

Aplicación de la citometría de flujo al estudio de las células IgM positivas de doradas (*Sparus aurata*) vacunadas frente *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*

Grasso, V.(1)*; Janeiro de Assunção, P.(2); Padilla, D.(1); El Aamri, F.(1); Román, L.(1); Real, F.(1) y Acosta, F.(1)

(1) Instituto Universitario de Sanidad Animal y Seguridad Alimentaria, IUSA, ULPGC, 35416, Arucas, Las Palmas.

(2) Instituto Tecnológico de Canarias (ITC), Playa de Pozo Izquierdo s/n, 35119 Sta Lucía, Las Palmas.

RESUMEN: La citometría de flujo (CF) es un método directo, específico y muy sensible que permite obtener señales cuantitativas de fluorescencia a partir de células individuales en suspensión. La CF ha sido ampliamente utilizada en el sector de la investigación en acuicultura debido al reciente desarrollo de los anticuerpos monoclonales (AcM) frente inmunoglobulinas de peces. Esta técnica permite determinar varios parámetros inmunológicos como la actividad fagocítica de los macrófagos del riñón anterior, la producción de anticuerpos frente antígenos específicos, y también permite detectar virus dentro de células inmunes. El objetivo de este estudio es analizar y comparar la producción total de células IgM positivas producidas en las branquias y bazo de juveniles de dorada vacunadas por baño frente a *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* (Phdp). La cepa utilizada para diseñar la vacuna ha sido previamente aislada de un brote natural ocurrido en las Islas Canarias. Los peces experimentales fueron vacunados con tres vacunas inactivadas preparadas a partir de la cepa Phdp 94/99 y como control positivo se utilizó una vacuna comercial. La producción de IgM después de la vacunación se midió con citometría de flujo utilizando una técnica de tinción directa con AcM específicos marcados con isotiocianato de fluoresceína (FITC). Los resultados indican una mayor presencia de células IgM positivas en las branquias con respecto al bazo de los peces vacunados y una respuesta más elevada después de la segunda vacunación con respecto a la primera. Este resultado demuestra que la CF es una técnica eficaz, fiable y rápida para detectar las células IgM positivas en bazo y branquias de juveniles de dorada.

Palabras clave: *Sparus aurata*, vacunación, IgM, *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*

SUMMARY: Flow cytometry (FC) is a straightforward, highly specific and sensitive procedure which provides objective and quantitative recording of fluorescent signals from individual cells. FC has been used widely in the area of aquaculture research due mainly to the development of monoclonal antibodies (mAbs). Phagocyte activity of head-kidney macrophages of several fish species, antibody production against specific antigens or detection of viruses inside immune cells, are some of the several possible analysis approached by this assay. The aim of this work is to analyze and compare total IgM positive cells in the gill and spleen of seabream juveniles after bath immunization against *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* (Phdp) using a direct and an indirect staining method. Strain used in this work was isolated from a natural outbreak in the Canary Islands. Fish were immunized with three different inactivated vaccines prepared with Phdp 94/99 antigen and a fourth commercial vaccine was used as a positive control. The effect on IgM production post-vaccination was compared among groups. Results show a higher number of IgM positives cells in the gill than in the spleen of vaccinated fish and also a higher response after second vaccination when compared to first vaccination. These results suggest that FC is an efficient, rapid, and trustable method to measure IgM positive cells in the gill and spleen of sea bream juveniles.

Key words: *Sparus aurata*, vaccination, IgM, *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*

Introducción

La disponibilidad de anticuerpos monoclonales o mAc ha ocasionado un gran impacto en inmunología de peces. En el mercado existen mAc específicos frente a las inmunoglobulinas (Ig) de varias especies de peces que reaccionan frente a antígenos de membranas de estas últimas permitiendo la identificación y caracterización de subpoblaciones de leucocitos. De entre los diferentes métodos para marcar células de peces con anticuerpos específicos, los más usados son:

- 1) Técnica Panning y Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA)(3-6-12-19) incluyendo el método ELISPOT (25). En todos estos métodos las células son inmovilizadas sobre una superficie sólida.
- 2) Inmunobeads, en este método las células son separadas con un imán (13).
- 3) Citometría de flujo (2-20-24).

