica, Portugal), donde se secuenciaron ambas cadenas de DNA, empleando los cebadores utilizados para la PCR (Tabla 4). Las secuencias obtenidas se analizaron manualmente con los programas Editseq y Megalign (DNASStar Lasergene v8.0).

Tabla 4. Secuencia de los cebadores utilizados para el diseño y evaluación de la vacuna.

Ensayo	Cebadores	Secuencia (5' → 3')	Tamaño amplicón
Clonación <i>mcp</i>	MCP-F	AAGCTAGCTATGACTTCTGTAGCGG	1398 pb
	MCP-R	TATCTAGATCTACAACACAGGGAAACCC	
PCR	pcDNA-MCP-F	CGATTTGGTGGCTCAAAAAT	768 pb
	pcDNA-MCP-R	CTGTTTCTACGGGGATGGAA	
nPCR	pcDNA-MCP-nF	ATATGACGCAACCCGTTGAT	224 pb
	pcDNA-MCP-nR	TTCTAAATCTCCCGCCGTTA	

Una vez comprobada su identidad, el fragmento de DNA se clonó en el vector de expresión pcDNA3.1/NT-GFP-TOPO de acuerdo con el protocolo suministrado por el fabricante. El plásmido recombinante (denominado pcDNA-MCP) se usó para transformar células de *Escherichia coli* One Shot TOP10 Electrocomp (Invitrogen) mediante electroporación, utilizando el aparato Eppendorf Eporator (Eppendorf) a 2.5 kV durante 4.5 ms. Tras la transformación, las células se incubaron durante 1 h a 37 °C y se sembraron en placas de agar LB (1% triptona, 1% extracto de levadura, 0,5% NaCl, 1,5% agar bacteriológico, pH 7) suplementado con ampicilina (100 µg/ml), incubándose a 37 °C durante 24 h. Posteriormente, las colonias obtenidas se sembraron en caldo LB con ampicilina, realizándose la extracción de DNA plasmídico a partir de los cultivos utilizando el sistema High Pure Plasmid Isolation Kit (Roche). La presencia del plásmido recombinante se comprobó mediante PCR, utilizando los cebadores suministrados en el kit de clonación, y la correcta orientación del inserto se verificó mediante secuenciación como se especificó anteriormente. De esta manera se seleccionó un clon conteniendo el plásmido pcDNA-MCP que se usó para la producción de la vacuna.

El plásmido pcDNA3.1/NT-GFP-TOPO vacío y religado (pcDNA) se utilizó como control en las vacunaciones. Las células de *E. coli* One Shot TOP10 Electrocomp se transformaron con este plásmido como se especificó anteriormente.

Los cultivos de *E. coli* con los plásmidos pcDNA-MCP o pcDNA se conservaron a -80 °C en caldo LB con ampicilina suplementado con glicerol al 20% (v/v). La purificación de los plásmidos se realizó a partir de 500 ml de cultivo bacteriano utilizando el sistema EndoFree Plasmid Mega kit (Qiagen). La concentración del plásmido purificado se determinó por espectofotometría, conservándose a -20 °C hasta su uso.

3.2. Expresión *in vitro* del plásmido vacunal

Se realizó un ensayo de transfección de la línea celular SAF-1 con el plásmido pcDNA-MCP, utilizando Lipofectamin 2000 Transfection Reagent (Invitrogen), con el fin de comprobar la expresión *in vitro* de la MCP clonada. Las células también se transfectaron con el plásmido pcDNA como control.

Las células se sembraron en placas de 6 pocillos (Nunc, Thermo Fisher Scientific) con medio L-15 suplementado con un 2% de L-glutamina, 10% de FBS y un 1% de P/S, y se incubaron a 25 °C. Cuando las células alcanzaron el 70-90% de confluencia se realizó el proceso de transfección. Para ello, se retiró el medio de crecimiento de los pocillos y se lavaron con 2 ml/pocillo de medio L-15 libre de suero y antibióticos. Posteriormente se añadieron a cada pocillo 2500 ng de DNA plasmídico diluido en medio Opti-MEM I (Thermo Fisher Scientific), y el reactivo lipofectamina. Siguiendo las recomendaciones de la casa comercial, se probaron diferentes volúmenes de lipofectamina, seleccionándose como óptimo un volumen de 12 µl. Las células se incubaron a 25 °C durante un mínimo de 3 h. Transcurrido el tiempo de incubación se comprobó la expresión de la proteína de fusión GFP-MCP.

3.2.1. Microscopía de fluorescencia

La expresión de la proteína de fusión se analizó en células SAF-1 a las 3 y 24 h post-transfección mediante microscopía de fluorescencia, utilizando un microscopio invertido Eclipse Ti (Nikon) dotado con una lámpara de mercurio y una cámara digital DS-Ri2 (Nikon).

3.2.2. Inmunoensayo dot-blot

Las células se recogieron a las 24 h post-transfección y se suspendieron en tampón de lisis celular (50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 1% Nonidet P-40, pH 7,8), incubándose durante 20 min a temperatura ambiente. Se centrifugó el lisado celular a 10000 x g durante 10 min y se recogió el sobrenadante, al que se añadieron inhibidores de proteasas (Halt Protease Inhibidor Cocktail, Thermo Fisher Scientific), conservándose a -20 °C.

Para el ensayo inmunoblot las muestras se sembraron mediante filtración sobre membranas de PVDF (BioRad) usando un equipo MilliBlot-D (Millipore) acoplado a una bomba de vacío. Tras la filtración se saturó la membrana con leche descremada en polvo al 5% (p/v) en PBS suplementado con Tween 20 (Sigma-Aldrich) al 0,05% (v/v) (PBS-T₅) durante 1 h. Seguidamente se realizaron 3 lavados de 5 min con PBS-T₅ y se incubó con un anticuerpo monoclonal anti-MCP (19411-1-5/C326, Abmart), a una dilución 1:500 en PBS-T₅ con 5% de leche descremada (PBS-T₅-M) durante 1 h a temperatura ambiente. Transcurrido el periodo de incubación, se lavó con PBS-T₅ (3 x 5 min) y se añadió el segundo anticuerpo, anti-IgG de ratón conjugado con peroxidasa (Sigma-Aldrich), a una dilución 1:1000 en PBS-T₅-M, incubándose a temperatura ambiente durante 1 h. Finalmente, y tras volver a lavar, se reveló usando el reactivo SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate (Thermo Fisher Scientific) y se analizó en el sistema ChemiDoc MP Imaging System (BioRad).

3.3. Distribución y expresión de la vacuna en doradas

3.3.1. Ensayo de vacunación

Para comprobar la distribución y persistencia del plásmido vacunal, y la expresión del mismo *in vivo*, se realizó un ensayo de vacunación en doradas. Se utilizaron ejemplares de dorada de 5-10 g de peso procedentes de la misma población descrita en el apartado 1.1.3. El mantenimiento de los animales también se realizó como se especificó anteriormente.

Se utilizaron 30 peces por grupo experimental, a los que se inyectó con el plásmido vacunal (pcDNA-MCP), el vector vacío (pcDNA) o PBS. La inyección (100 µl) se administró vía intramuscular, tal y como se especificó en el apartado 2.1. La dosis fue de 10 µg de DNA plasmídico por pez.

A los 7, 14 y 20 d post-vacunación (dpv) se sacrificaron mediante sobredosis de anestésico (apartado 1.1.3) seis peces por grupo experimental a los que se les extrajo en condiciones asépticas una porción de músculo (zona de inyección), aleta caudal y riñón. Las muestras se congelaron inmediatamente en nitrógeno líquido para su posterior conservación a -80 °C.

Las muestras procedentes de tres peces se procesaron para extracción de DNA, mientras que las de los otros tres animales se utilizaron para extracción de RNA total y síntesis de cDNA. En ambos casos se siguió la metodología especificada en el apartado 1.1.4.

3.3.2. Detección de la vacuna y expresión del gen *mcp*

La detección de DNA de la vacuna y de transcritos del gen *mcp* se realizó mediante PCR o nPCR utilizando los cebadores especificados en la Tabla 4.

La composición y volúmenes de reacción para la PCR y nPCR fueron los mismos especificados en el apartado 1.1.5. El perfil de amplificación para la PCR constó de un paso de desnaturalización a 95 °C durante 5 min, 35 ciclos de 1 min a 95 °C, 30 s a 60 °C y 90 s a 72 °C, y un paso final a 72 °C durante 10 min. Para la nPCR, el perfil de temperaturas y tiempos fue el mismo, pero constó solo de 30 ciclos de amplificación. Los productos amplificados se visualizaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio.

4. EVALUACIÓN DE LA VACUNA DNA EN DORADA

4.1. Diseño de un protocolo de qPCR para la cuantificación de LCDV-Sa

Para la detección y cuantificación de DNA vírico en peces vacunados infectados experimentalmente con LCDV-Sa, así como para determinar la expresión de transcritos víricos, se diseñó un protocolo de qPCR basado en la amplificación de un gen estructural vírico alternativo al *mcp*. El gen seleccionado corresponde al ORF LCDVSa074R del LCDV-Sa (GenBank número de acceso KX643370.1), que codifica una proteína de membrana miristilada (MMP).

4.1.1. Clonación de un fragmento del gen codificante de la MMP

Como estándar para la cuantificación de DNA vírico mediante qPCR se utilizó un plásmido recombinante que contenía un fragmento del gen codificante de la MMP del LCDV-Sa. En primer lugar, se procedió a amplificar mediante PCR un fragmento de 416 pb del gen *mmp*, usando los cebadores especificados en la Tabla 5 y como molde DNA total obtenido a partir del aislado vírico de LCDV-Sa (apartado 3.1). La PCR se realizó como se describió también en el apartado 3.1, pero empleando una temperatura de alineamiento de 61 °C.

Tabla 5. Secuencia de los cebadores utilizados para la clonación de un fragmento del gen *mmp* de LCDV-Sa y el ensayo de qPCR.

Ensayo	Cebadores	Secuencia (5' → 3')	Tamaño amplicón
Clonación	MMP-PCR-F	ATTAGCACGCGCTTCAGAT	416 pb
	MMP-PCR-R	TTTATGGGCGGTTTTTCAG	
qPCR	MMP-qPCR-F	TTGCCCCACTTCCTATTGTC	122 pb
	MMP-qPCR-R	CCGGTTTTTCAGACTTGAA	

El producto de amplificación se separó mediante electroforesis en gel de agarosa, se purificó a partir del gel, y se clonó en el vector pCR2.1-TOPO (Invitrogen), usándose posteriormente para transformar células competentes de *E. coli*,

siguiendo los procedimientos especificados en el apartado 3.1. La correcta inserción de una sola copia del producto amplificado se comprobó mediante PCR y secuenciación, empleando, en ambos casos, los cebadores M13 suministrados en el kit de clonación (TOPO TA Cloning kit, Invitrogen).

4.1.2. Ensayo de PCR a tiempo real

Los cebadores diseñados para la qPCR (Tabla 5) generan un amplicón de 122 pb interno al fragmento del gen *mmp* clonado. Los ensayos de qPCR se realizaron tal y como se especificó en el apartado 1.1.6, con la excepción del perfil de amplificación que consistió en un paso a 95 °C durante 10 min, 40 ciclos de 95 °C durante 10 s, 60 °C durante 10 s y 72 °C durante 10 s.

4.1.3. Curva estándar para la cuantificación de LCDV-Sa

El plásmido recombinante descrito en el apartado 4.1.1 se utilizó para generar una curva estándar que permitiese cuantificar la cantidad de DNA vírico en las muestras. La concentración del plásmido se determinó por espectrofotometría como se ha indicado con anterioridad, y el plásmido se diluyó para servir como molde para la qPCR (diluciones de 10^6 copias hasta 1 copia). En cada placa de 96 pocillos, se incluyeron las diluciones del plásmido para la curva estándar, junto a las muestras y a los controles negativos (agua Milli-Q y DNA de una muestra de dorada negativa para LCDV-Sa), utilizando tres réplicas por dilución. El número de copias de DNA en cada pocillo se calculó a partir de su valor de Ct por interpolación en la curva estándar (Ct vs log número de copias). A partir de la curva estándar se calculó la eficiencia de amplificación (E) usando la fórmula $E = (10^{-1/S} - 1) \times 100$, donde S se corresponde a la pendiente de la recta.

4.1.4. Precisión y reproducibilidad del ensayo

Para evaluar la precisión de la PCR cuantitativa, se determinó la variabilidad intra- e inter-ensayo utilizando el plásmido recombinante. La variación intra-ensayo se determinó utilizando tres series de diluciones del DNA plasmídico (de 10^5 a 2 copias)

analizadas en una misma placa de qPCR, mientras que para calcular la variación inter-ensayo se realizaron tres ensayos de qPCR independientes en los que se analizaron las mismas diluciones del plásmido. Para cada dilución del plásmido recombinante se calculó la media de los valores de Ct, la desviación estándar (SD), y el coeficiente de variación (CV).

4.2. Protección inducida por la vacunación

La protección conferida por la vacuna se determinó en un ensayo de vacunación de ejemplares de dorada realizado tal y como se especificó en el apartado 3.3.1. Los animales se distribuyeron en dos grupos y se inocularon intramuscularmente con pcDNA-MCP (10 µg/pez) o pcDNA (10 µg/pez). Tras 21 d, se les inoculó vía intraperitoneal el aislado de LCDV-Sa a una dosis de 10^5 TCID₅₀/pez. A los 2 y 10 dpi, se recogieron asépticamente muestras de aleta caudal y riñón cefálico procedentes de seis y tres peces por grupo, respectivamente, almacenándose a -80 °C hasta su procesamiento.

Las muestras de aleta caudal (60-100 mg) se dividieron en dos y se procesaron para extracción de DNA y RNA total, mientras que las muestras de riñón cefálico (50-70 mg) se utilizaron para extraer RNA total, utilizando la metodología especificada en el apartado 2.2. En cuanto al cDNA, se obtuvo a partir de 1 µg de RNA utilizando el Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit (Roche) (apartado 1.1.4).

La cuantificación de DNA vírico en muestras de aleta caudal se realizó mediante qPCR siguiendo el procedimiento descrito en el apartado anterior. La carga viral se expresó como número de copias de DNA vírico por mg de tejido. Los datos de qPCR se transformaron logarítmicamente y se analizaron para determinar si existen diferencias significativas en la carga viral entre peces inyectados con la vacuna o el plásmido vacío, utilizando los análisis estadísticos especificados en el apartado 2.5

Por último, se analizó la presencia de transcritos víricos en muestras de aleta caudal y riñón cefálico mediante RT-qPCR siguiendo el protocolo antes mencionado, pero utilizando un volumen de reacción de 20 µl y cDNA producido a partir de 100 ng de RNA total.

4.3. Evaluación de la respuesta inmune de doradas tras la vacunación

4.3.1. Diseño experimental

Este experimento se realizó en paralelo con el experimento correspondiente al estudio de la respuesta inmune frente a la infección por LCDV-Sa (apartado 2), utilizándose ejemplares de dorada de 70-100 g de peso.

Los animales se separaron en dos grupos: un grupo vacunado, al que se inyectó intramuscularmente el plásmido pcDNA-MCP, y otro control, inoculado con el vector vacío (pcDNA). La cantidad de plásmido inoculada fue de 10 µg/pez. A los 1, 3 y 8 dpv se muestrearon cinco peces por grupo experimental y se extrajeron el riñón cefálico y el intestino como se describió en el apartado 2.1, con el fin de evaluar la expresión de inmunogenes en doradas vacunadas.

Por otra parte, y para determinar la producción de anticuerpos inducida por la vacunación, se procedió a obtener el suero de cinco ejemplares de dorada después de 1, 2 y 3 meses de la vacunación. Como suero control se utilizó el obtenido a partir de animales del grupo inyectado con PBS al mes post-inyección. La sangre se obtuvo mediante punción de la vena caudal con una jeringa de 1 ml, previa anestesia de los animales, y se transfirió a tubos de centrifuga de 1,5 ml, dejándose coagular a 4 °C durante toda la noche. Posteriormente se centrifugó a 10000 x g durante 10 min a 4 °C, y se recuperó el suero, que se almacenó a -80 °C hasta su análisis.

4.3.2. Análisis de la expresión de inmunogenes en respuesta a la vacunación

La extracción de RNA y obtención de cDNA se realizó como se especificó en el apartado 2.2. Posteriormente, se procedió al estudio de la expresión génica, analizándose los 23 genes relacionados con el sistema inmune especificados en el apartado 2.4. Además, se incluyó la determinación de la expresión del gen *mcp* para comprobar que la vacuna se expresaba en estos animales. La expresión relativa de los genes analizados se calculó usando el método $2^{-\Delta\Delta C_t}$. La normalización de la expresión génica se realizó utilizando los genes de referencia *efl α* y *act β* , y como calibrador se utilizaron las muestras del grupo control (no infectado) del experimento descrito en el

apartado 2.1, que habían sido inyectadas intramuscularmente con PBS. En el caso de la expresión del gen *mcp* de la vacuna se usaron como calibrador las muestras obtenidas a 1 dpv para el órgano correspondiente.

El análisis estadístico de los datos de expresión en los peces vacunados incluyó la realización de un análisis de clúster de las muestras y una representación Volcano plot para determinar los genes que se expresan diferencialmente (DEG) con respecto al grupo control (inyectado con PBS) en cada órgano a diferentes tiempos pv. En el caso de los peces inyectados con el vector vacío también se realizó el análisis estadístico para determinar si el tratamiento induce una expresión diferencial de genes. Estos análisis se realizaron como se especificó en el apartado 2.4.

Posteriormente, se compararon los niveles de expresión de los DEG entre peces vacunados y peces inyectados con pcDNA, para determinar los genes cuya expresión diferencial está relacionada únicamente con la inyección de pcDNA-MCP. Por último, se realizó un análisis comparativo del nivel de transcripción de estos genes en función del tiempo en ambos órganos estudiados. Las diferencias de expresión detectadas se evaluaron estadísticamente tal y como se describió en el apartado 2.5.

4.3.3. Determinación de la producción de anticuerpos en doradas vacunadas

4.3.3.1. *Obtención de MCP recombinante*

El ORF codificante de la MCP vírica se clonó en el plásmido pGEX-6P-3 (GE Healthcare). Este vector permite la expresión en *E. coli* de la proteína de interés como proteína de fusión con la glutatión S-transferasa (GST). Para ello se amplificó mediante PCR la secuencia del gen *mcp* desde el plásmido vacunal, diseñándose unos cebadores específicos conteniendo sitios de restricción para *Bam*HI y *Sal*I (Tabla 6). La PCR se realizó como se describió en el apartado 3.1, pero empleando una temperatura de alineamiento de 57 °C.

El producto de amplificación se separó mediante electroforesis en gel de agarosa, se purificó a partir del gel, y se clonó en el vector indicado previamente linealizado con las enzimas *Bam*HI y *Sal*I (Takara), siguiendo las recomendaciones de

las casas comerciales. Posteriormente, el plásmido recombinante se utilizó para transformar células competentes de *E. coli* DH5 α (Thermo Fisher Scientific), utilizadas para su mantenimiento, siguiendo los procedimientos especificados en el apartado 3.1. Una vez confirmada la correcta inserción del gen en el vector mediante PCR y secuenciación, empleando los cebadores específicos indicados por la casa comercial, se procedió a la transformación de *E. coli* BL21 (GE Healthcare).

Tabla 6. Secuencia de los cebadores utilizados para la clonación del gen *mcp* de LCDV-Sa en el vector pGEX-6P-3.

Cebadores	Secuencia (5' $\rightarrow$ 3')	Tamaño amplicón
MMP-pGEX-F	AA GGATCC ATGACTTCTGTAGCGG	1396 pb
MMP-pGEX-R	AG GTCGAC CTACAACACAGGGAA	

Se señalan las secuencias correspondientes al sitio de reconocimiento de las enzimas de restricción *Bam*HI (amarillo) y *Sal*I (cian).

Para la expresión de la proteína recombinante se sembró el clon de *E. coli* BL21 seleccionado en caldo 2x YT (1% triptona, 1% extracto de levadura, 0,5% NaCl, pH 7) con ampicilina (100 μ g/ml) y se incubó a 37 °C hasta alcanzar la fase exponencial de crecimiento. Posteriormente, se añadió al cultivo isopropil β -D-tiogalactopiranosido (IPTG, Sigma-Aldrich) a una concentración de 0,8 mM, analizándose la expresión de la proteína tras 1, 2 y 3 h. Finalizado el periodo de inducción, el cultivo se centrifugó a 7700 x g, 10 min a 4 °C y el pellet se suspendió en PBS. Tras sonicar (Ultrasons-HD, Selecta) en hielo, se añadió Triton X-100 (Sigma-Aldrich) al 1% y se dejó 30 min en agitación a temperatura ambiente. El lisado celular se centrifugó a 12000 x g durante 10 min a 4 °C, y el sobrenadante se conservó a -20 °C.

La expresión de la proteína en el sobrenadante de los lisados bacterianos se puso de manifiesto mediante Western-blot. Para ello, se separaron las proteínas presentes en el sobrenadante mediante electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS (SDS-PAGE) al 12,5% y se electrotransfirieron a membranas de Immobilon-P (Millipore), usando un procedimiento estándar (Mahmood and Yang, 2012). La detección de GST

en la membrana se realizó utilizando el protocolo de inmunoblot descrito en el apartado 3.2.2, empleando como anticuerpo primario anti-GST (Sigma-Aldrich) (dilución 1:2000 en PBS-T₅-M), y anti-IgG de conejo marcado con peroxidasa (Sigma-Aldrich) como anticuerpo secundario (1:4000 en PBS-T₅-M).

Una vez comprobada la expresión de la proteína recombinante, y seleccionado el tiempo de inducción con IPTG (2 h), se procedió a su purificación mediante cromatografía de afinidad utilizando columnas comerciales con GST inmovilizado en una matriz de sefarosa (Glutathione Sepharose 4B, GE Healthcare), siguiendo las instrucciones del fabricante.

4.3.3.2. Ensayo inmunoenzimático indirecto (ELISA)

Para evaluar la producción de anticuerpos anti-MCP en los peces vacunados se llevó a cabo un ELISA de captura. Como antígeno para el recubrimiento de las placas se usó la MCP vírica obtenida como se indicó en el apartado anterior. La concentración de proteínas presentes en la muestra se determinó mediante espectrofotometría utilizando ácido bicinchonínico (Sigma-Aldrich) y albúmina sérica bovina (BSA, Sigma-Aldrich) como estándar.

Se utilizaron placas de 96 pocillos (Nunc Maxisorp, Thermo Fisher Scientific) a las que se adicionaron 100 µl por pocillo de la GST-MCP diluida en bicarbonato 100 mM a una concentración de 10 µg/ml, y se incubó toda la noche a 4 °C. Tras lavar tres veces durante 5 min con PBS suplementado con Tween 20 al 0,25% (PBS-T₂₅), se saturó la placa durante 1 h a temperatura ambiente usando 300 µl de PBS-T₂₅ con BSA al 0,25% (p/v) (PBS-T-BSA). Una vez lavadas las placas (3 x 5 min con PBS-T₂₅), se añadieron 50 µl/pocillo de diluciones dobles seriadas en PBS de las muestras de suero a analizar, incubándose durante 2 h a temperatura ambiente. Como control negativo se utilizaron sueros de doradas no vacunadas diluidos 1:100 en PBS, y para determinar la absorbancia de fondo del ensayo (blanco) se utilizaron pocillos a los que se añadió PBS-T₂₅ en lugar de suero de peces. Tras la incubación, se volvió a lavar como se indicó anteriormente y se añadieron 50 µl/pocillo de suero anti-Ig de dorada (1:800 en PBS-T-BSA) y se incubó durante 2 h a temperatura ambiente. Se realizó otro paso de lavado, y se añadieron 50 µl/pocillo de un anticuerpo monoclonal anti-

IgG de conejo marcado con peroxidasa (Sigma-Aldrich) a una dilución 1:3000 en PBS-T-BSA y se incubó durante 1 h a temperatura ambiente. Finalmente, tras un último paso de lavado, la actividad peroxidasa se reveló usando 50 µl/pocillo de 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine (TMB, Sigma-Aldrich) e incubando durante 10 min a temperatura ambiente. La reacción se paró añadiendo 50 µl/pocillo de una solución de parada comercial (Sigma-Aldrich) y las absorbancias se leyeron a 450 nm usando un lector de ELISA (Microplater Reader, 2002, Whittaker). El título de anticuerpos anti-MCP se definió como la máxima dilución de suero con un valor de absorbancia superior a la media del control negativo más la desviación estándar multiplicada por tres (Classen *et al.* 1987).

4.3.3.3. Ensayo de neutralización

Para determinar la capacidad del suero de neutralizar al LCDV-Sa se utilizaron mezclas de muestras de suero de peces vacunados obtenidas a los 1, 2 y 3 meses pv. Se ensayaron tres concentraciones de la suspensión vírica (10^4 , 10^3 y 10^2 TCID₅₀/ml) y dos diluciones de suero (1:32 y 1:64, en medio de inoculación). Se mezclaron volúmenes iguales de la suspensión vírica y la dilución del suero, o del medio de inoculación (control negativo), y se incubaron durante 1 h a 20 °C. La presencia de partículas víricas infectivas, no neutralizadas, en estas mezclas se determinó mediante el ensayo ICC-RT-PCR descrito por Valverde *et al.* (2016a). Para ello, se inocularon monocapas semiconfluentes de células SAF-1 en placas de 24 pocillos con 200 µl de las suspensiones víricas. A los 5 dpi, se recogieron las células, se lisaron y se procedió a la extracción de RNA y obtención de cDNA tal y como se describió en el apartado 1.1.4. Posteriormente se realizó una PCR usando los cebadores LCDVs-F y LCDVs-R (apartado 1.1.4) y los productos amplificados se desnaturalizaron y se detectaron mediante hibridación en blot usando una sonda específica marcada con digoxigenina.



RESULTADOS



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

1. ESTUDIO DE LA CARGA VIRAL EN DORADAS INFECTADAS POR LCDV-Sa Y SU RELACIÓN CON EL CURSO DE LA INFECCIÓN

1.1. Estudio del curso de la infección en doradas infectadas experimentalmente

En este estudio se utilizaron ejemplares juveniles de dorada procedentes de una población en la que se descartó que existiesen portadores asintomáticos del LCDV-Sa. Los peces se infectaron mediante inyección intraperitoneal, determinándose, a distintos tiempos p_i , la presencia de genoma y transcritos víricos, así como la carga viral. Al mismo tiempo, los animales se observaron para detectar la aparición de signos macroscópicos de LCD. Ningún pez del grupo control desarrolló la enfermedad, ni tampoco se detectaron genomas ni transcritos víricos en ninguna de las muestras analizadas obtenidas de doradas de este grupo.

Se detectó genoma vírico mediante nPCR en aleta caudal de todos los peces inyectados con LCDV-Sa analizados entre 2 y 16 dpi, con una carga viral que varió entre $1,4 \times 10^2$ y $3,8 \times 10^3$ copias de DNA vírico por mg de tejido (Tabla 7), sin diferencias significativas ($p < 0,05$) en función del tiempo p_i . Sin embargo, solo se detectaron transcritos víricos en un 40% de las muestras de aleta caudal analizadas. En el caso de cerebro, se detectó el virus en dos de los animales analizados a 2 dpi, mientras que a los 4 dpi el 100% de los individuos fueron positivos. A diferencia de lo que ocurría en aleta caudal, a partir de los 7 dpi disminuyó la cantidad de individuos positivos para la detección de genoma viral en cerebro, siendo de dos individuos a 7 dpi y un individuo a 11 y 16 dpi (Tabla 7). En ninguno de estos peces pudo observarse la presencia de linfocistes, por lo que presentaban una infección subclínica o asintomática.

A los 21 dpi, se volvieron a inyectar las doradas con LCDV-Sa, usando la misma dosis administrada en la primera inoculación, intentando así mantener y/o aumentar la carga viral en los peces para conseguir desarrollar los signos de la enfermedad. Los primeros peces en los que pudo observarse la presencia de linfocistis característicos aparecieron a los 31 dpi, es decir, 10 d tras la re-inoculación (Figura 13). La progresión de la enfermedad en estos peces fue muy rápida, y a los 43 dpi ya no se detectaron linfocistis en las doradas infectadas.

Tabla 7. Detección de genomas y transcritos de LCDV-Sa en doradas juveniles infectadas de forma experimental y evolución temporal de la carga viral estimada mediante PCR a tiempo real.

Detección LCDV-Sa ^a							Signos LCD	
Aleta caudal			Cerebro		Carga viral en aleta caudal ^b			
PCR	nPCR	PCR	PCR	nPCR	Rango	Media ± SEM		
2 dpi	0	3	0	2	4,6 x 10 ² – 3,5 x 10 ³	(1,6 ± 1,0) x 10 ³	2	-
4 dpi	0	3	0	3	2,0 x 10 ³ – 7,6 x 10 ²	(5,7 ± 1,9) x 10 ²	0	-
7 dpi	0	3	0	2	1,4 x 10 ² – 6,8 x 10 ²	(4,1 ± 1,5) x 10 ²	0	-
11 dpi	0	3	0	1	1,7 x 10 ² – 7,0 x 10 ³	(3,9 ± 1,6) x 10 ²	1	-
16 dpi	0	3	0	1	1,1 x 10 ³ – 3,8 x 10 ³	(2,9 ± 0,9) x 10 ³	3	-
Re-inoculación (21 dpi)								
31 dpi	3	3	1	3	5,9 x 10 ⁴ – 1,2 x 10 ⁸	(3,9 ± 3,9) x 10 ⁷	3	+
39 dpi	3	3	3	3	1,0 x 10 ⁴ – 4,4 x 10 ⁵	(1,5 ± 1,5) x 10 ⁵	3	+
43 dpi	1	3	0	3	3,6 x 10 ¹ – 1,7 x 10 ²	(8,1 ± 4,4) x 10 ¹	2	-
57 dpi	0	3	0	3	3,6 x 10 ¹ – 2,1 x 10 ²	(1,2 ± 0,5) x 10 ²	0	-

^a Número de peces positivos (n = 3).