La técnica ELISA siempre ha sido considerada el mejor método (16) ya que las técnicas de aglutinación son rápidas y efectivas pero menos sensibles que ELISA (22). Con respecto a la citometría de flujo (CF), el método clásico es utilizar un primer anticuerpo no conjugado seguido por un segundo anticuerpo conjugado con un fluorocromo que excite y emita fluorescencia a 488 nm (26).

La vacunación es una alternativa sostenible a la quimioterapia que permite proteger el pez frente a las infecciones y tiene la ventaja de no generar residuos (23). Recientemente, el interés en desarrollar métodos estandarizados para medir la producción de anticuerpos se ha incrementado enormemente. Esto se debe básicamente a la introducción de programas de monitoreo en acuicultura, como por ejemplo la detección de anticuerpos séricos frente a nodavirus en cultivos de lubina. Los niveles de anticuerpos en el suero también se han utilizado en varias especies como indicador de la eficacia de la vacuna-

ción (9). En algunos casos existe una correlación positiva entre los anticuerpos producidos y la protección frente a la enfermedad, pero no siempre es así, y sobre todo en el caso de la vacunación por baño frente a Phdp. Mulero et al. (17) encontraron un aumento de la sensibilidad frente a la infección en doradas vacunadas por baño largo respecto al grupo control sin vacunar. Estos autores utilizaron la técnica ELISA para detectar las IgM en los peces vacunados. El mecanismo de defensa de la dorada frente a las infecciones, y la correlación entre vacunación y la producción de células IgM positivas queda aún por dilucidar.

Material y Método

2.1 Animales experimentales

Un total de 1500 juveniles de dorada con peso medio de 3 g fueron proporcionados por una granja local (ADSA, Alevines y Doradas S.A.) y mantenidos en las instalaciones del ICCM (Instituto Canario de Ciencias Marinas, Taliarte) durante todo el experimento. Los peces se distribuyeron de forma aleatoria en 15 tanques de 500 l (150 peces/tanque y por triplicado por cada tratamiento). Todos los tanques presentan aireación continua, sistema abierto de renovación de agua, la temperatura del agua se mantuvo alrededor de 22 °C y los peces fueron expuestos a un fotoperiodo natural de 12 h. Los peces fueron alimentados hasta la saciedad aparente con una dieta comercial de la casa Skretting (Burgos, España) dos veces al día.

2.2. Bacteria y vacunas

La cepa de Phdp 94/99 utilizada para elaborar las vacunas fue aislada de un brote natural ocurrido en las islas Canarias en 1999. Esta cepa fue caracterizada utilizando el sistema miniaturizado de identificación API 20E (BioMérieux®, España) y la técnica de la PCR. La cepa se cultivó en

agar sangre enriquecido con el 2% de cloruro de sodio y el 1% de glucosa para que produjera cápsula (1). Se prepararon tres vacunas inactivadas diferentes (bacterinas):

- 1) Vacuna inactivada con formol al 5 % en agitación continua durante la noche
- 2) Vacuna inactivada con calor. La inactivación se produjo exponiendo la bacteria a una temperatura de 80°C durante 10 minutos (15).
- 3) Vacuna inactivada con rayos UV. La bacteria fue expuesta a rayos UV durante dos horas utilizando un transiluminador BIORAD (transiluminator 2000).

La concentración final de cada una de las bacterinas fue ajustada a 10^8 ufc/ml por espectrofotometría (GENESYS 10UV®, Thermo) y medida a una longitud de onda 600 nm. Se utilizó la vacuna comercial Ictiovac PD® (Hipra, España) como control positivo.

2.3 Inmunización de los peces

Una vez alcanzado los 5 g de peso medio, los peces de cada grupo fueron inmunizados por inmersión directa en una dilución 1:10 de cada vacuna (9 litros de agua de mar: 1 litro de vacuna) durante 60 segundos (baño corto). Después de la inmunización los peces recibieron otro baño en agua de mar limpia antes de ser devueltos a sus respectivos tanques. El grupo control positivo recibió un baño corto con la vacuna comercial (Fig 1) y el grupo control negativo recibió el mismo tratamiento pero con tampón salino (PBS) (9 litros agua de mar: 1 litro PBS) (Fig 2). Posteriormente se recogieron muestras de bazo y branquias los días 4, 9, 11, 14, 18 y 23 post vacunación, para ello se tomaron 8 peces por tanque los cuales fueron anestesiados con 2-fenoxietanol y sacrificados en agua con hielo. Se procedió a aislar los leucocitos de los animales muestreados por métodos previamente descritos (7) y se almacenaron a -80 °C en medio dMEM

(Sigma) adicionado con un 10% de dimetilsulfóxido. Treinta y un días después de la primera vacunación los peces recibieron una segunda vacunación por baño corto (booster) y nuevamente se recogieron muestras de bazo y branquias de otros ocho peces de cada tanque.

2.4 Citometría de Flujo

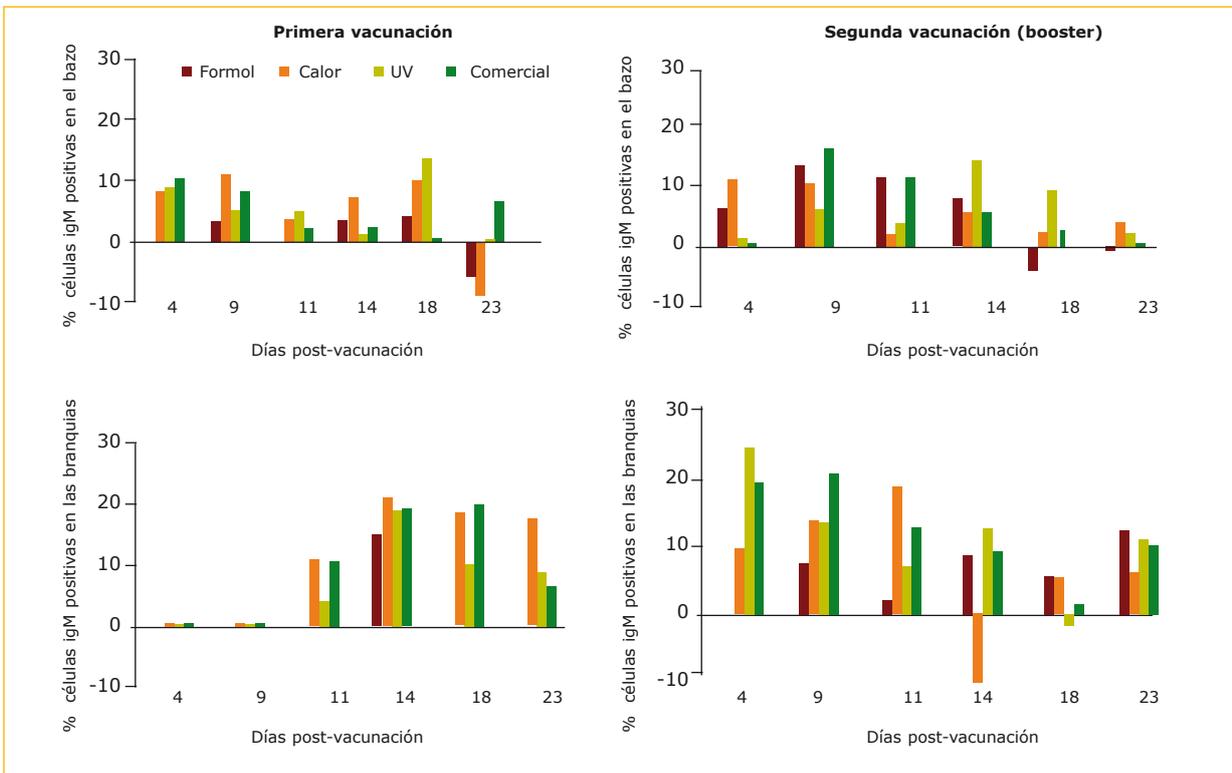
Antes de empezar el experimento se realizaron varios ensayos preliminares para determinar un protocolo de citometría de flujo eficaz para leucocitos de dorada. Para ello se diseñó un método de tinción directa de IgM de dorada utilizando un anticuerpo monoclonal (AquaMab, Aquatic Diagnostics Ltd, Stirling, Escocia) conjugado con FITC que reaccionó frente los leucocitos de las branquias y del bazo. La conjugación con FITC se realizó utilizando el FluoroTag™ FITC Conjugation Kit (Sigma, USA)