^b Carga viral expresada como copias de DNA vírico/mg de tejido.

SEM: Error estándar de la media.

LCD: enfermedad de linfocistis.



Figura 13. Ejemplar de dorada con signos característicos de LCD recogido a los 31 dpi. Se señalan con flechas linfocistes en aleta pectoral y cabeza. Barra = 1cm.

En esta segunda fase del experimento, se detectó genoma vírico mediante PCR en el 100% de las muestras de aleta caudal analizadas y en un 66,7% (100% mediante nPCR) de las de cerebro a los 31 y 39 dpi (peces con signos de LCD), con una carga viral estimada en aleta caudal superior a 1×10^4 copias DNA vírico/mg de tejido (Tabla 7). Esta carga viral es significativamente superior a la observada a los 2-16 dpi ($p < 0,01$). Una vez que los animales se recuperaron de la enfermedad, se siguió detectando LCDV-Sa mediante nPCR en el 100% de las muestras de aleta caudal y cerebro analizadas, aunque la carga viral descendió significativamente ($p < 0,01$) con respecto a la estimada a los 31-39 dpi, con una media de $(9,9 \pm 3,1) \times 10^1$ copias DNA vírico/mg de tejido.

1.2. Cuantificación viral en doradas procedentes de un brote de linfocistis

Se determinó la carga viral en alta caudal mediante qPCR en 40 ejemplares de dorada recogidos de una población que sufría un brote de LCD. El LCDV-Sa se detectó en el 100% de los animales analizados que mostraban signos de LCD y en un 80% de los animales asintomáticos (Tabla 8). En las doradas con signos de enfermedad la carga viral osciló entre $3,3 \times 10^3$ y $8,5 \times 10^8$ copias DNA vírico/mg de tejido, mientras que en peces asintomáticos la carga viral fue de $(4,8 \pm 1,5) \times 10^2$ copias DNA vírico/mg de tejido. En el grupo de peces enfermos, se observó una relación entre el número de copias de DNA vírico estimado en aleta y el grado de afectación por la enfermedad, detectándose una mayor extensión de los linfocistes en individuos que tenían una mayor carga viral.

Tabla 8. Detección de LCDV-Sa y cuantificación de la carga viral mediante qPCR en aleta caudal de doradas juveniles procedentes de un brote de la enfermedad de linfocistis.

Signos LCD	Detección LCDV-Sa ^a	Carga viral en aleta caudal ^b	
		Rango	Media $\pm$ SEM
+	100 (20)	$3,3 \times 10^3 - 8,5 \times 10^8$	$(8,4 \pm 4,8) \times 10^7$
-	80 (20)	$2,5 \times 10^1 - 1,9 \times 10^3$	$(4,8 \pm 1,5) \times 10^2$

^a Porcentaje de peces positivos (número de peces analizados).

^b Carga viral expresada como copias de DNA vírico/mg de tejido.

LCD: enfermedad de linfocistis.

SEM: Error estándar de la media.

En la Figura 14 se muestran las cargas virales estimadas para todos los peces analizados, tanto procedentes de la infección experimental como del brote de LCD. No se observaron diferencias significativas entre la carga viral de las doradas con infección subclínica para ambos grupos experimentales, ni entre los animales infectados experimentalmente antes del desarrollo de síntomas o tras su recuperación ($p < 0,01$). En cuanto a las doradas con signos de LCD tampoco existen diferencias significativas ($p < 0,01$) en la carga viral estimada entre infección natural y experimental.

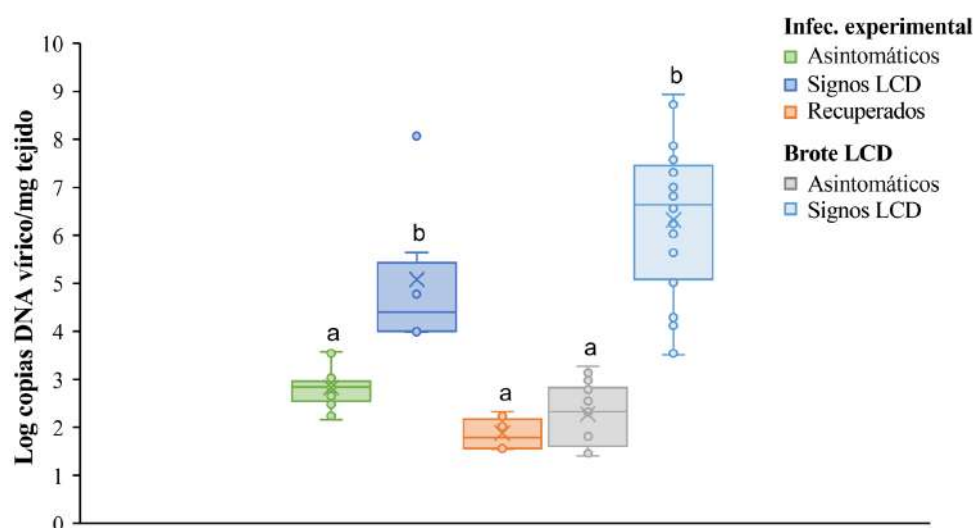


Figura 14. Comparación de la carga viral en aleta caudal de juveniles de dorada infectadas experimentalmente por LCDV-Sa o procedentes de un brote de la enfermedad de linfocistis. Los animales se han agrupado en función de la presencia de signos de la enfermedad. Las distintas letras indican diferencias significativas para $p < 0,01$.

2. ESTUDIO DE LA RESPUESTA INMUNE DE DORADAS FRENTE A LA INFECCIÓN POR LCDV-Sa

2.1. Carga viral y expresión génica vírica

Para estudiar la progresión temporal de la infección por LCDV-Sa en doradas tras su inoculación por inyección intramuscular se determinó el número de copias de DNA vírico y la expresión del gen *mcp*.

No se observó mortalidad ni signos de la enfermedad durante el tiempo que se extendió el experimento (8 d). El LCDV-Sa se detectó mediante qPCR en todas las muestras de peces inoculados analizadas, mientras que no hubo amplificación de genoma vírico en los peces del grupo control procesados en paralelo. En la Figura 15 se muestra la carga viral en los órganos analizados a diferentes tiempos pi. En las muestras de aleta caudal, la cantidad de DNA vírico permaneció estable a lo largo del experimento, con una carga viral estimada de $9,5 \pm 0,9$ copias de DNA vírico/mg de tejido. La carga viral en riñón cefálico no mostró diferencias significativas ($p < 0,05$) con respecto a la obtenida en aleta caudal a 1 y 3 dpi, mientras que en el intestino fue significativamente menor ($p < 0,05$) en todos los tiempos analizados. Al final del ensayo, la carga viral en riñón cefálico e intestino fue menor que en aleta caudal, sin diferencias significativas entre ambos órganos ($p < 0,05$). Por último, en intestino a los 8 dpi se registró una disminución significativa de la carga viral con respecto a los niveles estimados en muestras de ese órgano analizadas a 1 y 3 dpi.

Se detectaron transcritos víricos en cuatro de los cinco peces analizados a 1 dpi y en todos los peces muestreados a los 3 y 8 dpi, aunque no en todos los órganos analizados en un mismo pez (Figura 16). Los valores de F se mantuvieron bajos durante todo el experimento, sin diferencias significativas ($p < 0,05$) en función del órgano o tiempo de muestreo.

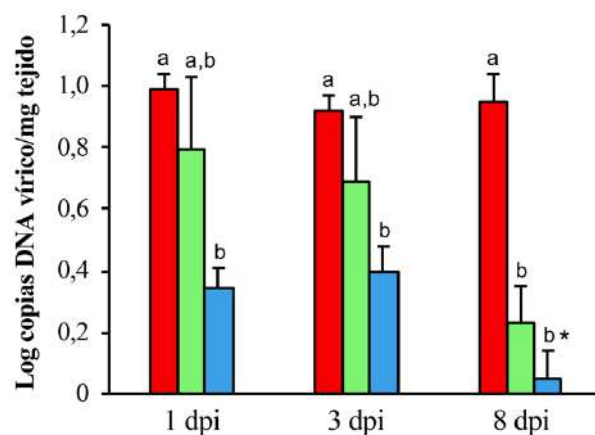


Figura 15. Carga viral en doradas infectadas con LCDV-Sa determinada mediante PCR a tiempo real. Los datos se expresan como la media $\pm$ SEM ($n = 5$). Las letras indican diferencias significativas entre los órganos analizados a diferentes tiempos post-inoculación, mientras que las diferencias significativas entre diferentes tiempos para un mismo órgano se indican con un asterisco ($p < 0,05$). Aleta caudal (columnas rojas), riñón cefálico (columnas verdes) e intestino (columnas azules).

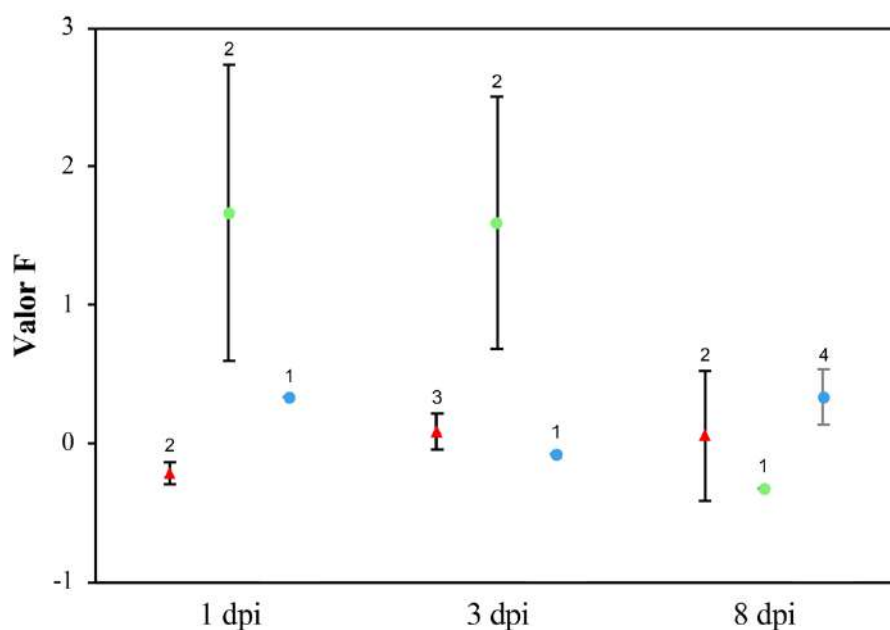


Figura 16. Valores de expresión relativa del gen *mcp* (media $\pm$ SEM) en muestras de doradas inoculadas con LCDV-Sa. Se indica el número de muestras positivas por órgano y tiempo analizado (número total de peces analizados por tiempo muestreado, $n = 5$). Aleta caudal (triángulos), riñón cefálico (círculos verdes) e intestino (círculos azules).

2.2. Expresión de genes relacionados con la respuesta inmune

Para evaluar la respuesta inmune contra el LCDV-Sa se analizaron un total de 23 genes en riñón cefálico e intestino a diferentes tiempos pi. El análisis de agrupamiento realizado mostró claramente la existencia de perfiles de expresión específicos para cada órgano que cambian a lo largo de la infección (Figura 17). En riñón cefálico, se observó una clara diferencia en el perfil de expresión a 1-3 dpi en comparación con el obtenido a 8 dpi, mientras que en intestino los perfiles fueron específicos para cada tiempo.

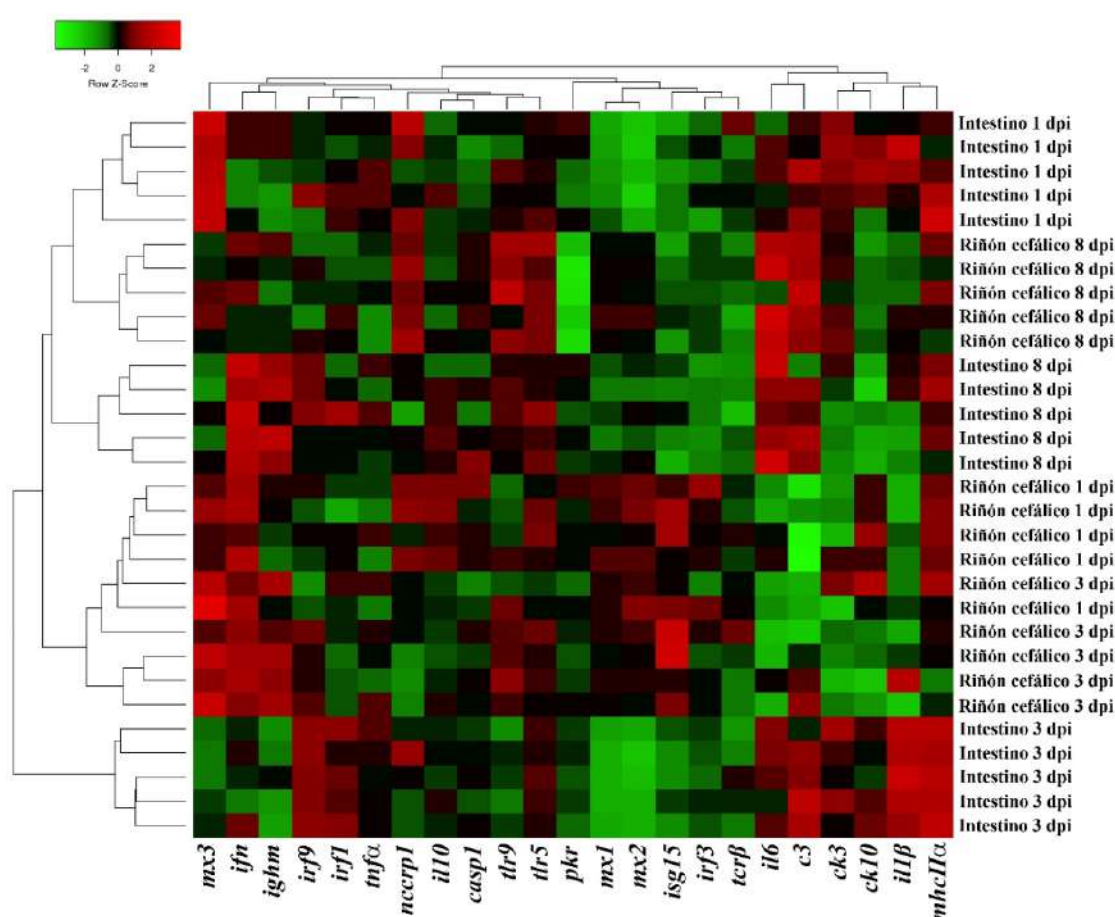


Figura 17. Análisis de agrupamiento jerárquico de muestras de riñón cefálico e intestino de doradas inoculadas con LCDV-Sa basado en el análisis de 23 genes relacionados con el sistema inmune. Los datos se expresan como $\log_2$ de la expresión relativa [$\log_2$ (FC)]. Los colores verde y rojo indican valores de expresión bajos o altos según la escala mostrada.

El *pkr* fue el único gen que no mostró expresión diferencial en ninguna de las muestras analizadas procedentes de doradas inoculadas con LCDV-Sa. Los dos órganos analizados compartían 14 genes con expresión diferencial. Por el contrario, solo cuatro genes aparecían sobre- o infra-regulados en riñón cefálico (*il10*, *nccrp1*, *mhcIIa* y *tnfa*) o en intestino (*mx1*, *casp1*, *ck3* y *tlr9*) de manera exclusiva (Figura 18).

Respecto a las muestras de riñón cefálico, se observó la expresión diferencial de 18 genes, incluyendo *ifn*, *irf3*, *isg15*, *mx3*, *il10*, *ck10* e *ighm* cuya expresión estaba sobreactivada a 1 dpi (3 dpi en el caso de *ighm*), si bien algunos de estos genes (*irf3*, *isg15*, *il10*, *ck10* e *ighm*) aparecieron desactivados a los 8 dpi. La expresión de *mx2* y *mhcIIa* también estaba sobre-regulada a 1 dpi, aunque sus niveles de expresión no eran significativamente distintos ($p < 0,05$) a los del grupo control a los 3 y 8 dpi. Los únicos genes sobre-regulados al final del experimento fueron *nccrp1* (también sobre-regulado a 1 dpi), *tlr5* y *c3* (cuya expresión estaba desactivada a 1 dpi). Los demás genes expresados diferencialmente mostraron una desactivación, *il6* a los 3 dpi, mientras que *irf1*, *irf9*, *il1 β* , *tnfa* y *tc β* aparecieron desactivados los 8 dpi (Figura 18.A).

El número de genes que se expresaron de manera diferencial en intestino en respuesta a la infección por LCDV-Sa fue también de 18, pero el sentido y/o la temporalidad de la expresión difirieron en ambos órganos (Figura 18.B). A 1 dpi, sólo *mx3* y *ck3* estaban sobreactivados, mientras que *irf3*, *isg15*, *mx1*, *mx2* y *casp1* aparecían desactivados. A 3 dpi, la desactivación de *irf3*, *isg15* y *mx1* se mantenía y además se desactivaron *tlr9*, *mx3*, *ighm* y *tc β* . Al igual que se observó en riñón cefálico, *irf3*, *il1 β* , *ck10* y *tc β* aparecían infra-regulados a los 8 dpi. La expresión de *tlr5*, *irf1*, *irf9*, *il6* y *c3* estaba sobre-regulada a los 3 dpi. Finalmente, a los 8 dpi se mantenía la sobre-regulación de *tlr5*, *irf9* e *il6*, observándose un desfase temporal con respecto al riñón cefálico en la sobre-regulación de *ifn* e *ighm*.

Figura 18. Volcano plots mostrando los genes expresados diferencialmente en riñón cefálico (A) y en intestino (B) de doradas inoculadas con LCDV-Sa a diferentes tiempos post-inoculación. El eje vertical corresponde a $-\log_{10}$ (p -valor) y el eje horizontal es el $\log_2$ de la expresión relativa.



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

Por otra parte, se realizó un análisis comparativo de los niveles de transcripción a lo largo del tiempo en ambos órganos estudiados. Cinco genes, *tlr9*, *tnfa*, *casp1*, *ck3* y *mhcIIa*, solo se expresaron diferencialmente en uno de los órganos en un único tiempo muestreado y por ello no se incluyeron en el análisis. Solo dos genes expresados diferencialmente estaban sobre-regulados en ambos órganos, *tlr5* a 3 y 8 dpi (con valores de expresión relativa, FC, de 1,6 y 1,8, respectivamente), e *ifn* a 1 y 3 dpi en riñón cefálico (FC de 3 y 2,3, respectivamente) y a 8 dpi en intestino (FC de 5,8) (Figura 19). Los transcritos analizados que codifican para IRF mostraron una regulación específica para cada órgano, observándose una sobre-regulación de *irf1* e *irf9* a los 3 dpi en intestino (FC de 2,9 y 3,3, respectivamente), pero una infra-regulación a los 8 dpi en riñón, mientras que, por el contrario, *irf3* solo apareció sobre-regulado a 1 dpi en riñón cefálico (FC de 1,7), presentando el mismo nivel de infra-regulación en el resto de muestras analizadas. En riñón cefálico, *isg15*, *mx2* y *mx3* se sobreexpresaron diferencialmente de forma temprana en la infección (con valores de expresión relativa que van de 1,8 a 3,6), mientras que la abundancia de sus transcritos no fue significativamente diferente del grupo control a los 8 dpi (en el caso de *isg15* la expresión relativa fue significativamente inferior). Por otro lado, la expresión de genes estimulados por interferón (IFN) tipo I estaba infra-regulada en las muestras de intestino a 1 y 3 dpi, excepto para el gen *mx3* que apareció sobre-regulado a 1 dpi (FC de 3,8), invirtiendo su regulación a los 3 dpi.

En lo referente a las citoquinas analizadas, los perfiles de expresión obtenidos consistieron en una sobre-regulación temprana de *il10* y *ck10* en muestras de riñón cefálico (FC de 1,6 y 1,7, respectivamente), que se invirtió a 8 dpi (Figura 19). En intestino sólo *ck10* mostró una infra-regulación. La expresión de *il6* a 3 dpi estaba sobre-regulada en intestino (FC de 2,4), manteniendo los niveles de sobreexpresión a 8 dpi, mientras que en riñón cefálico aparecía infra-regulada. La *il1β* estaba significativamente infra-regulada en ambos órganos a 8 dpi.

La transcripción del gen que codifica la fracción C3 del complemento estaba inicialmente infra-regulada en riñón cefálico a 1 dpi y sobre-regulada en intestino a 3 dpi, presentando un nivel de transcripción similar a 8 dpi en riñón cefálico (FC de 3,9 y 2,7, respectivamente).

Por último, se observó una sobreexpresión de *nccrp1* en riñón cefálico a 1 y 8 dpi (FC de 1,6 y 1,8) y para *ighm* a 3 y 8 dpi en intestino y riñón cefálico, respectivamente (FC de 2,2 y 4,2), mientras que la expresión para *tcrβ* a los 8 dpi aparecía infra-regulada en ambos órganos.

Figura 19. Niveles de expresión relativa ($2^{-\Delta\Delta C_t}$) de genes seleccionados analizados en riñón (columnas verdes) e intestino (columnas azules) a diferentes tiempos post-inoculación. Los datos se expresan como media $\pm$ SEM (n = 5). Los asteriscos muestran las diferencias significativas entre el grupo control y el grupo infectado. Las letras muestran las diferencias significativas entre órganos y tiempos analizados ($p < 0,05$).

Figura 19. (Continuación).

Figura 19. (Continuación).

3. CARACTERIZACIÓN DE LA VACUNA DNA FRENTE A LCDV-Sa

3.1. Expresión *in vitro* del plásmido vacunal

Se transfectaron células SAF-1 para demostrar si podría expresarse la MCP en células de dorada a partir del ORF clonado en el plásmido vacunal. En primer lugar, la expresión de la proteína se detectó por microscopía de fluorescencia, ya que el vector de expresión codifica una proteína de fusión con GFP. A las 3 y 24 h post-transfección se pudo observar fluorescencia correspondiente a la GFP en células transfectadas con el plásmido pcDNA-MCP o con el control positivo, aunque a 24 h se observó un incremento de la muerte celular, mientras que para el control negativo no se obtuvo señal (Figura 20).

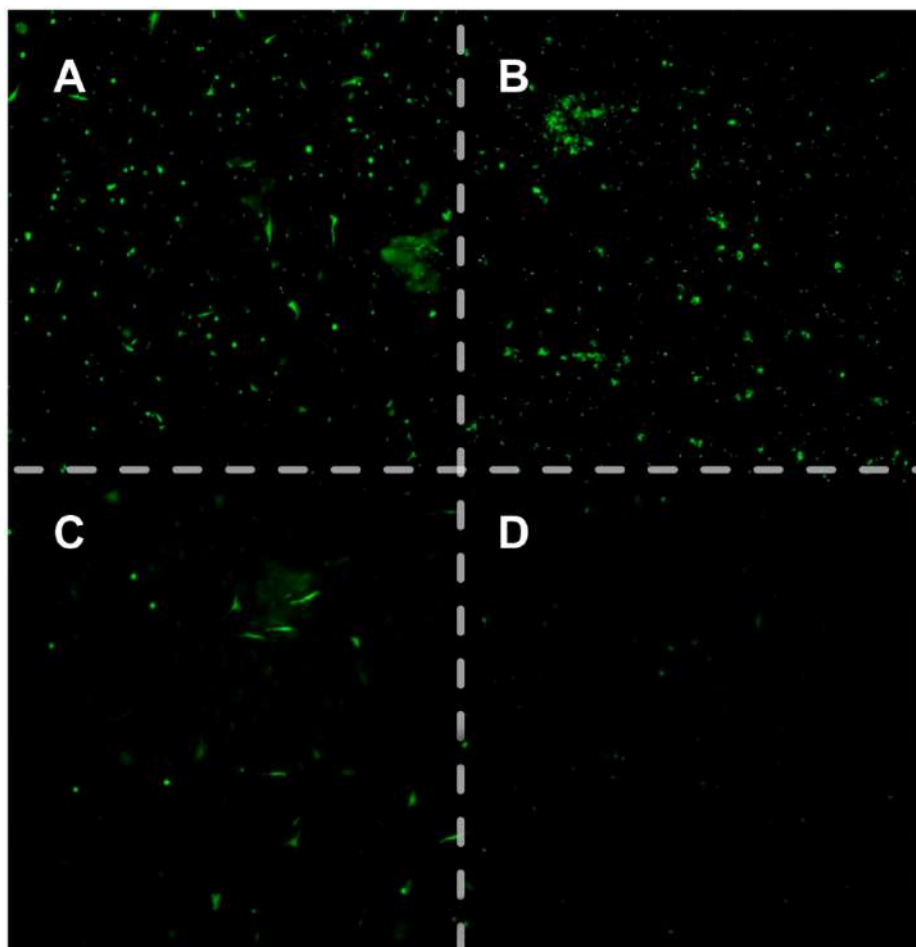


Figura 20. Expresión de GFP en células SAF-1 transfectadas. A, B: Plásmido vacunal (pcDNA-MCP), 3h y 24 h post-transfección, respectivamente. C: Control positivo de la transfección y expresión de GFP. D: Control negativo (pcDNA). Microscopía de fluorescencia.

Por otra parte, se realizó en paralelo un inmunoensayo dot-blot para comprobar si había expresión de MCP en las células. Para ello se analizó el sobrenadante de un lisado de células transfectadas con los plásmidos pcDNA-MCP o pcDNA, así como de células sin transfectar. Como puede observarse en la Figura 21, a las 24 h post-transfección fue posible detectar la MCP en células SAF-1.

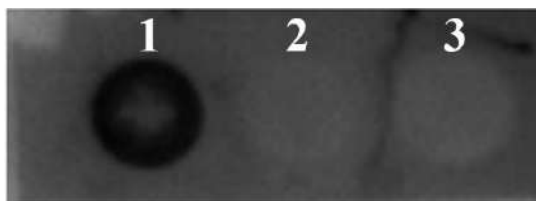


Figura 21. Inmunodetección de la MCP en la línea celular SAF-1 a las 24 h post-transfección. 1: Células transfectadas con pcDNA-MCP. 2: Células transfectadas con pcDNA. 3: Células sin transfectar.

3.2 Distribución y expresión de la vacuna en doradas

Se realizó un experimento de vacunación con ejemplares juveniles de dorada con el fin de valorar si la vacuna se distribuía de forma sistémica en el pez y su capacidad de expresión. Para ello, se analizó el músculo como sitio de entrada del plásmido vacunal (inyección intramuscular), la aleta caudal como órgano principal de replicación del LCDV y el riñón cefálico como principal órgano hematopoyético. Se realizó una nPCR de las muestras a 7, 14 y 20 d post-vacunación (dpv), detectándose el plásmido vacunal en todos los peces analizados en los tres órganos y a todos los tiempos muestreados (Figura 22).

En referencia a la expresión, se analizó la presencia de transcritos específicos mediante RT-nPCR en los mismos órganos y a los mismos tiempos, visualizándose en gel de agarosa el amplicón de 224 pb correspondiente al RNAm que codifica la MCP (Figura 23). La expresión del gen *mcp* del plásmido vacunal no se detectó en muestras de aleta caudal de ninguno de los peces analizados. En las muestras de músculo, zona de inoculación del pcDNA-MCP, se detectaron transcritos en los tres individuos analizados a 7 dpv, mientras que a los 14 dpv solo se detectó en dos animales y a 20 dpv únicamente en uno de los peces analizados. Finalmente, en riñón se detectó la expresión de la MCP en todas las muestras analizadas.