siguiendo las recomendaciones del fabricante. Los leucocitos extraídos de bazo y branquias se ajustaron a 10⁶ cel/ml, se suspendieron en un volumen final 250 ml de PBS, y finalmente se incubaron con 6 µl del conjugado anti-IgM-FITC a temperatura ambiente (25 °C) en oscuridad durante 30 min. Las muestras en suspensión fueron analizadas con un citómetro Coulter Epics XL flow (Coulter, Miami, FL, USA) equipado con un laser de argón a 488 nm. Cada célula se caracterizó por tres parámetros ópticos: dispersión de luz hacia adelante o forward-angle-scatter (FSC), dispersión de luz hacia los lados o side-angle-scatter (SSC) y fluorescencia verde emitida (525 nm, detector FL1). Los datos recolectados fueron analizados con el software SYSTEM II (Coulter) y con el software WinMDI versión 2.8 (Joseph Trotter; the Scripps Research Institute, La Jolla, CA, USA).

Resultados

Los resultados muestran que la tinción directa con anticuerpos monoclonales conjugados con FITC es un buen método para marcar las células IgM positivas de dorada. Los histogramas de CF muestran un pico muy alto de fluorescencia (Fig. 1) y los datos son repetitivos. El grupo control negativo muestra los niveles más bajos de células teñidas (Fig. 2). La producción de IgM fue más débil después de la primera vacunación (Fig. 3 y Fig. 4) comparada con la producción de IgM después del booster (Fig. 5 y Fig. 6). Destacamos que la producción de IgM en los peces inmunizados fue mucho más alta en las branquias que en el bazo. La cinética de respuesta inmune no fue igual en todos los grupos ya que algunas vacunas presentaron un pico más temprano que otras. Por ejemplo, después de la primera vacuna, en las branquias la

Figura 1. Porcentaje de células IgM positivas en el bazo y branquias de los peces vacunados. Valores expresados como incremento sobre el control.



producción de IgM empezó el día 11 mientras que en el bazo empezó el día 4 pero con unos niveles más bajos. La vacuna inactivada con UV presentó un pico el día 4 después del booster, mientras que la vacuna comercial el día 9 y la vacuna inactivada con calor el día 11. La vacuna inactivada con formol presentó los niveles más bajos de IgM y el pico fue el día 23. En el bazo la producción de IgM fue considerablemente inferior a la producción en las branquias. En este órgano la vacuna inactivada por UV presentó un pico el día 14, la vacuna de formol y la comercial el día 9 y la inactivada por calor presentó un pico que se quedó constante entre los días 4 y 9.

Discusión

La citometría de flujo es una técnica sensible que permite hacer un análisis multiparamétrico y analizar cualitativamente y cuantitativamente una muestra célula por célula (4). Hasta la fecha no se ha realizado ningún estudio sobre células IgM positivas de dorada utilizando la citometría de flujo. En este trabajo describimos por primera vez un método para medir la producción de IgM de dorada en el bazo y en las branquias después de vacunación por baño. En nuestro estudio, la vacunación por baño produjo un incremento en el número de células IgM positivas en los peces vacunados. Los resultados son de considerarse fiables ya que se utilizaron anticuerpos monoclonales frente IgM de dorada y que además los picos de fluorescencia fueron repetitivos. Los resultados muestran que la producción fue más alta en las branquias que en el bazo. Este resultado está en concordancia con lo descrito por Dos Santos et al. (2000) (6), en el estudio de este autor las lubinas vacunadas por baño presentaron una mayor producción de IgM en las branquias con respecto a otros órganos inmunitarios. Esto indica la importancia de las branquias en la vacunación por baño. Nakanishi y Ototake (18) ya habían postulado que la bran-

quias y la piel son los sitios de mayor captación de antígeno durante la vacunación por baño y que solo una pequeña cantidad de antígeno es transportada al bazo. Según estos autores la duración de la vacunación también tiene que ver con la cantidad de antígeno captado. En este experimento hemos decidido suministrar la vacuna por baño corto para no estresar demasiado los peces. En el trabajo de Raida et al. (19) las truchas arcoíris inmunizadas por baño también presentaron un incremento en la producción de IgM; en el trabajo de Raida y colaboradores las IgM fueron medidas con ELISA. La FC debería considerarse un método fiable para medir las IgM en peces. Hasta la fecha esta técnica ha sido utilizada por otros autores para medir la fagocitosis en macrófagos de dorada frente algunas bacterias tipo *V. anguillarum* (8), frente levaduras (5) o para analizar las funciones de los leucocitos en algunas especies como salmón Atlántico (20), carpa (14), ostra plana Europea (21), ostra común (10), perca plateada y perca dorada (11).