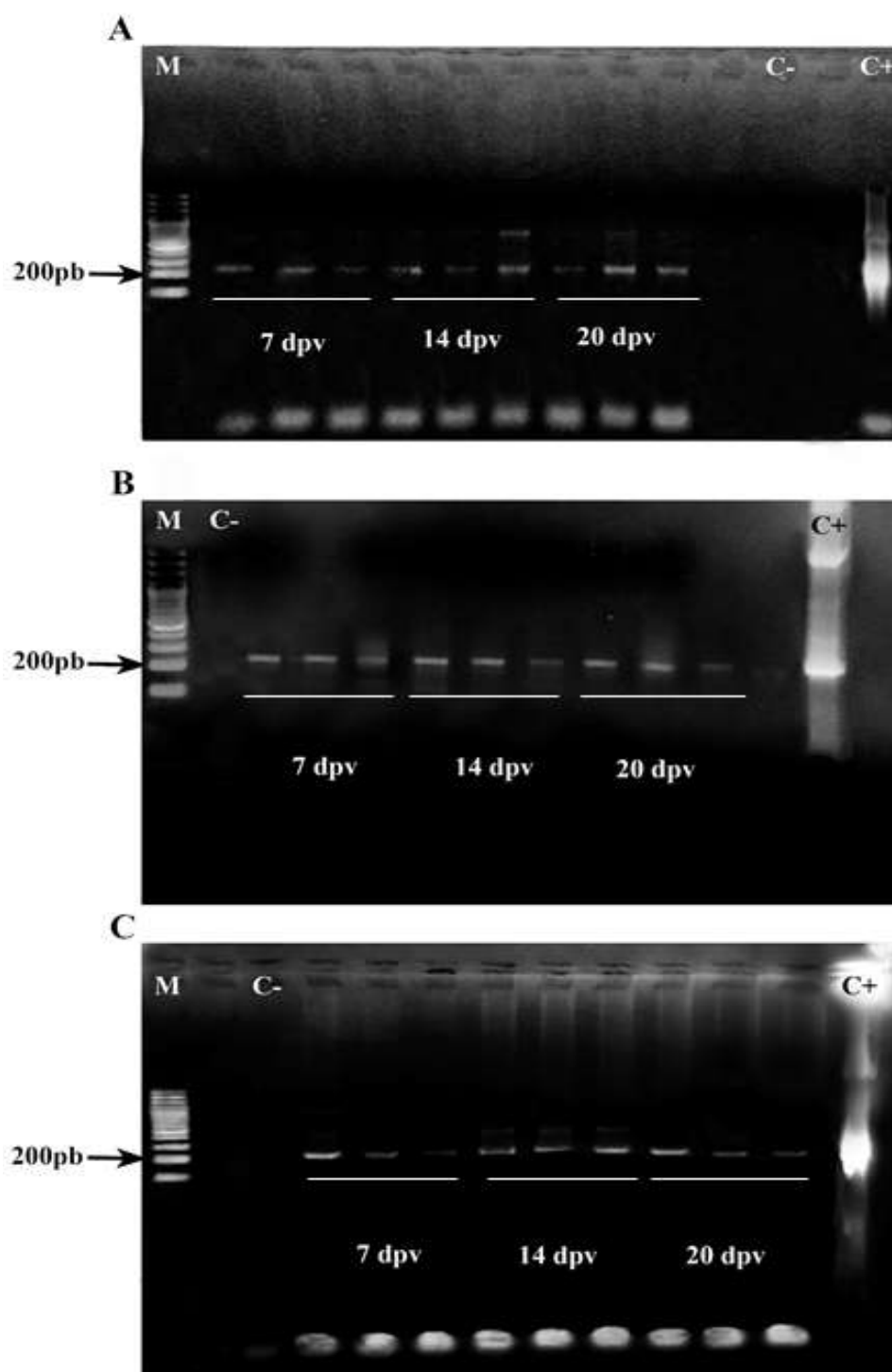


Figura 22. Detección del plásmido pcDNA-MCP mediante nested-PCR a 7, 14 y 20 d post-vacunación (dpv). A: Muestras de músculo. B: Muestras de aleta caudal. C: Muestras de riñón cefálico. C-: muestras de peces del grupo control (inyectados con pcDNA). C+: control positivo de amplificación de *mcp*. M: marcador de peso molecular.

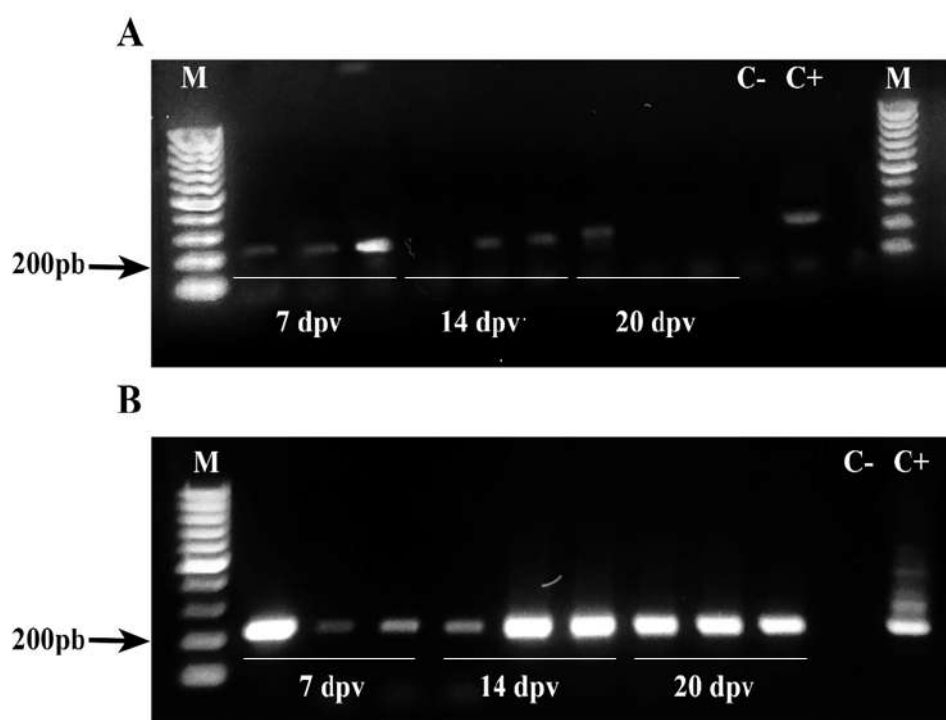


Figura 23. Expresión del plásmido vacunal determinada mediante RT-nPCR en peces vacunados a 7, 14 y 20 post-vacunación (dpv). A y B: Detección de RNA mensajero del gen *mcp* en músculo y riñón cefálico, respectivamente. C-: muestras de peces del grupo control (inyectados con pcDNA). C+: control positivo de amplificación de *mcp*. M: marcador de peso molecular.

4. EVALUACIÓN DE LA VACUNA DNA EN DORADA

4.1. Evaluación del ensayo de qPCR para la cuantificación de LCDV-Sa

La especificidad del ensayo de qPCR se determinó mediante análisis de las curvas de disociación generadas en cada experimento. La temperatura de fusión de los productos de PCR obtenidos con el plásmido recombinante usado como estándar y con las muestras positivas fue de $78 \pm 0,5$ °C. El tamaño de los amplicones se comprobó mediante electroforesis en gel de agarosa, observándose bandas correspondientes al tamaño esperado (122 pb).

El rango dinámico, la eficiencia y la precisión se evaluaron empleando el plásmido recombinante que contiene el fragmento del gen *mmp* del LCDV-Sa de 416

pb. Las curvas estándar generadas a partir de tres ensayos independientes mostraron una relación lineal entre la cantidad de DNA plasmídico y los valores de Ct obtenidos en un rango de concentración de 10^6 hasta 2 copias por reacción (Figura 24). El análisis de regresión mostró un coeficiente de correlación ($r \geq 0,997$) y una eficiencia de amplificación de $99,03 \pm 3,53\%$.

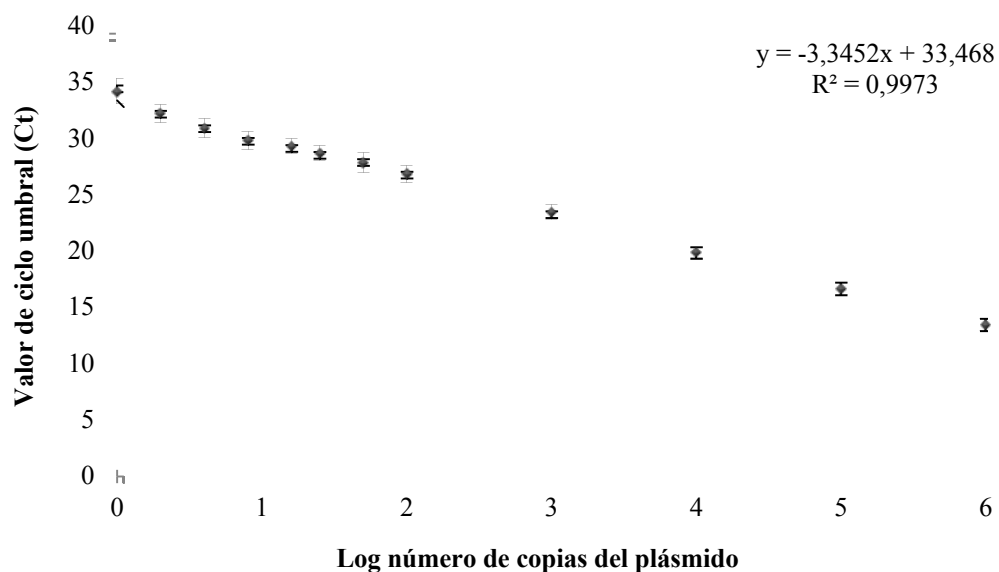


Figura 24. Curva estándar obtenida a partir de diluciones de DNA plasmídico en un rango de 10^6 a 2 copias por reacción. La regresión lineal se obtuvo a partir de los datos medios de tres reacciones independientes. Se representa el logaritmo en base 10 (log) del número de copias del plásmido frente al valor del ciclo umbral (Ct).

La variación media intra-ensayo fue de $2,63 \pm 0,65\%$, obtenida tras analizar tres réplicas de diluciones del plásmido en un mismo ensayo, mientras que la variación media inter-ensayo entre tres experimentos fue de $2,57 \pm 0,60\%$ (Tabla 9). Estos valores de CV se consideraron aceptables para validar la reproducibilidad del ensayo.

Tabla 9. Variabilidad intra- e inter-ensayo de la PCR a tiempo real diseñada.

Copias/reacción	Variación intra-ensayo		Variación inter-ensayo	
	Ct ^a	CV (%)	Ct ^a	CV (%)
1 x 10 ⁵	16,78±0,54	3,21	16,39±0,42	2,56
1 x 10 ⁴	20,03±0,55	2,74	19,78±0,32	1,61
1 x 10 ³	23,63±0,80	3,38	23,26±0,44	1,80
1 x 10 ²	27,38±0,86	3,14	26,55±0,26	0,97
5 x 10 ¹	28,43±0,68	2,39	27,47±0,85	3,09
2,5 x 10 ¹	28,98±0,83	2,86	28,47±0,46	1,61
1,6 x 10 ¹	29,13±0,90	3,08	29,17±0,80	2,74
8 x 10 ⁰	30,40±0,54	1,77	29,48±0,65	2,20
4 x 10 ⁰	31,63±0,76	2,40	30,03±0,59	1,96
2 x 10 ⁰	32,94±0,45	1,36	31,96±0,65	2,03
CV (%) total ^a		2,63 ± 0,65		2,57 ± 0,60

^a Media ± desviación estándar (SD).

CV: coeficiente de variación.

4.2. Protección inducida por la vacunación

Se llevó a cabo un experimento *in vivo* con el fin de comprobar la eficacia que presentaba el plásmido pcDNA-MCP como vacuna DNA en relación a la capacidad de protección en dorada frente a la infección por LCDV-Sa. Dicha capacidad de protección se estimó mediante la detección y cuantificación de genoma viral en muestras de aleta caudal (principal órgano diana del LCDV-Sa), usando en ambos casos el protocolo de qPCR diseñado.

Los peces se vacunaron mediante inyección intramuscular (o se inyectaron con el plásmido vacío como control) y a los 21 dpv se inocularon con el virus. En el grupo control se detectó genoma vírico en aleta caudal en un 83,3% de los animales analizados a 2 dpi y en un 100% a los 10 dpi (Figura 25). La carga viral estimada en estos peces fue de $(1,6 \pm 0,9) \times 10^1$ copias de DNA vírico/mg de tejido a los 2 dpi, observándose un incremento significativo ($p < 0,05$) a los 10 dpi, con una carga viral media estimada de $(1,4 \pm 0,7) \times 10^2$ copias de DNA vírico/mg de tejido (Figura 26). En el grupo de peces

vacunados se detectó genoma vírico en un 33,3% de los animales analizados a 2 y 10 dpi (Figura 25), con una carga viral media estimada de $(3,0 \pm 1,2) \times 10^1$ copias de DNA vírico/mg de tejido, no observándose diferencias significativas ($p < 0,05$) entre la carga viral determinada a 2 y 10 dpi (Figura 26).

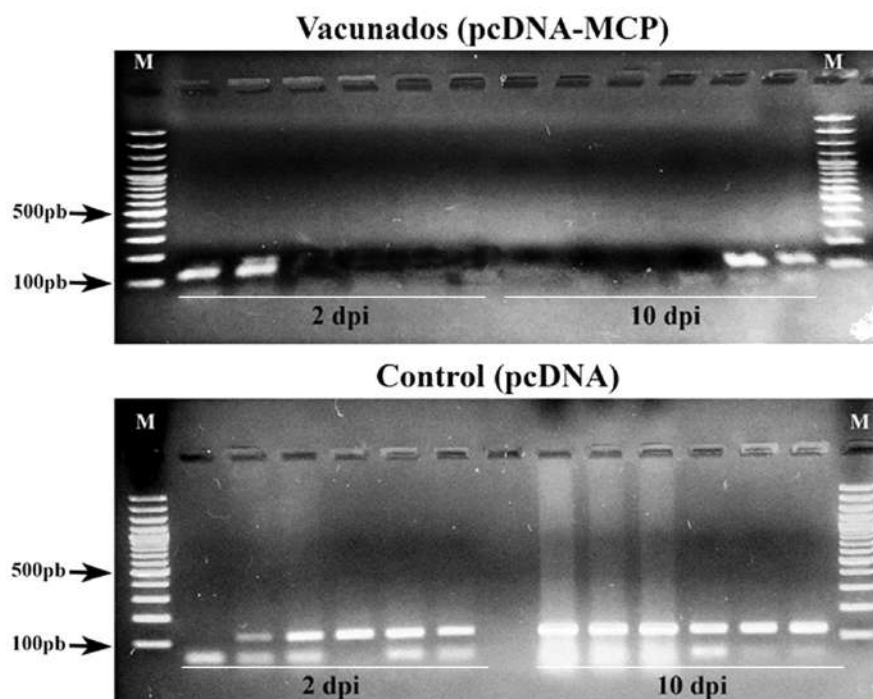


Figura 25. Detección de LCDV-Sa mediante qPCR en muestras de aleta caudal de doradas vacunadas y controles (inyectadas con pcDNA) inoculadas con LCDV-Sa a los 21 d post-vacunación. Las muestras se tomaron a los 2 y 10 d post-inoculación (dpi) del virus. M: marcador de peso molecular.

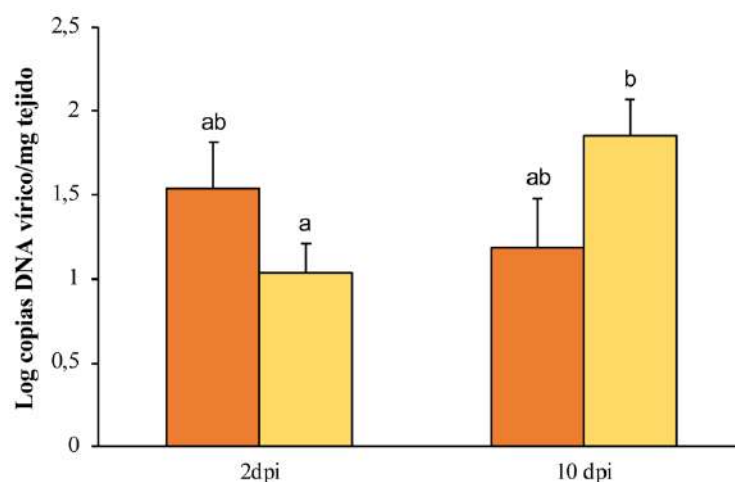


Figura 26. Carga viral en doradas vacunadas (columnas naranjas) y controles (columnas amarillas) infectadas con LCDV-Sa determinada mediante qPCR. Los datos se expresan como media $\pm$ SEM. Las letras indican diferencias significativas entre los dos grupos analizados a diferentes tiempos post-inoculación ($p < 0,05$).

Por otra parte, se procedió a determinar la presencia de transcritos víricos en aleta caudal y riñón cefálico como indicador de una infección productiva en los animales. En el grupo control se detectaron transcritos víricos en aleta caudal a 10 dpi en un 83,3% de los peces analizados (Figura 27.A) y en un 66,7% en el caso de muestras de riñón (analizadas a 1, 2 y 10 dpi) (Figura 27.B). En el caso del grupo de peces vacunados, solo se detectaron mensajeros víricos en una de las muestras de aleta caudal recogida a 10 dpi (Figura 27.A) y en dos de las muestras de riñón analizadas a 2 dpi (Figura 27.B).

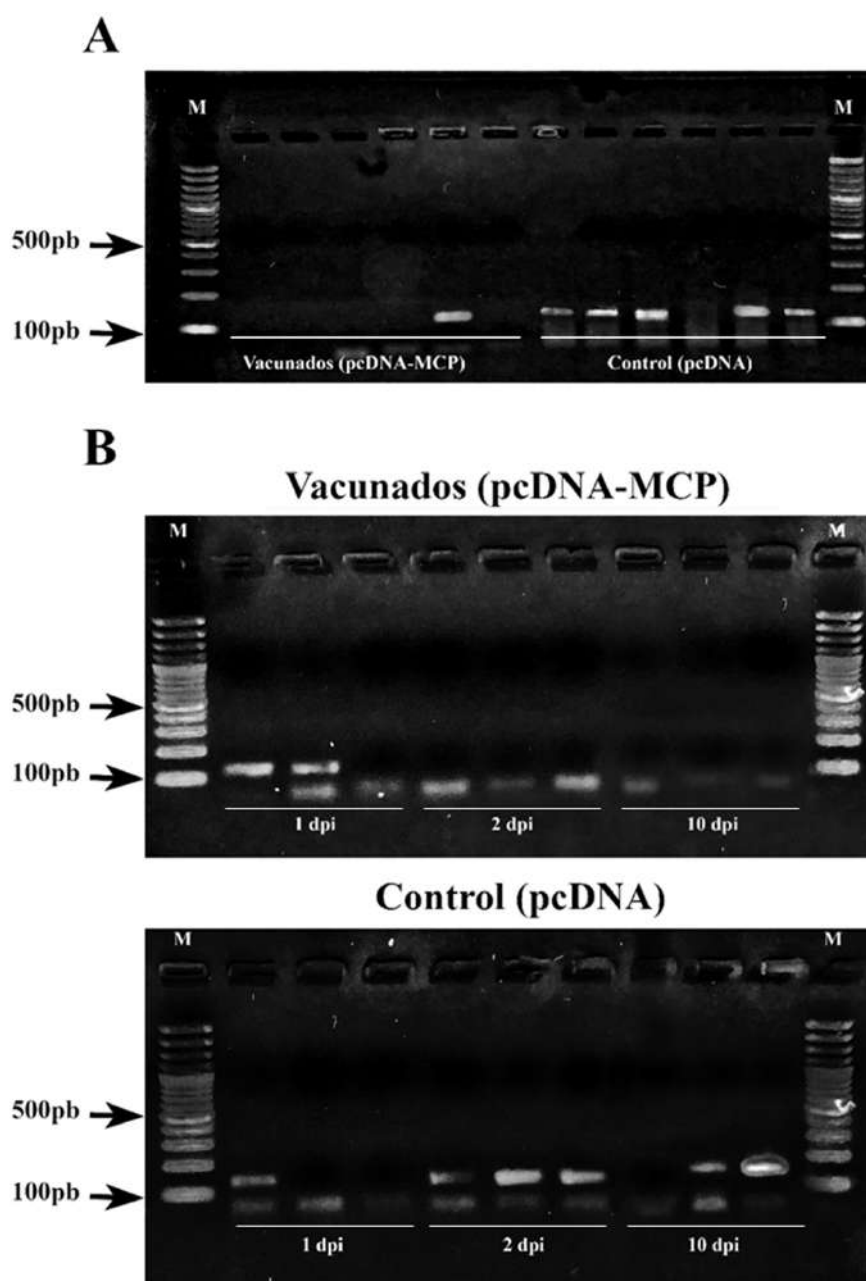


Figura 27. Detección de transcritos codificantes de MMP en doradas vacunadas y controles infectadas con LCDV-Sa a los 21 d post-vacunación. Las muestras se tomaron a los 1, 2 y 10 d post-inoculación (dpi) del virus. Muestras de aleta caudal (**A**) y riñón cefálico (**B**). M: marcador de peso molecular.

4.3. Evaluación de la respuesta inmune de doradas tras la vacunación

4.3.1. Expresión de inmunogenes en respuesta a la vacunación

4.3.1.1. *Expresión del plásmido vacunal*

En primer lugar, se comprobó la expresión del plásmido pcDNA-MCP en los peces vacunados mediante la detección del RNA mensajero codificante para la MCP utilizando un ensayo RT-qPCR. La expresión de *mcp* se observó en riñón cefálico y/o intestino de 4 de los 5 peces analizados a 1 y 3 dpv, mientras que a 8 dpv se detectó en todos los animales analizados (Figura 28).

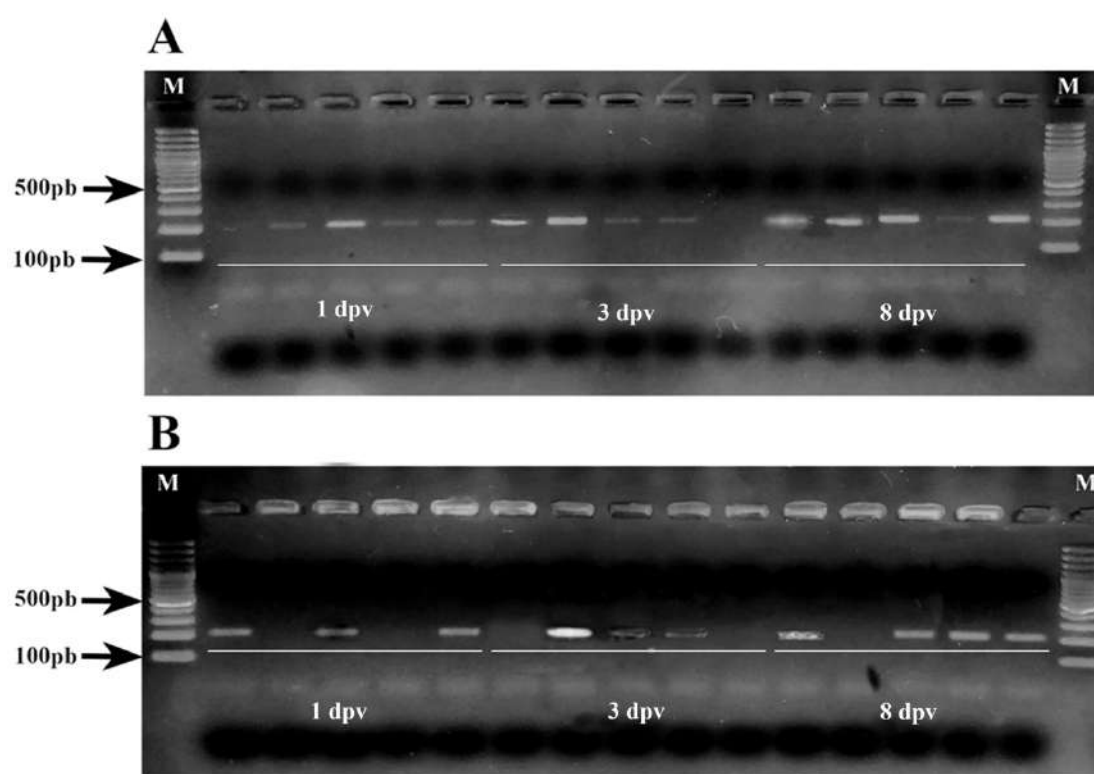


Figura 28. Detección de transcritos codificantes de MCP en doradas vacunadas con pcDNA-MCP a distintos tiempos post-vacunación en muestras de riñón cefálico (A) e intestino (B). Las muestras obtenidas de un mismo animal aparecen en la misma posición en ambos geles. M: marcador de peso molecular.

En cuanto al nivel de expresión relativa del gen *mcp*, este se mantuvo en niveles bajos en las muestras de intestino analizadas, observándose un descenso significativo

de la expresión ($p < 0,05$) entre 3 y 8 dpv. Por el contrario, en el riñón se observó un aumento significativo de la expresión relativa del plásmido vacunal a 8 dpv, alcanzándose un valor de FC de 41,8 con respecto al nivel detectado a 1 dpv (usado como calibrador) (Figura 29).

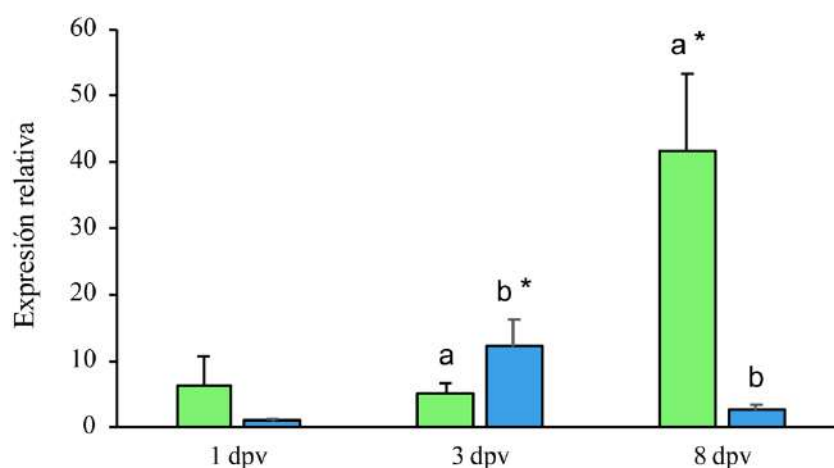


Figura 29. Valores de expresión relativa ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) del gen *mcp* en peces vacunados con pcDNA-MCP a distintos tiempos post-vacunación en muestras de riñón cefálico (columnas verdes) e intestino (columnas azules). Los datos se expresan como media $\pm$ SEM. Las letras indican diferencias significativas entre los órganos analizados a un determinado tiempo, mientras que las diferencias significativas para un mismo órgano entre diferentes tiempos se indican con un asterisco ($p < 0,05$).

4.3.1.2. Expresión de genes relacionados con el sistema inmune

Para poder evaluar la expresión de inmunogenes en doradas en respuesta a la vacunación con el pcDNA-MCP se analizaron 23 genes en riñón cefálico e intestino a diferentes tiempos pv. Se realizó un análisis de agrupamiento en el que se puso de manifiesto que los perfiles de expresión eran específicos de cada órgano analizado, observándose también una variación temporal (Figura 30). En ambos órganos hay una clara diferenciación de los perfiles de expresión a 8 dpv frente a 1 dpv, mientras que la mayor variabilidad entre individuos se observa en las muestras tomadas a 3 dpv.

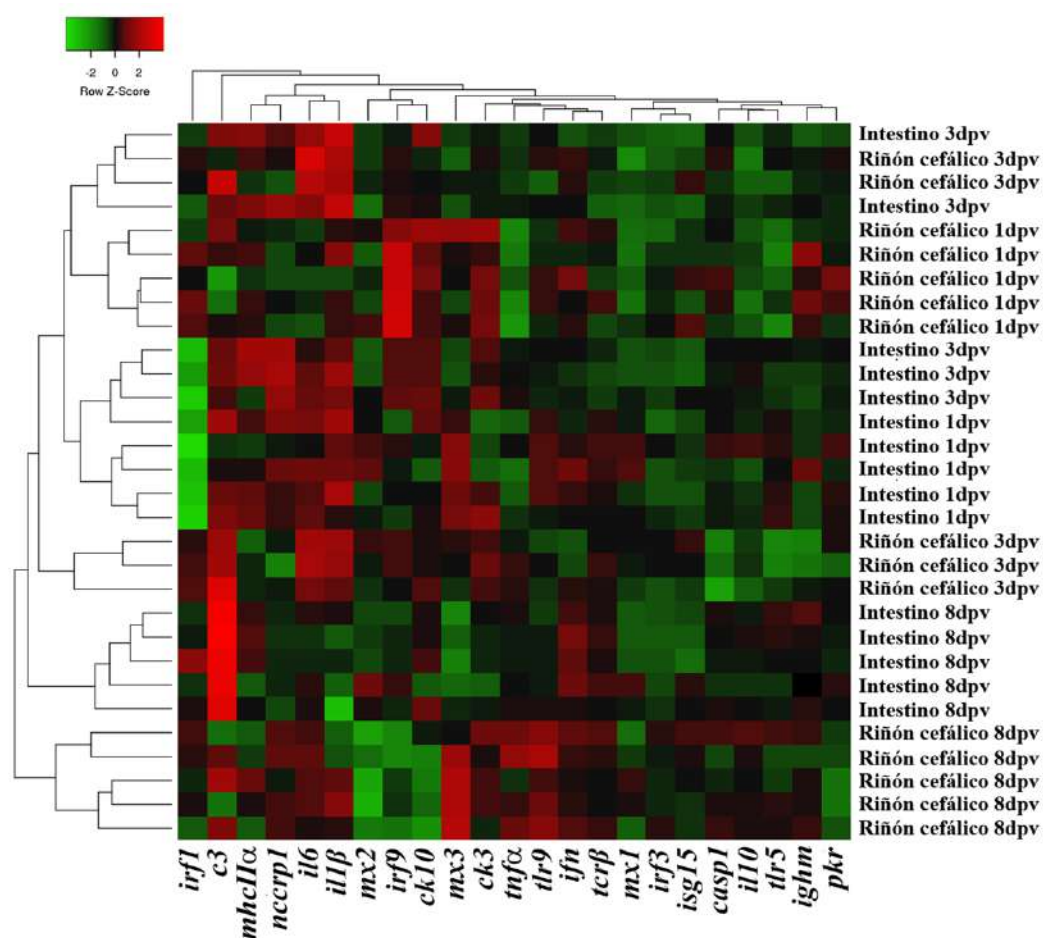


Figura 30. Análisis de agrupamiento jerárquico de muestras de riñón cefálico e intestino de doradas vacunadas intramuscularmente con pcDNA-MCP basado en el análisis de 23 genes relacionados con el sistema inmune. Los datos se expresan como $\log_2$ de la expresión relativa [$\log_2(\text{FC})$]. Los colores verde y rojo indican valores de expresión bajos o altos según la escala mostrada.

Los análisis realizados mostraron que en riñón cefálico e intestino aparecen 13 genes comunes con expresión diferencial. Además, solo tres genes estaban sobre- o infra-regulados de manera exclusiva en riñón cefálico (*mx1*, *mx2* y *ck3*), y siete en intestino (*irf1*, *isg15*, *casp1*, *nccrp1*, *mhclla*, *ighm* y *tcrb*) (Figura 31).



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

En las muestras de riñón cefálico se expresaron diferencialmente 16 genes, estando un 43,75% de los mismos exclusivamente infra-regulados, incluyendo *tlr5*, *irf3*, *mx1*, *mx2*, *pkrr*, *il10* y *tnfa*. En lo referente a la sobreactivación de genes, a 1 dpv, *ifn*, *irf9*, *ck3* y *ck10* mostraron una expresión significativamente ($p < 0,05$) superior a la del grupo control (peces inoculados con PBS). A 3 dpv, se mantuvo la sobreexpresión de *irf9* (que posteriormente se reprimió a 8 dpv), y los genes *il1 β* , *il6* y *c3* se sobreexpresaron de manera puntual. A los 8 dpv, tuvo lugar una sobre-regulación en la expresión de los genes *tlr9* y *mx3* (Figura 31.A).

En el caso del intestino, 20 genes se expresaron de manera diferencial en respuesta a la vacunación, de los cuales el 80% se sobreexpresaron en algún momento del experimento. Además, la cantidad de genes sobre-regulados se incrementó con el tiempo, siendo de tres genes (15%) a 1 dpv y alcanzando los 12 genes (65%) a los 8 dpv. Los genes desactivados a 1 pdv incluyeron *irf1* (cuya expresión también aparecía infra-regulada a 3 dpv), *irf3*, *isg15* y *tnfa*. Finalmente, no se observaron genes infra-regulados a 8 dpv (Figura 30.B).

El efecto de la inoculación del plásmido vacío pcDNA sobre la expresión génica en dorada también se analizó. En los peces inyectados con este plásmido se detectó una regulación diferencial de algunos de los genes ensayados. En el caso de muestras de riñón cefálico se observó la expresión diferencial de 14 genes, y solo dos de ellos, *tlr9* e *irf3*, aparecieron sobre-regulados a 8 y 3 dpv, respectivamente (Tabla 10). En el intestino, la respuesta fue claramente distinta, con 11 DEG detectados, siete de los cuales estaban sobreactivados. Cabe destacar la fuerte sobreactivación del gen *mx3* a 1 dpv, con un valor de FC de 24,6, muy superior al estimado para ese gen y tiempo de muestreo en los peces inyectados con la vacuna (FC 5,3) (Tabla 11).

Figura 31. Volcano plots mostrando los genes expresados diferencialmente en riñón cefálico (A) y en intestino (B) de doradas vacunadas con pcDNA-MCP a diferentes tiempos post-vacunación. El eje vertical corresponde a $-\log_{10}$ (p -valor) y el eje horizontal es el $\log_2$ de la expresión relativa.

Tabla 10. Expresión relativa y *p*-valor de inmunogenes en riñón cefálico de peces vacunados y del grupo control a diferentes tiempos post-vacunación.

Gen	1 dpv			3 dpv			8 dpv		
	pcDNA-MCP	pcDNA	<i>p</i> -valor	pcDNA-MCP	pcDNA	<i>p</i> -valor	pcDNA-MCP	pcDNA	<i>p</i> -valor
<i>tlr5</i>	0.49±0.10*	0.84±0.30	0.3109	0.58±0.36	4.12±0.98*	0.0086	1.37±0.91	0.52±0.09*	0.4046
<i>tlr9</i>	1.30±0.14	1.44±0.62	0.5076	0.91±0.46	0.58±0.16	0.7480	20.80±14.14*	5.17±1.91*	0.5403
<i>ifn</i>	2.01±0.55*	1.90±0.39	0.8657	1.57±0.63	1.17±0.13	0.8589	3.00±1.39	1.90±0.46	0.9205
<i>irf-1</i>	2.06±0.49	1.60±0.31	0.4631	2.48±1.07	0.69±0.07	0.0538	1.91±0.94	0.36±0.07	0.2898
<i>irf-3</i>	0.93±0.09	2.57±0.89	0.0147	0.54±0.05*	4.51±2.12*	0.0327	1.16±0.45	0.64±0.06	0.5349
<i>irf-9</i>	14.17±3.34*	2.14±1.01	0.0012	1.58±0.23*	1.38±0.64	0.3356	0.17±0.07*	0.34±0.05*	0.0996
<i>plkr</i>	1.72±0.36	1.53±0.37	0.7230	1.11±0.37	0.97±0.41	0.9743	0.37±0.18*	1.38±0.38	0.9112
<i>mx1</i>	0.53±0.09*	0.97±0.12	0.0459	0.45±0.06*	0.54±0.26	0.3669	0.62±0.25	0.73±0.04	0.2873
<i>mx2</i>	1.23±0.37	1.26±0.19	0.7379	0.76±0.07	0.49±0.07	0.0371	0.08±0.06*	0.59±0.02	0.0015
<i>mx3</i>	3.02±0.61	1.70±1.86*	0.7617	0.69±0.06*	0.19±0.02	0.0001	17.01±8.45*	0.16±0.01*	0.0001
<i>isg15</i>	1.26±0.20	1.68±0.54	0.8073	0.94±0.25	1.92±0.90	0.7210	1.69±0.82	0.52±0.28	0.2621
<i>tnfa</i>	0.34±0.08*	0.73±0.12*	0.0372	1.25±0.39	0.97±0.11	0.8928	10.99±8.02	0.51±0.13*	0.0795
<i>caspl</i>	1.43±0.29	1.20±0.15	0.6392	0.69±0.49	0.46±0.10*	0.3227	1.38±0.84	0.76±0.13	0.6870
<i>il-1β</i>	2.76±1.30	0.05±0.01*	0.0001	12.14±2.50*	0.38±0.13*	0.0001	1.31±0.52	0.52±0.22	0.2168
<i>il-6</i>	1.02±0.25	0.02±0.00*	0.0001	28.39±11.65*	0.32±0.04*	0.0001	3.69±1.84	0.82±0.30	0.1329
<i>il-10</i>	0.71±0.17	1.61±0.19	0.0165	0.26±0.02*	0.74±0.09	0.0006	2.04±0.94	1.16±0.16	0.9079
<i>ck3</i>	4.19±1.67*	1.02±0.30	0.0188	2.50±0.73	0.34±0.08*	0.0016	3.54±2.10	0.56±0.11	0.0290
<i>ck10</i>	4.04±1.69*	0.81±0.32	0.0303	1.91±0.97	0.32±0.08*	0.0185	0.33±0.21*	0.09±0.01*	0.6588
<i>c3</i>	2.08±1.17	0.49±0.21	0.2334	309.41±290.65*	0.30±0.14*	0.0051	4.41±2.29	0.72±0.27	0.6448
<i>ncgrp-1</i>	0.99±0.23	0.75±0.26	0.3314	0.86±0.40	0.40±0.08*	0.8254	3.56±1.84	0.75±0.22	0.1341
<i>tcrb</i>	1.48±0.42	0.82±0.25	0.2108	1.29±0.35	0.16±0.09*	0.0030	2.17±0.99	0.07±0.008*	0.0006
<i>ighm</i>	3.07±1.44	1.95±0.51	0.4754	0.80±0.33	1.17±0.13	0.1803	1.31±0.63	1.92±0.49	0.3121
<i>mhcIIa</i>	1.69±0.39	2.66±1.00	0.3524	1.15±0.60	0.90±0.09	0.6042	0.93±0.45	0.75±0.08	0.5573

Los datos se expresan como expresión relativa ($2^{-\Delta\Delta C_t}$) (media $\pm$ SEM, $n = 5$). Los asteriscos indican genes diferencialmente expresados (DEG) con respecto al grupo control inoculado con PBS. En negrita se indican las diferencias significativas entre el grupo vacunado (pcDNA-MCP) y el grupo control (pcDNA) ($p < 0.05$).

Tabla 11. Expresión relativa y *p*-valor de inmunogenes en intestino de peces vacunados y del grupo control a diferentes tiempos post-vacunación.

Gene	1 dpv			3 dpv			8 dpv		
	pcDNA-MCP	pcDNA	<i>p</i> -valor	pcDNA-MCP	pcDNA	<i>p</i> -valor	pcDNA-MCP	pcDNA	<i>p</i> -valor
<i>tlr5</i>	1.77±0.57	0.77±0.08	0.0391	1.31±0.27	1.11±0.60	0.2793	2.35±0.15*	0.81±0.11	0.0001
<i>tlr9</i>	2.57±0.85	1.55±0.29	0.4258	1.67±0.20*	0.50±0.04*	0.0001	1.71±0.39	1.38±0.29	0.5212
<i>ifn</i>	1.91±0.54	1.30±0.34	0.3463	1.39±0.30	1.52±0.40	0.9296	5.44±1.04*	6.58±1.69*	0.7676
<i>irf-1</i>	0.03±0.02*	1.73±0.48	0.0001	0.08±0.05*	0.48±0.25	0.0536	7.24±5.49	2.06±0.50	0.5013
<i>irf-3</i>	0.58±0.14*	0.91±0.21	0.5700	0.66±0.13	1.54±0.97	0.5341	0.77±0.14	1.03±0.08	0.1189
<i>irf-9</i>	0.91±0.22	1.83±0.51	0.1239	4.39±1.15*	2.43±1.15	0.2603	1.48±0.30	1.31±0.31	0.6561
<i>pkr</i>	1.46±0.37	0.88±0.18	0.2099	1.44±0.30	0.24±0.12*	0.0083	1.83±0.22*	1.03±0.20	0.0849
<i>mx1</i>	1.72±0.45	2.52±0.33	0.1821	0.80±0.30	0.26±0.03*	0.1186	1.24±0.46	2.42±0.45	0.0766
<i>mx2</i>	1.90±0.60	2.12±0.35	0.4933	0.84±0.34	0.20±0.05*	0.0726	1.96±0.77	2.56±0.67	0.4276
<i>mx3</i>	5.34±0.99*	24.59±5.59*	0.0012	0.50±0.25	3.65±0.12	0.2612	2.03±0.26	0.30±0.69	0.0370
<i>isg15</i>	0.65±0.20*	1.11±0.48	0.8819	0.72±0.35	0.48±0.23	0.4965	1.14±0.40	1.08±0.40	0.6206
<i>tnfa</i>	0.59±0.19*	1.52±0.44	0.0947	1.72±0.33	0.93±0.22	0.0812	1.97±0.34*	1.33±0.38	0.1785
<i>caspl</i>	1.35±0.50	1.43±0.27	0.5620	1.76±0.23*	0.49±0.12*	0.0027	1.98±0.24*	1.37±0.12	0.0296
<i>il-1β</i>	11.34±7.26*	1.11±0.22	0.0286	46.41±22.71*	4.92±0.65	0.0093	0.87±0.34	0.56±0.19	0.9943
<i>il-6</i>	4.90±2.63*	0.83±0.23	0.0335	9.10±2.28*	3.11±1.39	0.0287	1.97±0.32*	1.66±0.46	0.4452
<i>il-10</i>	1.16±0.44	0.747±0.19	0.5786	1.66±0.46	0.86±0.13	0.2487	1.76±0.26*	2.71±0.98	0.7259
<i>ck3</i>	1.80±1.12	1.03±0.24	0.9939	4.07±1.43	1.12±0.14	0.0565	1.35±0.24	0.40±0.13*	0.0082
<i>ck10</i>	2.39±1.65	1.20±0.36	0.7911	6.09±1.43*	0.51±0.21	0.0014	4.58±2.30*	0.91±0.19	0.0699
<i>c3</i>	9.88±7.33	0.88±0.10	0.1128	8.27±1.30*	3.76±0.97*	0.0408	553.65±180.56*	36.10±5.16	0.0021
<i>ncrp-1</i>	4.90±3.15	0.83±0.24	0.0774	32.22±9.44*	1.08±0.28	0.0003	1.05±0.11	0.59±0.07*	0.0096
<i>tcrb</i>	2.11±0.75	1.44±0.28	0.5819	0.86±0.22	0.55±0.11	0.4898	2.43±0.18*	1.27±0.23	0.0139
<i>ighm</i>	1.37±0.63	0.59±0.27	0.2607	1.11±0.16	0.16±0.07	0.0018	3.18±0.20*	1.04±0.74	0.0023
<i>mhcIIa</i>	2.62±1.06	1.50±0.34	0.4709	26.85±11.28*	3.47±0.42	0.0021	2.86±0.70*	2.14±0.47*	0.6534

Los datos se expresan como expresión relativa ($2^{-\Delta\Delta C_t}$) (media $\pm$ SEM, $n = 5$). Los asteriscos indican genes diferencialmente expresados (DEG) con respecto al grupo control inoculado con PBS. En negrita se indican las diferencias significativas entre el grupo vacunado (pcDNA-MCP) y el grupo control (pcDNA) ($p < 0.05$).

Posteriormente, se analizó de forma comparativa la expresión génica relativa de los genes diferencialmente expresados en los grupos vacunado y control (inyectado con el plásmido vacío). En riñón cefálico, sólo 12 de los 16 genes que se expresaban diferencialmente mostraron diferencias significativas ($p < 0,5$) con el grupo inyectado con pcDNA (Tabla 10). La mitad de esos genes aparecían exclusivamente sobreactivados, *irf9*, *ck3* y *ck10* a 1 dpv (ninguno de estos eran genes diferencialmente expresados en el grupo control a ese tiempo pv), e *il1 β* , *il6* y *c3* a 3 dpv (en este caso, se trataba de DEG infra-regulados en el grupo control, con valores de FC entre 0,3 y 0,4). Los genes infra-regulados fueron *mx1* y *tnfa* (1 dpv), *irf3* e *il10* (3 dpv), y *mx2* (8 dpv). Estos genes no se expresaron diferencialmente en peces del grupo control, o lo hicieron con el mismo sentido que en el grupo vacunado, a excepción de *irf3* que muestra una sobre-regulación (FC de 4,5) en peces control a los 3 dpv. El gen *mx3* estaba infra-regulado a 3 dpv (FC de 0,7) y sobreactivado a 8 dpv (FC de 17), mientras que su expresión en el grupo control a esos tiempos se mantuvo desactivada (FC de 0,2) (Tabla 10).

En el caso del intestino, solo 13 de los 20 DEG detectados mostraron una expresión diferencial con respecto a los peces inoculados con pcDNA. Solo *irf1* mostró una infra-regulación a 1 dpv (mientras que en peces del grupo control este gen aparecía sobreexpresado a este tiempo, con un valor de FC de 1,7), mientras que el resto de los genes aparecieron sobre-regulados a distintos tiempos pv (Tabla 11). Los genes *tlr5*, *tlr9*, *ck10*, *casp1* e *ighm* aparecieron sobreexpresados a 3/8 dpv en peces vacunados, mientras que en los peces control su expresión estaba reprimida a esos tiempos. Por otra parte, el gen *mx3* estaba sobreexpresado a 1 dpi tanto en peces vacunados como control, si bien en este último caso el nivel de expresión relativa fue muy superior (valores de FC de 5,4 y 24,6, respectivamente) (Tabla 11). El resto de los DEG con expresión significativamente distinta entre peces vacunados y controles, *il1 β* , *il6*, *c3*, *nccrp1*, *mhcIIa* y *tcrc β* , presentaron el mismo sentido de regulación en ambos grupos experimentales, si bien los valores de expresión relativa fueron significativamente mayores ($p < 0,05$) en peces vacunados (Tabla 11).

Por último, se realizó un análisis comparativo de los niveles de transcripción a lo largo del tiempo para ambos órganos estudiados, seleccionando solo los 20 genes que

mostraban una diferencia significativa de expresión con respecto a los genes expresados en los animales inyectados con pcDNA (grupo control). Catorce de estos genes, *tlr5*, *tlr9*, *irf1*, *irf3*, *irf9*, *mx1*, *mx2*, *il10*, *tnfa*, *ck3*, *nccrp1*, *mhcIIa*, *ighm* y *tcrl*, se expresaron diferencialmente con respecto al grupo control en uno de los órganos en un único tiempo muestreado y por ello no fueron incluidos en el análisis.

En la Figura 32 se muestran los niveles de expresión relativa para los genes considerados. El gen *mx3* se sobre-reguló entre 3 y 8 dpv en riñón cefálico, pasando de valores de expresión relativa (FC) de 0,7 a 17, mientras que en intestino solo apareció sobreexpresado a 1 dpv. La expresión de *casp1* presentó una sobre-regulación en intestino a 3 y 8 dpv, no observándose diferencias significativas ($p < 0,05$) en los valores de expresión relativos para ambos tiempos. Los perfiles de expresión obtenidos para *il1 β* e *il6* fueron similares, con una sobreexpresión temprana en intestino (valores de FC de 4,9 y 11,3 a 1 dpv, y 9,1 y 46,4 a 3 dpv, respectivamente) y riñón cefálico (FC de 12,1 y 28,4 a 3 dpv, respectivamente). La *ck10* en riñón cefálico se sobreexpresó a 1 dpv y pasó a reprimirse a 8 dpv, mientras que en intestino se sobre-reguló a partir del tercer dpv, sin presentar diferencias significativas en los niveles de expresión a lo largo del tiempo. Finalmente, la transcripción de la fracción c3 del complemento se sobre-reguló en intestino en todos los tiempos analizados, alcanzando un valor máximo de expresión relativa de 553,6 a los 8 dpv, mientras que en riñón cefálico apareció sobreexpresado solo a 3 dpv (FC de 309,4).

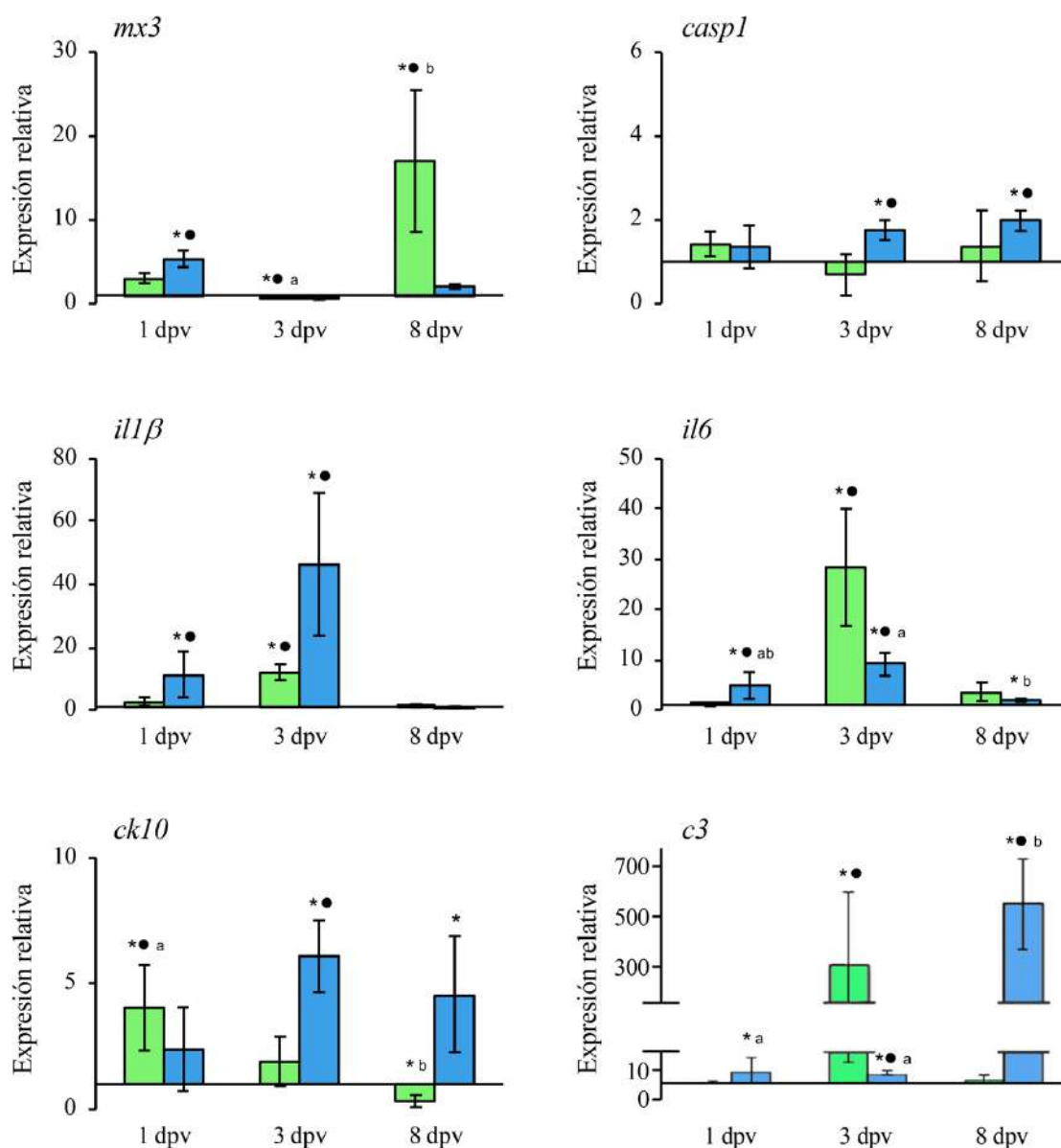


Figura 32. Niveles de expresión relativa ($2^{-\Delta\Delta C_t}$) de genes seleccionados analizados en riñón (columnas verdes) e intestino (columnas azules) a diferentes tiempos post-vacunación. Los datos se expresan como media $\pm$ SEM ($n = 5$). Los asteriscos muestran los genes diferencialmente expresados en el grupo vacunado (es decir, con diferencias significativas con el grupo inyectado con PBS) mientras que los puntos muestran los genes con expresión significativamente distinta entre el grupo vacunado y el grupo control (inyectado con pcDNA). Las letras muestran las diferencias significativas en un órgano para los tiempos analizados ($p < 0,05$).

4.3.2. Producción de anticuerpos en doradas vacunadas

Se utilizó un ELISA de captura para la detección de anticuerpos anti-MCP en el suero de doradas vacunadas (Figura 33). El título más alto de anticuerpos se determinó en los sueros recogidos al mes post-vacunación (título de 4096). En los sueros de los animales analizados a los 2 y 3 meses pv el título fue de 1024.

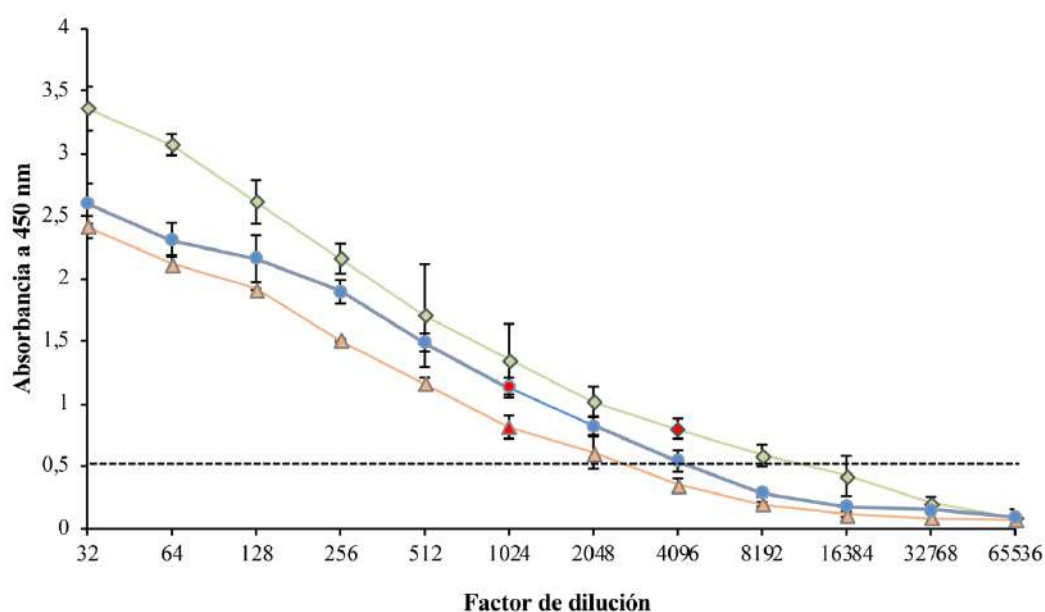


Figura 33. Titulación mediante ELISA de anticuerpos anti-MCP en suero de doradas recogidos a 1 (verde), 2 (azul) y 3 (naranja) meses post-vacunación. Se representa la media $\pm$ SD de la absorbancia de cinco sueros por grupo. La línea discontinua marca el umbral de positividad (media del control negativo + 3 x SD). En rojo se indica el título de anticuerpos para cada grupo analizado.

Además de la cuantificación de anticuerpos, se evaluó la capacidad neutralizante del suero de los peces vacunados. Para ello se realizó un ensayo de neutralización y la presencia de partículas víricas infectivas en presencia de suero se puso de manifiesto mediante la detección de transcritos víricos por PCR-hibridación en cultivos celulares procesados a los 5 dpi. El suero de doradas vacunadas a una dilución 1:32 es capaz de neutralizar completamente la infectividad de un inóculo de LCDV-Sa correspondiente a 10^4 TCID₅₀/ml, mientras que la dilución 1:64 bloquea parcialmente la infectividad vírica de ese inóculo, neutralizando completamente un inóculo correspondiente a 10^3 TCID₅₀/ml. No se observaron diferencias en la capacidad neutralizante de los sueros recogidos a los 1, 2 y 3 meses pv.



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA



DISCUSIÓN



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

1. ESTUDIO DE LA CARGA VIRAL EN DORADAS INFECTADAS POR LCDV-Sa Y SU RELACIÓN CON EL CURSO DE LA INFECCIÓN

La enfermedad de linfocistis (LCD) constituye una de las enfermedades de etiología viral detectada con más frecuencia en las instalaciones de acuicultura marina mediterráneas y atlánticas, constituyendo una de las pocas patologías víricas con incidencia significativa en el cultivo de la dorada (Borrego *et al.*, 2001; Colorni & Prados, 2011). Aunque normalmente se describe como una enfermedad autolimitada, en la que las lesiones se resuelven en 20-45 d, dependiendo de la temperatura del agua, se han observado casos en los que la mortalidad puede llegar a ser del 45% en doradas juveniles, lo cual podría estar desencadenado por infecciones bacterianas secundarias o por un crecimiento excesivo de los linfocistes que limitan la respiración y/o alimentación del pez (Colorni & Prados, 2011; Dezfuli *et al.*, 2012; Haddad-Boubaker *et al.*, 2013). En estos peces recuperados el virus establece un estado portador que puede extenderse al menos durante dos meses, pudiendo detectarse el virus de forma sistémica (Cano *et al.*, 2009; Valverde *et al.*, 2017a). Por otra parte, en las piscifactorías de dorada es muy frecuente detectar infecciones asintomáticas, incluso en instalaciones en las que no se han detectado en cierto tiempo brotes de LCD, lo que indica que esta especie es un portador común de LCDV-Sa (Cano *et al.*, 2007; 2013; Valverde *et al.*, 2016; 2017a).

Unos pocos estudios se han centrado en la interacción patógeno-hospedador en infecciones por linfocistivirus. Sin embargo, existe poca información a cerca de determinados aspectos relacionados con el curso de la infección como, por ejemplo, la dosis infectiva, la cinética de replicación viral o su relación con el establecimiento de infecciones subclínicas. En el caso de la dorada, los estudios de patogénesis realizados se han basado exclusivamente en el análisis de infecciones naturales (Cano *et al.*, 2009a; 2013; Dezfuli *et al.*, 2012; Cordero *et al.*, 2016; 2017; Valverde *et al.*, 2017a), a excepción de sendos estudios sobre la transmisión del virus, realizados en larvas y alevines (Cano *et al.*, 2013; Valverde *et al.*, 2019).

En el trabajo realizado en la primera parte de la tesis, se analizó la evolución de la carga viral en doradas juveniles en el transcurso de una infección experimental por LCDV-Sa, analizándose también la expresión del gen *mcp*, un gen estructural vírico,

como indicador de la presencia de una infección productiva. Los datos de carga viral se compararon con los obtenidos para animales recogidos de una población que estaba sufriendo un brote de linfocistis, con el fin de determinar si existe una relación entre el grado de multiplicación vírica y el desarrollo de la enfermedad.