Una buena vacuna en acuicultura debe presentar ciertas características como: Ser fácil de administrar, conferir una protección rápida y duradera y ser rentable desde el punto de vista económico. En este estudio hemos decidido vacunar por baño ya que es una práctica muy común en acuicultura frente patógenos como por ejemplo *Photobacterium* spp. La vacunación de peces en fases tempranas del desarrollo es una buena estrategia ya que la manipulación resulta sencilla (baño frente inyección intraperitoneal) y requiere menos cantidades de antígeno y de tiempo. Otra ventaja de vacunar los peces por baño es que esta vía de administración es la misma que utilizan muchos patógenos y por lo tanto genera una inmunidad mucosal específica.

En nuestro estudio el incremento de IgM apareció bastante rápido en las branquias y bazo de las doradas vacunadas sobre todo después de la segunda administración (booster). No

obstante hemos encontrados diferencias en las cinéticas de las diferentes vacunas. Es entonces necesario seguir investigando y ampliando los conocimientos sobre el sistema inmune de la dorada para poder conocer cuál es el mejor momento para revacunar. Sugerimos que la citometría de flujo es un método sensible, fiable y rápido que se puede utilizar como técnica principal o complementaria para medir IgM de dorada en branquias y bazo.

Bibliografía

- 1.- Acosta F, Ellis AE, Vivas J, Padilla D, Acosta B, Déniz S, Bravo J, Real F. (2006). Complement consumption by *Photobacterium damsela* subsp. piscicida in seabream, red porgy and seabass normal and immune serum. Effect of the capsule on the bactericidal effect. *Fish & Shellfish Immunol.* (20): 709-17.
- 2.- Arnardottir HH, Freysdottir J, Hardardottir I. (2012). Dietary fish oil decreases the proportion of classical monocytes in blood in healthy mice but increases their proportion upon induction of inflammation. *J Nutr. Apr;* 142(4): 803-8.
- 3.- Bastardo A, Ravelo C, Castro N, Calheiros J, Romalde JL. (2012). Effectiveness of bivalent vaccines against *Aeromonas hydrophila* and *Lactococcus garvieae* infections in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). *Fish & Shellfish Immunol.* (32): 756-761.
- 4.- Chilmonczyk S and Monge D. (1999). Flow cytometry as a tool for assessment of the fish cellular immune response to pathogens. *Fish & Shellfish Immunol.* (9): 319-333
- 5.- Cuesta A, Rodríguez A, Salinas I, Meseguer J, Esteban MA. (2007). Early local and systemic innate immune responses in the teleost gilthead seabream after intraperitoneal injection of whole yeast