Se detectaron genoma y transcritos víricos en muestras de aleta caudal de los peces infectados mediante inyección intraperitoneal en todos los tiempos analizados. En los primeros 16 d post-infección no se apreció una variación significativa de la carga viral en relación al tiempo, siendo del orden de 10^3 copias DNA vírico/mg de tejido, no observándose en los animales signos de LCD. Esta carga viral no es significativamente distinta a la estimada en doradas asintomáticas procedentes de un brote de la enfermedad analizadas también en este trabajo, pero si es al menos un orden de magnitud superior a la determinada en doradas de poblaciones con infecciones subclínicas procedentes de piscifactorías donde no existía un brote de LCD en el momento del muestreo (Valverde *et al.*, 2016b; 2017a; 2017b).

En infecciones experimentales realizadas con anterioridad en nuestro laboratorio, tanto mediante inyección intraperitoneal como intramuscular, se observó que LCDV-Sa puede detectarse mediante nPCR en aleta caudal de los peces inoculados durante largos periodos de tiempo (hasta dos meses) sin que se desarrollen los signos característicos de la LCD (datos no publicados). Por ese motivo, se volvió a re-inocular el virus a los 21 dpi, estudiándose la evolución de la carga viral en relación al desarrollo de la enfermedad. A los 10 d tras esta segunda inoculación, los peces comenzaron a mostrar linfocistes, constatándose un aumento significativo de la carga viral. En estos animales enfermos, la carga viral fue superior a 10^4 copias DNA vírico/mg de tejido, no significativamente distinta a la estimada en los peces enfermos procedentes del brote de LCD. Los peces muestreados a los 22 d después de la re-inoculación del virus ya no mostraban linfocistes, por lo que pasaron a considerarse como recuperados. Sin embargo, los análisis realizados demostraron que seguían infectados, con una carga viral acorde con una infección asintomática. Por tanto, como cabría esperar, el aumento de la carga viral, indicativo de una activa multiplicación vírica, está relacionado con la manifestación de la enfermedad, como también se ha demostrado en platija japonesa infectada experimentalmente con LCDV-C (Iwakiri *et al.*, 2014; Wu *et al.*, 2015).

En los ejemplares de doradas infectados experimentalmente, tanto con infecciones asintomáticas como enfermos, se detectó el genoma vírico en muestras de cerebro, lo que indica que LCDV-Sa produjo en estos animales una infección sistémica, como ocurre en infecciones naturales en doradas (Cano *et al.*, 2009a; Valverde *et al.*, 2017a) y también en doradas infectadas mediante inyección intramuscular (ver apartado siguiente).

Los peces con infecciones subclínicas son parte esencial de la epizootiología de la LCD, ya que diversos estudios apuntan a que las situaciones de estrés pueden estimular la replicación del virus, desencadenando un brote de LCD (Sindermann, 1996; Møllergaard y Nielsen, 1997; Austin, 1999; Cano *et al.*, 2007). Los resultados obtenidos indican que una carga viral de 10^3 copias DNA vírico/mg de tejido podría ser un buen indicador de riesgo para que se produzca un brote de LCD en una población de doradas. Por tanto, la determinación periódica, o ante situaciones potenciales de estrés, de la carga viral de los peces mediante técnicas de cuantificación sensibles y rápidas, tales como la qPCR o el LAMP (Valverde *et al.*, 2016b; 2017b), podría servir para controlar la incidencia de la enfermedad en las piscifactorías.

2. ESTUDIO DE LA RESPUESTA INMUNE DE DORADAS FRENTE A LA INFECCIÓN POR LCDV-Sa

Como ya hemos comentado, la interacción patógeno-hospedador en infecciones por linfocistivirus está poco estudiada, siendo este el primer estudio centrado en el análisis de la respuesta inmune de dorada infectada con LCDV-Sa de manera experimental.

Los ejemplares de dorada se inocularon intramuscularmente con un aislado de LCDV-Sa y se estudió el curso de la infección, analizando la carga viral y la expresión del gen *mcp*. El DNA y los transcritos víricos se detectaron en aleta caudal, riñón cefálico e intestino a 1 d post-inoculación (dpi), indicando que el virus se propaga rápidamente desde el lugar de la inyección hasta la piel (órgano diana principal) y los órganos internos, estableciendo una infección sistémica como también se demostró en

el apartado anterior. La carga viral se mantiene baja a lo largo de todo el experimento, con valores similares a los encontrados en peces procedentes de poblaciones que sufren una infección subclínica (Valverde *et al.*, 2016; 2017a; 2017b). En un estudio, la platija japonesa se infectó experimentalmente con LCDV-C mediante inyección intramuscular, pero, contrariamente a nuestros resultados, la carga viral en todos los órganos analizados aumentó con el tiempo, alcanzando el valor más alto ($2,4 \times 10^7$ copias por microgramo de DNA total) en muestras de piel al final del experimento (4 semanas pi), aunque los peces permanecieron asintomáticos (Wu *et al.*, 2015). En el modelo experimental de la platija japonesa, los signos de la LCD aparecen tras 5-6 semanas post-inoculación a 20 °C (Hossain *et al.*, 2009; Iwakiri *et al.*, 2014).

La respuesta inmune de la dorada contra el LCD-Sa se evaluó analizando el nivel de expresión de 23 genes relacionados con el sistema inmune en dos órganos, riñón cefálico e intestino. Estos genes incluyen aquellos que codifican para dos receptores tipo Toll (*tlr5* y *tlr9*), miembros de la ruta del IFN tipo I (*ifn*, *irf1*, *irf3*, *irf9*, *pkr*, *mx1*, *mx2*, *mx3* e *isg15*), que desempeñan un papel crítico en la respuesta inmune innata contra el virus (Robertsen, 2006; Collet, 2014), varias citoquinas relacionadas con procesos inflamatorios (*tnfa*, *il1b*, *il6* e *il10*) (Roca *et al.*, 2008; Collet, 2014), la caspasa 1 (*caspl*), con actividad pro-inflamatoria, quimioquinas (*ck3* y *ck10*), el componente C3 del complemento (*c3*), y varios marcadores de receptores característicos de las células citotóxicas no específicas (*ncrrp1*), linfocitos T y B (*tcrb* e *ighm*, respectivamente) y células presentadoras de antígenos (*mhcIIa*) (Cuesta *et al.*, 2006; Castro *et al.*, 2011; Chaves-Pozo *et al.*, 2012, Rauta *et al.*, 2012).

El TLR9 humano reconoce moléculas de DNA exógenas procedentes de bacterias y/o virus que normalmente contienen secuencias cortas de dinucleótidos no metilados (CpG) en mayor proporción que el DNA eucariótico (Pan *et al.*, 2012). En el caso de los peces, la expresión del *tlr9* en diferentes especies es inducida después de la exposición a bacterias, pero también después de la infección viral, como ha sido demostrado recientemente en el pez roca coreano (*Oplegnathus fasciatus*) infectado por un iridovirus (RBIV) (Jung & Jung, 2017). Por otro lado, el TLR5 presente en humanos y también en el pez cebra, se encarga del reconocimiento de la flagelina, principal

componente del flagelo bacteriano, estando la expresión de *tlr5* sobre-regulada en peces infectados por bacterias móviles (Pietretti & Wiegertjes, 2014; He *et al.*, 2019). En el presente estudio, el *tlr9* no se expresó diferencialmente en riñón cefálico en los peces infectados por LCDV-Sa, mientras que la expresión de *tlr5* estaba sobre-regulada en ambos órganos a los 8 dpi. En el pez roca coreano infectado por RBIV, la expresión de *tlr9* dependía del curso de la infección; en peces mantenidos a 26 °C, con una mortalidad del 100% a los 15 dpi, se observó una sobreexpresión en riñón cefálico a los 8 dpi, mientras que no hubo expresión diferencial en peces infectados de forma subclínica mantenidos a 17 °C (Jung & Jung, 2017). El *tlr5* es uno de los genes expresados de forma diferencial encontrados en un análisis reciente de transcriptómica en platija japonesa infectada con el virus de la septicemia hemorrágica viral (VHSV) (Hwang *et al.*, 2018), y su expresión también está sobre-regulada en lenguado infectado por LCDV-Sa (Carballo *et al.*, 2017). Aunque se desconoce el mecanismo de regulación de la expresión de *tlr5* en peces infectados por virus, estos resultados sugieren que el TLR5 en los peces detecta otros ligandos además de la flagelina.

La inducción del IFN tipo I es crucial para la inmunidad innata antiviral y se controla principalmente a nivel de la transcripción génica, desempeñando los IRFs un papel central. Los IRF1, IRF3 e IRF7 actúan como reguladores positivos de la transcripción de genes de IFN tipo I a través de diferentes vías reguladoras, mientras que el IRF9 participa en la ruta de señalización de IFN activando la transcripción de cientos de genes a través de mecanismos dependientes de STAT (Honda *et al.*, 2006). En humanos, más de 50 de estos genes estimulados por IFN (ISGs) codifican proteínas antivirales (Schmeisser *et al.*, 2010; Waddell *et al.*, 2010). En algunas especies de peces se han caracterizado un pequeño número de ISGs, entre ellos los genes *pkr*, *mx* e *isg15* (Verrier *et al.*, 2011; Collet, 2014). En doradas infectadas por LCDV-Sa, se observó una sobre-regulación en la expresión de *ifn*, *irf3*, *mx2*, *mx3* e *isg15* en la etapa temprana de la infección, mientras que la expresión de *irf1*, *irf9*, *pkr* y *mx1* se mantuvo inalterada. A los 8 dpi todos estos genes disminuyeron su nivel transcripcional a niveles que no difieren significativamente del control o se encontraban ligeramente desregulados. Las proteínas Mx de peces presentan actividad antiviral contra un amplio rango de virus, aunque la especificidad antiviral varía entre especie de peces e isoformas de la Mx

(García-Rosado, *et al.*, 2010; Verrier *et al.*, 2011). Las Mx1 y Mx2 de doradas, pero no la Mx3, muestran *in vitro* actividad antiviral contra el LCDV-Sa (Fernández-Trujillo, 2013). Además, la expresión de los genes que codifican para las tres Mx se induce en células SAF-1 inoculadas con LCDV-Sa, alcanzando valores hasta cinco veces más altos que los observados después de la inducción con poli I:C (Valverde *et al.*, 2012). En doradas infectadas con LCDV-Sa, el *mx3* es el ISG con el nivel de sobreexpresión más elevado, y la *mx2* solo está ligeramente sobre-regulada en riñón cefálico a 1 dpi. La expresión de *ifn*, *irf3* y *mx* también estaba sobre-regulada a 1-4 dpi en platija japonesa infectada con LCDV-C (Hu *et al.*, 2011), mientras que la expresión de *mx* e *isg15* se reprimió 1 semana después de la infección (Wu *et al.*, 2018). Estos resultados sugieren que la respuesta innata antiviral relacionada con el IFN tipo I producida tanto en dorada como en platija japonesa, no es suficiente para la eliminación del virus.

La infección de dorada por LCDV-Sa es a menudo una infección asintomática, asociada a una baja carga viral en aleta caudal. Por lo contrario, en platija japonesa infectada con LCDV-C se establece una infección altamente productiva que conduce a la aparición de la enfermedad (Wu *et al.*, 2015). El análisis transcriptómico realizado en platija japonesa infectada con LCDV mostró una sobre-regulación de numerosos genes relacionados con procesos de inflamación y apoptosis, entre otros procesos, mientras que la expresión de algunas citoquinas anti-inflamatorias aparecía infra-regulada. Sin embargo, la multiplicación del virus no se afectó, a pesar de la respuesta inmune observada a los 7 dpi (Wu *et al.*, 2018). En otro estudio realizado en lenguado infectado con LCDV-Sa, se observó una alta activación de la transcripción de genes que codifican para IRFs (incluyendo *irf1*, *irf3* y *irf9*) y de la *mx* en riñón cefálico e intestino. Además, la expresión de citoquinas pro-inflamatorias (*tnfa*, *il1β*, *il6*, *irf8* e *il12*), quimioquinas, y componentes del complemento también estaba activada. En estos animales, la carga viral disminuyó entre 1 y 7 dpi, indicando la capacidad de la respuesta inmune para limitar la multiplicación del virus (Carballo *et al.*, 2017). Estos resultados resaltan la importancia de la inflamación en la respuesta temprana a una infección por linfocistivirus, y apuntan a la existencia de un potencial mecanismo de evasión de la respuesta inmune del hospedador presente en LCDV-C que sería necesario investigar.

La reacción inflamatoria se caracteriza por la liberación sistémica de citoquinas y quimioquinas específicas, y la migración quimiotáctica de leucocitos (neutrófilos y macrófagos) al sitio de inflamación (Collet, 2014), siendo un proceso clave para una eficiente respuesta inmune innata y una consiguiente respuesta inmune adaptativa frente a la infección viral (Hussell & Goulding, 2010). La expresión de citoquinas pro-inflamatorias, *casp1* y quimioquinas no se indujo en riñón cefálico de doradas infectadas por LCDV-Sa, a excepción de una leve sobre-regulación de *ck10* a 1 dpi. Además, el gen *il10* se sobreexpresó a 1 dpi. La presencia de la citoquina anti-inflamatoria IL-10 de manera temprana en el curso de la infección es un factor clave en el desarrollo de infecciones persistentes en diferentes virus de mamíferos (Wilson & Brooks, 2011). A su vez, bajos niveles de activación de citoquinas pro-inflamatorias, acompañados por la inducción de una respuesta ineficaz del IFN tipo I y una sobre-regulación de *il10*, se han relacionado con el establecimiento de infecciones persistentes de IPNV en el salmón atlántico (Reyes- Cerpa *et al.*, 2012). Los resultados obtenidos en el presente estudio sugieren que un mecanismo similar puede estar implicado en la presencia de infecciones asintomáticas de larga duración por LCDV-Sa en doradas. Este tipo de infección se detecta frecuentemente en piscifactorías de dorada, con valores de prevalencia de hasta el 100% (Valverde *et al.*, 2016b).

El perfil de expresión de genes relacionados con el sistema inmune en el intestino de doradas infectadas con LCDV-Sa fue diferente al observado en riñón cefálico. La transcripción de *irf1* e *irf9* estaba sobre-regulada a los 3 dpi, lo cual podría estar relacionado con el retraso en la sobreexpresión de *ifn*, mientras que *irf3* mostraba una infra-regulación a lo largo del periodo experimental. Con respecto a los ISGs, *mx3* estaba sobre-regulado a 1 dpi, pero los otros cuatro genes analizados estaban infra-regulados a 1 y 3 dpi. A los 8 dpi, tanto *ifn* como *il6* aparecían fuertemente sobre-regulados, y el nivel de expresión de *il1β* también fue muy alto, aunque no difirió significativamente del grupo de peces control no-infectados. Este perfil de expresión puede estar relacionado con una inflamación localizada en el intestino, lo que podría explicar la disminución de la carga viral observada en este órgano al final del experimento.

El componente C3 del complemento juega un papel central en todas las rutas de activación del sistema complemento, y está involucrado tanto en la respuesta inmune innata como en la adaptativa, participando en procesos biológicos como la lisis de microorganismos, promover la fagocitosis, desencadenar la respuesta inflamatoria y eliminación del patógeno (Dunkelberger & Song, 2010). En este estudio, se observó una inducción de la transcripción de *c3* en intestino y riñón cefálico a 3 y 8 dpi, respectivamente. En platija japonesa, también se describió una sobre-regulación de *c3* en branquias a 7dpi en respuesta a una infección por LCDV-C (Wu *et al.*, 2018), lo que indica que la activación del complemento podría ser una estrategia defensiva del hospedador común activada por una infección con LCDV.

La transcripción de *nccrp1* se indujo en riñón cefálico al principio de la infección, manteniéndose hasta los 8 dpi, indicando que las células citotóxicas no específicas (NCCs) pueden ser importantes en la citotoxicidad innata mediada por células dirigida contra células infectadas por LCDV-Sa. La sobre-regulación de *nccrp1* también se describió en riñón cefálico de doradas enfermas, obtenidas de un brote de LCD, sugiriendo que este gen desempeña un papel importante en la infección por este virus (Cordero *et al.*, 2016). Además, el *mhcIIa* también se sobreexpresó en riñón cefálico a 1 dpi, mientras que la expresión de *tcrcβ* apareció infra-regulada a 8 dpi en los dos órganos analizados, y la expresión de *ighm* estaba sobre-regulada a 3 y 8 dpi en riñón cefálico e intestino, respectivamente. Estos resultados podrían indicar que la infección por LCDV-Sa desencadena en dorada una respuesta inmune adaptativa insuficiente, en la que se inducen las células presentadoras de antígenos y linfocitos B, pero no las células T. En peces que desarrollan la enfermedad de linfocistis, la expresión de estos tres genes se encuentra fuertemente reprimida (Cordero *et al.*, 2016). La represión de *tcrcβ* tiene especial relevancia, ya que los linfocitos T desempeñan un papel esencial en el control de infecciones virales (Rauta *et al.*, 2012; Fischer *et al.*, 2013).

En resumen, la respuesta inmune en doradas disparada por LCDV-Sa parece estar caracterizada por una leve y transitoria activación del sistema IFN tipo I y una falta de respuesta inflamatoria sistémica. Aunque la actividad de NCC podría estar implicada en la eliminación del virus, una deficiencia en la respuesta inmune adaptativa daría lugar a un fracaso en la eliminación de células infectadas por parte del sistema

inmune. Este tipo de respuesta podría conducir al establecimiento de una infección persistente asintomática, que puede ser resultado de los mecanismos de evasión del sistema inmune presentes en LCDV-Sa, lo que habrá de ser investigado en el futuro.

3. EVALUACIÓN DE UNA VACUNA DNA CONTRA EL LCDV-Sa EN DORADAS

Actualmente, no existen tratamientos efectivos o vacunas comerciales disponibles para prevenir la aparición de la enfermedad de linfocistis en las piscifactorías, por lo tanto, las medidas de control se basan en la selección de reproductores libres de LCDV, el uso de métodos efectivos de descontaminación de los huevos para prevenir la transmisión de reproductores asintomáticos a larvas y el suministro de alimento vivo libre de virus (Cano *et al.*, 2009b; Carballo *et al.*, 2019; Yoshimizu, 2009).

Las vacunas DNA son un método eficaz para la prevención de enfermedades infecciosas que afectan a los peces en la acuicultura, especialmente las de etiología viral (Heppell & Davis, 2000). Las vacunas DNA se administran principalmente de forma intramuscular, y consisten en un plásmido recombinante que permitirá la expresión de un gen del patógeno que codifica para una proteína antigénica, generando altos niveles de protección (Evensen & Leong, 2013). Una de las primeras vacunas DNA contra una infección viral en peces fue la desarrollada por Lorenzen *et al.* (1998), que confería protección contra la septicemia hemorrágica viral. En la actualidad, la eficacia de las vacunas DNA ha sido demostrada en una gran cantidad de peces dirigidas contra una variedad de enfermedades virales (Kurath, 2005; Lorenzen & LaPatra, 2005; Gomez-Casado *et al.*, 2008; Leong *et al.*, 2012). A pesar de las diferentes vacunas DNA investigadas, sólo una, dirigida contra el virus de la necrosis hematopoyética infecciosa (IHNV), ha sido autorizada para su comercialización en acuicultura (Kutzler, 2008).

En el presente estudio se ha desarrollado una vacuna DNA que porta el gen *mcp* de LCDV-Sa. Este gen codifica la MCP, proteína que representa en torno al 45% de las proteínas totales del virión de iridovirus. La MCP ha sido identificada como proteína

antigénica en distintas especies de iridovirus, al detectarse utilizando suero de peces infectados, incluyendo meros (*Epinephelus* sp.) infectados por el iridovirus TGIV, pez roca coreano infectado por el ranavirus RSIV, o platija japonesa infectada LCDV-C (Liu *et al.*, 2015; Kim *et al.*, 2007a; Jang *et al.*, 2011). Además, el gen codificante de la MCP se ha utilizado en vacunas DNA frente a virus de diversas especies de la familia *Iridoviridae*, demostrándose su capacidad protectora contra el iridovirus del pez roca coreano (RSIV) (Caipang *et al.*, 2006), el virus de la necrosis infecciosa de bazo y riñón (ISKNV) (Fu *et al.*, 2014) o el LCDV-C (Wu *et al.*, 2003; Zheng *et al.*, 2006).

Diversos estudios han analizado la persistencia de los plásmidos vacunales, y su capacidad de expresión, en animales vacunados, constatándose que las vacunas DNA administradas en peces son más estables y duraderas que las ensayadas en ratones, donde la degradación de la vacuna ocurre en cuestión de horas (Wolff *et al.*, 1991). La persistencia del DNA vacunal parece depender del gen clonado y de la especie de pez, con valores que van desde menos de una semana hasta algo más de año y medio (Rahman & Maclean, 1992; Tonheim *et al.*, 2008b). Por otra parte, se ha observado que ciertas vacunas presentan una distribución sistémica en el animal vacunado, evitando la degradación local existente en el sitio de administración y en el plasma sanguíneo (Lorenzen *et al.*, 2000; Zheng *et al.*, 2006; Seternes *et al.*, 2007; Tonheim *et al.*, 2008a; de las Heras *et al.*, 2010).

Una vez construido el plásmido vacunal, y comprobada su capacidad para expresar la MCP vírica en células de dorada, se analizó la distribución de la vacuna en diferentes órganos (músculo, riñón y aleta) y su persistencia, determinándose su expresión a diferentes tiempos post-vacunación. La vacuna desarrollada es capaz de persistir en las doradas vacunadas al menos durante 20 d, distribuyéndose desde el sitio de inoculación (músculo) al riñón y la aleta caudal, lo que indica que el plásmido vacunal es distribuido de manera sistémica, llegando a los distintos tejidos vía sanguínea. En lo referente a la expresión, se detectaron transcritos de *mcp* de forma consistente durante todo el periodo analizado en riñón cefálico, indicando que se trata de un órgano diana para la expresión de la vacuna, lo que es relevante dado su papel hematopoyético. La detección del plásmido vacunal y la expresión del transgen en riñón cefálico ha sido descrita en otras especies de peces (Nielsen *et al.*, 2006; Seternes *et al.*,

2007). En músculo, lugar de la inyección, hubo una disminución de la expresión en el tiempo, que puede deberse a la rápida dispersión que sufre el plásmido desde la zona de administración de la vacuna en peces de pequeño tamaño, como ya han señalado estudios previos (Anderson *et al.*, 1996a; 1996b; Heppell *et al.*, 1998).

La evaluación de la protección conferida por la vacuna frente a la infección con LCDV-Sa se llevó a cabo mediante determinación de la carga viral y detección de transcritos víricos en doradas vacunadas en el transcurso de una infección experimental. El protocolo de detección y cuantificación de DNA vírico mediante qPCR utilizado en los estudios anteriormente comentados no es adecuado en estos experimentos, ya que en los peces vacunados se detectaría el gen *mcp* presente en la vacuna. Por ello, en el presente trabajo se ha desarrollado y evaluado un protocolo de qPCR que utiliza como diana el gen que codifica otra proteína estructural del LCDV-Sa. La proteína seleccionada fue la proteína de membrana miristilada (MMP) que es un componente del virión descrito en distintos iridovirus (Tsai *et al.*, 2005; Zhou *et al.*, 2011; Chen *et al.*, 2015). El ensayo de qPCR desarrollado presentó una sensibilidad, estimada en base a la detección del plásmido recombinante utilizado como estándar, de 2 copias de DNA por reacción, y una eficiencia de amplificación de 99,03%, similar a la presentada al ensayo de qPCR descrito por Valverde *et al.* (2016b).

Se realizó un ensayo de vacunación con doradas juveniles, usando el plásmido vacío como control, y tras 21 d los peces se inocularon con LCDV-Sa. En el grupo control, se demostró la presencia de infección en todos los peces analizados a 10 dpi, mientras que en los peces vacunados se detectaron genoma y transcritos víricos en un 33,3 y 16,7%, respectivamente, de los animales analizados a 10 dpi. Además, la carga viral aumentó significativamente entre 2 y 10 dpi en los peces control, mientras que en los peces vacunados se mantuvo baja y constante. Aunque en este experimento de protección se analizaron un número pequeño de ejemplares de dorada, y el ensayo de infección se prolongó solo 10 d, los resultados obtenidos permiten sugerir que la vacuna DNA diseñada posibilita la eliminación del virus inoculado, siendo capaz también de limitar la multiplicación viral. Estos resultados son similares a los obtenidos en otros estudios de evaluación de vacunas DNA antivíricas en peces (Sommerset *et al.*, 2003; Caipang *et al.*, 2006; Xu *et al.*, 2012).

La vacunación DNA en peces ha mostrado capacidad de inducir tanto la respuesta inmune innata como la adaptativa, similar a lo que se observa en mamíferos (Hølvold *et al.*, 2014; Dalmo, 2017). En nuestro estudio, la respuesta inmune de dorada tras la vacunación se evaluó analizando el nivel de expresión de 23 genes relacionados con el sistema inmune, los cuales se describieron en el apartado anterior, en muestras de riñón cefálico e intestino a los 1, 3 y 8 dpv.

El conocimiento sobre la respuesta inmune en peces vacunados es bastante limitado, ya que existen pocos estudios que impliquen un grupo amplio de inmunógenos, y la mayoría están centrados en análisis de expresión en órganos hematopoyéticos, fundamentalmente riñón cefálico y bazo (Dalmo, 2017). En términos generales, la respuesta inicial tras la vacunación es disparada por las células presentadoras de antígenos (APC) (Restifo *et al.*, 2000), permitiendo la presentación del péptido antigénico codificado en la vacuna a cargo del MHCI o MHCII. A continuación, los receptores de las células T (TCR) pueden reconocer los péptidos presentados por el MHCI y MHCII, estimulando la respuesta de linfocitos T citotóxicos (CD8⁺) y colaboradores (CD4⁺) (Tonheim *et al.*, 2008a).

En nuestro estudio, se ha observado un incremento significativo con respecto a los grupos controles (inyectados con PBS y pcDNA) del nivel de expresión del gen *mhcIIa* en intestino a 3 dpv, así como una sobreexpresión de *tcrβ* a los 8 dpv en dicho órgano, si bien ninguno de estos genes está regulado diferencialmente en riñón cefálico. Esto podría interpretarse como una activación a nivel de mucosas de la inmunidad celular específica tras vacunación (Rauta *et al.*, 2012). En platija japonesa vacunada frente a LCDV-C se ha observado también un incremento de la expresión de *tcr* y *mhcIIa* en riñón cefálico e intestino (Zheng *et al.*, 2010). Esta activación de la respuesta inmune celular y humoral incrementa el número de linfocitos T colaboradores, que a su vez incrementan la secreción de citoquinas pro-inflamatorias y la activación de linfocitos T citotóxicos, los cuales eliminarían las células presentadoras de antígenos (Tonheim *et al.*, 2008a).

En mamíferos, la activación del sistema inmune provocada por DNA exógeno depende de la captación del DNA por receptores tipo Toll, más concretamente TLR9.

El gen *tlr9* se expresa en células dendríticas, macrófagos, células B y células endoteliales del hígado (Hemmi *et al.*, 2000; Latz *et al.*, 2004; Martin-Armas *et al.*, 2006; Huggins *et al.*, 2007), donde provoca una cascada de señalización que resulta en la activación de la transcripción de genes pro-inflamatorios (Medzhitov *et al.*, 2000; Underhill *et al.*, 2002). El ligando para el TLR9 es DNA plasmídico que contiene motivos CpG (Krieg *et al.*, 2000), los cuales están presentes en el vector de expresión empleado para el desarrollo de la vacuna, teniendo efectos inmunoestimulantes. Esto podría explicar la sobre-regulación de la expresión del gen *tlr9* en riñón cefálico a los 8 dpv, coincidiendo con el pico máximo de expresión del plásmido vacunal, mientras que, en intestino, dicha expresión ocurre a los 3 dpv, coincidiendo también con el máximo nivel de expresión del plásmido vacunal en dicho órgano. El plásmido vacío utilizado como control también provoca la sobre-regulación de la expresión de *tlr9* en riñón (aunque con unos niveles significativamente inferiores a los asociados a la vacuna), mientras que en intestino produce una desactivación. El TLR9 está presente en peces (Meijer *et al.*, 2004; Franch *et al.*, 2006), aunque no se ha dilucidado si el DNA vacunal es capaz de unirse a dicho receptor (Tonheim *et al.*, 2008a). Los resultados obtenidos en este trabajo apoyan que los TLR9 de peces son capaces de unirse a DNA plasmídico.

La inducción del sistema de IFN tipo I es determinante en la inmunidad innata por su papel antiviral. Los IRFs 1 y 3 actúan regulando la transcripción de los genes que codifican para IFN tipo I, mientras que el IRF9 participa en la ruta de señalización del IFN (Honda *et al.*, 2006). En los peces vacunados se ha observado una infra-regulación de la expresión de *irf1* e *irf3* a los 1-3 dpv, mientras que la expresión de *irf9* aparecía sobreactivada en esos tiempos. Dicha sobre-regulación se observó también en animales inyectados con el plásmido vacío, si bien la intensidad de la activación era significativamente menor que la observada en peces vacunados. El gen *ifn* apareció sobre-regulado en riñón cefálico e intestino a los 1 y 8 dpv, respectivamente, aunque el nivel de activación era igual al inducido por el plásmido vacío. En cuanto a la expresión de los genes inducidos por IFN, se observó en general una similar regulación de la expresión en respuesta al plásmido vacunal y al plásmido control, que implica la deasactivación de *mx1*, *mx2* y *pkr* en riñón cefálico, y de *isg15* en intestino, con una activación de *mx3* en riñón cefálico a 8dpv y en intestino a 1 pdv. Curiosamente, esta

sobreexpresión en intestino es significativamente inferior a la observada en los peces control inoculados con pcDNA. En platija japonesa inoculada con una vacuna DNA frente a LCDV-C se observó una sobre-regulación de la expresión de *mx* y *pkr* en riñón cefálico, mientras que la *isg15* se mostró inalterada (Jung *et al.*, 2018). Por tanto, y a diferencia de lo observado en las infecciones por linfocistivirus, la vacunación no induce la sobreexpresión diferencial de genes relacionados con la inmunidad innata antiviral.

Referente a la respuesta inflamatoria, y a diferencia de lo observado en la infección experimental por LCDV-Sa, se ha observado que la vacunación desencadena la sobreexpresión de genes con actividad pro-inflamatoria, tales como *il1 β* , *il6* y *caspl*, así como las quimioquinas *ck3* y *ck10*, en riñón cefálico y/o intestino a 1-3 dpv, mientras que el plásmido vacío no induce una regulación de estos genes o produce el efecto contrario. En el caso del gen *il10* se ha observado una desactivación a 3 dpv en riñón y una activación no significativamente distinta al plásmido vacío en intestino a 8 dpv. En la infección experimental descrita en el apartado anterior se observó una falta de inducción de citoquinas pro-inflamatorias, unido a una sobreexpresión temprana de *il10*, lo que puede relacionarse con el establecimiento de una infección persistente. La vacuna DNA ensayada tiene el efecto contrario, desactivando la expresión de *il10* y activando la de genes relacionados con el proceso inflamatorio.

Por otra parte, y al igual que se ha detectado en infecciones por LCDV-Sa, la vacuna DNA da lugar a una fuerte inducción en la expresión de *c3* tanto en riñón cefálico como en intestino, correspondiendo a los valores de expresión relativa más elevados detectados. Esto implica que la vacuna DNA es capaz de disparar la activación del sistema del complemento, el cual podría constituir una estrategia defensiva del hospedador frente a una ulterior infección vírica, ya que está involucrado tanto en la respuesta inmune innata como en la adaptativa, siendo capaz de desencadenar la respuesta inflamatoria.

Por último, y en referencia a los genes de receptores característicos de células del sistema inmune analizados, se observó que la transcripción de *nccrp1* aparece sobreactivada de manera puntual en riñón cefálico a 3 dpv, de forma similar a lo que

ocurre en doradas infectadas por LCDV-Sa, existiendo también una sobreexpresión de *ighm* en intestino a 3 y 8 dpv. Este último resultado, junto con el de sobreexpresión de *mhcIIa* y *tcrl* anteriormente comentado, podría indicar que la vacuna DNA desencadena en dorada una respuesta inmune en la que se inducen células presentadoras de antígenos, linfocitos B y linfocitos T, y que ésta ocurre a nivel de la mucosa intestinal.

El reconocimiento de antígenos víricos por anticuerpos específicos es esencial en una adecuada respuesta antiviral, sobre todo asociada al fenómeno de neutralización sérica que permite eliminar los virus circulantes (Heppell *et al*, 1998). La detección de altos niveles de anticuerpos específicos es típica en animales que han superado una infección viral, como ocurre con doradas recuperadas de la enfermedad de linfocistis (Cano, 2004). En las doradas vacunas en el presente trabajo, se han detectado altos títulos de anticuerpos anti-MCP en todo el periodo experimental (de 1 a 3 meses post-vacunación). Resultados similares se obtuvieron en ejemplares de platija japonesa a los que se les administró una vacuna DNA frente a LCDV-C (Zheng *et al.*, 2010; 2011). Sin embargo, este es el primer estudio que demuestra la capacidad neutralizante de dichos anticuerpos.

En resumen, la vacuna DNA administrada a las doradas produce un perfil de inducción de la expresión de inmunogenes diferente al que se obtuvo en la infección experimental por LCDV-Sa, caracterizado por una importante sobreexpresión de genes implicados en el proceso inflamatorio y otros que estarían relacionados con una activación de la respuesta inmune celular adaptativa, como queda patente por la producción de anticuerpos neutralizantes específicos. Esta respuesta podría explicar la protección inducida por la vacuna demostrada en este trabajo.



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA



CONCLUSIONES



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

1. Las rutas de inoculación intramuscular e intraperitoneal permiten infectar de forma efectiva doradas juveniles de diversa talla con LCDV-Sa. Las infecciones establecidas son sistémicas y de bajo título, características comunes a infecciones subclínicas naturales.
2. En doradas infectadas experimentalmente, al igual que en el transcurso de un brote de la enfermedad de linfocistis, existe una relación directa entre la carga viral y la aparición de los signos de enfermedad. Se ha estimado que una carga viral de 10^3 copias DNA vírico/mg de tejido podría ser un buen indicador de riesgo para que se produzca un brote de linfocistis en una población de doradas portadoras del virus.
3. La respuesta inmune de dorada frente a la infección por LCDV-Sa se caracteriza por una activación parcial del sistema IFN tipo I, acompañada de una falta de respuesta inflamatoria sistémica. Esta respuesta, unida a la activación temprana de la expresión de *il10*, permitiría el establecimiento de infecciones asintomáticas persistentes.
4. La vacuna DNA desarrollada (pcDNA-MCP), administrada mediante inyección intramuscular, se distribuye de forma sistémica en los peces vacunados, persistiendo al menos durante 20 d, en los cuales es posible detectar transcritos de la proteína vírica antigénica en riñón cefálico.
5. La administración de la vacuna DNA protege a doradas juveniles frente a la infección por LCDV-Sa a los 21 d post-vacunación, impidiendo la multiplicación vírica y/o propiciando la eliminación del virus mediada por el sistema inmune del pez.
6. En las doradas vacunadas se produce la expresión diferencial de diversos inmunogenes, relacionados fundamentalmente con una respuesta inflamatoria sistémica y con una activación de células del sistema inmune en la mucosa intestinal. Además, se ha demostrado una respuesta inmune humoral adaptativa identificada en base a la detección de anticuerpos neutralizantes en suero a los 3 meses post-vacunación.



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

BIBLIOGRAFÍA



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

- Abdel-Latif, H.M.R., Khalil, R.H., El-Hofi, H.R., Saad, T.T., Zaied, S.M.A. (2014).** Epidemiological investigations of mycotic infections of cultured gilthead sea bream, *Sparus aurata* at Marriott Lake, Egypt. *Int. J. Fish. Aquat Stud.*, **2**: 5-13.
- Akira, S., Takeda, K. (2004).** Toll-like receptor signalling. *Nat. Rev. Immunol.*, **4**: 499-511.
- Alcaide, E., Blasco, M.D., Esteve, C. (2005).** Occurrence of drug-resistant bacteria in two european eel farms. *Appl. Environ. Microbiol.*, **71**: 3348-3350.
- Alonso, M.C., Cano, I., Garcia-Rosado, E., Castro, D., Lamas, J., Barja, J.L., Borrego, J.J. (2005).** Isolation of lymphocystis disease virus from sole, *Solea senegalensis* Kaup, and blackspot sea bream, *Pagellus bogaraveo* (Brünnich). *J. Fish Dis.*, **28**: 221-228.
- Alvarez-Pellitero, P. (2008).** Fish immunity and parasite infections: from innate immunity to immunoprophylactic prospects. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, **126**: 171-198.
- Álvarez-Torres, D., Gómez-Abellán, V., Arizcun, M., García-Rosado, E., Béjar, J., Sepulcre, M.P. (2018).** Identification of an interferon-stimulated gene, isg15, involved in host immune defense against viral infections in gilthead seabream (*Saprus aurata* L.). *Fish Shellfish Immunol.*, **73**: 220-227.
- Anders, K. (1989).** Lymphocystis disease of fishes. In: *Viruses of Lower Vertebrates* (Ahne, W., Kurstak, D., eds.). pp 141-160. Springer-Verlag, Berlín.
- Anderson, E.D., Mourich, D.V., Fahrenkrug, S.C., LaPatra, S., Shepherd, J., Leong, J.A. (1996a).** Genetic immunization of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) against infectious hematopoietic necrosis virus. *Mol. Marine Biol. Biotechnol.*, **5**: 114-122.

- Anderson, E.D., Mourich, D.V., Leong, J.C. (1996b).** Gene expression in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) following intramuscular injection of DNA. *Mol. Marine Biol. Biotechnol.*, **5**: 105-113.
- APROMAR. (2018).** *La Acuicultura en España*. Editada por Asociación Empresarial de Acuicultura de España. Cádiz, España.
- Austin, B. (1999).** The effects of pollution on fish health. *J. Appl. Microbiol.*, **85**: 234S-242S.
- Austin, B., Austin, D.A. (2007).** Bacterial Fish Pathogens. In: Diseases of Farmed and Wild Fish. 4^o ed, pp337-404. Springer Praxis Books, Chichester
- Babicki, S., Arndt, D., Marcu, A., Liang, Y., Grant, J.R., Maciejewski, A., Wishart, D.S. (2016).** Heatmapper: web-enabled heat mapping for all. *Nucleic Acids Res.*, **44**: W147-W153.
- Bahri, S. (2012).** Protozoan and myxozoan infections in wild gilthead seabream (*Sparus aurata* L.) from North Lake of Tunis, Tunisia. *Acta Parasitol.*, **57**: 114-121.
- Bayne, C.J., Gerwick, L. (2001).** The acute phase response and innate immunity of fish. *Dev. Comp. Immunol.*, **25**: 725-743.
- Bejar, J., Borrego, J.J., Alvarez, M.C. (1997).** A continuous cell line from the cultured marine fish gilt-head sea bream (*Sparus aurata*, L.). *Aquaculture.*, **150**: 143-153.
- Berthiaume, L., Alain, R., Robin, J. (1984).** Morphology and ultrastructure of lymphocystis disease virus, a fish iridovirus, grown in tissue culture. *Virology*, **135**: 10-19.
- Biacchesi, S., LeBerre, M., Lamoureux, A., Louise, Y., Lauret, E., Boudinot, P., Brémont, M. (2009).** Mitochondrial antiviral signaling protein plays a major role in induction of the fish innate immune response against RNA and DNA viruses. *J. Virol.*, **83**: 7815-7827.

- Biering E., Villoing, S., Sommerset, I., Christie, K.E. (2005).** Update on viral vaccines for fish. In: *Fish Vaccinology, Developments in Biologicals*. (Midtlyng, P.J, ed). pp97-113. Karger, Basel.
- Birkbeck, T.H., Reid, H.I., Darde, B., Grant, A.N. (2006).** Activity of bronopol (Pyceze®) against bacteria cultured from eggs of halibut, *Hippoglossus hippoglossus* and cod, *Gadus morhua*. *Aquaculture*, **254**: 125-128.
- Bitchava, K., Xylouri, E., Fragkiadaki, E., Attanassopoulou, F., Attanassopoulou, M., Sabatakou, O. (2007).** First incidence of clinical signs of nodavirus infection in sea bream, *Sparus auratus* L. *Isr. J. Aquacult. Bamidgeh.*, **59**: 3-9.
- Boltaña, S., Roher, N., Goetz, F.W., MacKenzie, S.A. (2011).** PAMPS, PRRS and the genomics of gram negative bacterial recognition in fish. *Dev. Comp. Immunol.*, **35**: 1195-1203.
- Boltaña. S., Valenzuela-Miranda, D., Aguilar, A., Mackenzie, S., Gallardo-Escárate, C. (2016).** Density-dependent effects of *Caligus rogercresseyi* infestation on the immune response of *Salmo salar*. *Fish Shellfish Immunol.*, **59**: 365-374.
- Bonjardim, C.A., Ferreira, P.C.P., Kroon, E.G. (2009).** Interferons: Signaling, antiviral and viral evasion. *Immunol. Lett.*, **122**: 1-11.
- Borrego, J.J., Castro, D., Balebona, M.C., García-Rosado, E., López-Cortes, L. (2001).** Patologías que Afectan al Cultivo de la Dorada (*Sparus aurata*, L.) en la Comunidad Autónoma Andaluza. Consejería de Agricultura y Pesca, Junta de Andalucía, Sevilla.
- Borrego, J.J., Valverde, E.J., Labella, A.M., Castro, D. (2015).** Lymphocystis disease virus: its importance in aquaculture. *Rev. Aquacult.*, **9**: 179-193.
- Borrego, J.J., Labella, A.M., Castro, D., Ortiz-Delgado, J.B., Sarasquete, C. (2017).** Updated of the pathologies affecting cultured gilthead seabream, *Sparus aurata*. *Ann. Aquacult. Res.*, **4**: 1033-1047.
- Boshra, H., Li, J., Sunyer, J.O. (2006).** Recent advances on the complement system of teleost fish. *Fish Shellfish Immunol.*, **20**: 239-262.

- Bovo, G., Florio, D. (2008).** Viral diseases of cultured marine fish. In: *Fish Diseases* (Eiras, J.C. Segner, H.; Wahli, T., Kapoor, B.G., eds.), pp. 185-238. Science Publishers, Enfield, NH.
- Bricknell, I., Dalmo, R.A. (2005).** The use of immunostimulants in fish larval aquaculture. *Fish Shellfish Immunol.*, **19**: 457-472.
- Brudeseth, B.E., Wiulsrød, R., Fredriksen, B.N., Lindmo, K., Løkling, K.E., Bordevik, M., Nils, S., Klevan, A., Gravningen, K. (2013).** Status and future perspectives of vaccines for industrialised fin-fish farming. *Fish Shellfish Immunol.*, **35**: 1759-1768.
- Bryan, L.K., Baldwin, C.A., Gray, M.J., Miller, D.B. (2009).** Efficacy of select disinfectants at inactivating *Ranavirus*. *Dis. Aquat. Org.*, **84**: 89-94.
- Buonocore, F., Randelli, E., Casani, D., Marozzi, C., Scapigliati, G. (2011).** Cloning of interferon in sea bream (*Sparus aurata*): an important marker for immune response after viral infection. In: *Aquaculture II. Dynamic Biochemistry, Process Biotechnology and Molecular Biology 5* (Special Issue 1) (Russo, R., ed.), pp. 41-48. Global Science Books, Viterbo.
- Buonocore, F., Castro, R., Randelli, E., Lefranc, M.P., Six, A., Kuhl, H., Reinhardt, R., Facchiano, A., Boudinot, P., Scapigliati, G. (2012).** Diversity, molecular characterization and expression of T cell receptor γ in a teleost fish, the sea bass (*Dicentrarchus labrax*, L). *PLoS ONE*, **7**: p. 47957-47968.
- Caipang, C.M.A., Takano, T., Hirono, I., Aoki, T. (2006).** Genetic vaccines protect reared seabream, *Pagrus major*, upon challenge with red seabream iridovirus (RSIV). *Fish. Shellfish Immunol.*, **21**: 130-138.
- Can, E., Saka, S., Firat, K. (2010).** Desinfection of gilthead sea bream (*Sparus aurata*), red porgy (*Pagrus pagrus*), and common dentex (*Dentex dentex*) eggs from *Sparidae* with different disinfectants. *Kafkas Univ. Vet. Fak. Derg.*, **16**: 299-306.
- Cano, I. (2004).** *Diagnóstico de Infecciones Producidas por el Virus de Linfocistis en Peces Marinos Cultivados*. Tesis doctoral, Universidad de Málaga, Málaga.

- Cano, I., Alonso, M.C., García-Rosado, E., Rodríguez Saint-Jean, S., Castro, D., Borrego, J.J. (2006).** Detection of lymphocystis disease virus (LCDV) in asymptomatic cultured gilt-head seabream (*Sparus aurata*, L.) using an immunoblot technique. *Vet. Microbiol.*, **113**: 137-141.
- Cano, I., Ferrero, P., Alonso, M.C., Bergmann, S.M., Römer- Oberdörfer, A., García-Rosado, E., Castro, D., Borrego, J.J. (2007).** Development of molecular techniques for detection of lymphocystis disease virus in different marine fish species. *J. Appl. Microbiol.*, **102**: 32-40.
- Cano, I., Ferro, P., Alonso, M.C., Sarasquete, C., García-Rosado, E., Borrego, J.J., Castro, D. (2009a).** Application of *in situ* detection techniques to determine the systemic condition of lymphocystis disease virus infection in cultured gilt-head seabream, *Sparus aurata* L. *J. Fish Dis.*, **32**: 143-150.
- Cano, I., López-Jimena, B., García-Rosado, E., Ortiz-Delgado, J.B., Alonso, M.C., Borrego, J.J., Sarasquete, M.C., Castro, D. (2009b).** Detection and persistence of lymphocystis disease virus in *Artemia* sp. *Aquaculture*, **291**: 230-236.
- Cano, I., Valverde, E.J., López-Jimena, B., Alonso, M.C., García-Rosado, E., Sarasquete, M.C., Borrego, J.J., Castro, D. (2010).** A new genotype of Lymphocystivirus isolated from cultured gilthead seabream, *Sparus aurata* L., and Senegalese sole, *Solea senegalensis* (Kaup). *J. Fish Dis.*, **33**: 695-700.
- Cano, I., Valverde, E.J., García-Rosado, E., Alonso, M.C., López-Jimena, B., Ortiz-Delgado, J.B., Borrego, J.J., Sarasquete, C., Castro, D. (2013).** Transmission of lymphocystis disease virus to cultured gilthead seabream, *Sparus aurata* L., larvae. *J. Fish Dis.*, **36**: 569-576.
- Carballo, C., Castro, D., Borrego, J.J., Manchado, M. (2017).** Gene expression profiles associated with lymphocystis disease virus (LCDV) in experimentally infected Senegalese sole (*Solea senegalensis*). *Fish Shellfish Immunol.*, **66**: 129-139.

- Carballo, C., Ortiz-Delgado, J.B., Berbel, C., Castro, D., Borrego, J.J., Sarasquete, C., Manchado, M. (2019).** Feed and immersion challenges with lymphocystis disease virus (LCDV) reveals specific mechanisms for horizontal transmission and immune response in senegalese sole post-larvae. *Fish Shellfish Immunol.*, **89**: 710-718.
- Castro, R., Bernard, D., Lefranc, M.P., Six, A., Benmansour, A. and Boudinot, P. (2011).** T cell diversity and TCR repertoires in teleost fish. *Fish Shellfish Immunol.*, **31**: 644-654.
- Castric, J., Thiery, R., Jeffroy, J., de Kinkelin, P., Raymond, J.C. (2001).** Sea bream *Sparus aurata*, an asymptomatic contagious fish host for nodavirus. *Dis. Aquat. Org.*, **47**: 33-38.
- Chaves-Pozo, E., Guardiola, F.A., Meseguer, J., Esteban, M.A., Cuesta, A. (2012).** Nodavirus infection induces a great innate cell-mediated cytotoxic activity in resistant, gilthead seabream, and susceptible, *European sea bass*, teleost fish. *Fish Shellfish Immunol.*, **33**: 1159-1166.
- Chen, Z.Y., Chiou, P.P., Liou, C.J., Lai, Y.S. (2015).** Monoclonal antibody against a putative myristoylated membrane protein encoded by grouper iridovirus 59L gene. *Dis. Aquat. Organ.*, **113**: 215-226.
- Cheng, S., Zhan, W., Xing, J., Sheng, X. (2006).** Development and characterization of monoclonal antibody to the lymphocystis disease virus of Japanese flounder *Paralichthys olivaceus* isolated from China. *J. Virol. Methods.* **135**: 173-180.
- Cherif, N., Thiery, R., Castric, J., Biacchesi, S., Bremont, M., Thabti, F., Limem, L., Hammami, R. (2009).** Viral encephalopathy and retinopathy of *Dicentrarchus labrax* and *Sparus aurata* farmed in Tunisia. *Vet. Res. Commun.*, **33**: 345-353.
- Chico, V., Ortega-Villaizan, M., Falcó, A., Tafalla, C., Pérez, L., Coll, J.M., Estepa, A. (2009).** The immunogenicity of viral haemorrhagic septicaemia rhabdovirus (VHSV) DNA vaccines can depend on plasmid regulatory sequences. *Vaccine*, **27**: 1938-1948.

- Chinchar, V.G. (2002).** *Ranavirus* (family *Iridoviridae*): emerging cold-blooded killers. *Arch. Virol.*, **147**: 447-470.
- Chinchar, V.G., Essbauer, S., He, J.G., Hyatt, A., Miyazaki, T., Seligy, V., Williams, T. (2005).** Family *Iridoviridae*. In: *Virus Taxonomy. Eighth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. (Fauquet, C.M., Mayo, M.A., Maniloff, J., Desselberger, U., Ball, L.A., eds.), pp. 145-162. Academic Press, New York.
- Chinchar, V.G., Hyatt, A., Miyazaki, T., Williams, T. (2009).** Family *Iridoviridae*: poor viral relations no longer. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*, **328**: 123-170.
- Chinchar, V.G., Hick, P., Ince, I.A., Jancovich, J.K., Marschang, R., Qin, Q., Subramaniam, K., Waltzek, T.B., Whittington, R., Williams, T., Zhang, Q. (2017).** ICTV Report Consortium ICTV Virus Taxonomy: *Iridoviridae*. *J. Gen. Virol.*, **98**: 890-891.
- Ciulli, S., Pinheiro, A.C., Volpe, E., Moscato, M., Jung, T.S., Galeotti, M., Stellino, S., Farneti, R., Prosperi, S. (2015).** Development and application of a real-time PCR assay for the detection and quantitation of lymphocystis disease virus. *J. Virol. Methods*, **213**: 164-173.
- Classen, D.C., Morningstar, J.M., Shanley, J.D. (1987).** Detection of antibody to murine cytomegalovirus by enzyme-linked immunosorbent and indirect immunofluorescence assays. *J. Clin. Microbiol.*, **25**: 600-604.
- Collet, B. (2014).** Innate immune responses of salmonid fish to viral infections, *Dev. Comp. Immunol.* **43**: 160-173.
- Colorni, A., Diamant, A. (1995).** Splenic and cardiac lymphocystis in red drum, *Sciaenops ocellatus* (L.). *J. Fish Dis.*, **18**: 467-471.
- Colorni, A., Padros, F. (2011).** Diseases and health management. In: *Sparidae: Biology and Aquaculture of Gilthead Sea Bream and other Species*, (Pavlidis, M.A., Mylonas, C.C., eds), pp. 321-357. Wiley-Blackwell, Oxford.
- Coombes, B.K., Mahony, J.B. (2001).** Dendritic cell discoveries provide new insight into the cellular immunobiology of DNA vaccines. *Immunol. Lett.*, **78**: 103-111.

- Cordero, H., Cuesta, A., Meseguer, J., Esteban, M.A. (2016).** Characterization of the gilthead seabream (*sparus aurata* L.) immune response under a natural lymphocystis disease virus outbreak. *J. Fish Dis.*, **39**: 1467-1476.
- Cordero, H., Li, C.H., Chaves-Pozo, E., Esteban, M.A., Cuesta, A. (2017).** Molecular identification and characterization of haptoglobin in teleosts revealed an important role on fish viral infections. *Dev. Comp. Immunol.*, **76**: 189-199.
- Dalmo, R. A. (2017).** DNA vaccines for fish: Review and perspectives on correlates of protection. *J. Fish Dis.*, **41**: 1-9.
- Darai, G., Anders, K., Koch, H.G., Delius, H., Gelderblom, H., Salamecos, C., Flügel, R.M. (1983).** Analysis of the genome of fish lymphocystis disease virus isolated directly from epidermal tumours of Pleuronectes. *Virology*, **126**: 466-479.
- De las Heras, A.I., Saint-Jean, S.R., Pérez- Prieto, S.I. (2010).** Immunogenic and protective effects of an oral DNA vaccine against infectious pancreatic necrosis virus in fish. *Fish Shellfish Immunol.*, **28**: 562-570.
- Dezfuli, B.S., Lui, A., Giari, L., Castaldelli, G., Mulero, V., Noga, E.J. (2012).** Infiltration and activation of acidophilic granulocytes in skin lesions of gilthead seabream, *Sparus aurata*, naturally infected with lymphocystis disease virus, *Dev. Comp. Immunol.*, **36**: 174-182.
- Dunkelberger, J.R., Song, W.C. (2010).** Complement and its role in innate and adaptive immune responses., *Cell Res.* **20**: 34-50.
- Eaton, H.E., Metcalf, J., Penny, E., Tcherepanov, V., Upton, C., Brunetti, C. R. (2007).** Comparative genomic analysis of the family *Iridoviridae*: reannotating and defining the core set of iridovirus genes. *Virol. J.*, **4**:11-28.
- El-Dakour, S., Saheb, A.I., Al-Abdul-Elah, K. (2015).** Effects of commonly used disinfectants on bacterial load, hatchability and survival of Bluefin sea bream (*Sparidentex hasta*) eggs. *Aquac.Res.*, **46**: 1281-1291.

- Eletta, M.E.A. (2013).** Some bacterial and fungal affections causing disease problems in cultured sea bream *Sparus aurata* in Damietta Governorate and trials for control. *J. Arab. Aquacult. Soc.*, **8**: 357-372.
- Ellis, A.E. (2001).** Innate host defense mechanisms of fish against viruses and bacteria. *Dev. Comp. Immunol.*, **25**: 827-839.
- Elouafi, I., Nachit, M.M., Martin, L.M. (2001).** Identification of a microsatellite on chromosome 7B showing a strong linkage with yellow pigment in durum wheat (*Triticum turgidum* L. var. durum). *Heredity*, **135**: 255-261.
- Essam, H.M., Abdellrazeq, G.S., Tayel, S.I., Torky, H.A., Fadel, A.H. (2016).** Pathogenesis of *Photobacterium damsela* subspecies infections in sea bass and sea bream. *Microb Pathol.*, **99**: 41-50.
- Essbauer, S., Ahne, W. (2001).** Viruses of lower vertebrates. *J. Vet. Med. B.*, **48**: 403-475.
- Essbauer, S., Fishcher, U., Bergamann, S., Ahne, W. (2004).** Investigations on the ORF 167L of lymphocystis disease virus (*Iridoviridae*). *Virus Genes.*, **28**: 19-39.
- Esteban, M.A., Rodríguez, A., Cuesta, A., Meseguer, J. (2005).** Effects of lactoferrin on non-specific immune responses of gilthead seabream (*Sparus auratus* L.). *Fish Shellfish Immunol.*, **18**: 109-124.
- Evensen, Ø., Leong, J.C. (2013).** DNA vaccines against viral diseases of farmed fish. *Fish Shellfish Immunol.*, **35**: 1751-1758.
- Faggio, C., Piccione, G., Marafioti, S., Arfuso, F., Fortino, G., Fazio, F. (2014a).** Metabolic response to monthly variation of *Sparus aurata* reared in Mediterranean off-shore tanks, *Turk. J. Fish. Aquat. Sci.*, **14**: 567-574.
- Faggio, C., Piccione, G., Marafioti, S., Arfuso, F., Trischitta, F., Fortino, G., Fazio, F. (2014b).** Monthly variations of haematological parameters of *Sparus aurata* and *Dicentrarchus labrax* reared in Mediterranean land off-shore tanks. *Cah. Biol. Mar.*, **55**: 437-443.

FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations) (2005).

Programa de información de especies acuáticas. *Sparus aurata*. Programa de información de especies acuáticas. Texto de: Colloca, F.; Cerasi, S. En: Departamento de Pesca y Acuicultura de la FAO [en línea]. Roma. Actualizado 8 February 2005.

FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations) (2017) National

Aquaculture Sector Overview. Visión general del sector acuícola nacional - España. National Aquaculture Sector Overview Fact Sheets. Texto de: de la Figuera Morales, R. En: Departamento de Pesca y Acuicultura de la FAO [en línea]. Roma. Actualizado 12 May 2017.

FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations) (2016). El

Estado Mundial de la Pesca y la Acuicultura 2016. Contribución a la Seguridad Alimentaria y Nutrición para todos. Editado por Departamento de Pesca y Acuicultura de la FAO, Roma.

Fernandes, T., Herlin, M., López Belluga, M. D., Ballón, G., Martínez, P., Toro

Ibañez, M.A., Fernández, J. (2017). Estimation of genetic parameters for growth traits in a hatchery population of gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.). *Aquac. Int.*, **25**: 499-514.

Fernández-Trujillo, M.A., García-Rosado, E., Alonso, M.C., Borrego, J.J.,

Álvarez, M.C., Béjar, J. (2008a). *In vitro* inhibition of sole aquabirnavirus by Senegalese sole Mx. *Fish Shellfish Immunol.*, **24**: 187-193.

Fernández-Trujillo, M.A., García-Rosado, E., Alonso, M.C., Borrego, J.J.,

Álvarez, M.C., Béjar, J. (2008b). *In vitro* inhibition of sole aquabirnavirus by Senegalese sole Mx. *Fish Shellfish Immunol.*, **24**: 187-193.

Fernández-Trujillo, M.A., Novel, P., Manchado, M., Sepulcre, M.P., Mulero, V.,

Borrego, J.J., Álvarez, M.C., Béjar, J. (2011a). Three Mx genes with differential response to VNNV infection have been identified in gilthead seabream (*Sparus aurata*). *Mol. Immunol.*, **43**: 1216-1223.