- cells. *Fish & Shellfish Immunol.* (22): 242-251.
- 6.- Dipangka S and Dibyendu K. (2012). Immune responses and protection in catla (*Catla catla*) vaccinated against epizootic ulcerative syndrome. *Fish & Shellfish Immunol.* (32): 353-359.
- 7.- Dos Santos NMS, Taverne-Thiele JJ, Barnes AC, Ellis AE y Rombout JHWM. (2001). The gill is a major organ for antibody secreting cell production following direct immersion of sea bass (*Dicentrarchus labrax*L.) in a *Photobacterium damsela*e ssp. *Piscicida* bacterin: an ontogenetic study. *Fish & Shellfish Immunol.* 11(1): 65-74.
- 8.- Esteban MA, Mulero V, Muñoz J, Mesenguer J. (1998). Methodological aspects of assessing phagocytosis of *Vibrio anguillarum* by leucocytes of gilthead seabream (*Sparus aurata* L.) by flow cytometry and electron microscopy. *Cell tissue Res.* (293): 133-41.
- 9.- Fraser T, Rønneseth A, Gyri T, Haugland, Fjellidal P, Mayer I, Wergeland H. (2012). The effect of triploidy and vaccination on neutrophils and B-cells in the peripheral blood and head kidney of 0+ and 1+ Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) post-smolts. *Fish & Shellfish Immunol.* (33): 60-66.
- 10.-Goedken M and De Guise S. (2004). Flow cytometry as a tool to quantify oyster defence mechanisms. *Fish & Shellfish Immunol.* (16): 539-52.
- 11.-Hardford AJ, O'Halloran K, Wright P FA. (2006). Flow cytometry analysis and optimization for measuring phagocytosis in three Australian freshwater fish. *Fish & Shellfish Immunol.* (20): 562-573.
- 12.-Hossain MM, Kawai K, Oshima S. (2011) Immunogenicity of pressure inactivated *Edwardsiella tarda* bacterin to *Anguilla japonica* (Japanese eel). *Pak J Biol Sci.* Aug 1; 14(15):755-67.
- 13.-Kishida M, Baker BI, Eberle AN. (1989). The measurement of melanin-concentrating hormone in trout blood. *Gen Comp Endocrinol.* May; 74(2):221-9.
- 14.-Koumans-van Diepen JCE, van de Lisdonk MHM, Taverne-Thiele AJ. (1994). Characterisation of immunoglobulin-binding leucocytes in carp (*Cyprinus carpio* L) *Dev Comp Immunol.* (18): 45-46.
- 15.-López-Dóriga MV, Barnes AC, dos Santos NM, Ellis AE. (2000). Invasion of fish epithelial cells by *Photobacterium damsela*e subsp. *piscicida*: evidence for receptor specificity, and effect of capsule and serum. *Microbiology.* 146 (Pt 1):21-30.
- 16.-Morrison and Nowak. (2002). The antibody response of teleost fish. *Seminars in Avian and Exotic pet Medicine.* Vol 11, 1 46-54.
- 17.-Mulero I, Sepulcre MP, Fuentes I, García-Alcázar A, Meseguer J, García-Ayala A, Mulero V. (2008). Vaccination of larvae of the bony fish gilthead seabream reveals a lack of correlation between lymphocyte development and adaptive immunocompetence. *Mo Immunol.* 45(10): 2981-9.
- 18.-Nakanishi T and Ototake M. (1997). Antigen uptake and immune responses after immersion vaccination. *Dev Biol Stand.* (90): 59-68.
- 19.-Raida M, Nyle J, Holten-Andersen L, Buchmann K. (2011). Association between Plasma Antibody Response and Protection in Rainbow Trout *Oncorhynchus mykiss* Immersion Vaccinated against *Yersinia ruckeri*. *PLoS One.* 6(6):e18832.
- 20.-Petterson E.F, Bjercknes R, Wergeland HI. (2000), Studies of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) blood, spleen and head kidney leucocytes using specific monoclonal antibodies, immunohistochemistry and flow cytometry. *Fish & Shellfish Immunol.* (10): 695-710.
- 21.-Renault T, Xue QG, Chilmoczyk S. (2001). Flow cytometric analysis of European flat oyster, *Ostrea edulis*, haemocytes using a monoclonal antibody specific for granulocytes. *Fish & Shellfish Immunol.* (11): 269-74.
- 22.-Romstad A, Reitan L, Midtlyng P, Gravningen K, Evensen Ø. (2012) Development of an antibody ELISA for potency testing of furunculosis (*Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida*) vaccines in Atlantic salmon (*Salmo salar* L) 40 (1):67-71
- 23.-Sanmartin ML, Paramá A, Castro R, Cabaleiro S, Leiro J, Lamas J y Barja JL. (2008). Vaccination of turbot; *Psetta maxima*, against the protozoan parasite *Philasterides dicentrachi*: effects on antibody production and protection. *Journal of Fish Disease.* 31, 135-140.
- 24.-Shelley L, Ross P, Kennedy CJ. (2012). The effects of an in vitro exposure to 17β-estradiol and nonylphenol on rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) peripheral blood leukocytes. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology.* Volume 155, 3,440-446
- 25.-Siwicki AK and Dunier M. (1993). Quantification of antibody secreting cells to *Yersinia ruckeri* by ELISPOT assay after in vivo and in vitro immunization of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Vet Immunol Immunopathol.* 37(1):73-80.
- 26.-Stewart CC and Stewart SJ. (1997). *Current Protocols in Cytometry.* 6.2.1-6.2.18.