- Fernández-Trujillo, M.A., García-Rosado, E., Alonso, M.C., Borrego, J.J., Álvarez, M.C., Béjar, J. (2011b).** Differential antiviral activity of Mx1, Mx2 and Mx3 proteins from gilthead seabream (*Sparus aurata*) against Infectious Pancreatic Necrosis Virus (IPNV). *Mol. Immunol.*, **49**: 107-114.
- Fernández-Trujillo, M.A., García-Rosado, E., Alonso, M.C., Castro, D., Álvarez, M.C., Béjar, J. (2013).** Mx1, Mx2 and Mx3 proteins from the gilthead seabream (*Sparus aurata*) show in vitro antiviral activity against RNA and DNA viruses. *Mol. Immunol.* **56**: 630-636.
- Fischer, U., Koppang, E.O., Nakanishi, T. (2013).** Teleost T and NK cell immunity. *Fish Shellfish Immunol.*, **35**: 197-206.
- Flajnik, M.F. (1996).** The immune system of ectothermic vertebrates. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, **54**: 145-150.
- Flügel, R.H., Darai, G., Elderblom, H. (1982).** Viral proteins and adenosine triphosphate phosphohydrolase activity of fish lymphocystis disease virus. *Virology*, **122**: 48-55.
- Franch, R., Cardazzo, B., Antonello, J., Castagnaro, M., Patarnello, T., Bargelloni, L. (2006).** Full-length sequence and expression analysis of Toll-like receptor 9 in the gilthead seabream (*Sparus aurata* L.). *Gene.*, **378**: 42-51.
- Fu, X., Li, N., Lin, Q., Guo, H., Zhang, D., Liu, L., Wu, S. (2014).** Protective immunity against infectious spleen and kidney necrosis virus induced by immunization with DNA plasmid containing *mcp* gene in Chinese perch *Siniperca chuatsi*. *Fish. Shellfish Immunol.*, **40**: 259-266.
- Fuji, K., Kobayashi, K., Hasegawa, O., Coimbra, M. R.M., Sakamoto, T., Okamoto, N. (2006).** Identification of a single major genetic locus controlling the resistance to lymphocystis disease in Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*). *Aquaculture*, **254**: 203-210.
- Gallardo, M.A., Sala-Rabanala M., Ibarza, A., Padrós, F., Blascoa, J., Fernández-Borrás, J., Sánchez, J. (2003).** Functional alterations associated

with “winter syndrome” in gilthead sea bream (*Sparus aurata*). *Aquaculture*, **223**: 15-27.

García-Rosado, E. (2000). *Patologías Viricas en Especies Piscícolas Marinas Cultivadas*. Tesis Doctoral, Universidad de Málaga.

García-Rosado, E., Castro, D., Rodríguez, S., Pérez-Prieto, S.I., Borrego, J.J. (1999). Isolation and characterization of *Lymphocystivirus* (LCDV) from gilt-head sea bream (*Sparus aurata*, L.) using a new homologous cell line. *Bull. Eur. Assoc. Fish Pathol.*, **19**: 53-56.

García-Rosado, E., Castro, D., Cano, I., Perez-Prieto, S.I., Borrego, J.J. (2002). Serological techniques for detection of lymphocystis virus in fish. *Aquat. Living Resour.*, **15**: 179-185

García-Rosado, E., Castro, D., Cano, I., Alonso, M.C., Pérez-Prieto, S.I., Borrego, J.J. (2004). Protein and glycoprotein content of lymphocystis disease virus (LCDV). *Int. Microbiol.*, **7**: 121-126.

García-Rosado, E., Cano, I., Martín-Antonio, B., Labella, A., Manchado, M., Alonso, M.C., Castro, D., Borrego, J.J. (2007). Co-occurrence of viral and bacterial pathogens in disease outbreaks affecting newly cultured sparid fish. *Int Microbiol.*, **10**: 193-199.

García-Rosado, E., Alonso, M.C., Fernández-Trujillo, M.A., Manchado, M., Béjar, J. (2010). Characterization of flatfish Mx proteins. In: *Vet. Immunol. Immunopathol.* (Nermann, L., Meier, S., eds.), pp. 99-128. Nova Science Publishers.

Gatlin, D.M. (2002). Nutrition and fish health, In: *Fish Nutrition*, (Halver, J.E., Hardy, R.W., eds), pp671-702. Academic Press, San Diego.

Gillund, F., Chevalier, C., Henry, C., Huet, J.C., Costa, B.D., Delmas, B. (2004). Peptides resulting from the pVP2 C-terminal processing are present in infectious pancreatic necrosis virus particles. *J. Gen. Virol.*, **85**: 2231-2236.

- Giménez, G., Padrós, F., Roque, A., Estévez, A., Furones, D. (2006).** Bacterial load reduction of live prey for fish larval feeding using Ox-Aquaculture[®]. *Aquac. Res.*, **37**: 1130-1139.
- Gisladdottir, B., Gudmundsdottir, S., Brown, L., Jonsson, Z.O., Magnadottir, B. (2009).** Isolation of two C-reactive protein homologues from cod (*Gadus morhua* L.) serum. *Fish Shellfish Immunol.*, **26**: 210-219.
- Gomez-Casado, E., Estepa, A., Coll, J.M. (2011).** A comparative review on European-farmed finfish RNA viruses and their vaccines. *Vaccine.*, **29**: 2657-2671.
- Granada, L., Sousa, N., Lopes, S., Lemos, M.F.L. (2016).** Is integrated multitrophic aquaculture the solution to the sectors' major challenges? – a review. *Rev. Aquacult.*, **8**: 283-300.
- Grizzle, J.M., Altinok, I., Noyes, A.D. (2003).** PCR method for detection of largemouth bass virus. *Dis. Aquat. Org.*, **54**: 29-33.
- Haddad-Boubaker, S., Bouzgarou, N., Fakhfakh, E., Khayech, M., Mohamed, S.B., Megdich, A., Chéhida, N.B. (2013).** Detection and genetic characterization of lymphocystis disease virus (LCDV) isolated during disease outbreaks in cultured gilt-head sea bream *Sparus aurata* in Tunisia. *Fish Pathol.*, **48**: 101-104.
- Harikrishnan, R., Balasundaram, C., Heo, M. (2010).** Effect of probiotics enriched diet on *Paralichthys olivaceus* infected with lymphocystis disease virus (LCDV). *Fish Shellfish Immunol.*, **29**: 868-874.
- He, J.G., Deng, M., Weng, S.P., Li, Z., Zhou, S.Y., Long, Q.X., Wang, X.Z., Chan, S.M. (2001).** Complete genome analysis of the mandarin fish infectious spleen and kidney necrosis iridovirus. *Virology*, **291**: 126–139.
- He, L., Liang, Y., Yu, X., Peng, W., He, J., Fu, L., Lin, H., Zhang, Y., Lu, D. (2019).** *Vibrio parahaemolyticus* flagellin induces cytokines expression via toll-like receptor 5 pathway in orange-spotted grouper, *Epinephelus coioides*. *Fish Shellfish Immunol.*, **87**: 573-581.

- Hemmi, H., Takeuchi, O., Kawai, T., Kaisho, T., Sato, S., Sanjo, H., Matsumoto, M., Hoshino, K., Wagner, H., Takeda, K., Akira, S. (2000).** A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA. *Nature.*, **408**: 740-745.
- Heppell, J., Berthiaume, L. (1992).** Ultrastructure of lymphocystis disease virus (LDV) as compared to frog virus 3 (FV3) and chilo iridescent virus (CIV): effects of enzymatic digestions and detergent degradations. *Arch. Virol.*, **125**: 215-226.
- Heppell, J., Lorenzen, N., Armstrong, N.K., Wu, T., Lorenzen, E., Einer-Jensen, K., Schorr, J., Davis, H.L. (1998).** “Development of DNA Vaccines for Fish: Vector Design, Intramuscular Injection and Antigen Expression Using Viral Haemorrhagic Septicaemia Virus Genes as Model. *Fish Shellfish Immunol.*, **8**: 271-286.
- Heppell, J., Davis, H.L. (2000).** Application of DNA vaccine technology to aquaculture. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **43**: 29-43.
- Hølvold, L.B., Myhr, A., Dalmo, R.A. (2014).** Strategies and hurdles using DNA vaccines to fish. *Vet. Res.*, **45**: 21-32.
- Honda, K., Takaoka, A., Taniguchi, T. (2006).** Type I interferon gene induction by the interferon regulatory factor family of transcription factors, *Immunity.*, **25**: 349-360.
- Hossain, M., Kim, S.R., Oh, M.J. (2007).** The lymphocystis disease in the olive flounder, *Paralichthys olivaceus*. *Univ. J. Zool. Rajshahi Univ.*, **26**: 59-62.
- Hossain, M., Song, J.Y., Kitamura, S.I., Jung, S.J., Oh, M.J. (2008).** Phylogenetic analysis of lymphocystis disease virus from tropical ornamental fish species bases on a major capsid protein gene. *J. Fish Dis.*, **31**: 473-479.
- Hossain, M., Kim, S.R., Kitamura, S.I., Kim, D.W., Jung, S.J., Nishizawa, T., Yoshimiza, M., Oh, M.J. (2009).** Lymphocystis disease virus persists in the epidermal tissues of olive flounder, *Paralichthys olivaceus* (Temminch & Schlegel), at low temperatures. *J. Fish Dis.*, **32**: 699-703.

- Hu, G.B., Cong, R.S., Fan, T.J., Mei, X.G. (2004).** Induction of apoptosis in a flounder gill cell line by lymphocystis disease virus infection. *J. Fish Dis.*, **27**: 657-662
- Hu, G., Yin, X., Lou, H., Xia, J., Dong, X., Zhang, J., Liu, Q. (2011).** Interferon regulatory factor 3 (IRF-3) in Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus*: Sequencing, limited tissue distribution, inducible expression and induction of fish type I interferon promoter, *Dev. Comp. Immunol.*, **35**: 164-173.
- Huggins, J., Pellegrin, T., Felgar, R.E., Wei, C., Brown, M., Zheng, B., Milner, E.C., Bernstein, S.H., Sanz, I., Zand, M.S. (2007).** CpG DNA activation and plasma-cell differentiation of CD27- naive human B cells. *Blood. Immunobiology.* **109**: 1611-1619.
- Huising, M.O., Stet, R.J.M., Savelkoul, H.F.J. (2004).** The molecular evolution of the interleukin-1 family of cytokines: IL-18 in teleost fish. *Dev. Comp. Immunol.*, **28**: 395-413.
- Hussell, T., Goulding, J. (2010).** Structured regulation of inflammation during respiratory viral infection. *Lancet Infect. Dis.*, **10**: 360-36.
- Huys, G., Bartie, K., Cnockaert, M., Oanh, D.T.H., Phuong, N.T., Somsiri, T., Chinabut, S., Yusoff, F.M., Shariff, M., Giacomini, M., Teale, A., Swings, J. (2007).** Biodiversity of chloramphenicol-resistant mesophilic heterotrophs from Southeast Asian aquaculture environments. *Res. Microbiol.*, **158**: 228-235.
- Hwang, J.Y., Markkandan, K., Kwon, M.G., Seo, J.S., Yoo, S.I., Hwang, S.D., Son, M.H., Park, J. (2018).** Transcriptome analysis of olive flounder (*Paralichthys olivaceus*) head kidney infected with moderate and high virulent strains of infectious viral hemorrhagic septicemia virus (VHSV). *Fish Shellfish Immunol.*, **76**: 293-304.
- ICTV (2018).** ICTV Report: *Iridoviridae*. International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV) https://talk.ictvonline.org/ictv-reports/ictv_online_report/dsdna-viruses/w/iridoviridae#Citation.

- Ina-Salwany, M.Y., Al-saari, N., Mohamad, A., Mursidi, F., Mohd-Aris, A., Amal, M.N., Kasai, H., Mino, S., Sawabe, T., Zamri-Saad, M. (2019).** Vibriosis in fish: A review on disease development and prevention. *J. Aquat. Anim. Health*, **31**: 3-22.
- Iwakiri, S., Song, J., Nakayama, K., Oh, M., Ishida, M., Kitamura, S. (2014).** Host responses of Japanese flounder *Paralichthys olivaceus* with lymphocystis cell formation. *Fish Shellfish Immunol.*, **38**: 406-411.
- Iwamoto R., Hasegawa O., LaPatra S., Yoshimizu M. (2002).** Isolation and characterization of the Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*) lymphocystis disease virus. *J. Aquat. Anim. Health.*, **14**: 114–123.
- Jancovich, J. K., Chichar, V. G., Hyatt, A., Miyazaki, T., Williams, T., Zhang, Q. Y. (2012).** Family *Iridoviridae*. In: *Virus Taxonomy: Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. (King, A.M.Q., Adams, M.J., Carstens, E.B., Lefkowitz, E.J., eds.) pp. 193-210. Elsevier, San Diego.
- Jang, H.B., Kim, Y.R., Cha, I.S., Noh, S.W., Park, S.B., Ohtani, M., Hikima, J., Aoki, T., Jung, T.S. (2011).** Detection and antigenic proteins expressed by lymphocystis virus as vaccine candidates in olive flounder, *Paralichthys olivaceus* (Temminck & Schlegel). *J. Fish Dis.*, **34**: 555-562.
- Jiménez, N., Coll, J., Estepa, A., Tafalla, C. (2005).** Futuro de las vacunas ADN frente a virus en acuicultura. *Rev. AquaTIC*, **23**: 20-35.
- Jung, M., Jung, S. (2017).** Gene expression regulation of the TLR9 and MyD88-dependent pathways in rock bream against rock bream iridovirus (RBIV) infection, *Fish Shellfish Immunol.* **70**: 507-514.
- Jung, M. J., Nikapitiya, C., Jung, S. J. (2018).** DNA vaccine encoding myristoylated membrane protein (MMP) of rock bream iridovirus (RBIV) induces protective immunity in rock bream (*Oplegnathus fasciatus*). *Vaccine*. **36**: 802-810.

- Kaatari, S.L., Zhang, H.I., Khor, I.W., Kaatari, I.M., Shapiro, D.A. (2002).** Affinity maturation in trout: clonal dominance of high affinity antibodies late in the immune response. *Dev. Comp. Immunol.*, **26**: 191-200.
- Kasai, H., Yoshimizu, M., Ezura, Y. (2002).** Disinfection of water for aquaculture. *Fish. Sci.*, **68**: 821-824.
- Kileng, O., Brundtland, M.I., Robertsen, B. (2007).** Infectious salmon anemia virus is a powerful inducer of key genes of the type I interferon system of Atlantic salmon, but is not inhibited by interferon. *Fish Shellfish Immunol.*, **23**: 378-389.
- Kim, T.J., Jung, T.S., Lee, J.I. (2007a).** Expression and serological application of a capsid protein of an iridovirus isolated from rock bream, *Oplegnathus fasciatus* (Temminck & Schlegel). *J. Fish Dis.*, **30**: 691-699.
- Kim, H.J., Yasuike M., Kondo, H., Hirono, I., Aoki T. (2007b)** Molecular characterization and gene expression of a CXC chemokine gene from Japanese flounder *Paralichthys olivaceus*. *Fish Shellfish Immunol.*, **23**: 1275-1284.
- Kitamura, S.I., Jung, S.J., Oh, M.J. (2006).** Differentiation of lymphocystis disease virus genotype by multiplex PCR. *J. Microbiol.*, **44**: 248-253.
- Koutná, M., Veselý, T., Psikal, I., Hülová, J. (2003).** Identification of spring viraemia of carp virus (SVCV) by combined RT-PCR and nested PCR. *Dis. Aquat. Organ.*, **55**: 229-235.
- Krieg, A.M. (2000)** Immune effects and mechanisms of action of CpG motifs. *Vaccine.*, **19**: 618-622.
- Kurath, G. (2005).** Overview of recent DNA vaccination development for fish. *Dev. Biol.*, **121**: 201-213.
- Kurt-Jones, E.A., Chan, M., Zhou, S., Wang, J., Reed, G., Bronson, R., Arnold, M.M., Knioe, D.M., Finberg, R.W. (2004).** Herpes simplex virus 1 interaction with Toll-like receptor 2 contributes to lethal encephalitis. *Proc. Natl. Sci. U.S.A.*, **101**: 1315-1320.
- Kutzler, M.A., Weiner, D.B. (2008).** DNA vaccines: ready for prime time? *Nat. Rev. Genet.*, **9**: 776-788.

- Kvitt, H., Heinisch, G., Diamant, A. (2008).** Detection and phylogeny of Lymphocystivirus in sea bream *Sparus aurata* based on the DNA polymerase gene and major capsid protein sequences. *Aquaculture*, **275**: 58–63.
- Kwon, Y.S., Eun, M.Y., Sohn, J.K. (2001).** Marker-assisted selection for identification of plant regeneration ability of seed-derived calli in rice (*Oryza sativa* L.). *Mol. Cells*, **12**: 103-106.
- Labarta, U. (2007).** El desarrollo de la acuicultura en España. *Arbor*, **183**: 669-685.
- Labella, A., Berbel, C., Manchado, M., Castro, D. (2011).** *Photobacterium damsela* subsp. *damsela*, an emerging pathogen affecting new cultured marine fish species in southern Spain. In: *Recent Advance in Fish Farms* (Aral, F., Doğu, Z., ed.), pp: 135-152. InTech, Rijeka.
- Labella, A., Gennari, M., Ghidini, V., Trento, I. (2013).** High incidence of antibiotic multi-resistant bacteria in coastal areas dedicated to fish farming. *Mar. Pollut. Bull.*, **70**: 197-203.
- Larsen, J.L., Pedersen, K. (1997).** Vaccination strategies in freshwater salmonid aquaculture. *Dev. Biol. Stand.*, **90**: 391-400.
- Latz, E., Schoenemeyer, A., Visintin, A., Fitzgerald, K.A., Monks, B.G., Knetter, C.F., Lien, E., Nilsen, N.J., Espevik, T., Golenbock, D.T. (2004).** TLR9 signals after translocating from the ER to CpG DNA in the lysosome. *Nat. Immunol.*, **5**: 190-198.
- Leong, J.C., Fryer, J.L. (1993).** Viral vaccines for aquaculture. *Annu. Rev. Fish Dis.*, **3**: 225-240.
- Leong, J.A., Romoren, K., Evensen, O. (2012).** DNA vaccines for viral diseases of farmed fish and shellfish. In: (Fletcher, G.L., Rise, M.L., eds.). *Aquaculture biotechnology*, Wiley.
- Leston, S., Nunes, M., Lemos, M.F.L., da Silva, G.J., Pardal, M.A., Ramos, F. (2011).** Veterinary drug use and environmental safety. In: *Animal Feed: Types, Nutrition and Safety*, (Borgearo, S.R., ed.), pp. 61-83. Nova Science Publishers Inc, New York.

- Li, J., Barreda, D.R., Zhang, Y.A., Boshra, H., Gelman, A.E., Lapatra, S., Tort, L., Sunyer, J.Q. (2006).** B lymphocytes from early vertebrates have potent phagocytic and microbicidal abilities. *Nat Immunol.*, **7**: 1116-1124.
- Liu, H.I., Chiou, P.P., Gong, H.Y., Chou, H.Y. (2015).** Cloning of the major capsid protein (MCP) of grouper iridovirus of Taiwan (TGIV) and preliminary evaluation of a recombinant MCP vaccine against TGIV. *J. Mol. Sci.*, **16**: 28647-28656.
- López-Bueno, A., Mavian, C., Labella, A.M., Castro, D., Borrego, J.J., Alcarni, A., Alejo, A. (2016).** Concurrence of iridovirus, polyomavirus, and a unique member of a new group of fish papillomaviruses in lymphocystis disease-affected gilthead sea bream. *J. Virol.*, **90**: 8768-8779.
- Lorenzen, N., Olesen, N.J. (1997).** Immunization with viral antigens: viral haemorrhagic septicaemia. *Dev. Biol. Stand.*, **90**: 201-209.
- Lorenzen, N., LaPatra, S.E. (2005).** DNA vaccines for aquacultured fish. *Rev. Sci. Tech.*, **24**: 201-213
- Lorenzen, N., Lorenzen, E., Einer-Jensen, K., Heppell, J., Wu, T., Davis, H.L. (1998).** Protective immunity to VHS in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum) following DNA vaccination. *Fish Shellfish Immunol.*, **8**: 261-270.
- Lorenzen, E., Einer-Jensen, K., Matinussen, F., LaPatra, S.E., Lorenzen, N. (2000).** DNA vaccination of rainbow trout against viral hemorrhagic septicemia virus: A dose-response and time-course study. *J. Aquat. Anim. Health.*, **12**: 167-180.
- Madeley, C.R., Smail, D.A., Egglestone, S.I. (1978).** Observations on the fine structure of lymphocystis virus from European flounders and plaice. *J. Gen. Virol.*, **40**: 421-431.
- Magariños, B., Toranzo, A.E., Romalde, J.L. (1995).** Different susceptibility of gilthead sea bream and turbot to *Pasteurella piscicida* infection by the water route. *Bull. Eur. Assoc. Fish Pathol.*, **15**: 88-90.

- Magnadóttir, B., Gudmundsdottir, S., Gudmundsdottir, B.K., Helgason, S. (2009).** Natural antibodies of cod (*Gadus morhua* L.): specificity, activity and affinity. *Comp. Biochem. Physiol. B. Biochem. Mol. Biol.*, **154**: 309-316.
- Magnadóttir, B. (2010).** Immunological control of fish diseases. *Mar. Biotechnol.*, **12**: 361-379.
- Mahmood, T., Yang, P.C. (2012).** Western blot: technique theory, and trouble shooting. *N. Am. J. Med. Sci.*, **4**: 429-434.
- Manoj, S., Babiuk, L.A., van Drunen Little-van den Hurk, S., (2004).** Approaches to enhance the efficacy of DNA vaccines. *Crit. Rev. Clin. Lab. Sci.*, **41**: 1-39.
- Martín-Armas, M., Simon-Santamaria, J., Pettersen, I., Moens, U., Smedsrød, B., Sveinbjørnsson, B. (2006).** Toll-like receptor 9 (TLR9) is present in murine liver sinusoidal endothelial cells (LSECs) and mediates the effect of CpG-oligonucleotides. *J. Hepatol.* **44**: 939-946.
- Martínez-Millan, L., Fontanillas, J.C. (2017).** Terapéutica en acuicultura. Panorama Actual del Mediamento, **41**: 579-588.
- Markussen, T., Jonassen, C.M., Numanovic, S., Braaen, S., Hjortaas, M., Nilsen, H., Mjaaland, S. (2008).** Evolutionary mechanisms involved in the virulence of infectious salmon anaemia virus (ISAV), a piscine orthomyxovirus. *Virology*, **374**: 515-527.
- Mashoof, S., Criscitiello, M.F. (2016).** Fish immunoglobulins. *Biology*, **5**: 45-68.
- Matsuo, A., Oshiumi, H., Tsujita, T., Mitani, H., Yoshimizu, M., Matsumoto, M., Seya, T. (2008).** Teleost TLR22 recognizes RNA duplex to induce IFN and protect cells from birnaviruses. *J. Immunol.*, **181**:3474-3485.
- Matsuzaki, T., Chin, J. (2000).** Modulating immune responses with probiotic bacteria. *Immunol. Cell Biol.*, **78**: 67-73.
- McBeath, A.J., Snow, M., Secombes, C.J., Ellis, A.E., Collet, B. (2007).** Expression kinetics of interferon and interferon-induced genes in Atlantic salmon (*Salmo salar*) following infection with infectious pancreatic necrosis virus and infectious salmon anemia virus. *Fish Shellfish Immunol.*, **22**: 230-241.

- Medzhitov, R., Janeway, J.C. (2000).** The Toll receptor family and microbial recognition. *Trends Microbiol.*, **8**: 452-456.
- Meijer, A.H., Gabby Krens, S.F., Medina Rodriguez, I.A., He, S., Bitter, W., Ewa Snaar-Jagalska, B., Spaink, H.P. (2004).** Expression analysis of the Toll-like receptor and TIR domain adaptor families of zebrafish. *Mol. Immunol.*, **40**: 773-783.
- Møllergaard, S., Nielsen, E. (1997).** Epidemiology of lymphocystis, epidermal papilloma and skin ulcers in common dab *Limanda limanda* along the west coast of Denmark. *Dis. Aquat. Org.*, **30**: 151-163.
- Meseguer, J., López-Ruiz, A., García-Ayala, A. (1995).** Reticulo-endothelial stroma of the head-kidney from the seawater teleost gilthead seabream (*Sparus aurata* L): an ultrastructural and cytochemical study. *Anat. Rec.*, **241**: 303-309.
- Mikalsen, E., Teig, A.B., Helleman, A., Mjaaland, A.L., Rimstad, S., (2001).** Detection of infectious salmon anaemia virus (ISAV) by RT-PCR after cohabitant exposure in Atlantic salmon *Salmo salar*. *Dis. Aquat. Org.*, **47**: 175-181.
- Miyaki, K., Mizuta, K., Yamamoto, N., Yoshikoshi, K., Kanai, K., Tabeta, O. (1998).** Mass mortality of hatchery-reared juveniles of bartail flathead, *Platycephalus sp.* due to epitheliocystis-like disease. *Bull. Nagasaki. Pref. Inst. Fish.*, **24**: 7-10.
- Miyazaki, T., Oota, S. (2002).** Ultrastructure of lymphocystis cells in Japanese flounder *Paralichthys olivaceus*. *Bull. Fac. Bior. Mie Univ.*, **29**: 21-30.
- Moretti, A., Fernandez-Criado, M.P., Cittolin, G., Guidastri, R. (1999).** Manual on Hatchery Production of Seabass and Gilthead Seabream, Vol. 1. Edited by Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO), Rome.
- Nielsen, C., Holst-Jensen, A., Løvseth, A., Berdal, K. (2006).** Persistence and distribution of intravenously injected DNA in blood and organs of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Eur. Food Res. Technol.*, **221**: 1-8.

- Noga, E.J. (2010).** *Fish Diseases: Diagnosis and Treatment*. 2nd ed., Wiley-Blackwell, Ames.
- OIE (Organización Mundial de Sanidad Animal) (2018a).** *Código Sanitario para los Animales Acuáticos (2018)* [en línea]. <http://www.oie.int/es/normas/codigo-acuatico/acceso-en-linea/>
- OIE (Organización Mundial de Sanidad Animal) (2018b).** *Manual de Pruebas de Diagnóstico para los Animales Acuáticos (2018)* [en línea]. <http://www.oie.int/es/normas/manual-acuatico/acceso-en-linea/>
- Ortega-Villaizan, M., Chico, V., Falcó, A., Pérez, L., Coll, J.M., Estepa, A. (2009).** The rainbow trout TLR9 gene and its role in the immune responses elicited by a plasmid encoding the glycoprotein G of the viral haemorrhagic septicaemia rhabdovirus (VHSV). *Mol. Immunol.*, **46**: 1710-1717.
- Palmer, L.J., Hogan, N.S., Van Den Heuvel, M.R. (2012).** Phylogenetic analysis and molecular methods for the detection of lymphocystis disease virus from yellow perch, *Perca falvenscens* (Mitchell). *J. Fish Dis.*, **35**: 661–670.
- Pan, X., Yue, J., Ding, G., Li, B., Liu, X., Zheng, X., Yu, M., Li, J., Jiang, W., Wu, C., Zheng, J., Zhou, H. (2012).** Leucine-rich repeat 11 of Toll-like receptor 9 can tightly bind to CpG-containing oligodeoxynucleotides, and the positively charged residues are critical for high affinity, *J. Biol. Chem.*, **287**: 30596-30609.
- Paperna, I. (1973).** Lymphocystis in fish from East African lakes. *J. Wildl. Dis.*, **9**: 331-335.
- Paperna, I., Vilenkin, M., de Matos, A.P. (2001).** Iridovirus infections in farm-reared tropical ornamental fish. *Dis Aquat Org.*, **48**: 17-25.
- Peters, N., Schmidt, W. (1995).** Formation and disintegration of virions in lymphocystis cells of plaice *Pleuronectes platessa*. *Dis. Aquat. Org.*, **21**: 109-113.
- Pestka, S., Krause, C.D., Walter, M.R. (2004).** Interferons, interferon-like cytokines, and their receptors. *Immunol. Rev.*, **202**: 8-32.

- Phelan, P.E., Mellon, M.T., Kim, C.H. (2005).** Functional characterization of full-length TLR3, IRAK-4, and TRAF6 in zebrafish (*Dani rerio*). *Mol. Immunol.*, **42**: 1057-1071.
- Pietretti, M., Wiegertjes, G.F. (2014).** Ligand specificities of Toll-like receptor in fish: indications from infection studies. *Dev. Comp. Immunol.*, **43**: 205-222.
- Plant, K.P., LaPatra, S.E. (2011).** Advances in fish vaccine delivery. *Dev. Comp. Immunol.* **35**: 1256-1262.
- Qin, W.Q., Shi, C.Y., Gin, K.Y.H., Lam, T.J. (2002).** Atigenic characterization of a marine fish iridovirus from grouper, *Epinephelus* sp. *J. Virol. Methods*, **106**: 89-96.
- Rahman, A., Maclean, N. (1992).** Fish transgene expression by direct injection into fish muscle. *Mol. Marine Biol. Biotechnol.*, **1**: 286-289.
- Ramstad, A., Midtlyng, P.J. (2008).** Strong genetic influence on IPN vaccination and challenge trials in Atlantic salmon, *Salmo salar* L. *J. Fish Dis.*, **31**: 567-578.
- Randall, R.E., Goodbourn, S. (2008).** Interferons and viruses: an interplay between induction, signalling, antiviral responses and virus countermeasures. *J. Gen. Virol.*, **89**: 1-47.
- Randelli, E., Buonocore, F., Scapigliati. (2008).** Cell markers and determinants in fish immunology. *Fish Shellfish Immunol.*, **25**: 326-340.
- Randon-Barragan. (2009).** Receptores similares a Toll en peces: el inicio de la divergencia. *InVet*, **11**: 15-30.
- Rauta, P.R., Nayak, B., Das, S. (2012).** Immune system and immune responses in fish and their role in comparative immunity study: A model for higher organisms. *Immunol. Lett.*, **148**: 23-33.
- Reed, L.J., Muench, H. (1938).** A simple method of estimating fifty per cent endpoints. *Am. J. Hyg.*, **27**: 493-497.
- Restifo, N.P., Ying, H., Hwang, L., Leitner, W.W. (2000).** The promise of nucleic acid vaccines. *Gene Ther.*, **7**: 89-92.

- Reverter, M., Bontemps, N., Lecchini, D., Banaigs, B., Sasal, P. (2014).** Use of plant extracts in fish aquaculture as an alternative to chemotherapy: current status and future perspectives. *Aquaculture*, **433**: 50-61.
- Reyes-Cerpa, S., Reyes-López, F.E., Toro-Ascuy, D., Ibañez, J., Maissey, K., Sandino, A.M., Imarai, S. (2012).** IPNV modulation of pro and anti-inflammatory cytokine expression in Atlantic salmon might help the establishment of infection and persistence, *Fish Shellfish Immunol.*, **32**: 291-300.
- Ribeiro, C.M.S., Hermesen, T., Taverne-Thiele, A.J., Savelkoul, H.F.J., Wiegertjes, G.F. (2010).** Evolution of recognition of ligands from gram-positive bacteria: similarities and differences in the TLR2-mediated response between mammalian vertebrates and teleost fish. *J. Immunol.*, **184**: 2355-2368
- Rigos, G., Grigorakis, K., Nengas, I., Christophilogiannis, P., Yiagnisi, M., Koutsodimou, M., Alexis M. (1998).** Stress-related pathology seems a significant obstacle for the intensive farming of common dentex, *Dentex dentex* (Linnaeus 1758). *Bull. Eur. Assoc. Fish Pathol.*, **18**: 15-18.
- Robertsen, B. (2006).** The interferon system of teleost fish. *Fish Shellfish Immunol.*, **20**: 172-191.
- Robertsen, B. (2008).** Expression of interferon and interferon-induced genes in salmonids in response to virus infection, interferon-inducing compounds and vaccination. *Fish Shellfish Immunol.*, **25**: 351-357.
- Robin, J., Lariviere-Dunrand, C., Bernard, J. (1983).** The chemical composition of lymphocystis disease virus of fish. *Rev. Can. Biol. Exp.*, **42**: 173-176.
- Robin, J., Laperriere, A., Berthiaume, L. (1986).** Identifications of the glycoproteins of lymphocystis disease virus (LDV) of fish. *Arch. Virol.*, **87**: 297-305.
- Roca, F.J., Mulero, I., López-Muñoz, A., Sepulcre, M.P., Renshaw, S.A., Meseguer, J., Mulero, V. (2008).** Evolution of the inflammatory response in

- vertebrates: fish TNF- α is a powerful activator of endothelial cells but hardly activates phagocytes. *J. Immunol.*, **181**: 5071-5081.
- Rodríguez, S., Alonso, M., Pérez-Prieto, S.I. (2005).** Comparision of two birnavirus-rhabdovirus coinfections in fish cell lines. *Dis. Aquat. Organ.*, **67**: 183-190.
- Rodríguez Saint-Jean, S., Borrego J.J., Pérez-Prieto, S.I. (2003).** Infectious pancreatic necrosis virus: biology, pathogenesis, and diagnostic methods. *Adv Virus Res.*, **62**: 113-165.
- Rombout, J.H., Huttenhuis, H.B., Picchietti, S., Scapigliati, G. (2005).** Phylogeny and ontogeny of fish leucocytes. *Fish Shellfish Immunol.* **19**: 441-455.
- Ronen, A., Perelberg, A., Abramowitz, J., Hutoran, M., Tinman, S., Bejerano, I., Steinitz, M., Kotler, M. (2003).** Efficient vaccine against the virus causing a lethal disease in cultured *Cyprinus carpio*. *Vaccine*, **21**: 4677-4684.
- Russell, S., Lumsden, J.S. (2005).** Function and heterogeneity of fish lectins. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, **108**: 111-120.
- Saklou, N.T., Burgess, B.A., Van Metre, D.C., Hornig, K.J., Morley, P.S., Byers S.R. (2016).** Comparison of disinfectant efficacy when using high-volume directed mist application of accelerated hydrogen peroxide and peroxymonosulfate disinfectants in a large animal hospital. *Equine Vet. J.*, **48**: 485-489.
- Salinas, I., Abelli, L., Bertoni, F., Picchietti, S., Roque, A., Furones, D., Cuesta, A., Meseguer, J., Esteban, M.A. (2008).** Monospecies and multispecies probiotic formulations produce different systemic and local immunostimulatory effects in the gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.). *Fish Shellfish Immunol.*, **25**: 114-123.
- Salinous, K., Simard, N., Harland, R., Ulmer, J.B. (2007).** The road to licensure of a DNA vaccine. *Curr. Opin. Invest. Dr.*, **8**: 635-641.
- Sapkota, A., Sapkota, A.R., Kucharski, M., Burke, J., McKenzie, S., Walker, P., Lawrence, R. (2008).** Aquaculture practices and potential human health risks: current knowledge and future priorities. *Environ. Int.*, **34**: 1215-1226.

- Sarasquete, C., González de Canales, M.L., Arellano, J., Pérez-Prieto, S.I., García- Rosado, E., Borrego, J.J. (1998).** Histochemical study of lymphocystis disease in skin of gilthead seabream, *Sparus aurata*, from the South Atlantic coast of Spain. *Histol. Histopathol.*, **13**: 37-45.
- Sarasquete, C., Borrega, B., Robles, R., Núñez, R., Bermúdez, L., Ortiz-Delgado, J.B., Barrios, M.M., García de Lomas, J.M. (2013).** Parásitos como bioindicadores de calidad y salud en cultivos semiintensivos en esteros. Diagnóstico y pronóstico de histopatologías branquiales en dorada, *Sparus aurata* y lubina, *Dicentrarchus labrax*. *Actas Cong. Nac. Acuicultura*. 320-323.
- Scapigliati, G., Fausto, A.M., Picchietti, S. (2018).** Fish Lymphocytes: An evolutionary equivalent of mammalian innate-like lymphocytes?. *Front. Immunol.*, **9**: 971-979.
- Schmeisser, H., Mejido, J., Balinsky, C.A., Morrow, A.N., Clark, C.R., Zhao, T., Zoon, K.C. (2010).** Identification of alpha interferon-induced genes associated with antiviral activity in Daudi cells and characterization of IFIT3 as a novel antiviral gene. *J. Virol.*, **84**: 10671-10680.
- Schmittgen, T.D., Livak, K.J. (2008).** Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method. *Nat. Protoc.*, **3**: 1101-1108.
- Schnick, R.A. (2001).** International harmonization of antimicrobial sensitivity determination for aquaculture drugs. *Aquaculture*, **196**: 277-288.
- Schnitzler, P., Darai, G. (1989).** Characterization of the repetitive DNA elements in the genome of fish lymphocystis disease virus. *Virology*, **172**: 32-41.
- Secombes, C.J., Wang, T., Hong, S., Peddie, S., Campre, M., Laing, K.J. (2001).** Cytokines and innate immunity of fish. *Dev. Comp. Immunol.*, **25**: 713-723.
- Secombes, C.J., Wang, T. (2012).** The innate and adaptive immune system of fish. In: (Austin, B., ed.), pp3-68. *Infectious Disease in Aquaculture, Prevention and Control*, Woodhead Publishing, Oxford.
- Segarra, A., Baillon, L., Tourbidez, D., Benabdelmouna, A., Faury, N., Bourgougnon, N., Renault, T. (2014).** Ostreid herpesvirus type I replication

- and host response in adult Pacific oysters, *Crassostrea gigas*. *Vet. Res.*, **45**: 103-113.
- Segner, H., Sundh, H., Buchmann, K., Douxfils, J., Sundell, K.S., Mathieu, C., Ruane, N., Jutfelt, F., Toften, H., Vaughan, L. (2011).** Health of farmed fish: its relation to fish welfare and its utility as welfare indicator. *Fish Physiol. Biochem.*, **38**: 85-105.
- Seternes, T., Tonheim, T.C., Løvoll, M., Bøgwald, J., Dalmo, R.A. (2007).** Specific endocytosis and degradation of naked DNA in the endocardial cells of cod (*Gadus morhua* L.). *J. Exp. Biol.*, **210**: 2091-2103.
- Sheng, X.Z., Zhan, W.B., Xu, S., Cheng, S. (2007).** Histopathological observation of lymphocystis disease and lymphocystis disease virus (LCDV) detection in cultured diseased *Sebastes schlegelii*. *J. Ocean Univ. China*, **6**: 378-382.
- Sheng, X.Z., Song, J.L., Zang, W. B. (2012).** Development of a colloidal gold immunochromatographic test strip for detection of lymphocystis disease virus in fish. *J. Appl. Microbiol.*, **113**: 737-744.
- Shi, Y.H., Chen, J., Li, C.H., Lu, X.J., Zhang, D.M., Li, H.Y., Zhao, Z.X., Li, M.Y. (2012).** Detection of bacterial pathogens in aquaculture samples by DNA microarray analysis. *Aquaculture*, **338–341**: 29-35.
- Shtrichman, R., Samuel, C.E. (2001).** The role of gamma interferon in antimicrobial immunity. *Curr. Opin. Microbiol.*, **4**: 251-259.
- Sindermann, C.J. (1996).** Pollution and infectious diseases. In: *Ocean Pollution: Effects on Living Resource and Humans*, (Sindermann, C.J., ed.), pp. 3740. CRC Press, Boca Raton.
- Sola, L., Moretti, A., Crosetti, D., Karaïskou, N., Magoulas, A., Rossi, A.R., Rye, M., Triantafyllidis, A., Tsigenopoulos, C.S. (2007).** Gilthead seabream—*Sparus aurata*. In: *Genetic Effects of Domestication, Culture and Breeding of Fish and Shellfish, and their Impacts on Wild Population*. (Svasand, T., Crosetti, D., Garcia-Vazquez, E., Verspoor, E., eds.), pp.47-54. Genimpact Final Scientific Report (EU contract n. RICA-CT-2005-022802).

- Sommerset, I., Lorenzen, E., Lorenzen, N., Bleie, H., Nerland, A.H. (2003).** A DNA vaccine directed against a rainbow trout rhabdovirus induces early protection against a nodavirus challenge in turbot. *Vaccine*, **21**: 4661-4667.
- Sommerset, I., Krossøy, B., Biering, E., Frost, P. (2005).** Vaccines for fish aquaculture. *Expert Rev. Vaccines*, **4**: 89-101.
- Stafford, J.L., Belosevic, M. (2003).** Transferrin and the innate immune response of fish: identification of a novel mechanism of macrophage activation. *Dev. Comp. Immunol.*, **27**: 539-554.
- Subasinghe, R.P., McGladdery, S.E., Hill, B.J. (2004).** Surveillance and zoning for aquatic animal diseases. *FAO Fish. Tech. Paper*, **451**. FAO, Rome.
- Subramanian, S., Mackinnon, S.L., Ross, N.W. (2007).** A comparative study on innate immune parameters in the epidermal mucus of various fish species. *Comp. Biochem. Physiol. B.*, **148**: 256-263.
- Subramanian, S., Ross, N.W., Mackinnon, S.L. (2008).** Comparison of antimicrobial activity in the epidermal mucus extracts of fish. *Comp. Biochem. Physiol. B.*, **150**: 85-92.
- Sun, Y., Liu, C.S., Sun, L. (2011).** Construction and analysis of the immune effect of an *Edwardsiella tarda* DNA vaccines encoding a D15-like surface antigen. *Fish Shellfish Immunol.*, **30**: 273-279.
- Sunyer, J.O., Tort, L., Lambris, J.D. (1997).** Structural C3 diversity in fish—characterization of five forms of C3 in the diploid fish *Sparus aurata*. *J. Immunol.*, **158**: 2813-2821.
- Takano, T., Iwahori, A., Hirono, I., Aoki, T. (2004).** Development of a DNA vaccine against hirame rhabdovirus and analysis of the expression of immune-related genes after vaccination. *Fish Shellfish Immunol.*, **17**: 367-374.
- Takeuchi, O., Akira, S. (2007).** Recognition of viruses by innate immunity. *Immunol. Rev.*, **220**: 214-224.

- Thompson, A.J., Locarnini, S.A. (2007).** Toll-like receptors, RIG-I-like RNA helicases and the antiviral innate immune response. *Immunol. Cell. Biol.*, **85**: 435-445.
- Tian, J.Y., Yu, J. (2011).** Poly (lactic-co-glycolic acid) nanoparticles as candidate DNA vaccine carrier for oral immunization of Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*) against lymphocystis disease virus. *Fish Shellfish Immunol.*, **30**: 109-117.
- Tian, J.Y., Sun, X.Q., Chen, X.G. (2008).** Formation and oral administration of alginate microspheres loaded with pDNA coding for lymphocystis disease virus (LCDV) to Japanese flounder. *Fish Shellfish Immunol.*, **24**: 592-599.
- Tidona, C.A., Schnitzler, P., Kehm, R., Darai, G. (1998).** Is the major capsid protein of iridoviruses a suitable target for the study of viral evolution? *Virus genes*, **16**: 59-66.
- Tonheim, C.T., Bøgwald, J., Dalmo, R.A. (2008a).** What happens to the DNA vaccine in fish. A review of current knowledge. *Fish Shellfish Immunol.*, **25**: 1-18.
- Tonheim, T.C., Dalmo, R.A., Bøgwald, J., Seternes, T. (2008b)** Specific uptake of plasmid DNA without reporter gene expression in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) kidney after intramuscular administration. *Fish Shellfish Immunol.*, **24**: 90-101.
- Tort, L., Balasch, J.C., Mackenzie, S. (2003).** Fish immune system. A crossroads between innate and adaptive responses. *Inmunología*, **22**: 277-286.
- Tort, L., Rotllant, J., Rovira, L. (1998).** Immunological suppression in gilthead sea bream *Sparus aurata* of the North-West Mediterranean at low temperatures. *Comp. Biochem. Physiol.*, **120**: 175-179.
- Tort, L., Rotllant, J., Liarte, C., Acerete, C., Hernandez, A., Ceulemans, S., Coutteau, P., Padros, F. (2004).** Effects of temperature decrease on feeding rates, immune indicators and histopathological changes of gilthead sea bream *Sparus aurata* fed with an experimental diet. *Aquaculture*, **229**: 55-65.

- Tsai, C.T., Ting, J.W., Wu, M.H., Wu, M.F., Guo C., Chang, C.Y. (2005).** Complete genome sequence of the grouper iridovirus and comparison of genomic organization with those of other iridoviruses. *J. Virol.*, **79**: 2010-2023.
- Tu, T.H., Silvestre, F., Bernard, A., Douny, C., Phuong, T.N., Tao, T.C., Maghuin-Rogiste, G., Kestemont, P. (2008).** Oxidative stress response of black tiger shrimp (*Penaeus monodon*) to enrofloxacin and to culture system. *Aquaculture.*, **285**: 244-248.
- Uematsu, S., Akira, S. (2007).** Toll-like receptors and Type I interferons. *J Biol Chem.*, **25**: 15319-15323.
- Underhill, D.M., Ozinsky, A. (2002).** Toll-like receptors: key mediators of microbe detection. *Curr. Opin. Immunol.* **14**: 103-110.
- Valero, Y., Morcillo, P., Meseguer, J., Buonocore, F., Esteban, M.A., Chaves-Pozo, E., Cuesta, A. (2015).** Characterization of the IFN pathway in the teleost fish gonad against vertically transmitted viral nervous necrosis virus. *J. Gen. Virol.*, **96**: 2176-2187.
- Valles, R., Roque, A., Caballero, A., Estevez, A. (2015).** Use of Ox-Aquaculture[©] for disinfection of live prey and meagre larvae, *Argyrosomus regius* (Asso, 1801). *Aquac. Res.*, **46**: 413-419.
- Valverde, E.J., Fernández-Trujillo, M.A., Cano, I., García-Rosado, E., Alonso, M.C., Borrego, J.J., Castro, D. (2012).** Differential response of gilthead seabream Mx genes to lymphocystis disease virus (LCDV) infection in SAF-1 cells, XIX International Poxvirus, Asfarvirus & Iridovirus Conference, Salamanca, Spain, p. 251.
- Valverde, E.J., Borrego, J.J., Castro, D. (2016a).** Evaluation of an integrated cell culture RT-PCR assay to detect and quantify infectious lymphocystis disease virus. *J. Virol. Methods*, **238**: 62-65.
- Valverde, E.J., Cano, I., Labella, A., Borrego, J.J., Castro, D. (2016b).** Application of a new real-time polymerase chain reaction assay for surveillance studies of

- lymphocystis disease virus in farmed gilthead seabream. *BMC Vet. Res.*, **12**: 71-79.
- Valverde, E.J., Borrego, J.J., Sarasquete, M.C., Ortiz-Delgado, J.B., Castro, D. (2017a).** Target organs for lymphocystis disease virus replication in gilthead seabream (*Sparus aurata*). *Vet.Res.*, **48**: 21-32.
- Valverde, E.J., Cano, I., Castro, D., Paley, R.K., Borrego, J.J. (2017b).** Rapid and sensitive detection of lymphocystis disease virus genotype VII by loop-mediated isothermal amplification, *Food Environ. Virol.*, **9**: 189-199.
- Valverde, E.J., Labella, A.M., Borrego, J.J., Castro, D. (2019).** *Artemia* spp., a susceptible host and vector for lymphocystis disease virus. *Viruses*. **11**: 506-516.
- Van der Vaart, M., Spalink, H.P., Meijer, A.H. (2012).** Pathogen recognition and activation of the innate immune response in zebrafish. *Adv. Hematol.*, **2012**: 1-19.
- Van Muiswinkel, W.B., Wiegertjes, G.F., Stet, R.J. (1999).** The influence of environmental and genetic factors on the disease resistance of fish. *Aquaculture*, **172**: 103-110.
- Vega-Ramírez, M.T., López-Santiago, R., Moreno, M., García, V. (2010).** Respuesta inmune en peces. In: *Inmunología Veterinaria*, (Gutiérrez Pabello, J.A., ed), pp: 309-314. El Manual Moderno.
- Verjan, N., Ooi, E.L., Nochi, T., Kondo, H., Hirono, I., Aoki, T., Kiyono, H., Yuki, Y. (2008).** A soluble nonglycosylated recombinant infectious hematopoietic necrosis virus (IHNV) G-protein induces IFNs in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Fish Shellfish Immunol.*, **25**: 170-180.
- Verner-Jeffreys, D.W., Joiner, C.L., Bagwell, N.J., Reese, R.A., Husby, A., Dixon, P.F. (2009).** Development of bactericidal and virucidal testing standards for aquaculture disinfectants. *Aquaculture*, **286**: 190-197.
- Verrier, E.R., Langevin, C., Benmansour, A., Boudinot, P. (2011).** Early antiviral response and virus-induced genes in fish, *Dev. Comp. Immunol.* **35**: 1204-1214.

- Waddell, S.J., Popper, S.J., Rubins, K.H., Griffiths, M.J., Brown, P.O., Levin, M., Relman, D.A. (2010).** Dissecting interferon-induced transcriptional programs in human peripheral blood cells. *PLoS ONE.*, **5**: 9753-9766.
- Walker, R. (1962).** Fine structure of lymphocystis virus of fish. *Virology*, **18**: 503-505.
- Walker, D. P., Hill, B. J. (1980).** Studies on the culture assay of infectivity and some *in vitro* properties of lymphocystis virus. *J. Gen. Virol.* **51**: 385-395.
- Wang, Y.Q., Lü, L., Weng, S.P., Huang, J.N., Chan, S.M., He, J.G. (2007).** Molecular epidemiology and phylogenetic analysis of a marine fish infectious spleen and kidney necrosis virus-like (ISKNV-like) virus. *Arch. Virol.*, **152**: 763-773.
- Wang, M., Sheng, X.Z., Xing, J., Tang, X.Q., Zhan, W.B. (2011).** Identification of a 27.8 kDa protein from flounder gill cells involved in lymphocystis disease virus binding and infection. *Dis. Aquat. Organ.*, **94**: 9-16.
- Weissenberg, R. (1965).** Morphological studies on lymphocystis tumour cells of a chichlid from Guatemala *Cichlasoma synspilum* Hubbs. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **126**: 396-413.
- WHO (World Health Organization) (2006).** Report of a joint FAO/OIE/WHO expert consultation on antimicrobial use in aquaculture and antimicrobial resistance, WHO, Seoul.
- Whyte, S.K., (2007).** The innate immune response of finfish - a review of current knowledge. *Fish Shellfish Immunol.*, **23**: 1127-1151.
- Williams, T., Chinchar, D., Darai, G., Hyatt, A., Kalmaakoff, J., Seligy, V. (2000).** Family *Iridoviridae*. In: *Seventh Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. (Regenmortel, M.H.V., Fauquet, C.M., Bishop, D.H.L., Carstens, E.B., Estes, M.K., Maniloff, J., Mayo, M.A., McGeoch, D.J., Pringle, C.R., Wickner, E.B., eds.), pp: 167-182. Academic Press, New York.
- Willis, D.B., Goorha, R., Granoff, A. (1984).** DNA methyltransferase induced by frog virus 3. *J. Virol.*, **49**: 86-91.

- Wilson, E.B., Brooks, D.G. (2011).** The role of IL-10 in regulating immunity to persistent viral infections. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*, **350**: 39-65.
- Wolf, K. (1988).** Lymphocystis disease. In: *Fish Viruses and Fish Viral Disease*. (Wolf, K., ed.), pp. 268-291. Cornell University Press, New York.
- Wolf, K., Carlson, C.P. (1965).** Multiplication of lymphocystis virus in the bluegill (*Lepomis macrochirus*). *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **126**: 414-419.
- Wolf, K., Gravell, M.K., Malsberger, R.G. (1966).** Lymphocystis virus: infectivity of lesion preparations stored after lyophilization or simple desiccation. *J. Fish Dis.*, **2**: 259-260.
- Wolf, K., Quimby, M.C. (1973).** Fish viruses: buffers and methods for plaquing eight agents under normal atmosphere. *Appl. Microbiol.*, **25**: 656-664.
- Wolff, J.A., Williams, P., Acsadi, G., Jiao, S., Jani, A., Chong, W. (1991).** Conditions affecting direct gene transfer into rodent muscle *in vivo*. *BioTechniques*, **11**: 474-485.
- Workenhe, S.T., Rise, M.L., Kibenge, M.J.T., Kibenge, F.S.S. (2010).** The fight between the teleost fish immune response and aquatic viruses. *Mol. Immunol.*, **47**: 2525-2536.
- Wu, X., Hu, G., Li, J., Lun, Y., Zhang, F., Yu, L., Bai, W., Sun, X., Xu, Z. (2003).** Construction and expression of recombinant eukaryotic expression vector containing lymphocystis disease virus (LCDV) MCP gene. *Science Technology and Engineering.*, **3**: 234-236.
- Wu, Y.C., Chi, S.C. (2007).** Cloning and analysis of antiviral activity of a barramundi (*Lates calcarifer*) Mx gene. *Fish Shellfish Immunol.*, **23**: 97-108.
- Wu, R., Tang, X., Sheng, X., Zhan, W. (2015).** Tissue distribution of the 27.8 kDa receptor and its dynamic expression in response to lymphocystis disease virus infection in flounder (*Paralichthys olivaceus*), *J. Comp. Pathol.*, **153**: 324-332.
- Wu, R., Sheng, X., Tang, X., Xing, J., Zhan, W. (2018).** Transcriptome analysis of flounder (*Paralichthys olivaceus*) gill in response to lymphocystis disease virus

(LCDV) infection: novel insights into fish defense mechanisms, *Int. J. Mol. Sci.*, **19**: 160-179.

Xing, J., Sheng, X., Zhan, W. (2006). Lymphocystis disease and diagnostic methods in China. *Aquaculture Asia Magazine*, **11**: 30-33.

Xu, C., Mutoloki, S., Evensen, Ø. (2012). Superior protection conferred by inactivated whole virus over subunit and DNA vaccines against salmonid. *Vaccine*, **30**: 3918-3928.

Xu, G., Sheng, X., Xian, J., Zhan, W. (2011). Effect of temperatura on immune response of Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*) to inactivated to lymphocystis virus (LCDV). *Fish Shellfish Immunol.*, **30**: 525-531.

Yoshimizu, M. (2003). Control strategy for diseases of salmonids and flounder. In: (Lee, C.S., O'Bryen, P.J., eds). *Biosecurity in Aquaculture Production Systems: Exclusion of Pathogens and Other Undesirables*, pp. 35-41. World Aquaculture Society, Baton Rouge.

Yoshimizu, M. (2009). Control strategy for viral diseases of salmonid fish, flounders and shrimp at hatchery and seed production facility in Japan. *Fish Pathol.*, **44**: 9-13.

Yoshimizu, M., Iwamoto, R. (2001). The development of protective vaccine against Japanese flounder lymphocystis disease using an inactivated vVirus. In: *Annual Report of Disease Control FIDIC*. (Yoshimizu, M., Iwammoto, R., ed.), pp. 1-14. Fish Disease Center News, Tokyo.

Yoshimizu, M., Yoshinaka, T., Hatori, S., Kasai, H. (2005). Survivability of fish pathogenic vViruses in enviromental water, and inactivation of fish viruses. *Bull. Fish Res. Agen. Supplement.*, **2**: 47-54.

Zhang, M., Hhy, Y.H., Xiao, Z.Z., Sun, Y., Sun, L. (2012). Construction and analysis of experimental DNA vaccine against megalocytivirus. *Fish Shellfish Immunol.*, **33**: 1192-1198.

Zhang, Y.A., Salinas, I., Sunyer, J.O. (2011). Recent findings on the structure and function of teleost IgT. *Fish Shellfish Immunol.*, **31**: 627-634.

- Zhang, Y.B., Jiang, J., Chen, Y.D., Zhu, R., Shi, Y., Zhang, Q.Y., Gui, J.F. (2007).** The innate immune response to grass carp hemorrhagic virus (GCHV) in cultured *Carassius auratus* blastulae (CAB) cells. *Dev. Comp. Immunol.*, **31**: 232-243.
- Zhang, Q.Y., Ruan, H.M., Li, Z.Q., Yuan, X.P., Gui, J.F. (2003).** Infection and propagation of lymphocystis virus isolated from the cultured flounder *Paralichthys olivaceus* in grass carp cell lines. *Dis. Aquat. Org.*, **57**: 27-34
- Zhang, Q.Y., Xiao, F., Xie, J., Li, Z.Q., Gui, J.F. (2004).** Complete genome sequence of lymphocystis disease virus isolated from China. *J. Virol.*, **78**: 6982-6994.
- Zheng, F.R., Sun, X.Q., Liu, H.Z., Zhang, J.X. (2006).** Study on the distribution and expression of a DNA vaccine against lymphocystis disease virus in Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*). *Aquaculture*, **261**: 1128-1134.
- Zheng, F., Sun, X., Liu, H., Wu, X., Zhong, N., Wang, B., Zhou, G. (2010).** Distribution and expression *in vitro* and *in vivo* of DNA vaccine against lymphocystis disease virus in Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*). *Chin. J. Oceanol. Limn.*, **28**: 67-74
- Zheng, F., Sun, X., Wu, X., Liu, H., Li, J., Wu, S., Zhang, J. (2011).** Immune efficacy of a genetically engineered vaccine against lymphocystis disease virus: Analysis of different immunization strategies. *Evid. Based Complement. Alternat. Med.*, **2011**: 729216-729226.
- Zheng, Q., Zhang, R., Wang, Y., Pan, X., Tang, J., Zhang, G. (2012).** Occurrence and distribution of antibiotics in the Beibu Gulf, China: impacts of river discharge and aquaculture activities. *Mar. Environ. Res.*, **78**: 26-33.
- Zhong, N., Hu, G., Zhang, L., Zhang, F.L., Bai, W.T., Yu, L., Xu, Z.K., Wu, X.A. (2006).** Prokaryotic expression of lymphocystis disease virus major capsid protein 1,3 Kb gene fragment. *Science Technology and Engineering*, **6**: 1345-1352.

Zhou, S., Wan, Q., Huang, Y., Huang X., Cao, J., Ye, L., Lim, T.K., Lin, Q., Qin, Q. (2011). Proteomic analysis of Singapore grouper iridovirus envelope proteins and characterization of a novel envelope protein VP088. *Proteomics.*, **11**: 2236-2248.