

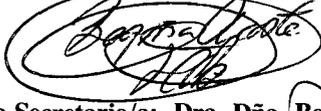
15/2003-04  
UNIVERSIDAD DE LAS PALMAS DE GRAN CANARIA  
UNIDAD DE TERCER CICLO Y POSTGRADO

Reunido el día de la fecha, el Tribunal nombrado por el Excmo. Sr. Rector Magfco. de esta Universidad, el/a aspirante expuso esta TESIS DOCTORAL.

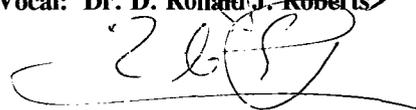
Terminada la lectura y contestadas por el/a Doctorando/a las objeciones formuladas por los señores miembros del Tribunal, éste calificó dicho trabajo con la nota de SOBRESALIENTE CUM LAUDE

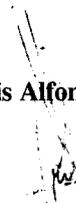
Las Palmas de Gran Canaria, a 25 de noviembre de 2003.

  
El/la Presidente/a: Dr. D. Luis León Vizcaino

  
El/la Secretario/a: Dra. Dña. Begoña Acosta Hernández

  
El/la Vocal: Dr. D. Ronald J. Roberts

  
El/la Vocal: Dr. D. Zoilo González Lama

  
El/la Vocal: Dr. D. Luis Alfonso Rodríguez López

  
El/la Doctorando/a: D. Daniel Fermín Padilla Castillo

BIBLIOTECA UNIVERSITARIA  
LAS PALMAS DE G. CANARIA  
N.º Documento 244/626  
N.º Copia 44318



**UNIVERSIDAD DE LAS PALMAS DE GRAN CANARIA**

**FACULTAD DE VETERINARIA**

**DEPARTAMENTO DE MORFOLOGÍA**

**TESIS DOCTORAL**

**FACTORES DE VIRULENCIA Y PATOGENICIDAD DE  
*HAFNIA ALVEI* EN LA ACUICULTURA CON ESPECIAL  
APLICACIÓN A LA DORADA (*SPARUS AURATA*, L.)**

**Daniel Fermín Padilla Castillo  
Las Palmas de Gran Canaria, 2003**



UNIVERSIDAD DE LAS PALMAS DE GRAN CANARIA  
DEPARTAMENTO DE MORFOLOGÍA

D<sup>a</sup> ENCARNACIÓN CASTELLANO SANTANA, SECRETARIA DEL  
DEPARTAMENTO DE MORFOLOGÍA DE LA UNIVERSIDAD DE LAS  
PALMAS DE GRAN CANARIA,

CERTIFICA,

Que el Consejo de Doctores del Departamento en su sesión de fecha 2 de septiembre de 2003 tomó el acuerdo de dar el consentimiento para su tramitación, a la tesis doctoral titulada **“FACTORES DE VIRULENCIA Y PATOGENICIDAD DE HAFNIA ALVEI EN LA ACUICULTURA CON ESPECIAL APLICACIÓN A LA DORADA (SPARUS AURATA, L.)”** presentada por el doctorando D. Daniel Padilla Castillo y dirigida por el Doctor D. Fernando Real Valcárcel

Y para que así conste, y a efectos de lo previsto en el Artº 73.2 del Reglamento de Estudios de Doctorado de esta Universidad, firmo la presente en Las Palmas de Gran Canaria, a 2 septiembre de dos mil tres.

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Encarnación Castellano Santana', written over a horizontal line.



**UNIVERSIDAD DE LAS PALMAS DE GRAN CANARIA**

**FACULTAD DE VETERINARIA**

**DEPARTAMENTO DE MORFOLOGÍA**

**PROGRAMA DE DOCTORADO “SANIDAD Y PATOLOGÍA ANIMAL”**

Tesis Doctoral presentada por **D. Daniel Fermín Padilla Castillo**

Dirigida por el **Dr. D. Fernando Real Valcárcel**

Codirigida por el **Dr. D. Félix Acosta Arbelo**

El Director

A blue ink signature of Fernando Real Valcárcel, written in a cursive style.

Fernando Real Valcárcel

El Codirector

A blue ink signature of Félix Acosta Arbelo, written in a cursive style.

Félix Acosta Arbelo

El Doctorando

A blue ink signature of Daniel Padilla Castillo, written in a cursive style.

Daniel Padilla Castillo

Las Palmas de Gran Canaria a 15 de septiembre de 2003

FERNANDO REAL VALCÁRCEL, CATEDRÁTICO DE UNIVERSIDAD EN EL DEPARTAMENTO DE PATOLOGÍA ANIMAL, PRODUCCIÓN ANIMAL, BROMATOLOGÍA y TECNOLOGÍA DE LOS ALIMENTOS DE LA FACULTAD DE VETERINARIA DE LA UNIVERSIDAD DE LAS PALMAS DE GRAN CANARIA.

**INFORMA:**

Que D. Daniel Fermín Padilla Castillo, Licenciado en Veterinaria, ha realizado bajo mi dirección y asesoramiento el presente trabajo titulado "**Factores de virulencia y patogenicidad de *Hafnia alvei* en la acuicultura con especial aplicación a la dorada (*Sparus aurata*, L.)**", el cual considero reúne las condiciones y calidad científica para optar al grado de Doctor en Veterinaria.

Las Palmas de Gran Canaria a 15 de septiembre de 2003



**Fdo. Fernando Real Valcárcel**

FÉLIX ACOSTA ARBELO, DOCTOR EN VETERINARIA POR LA UNIVERSIDAD DE LAS PALMAS DE GRAN CANARIA Y COLABORADOR DE INVESTIGACIÓN DE LA UNIDAD DE ICTIOPATOLOGÍA DE LA FACULTAD DE VETERINARIA

INFORMA:

Que D. Daniel Fermín Padilla Castillo, Licenciado en Veterinaria, ha realizado bajo mi dirección y asesoramiento el presente trabajo titulado "**Factores de virulencia y patogenicidad de *Hafnia alvei* en la acuicultura con especial aplicación a la dorada (*Sparus aurata*, L.)**", el cual considero reúne las condiciones y calidad científica para optar al grado de Doctor en Veterinaria.

Las Palmas de Gran Canaria a 15 de septiembre de 2003

A handwritten signature in black ink, consisting of a large, stylized initial 'F' followed by a horizontal line extending to the right.

Fdo. Félix Acosta Arbelo

***A mis padres y hermanos***

***A Eli, que le prometí mi vida  
a cambio de una sonrisa.***

# Índice

---

<b>1.- INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>1</b>
<b>2.- REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....</b>	<b>5</b>
<b>2.1.-MICROBIOLOGÍA DE HAFNIA ALVEI.....</b>	<b>5</b>
<b>2.2.-CARACTERÍSTICAS DE LA INFECCIÓN O LA ENFERMEDAD PRODUCIDA POR HAFNIA ALVEI.....</b>	<b>9</b>
<b>2.2.1.- En ictiopatología .....</b>	<b>9</b>
<b>2.2.2.- En otras especies animales.....</b>	<b>14</b>
<b>2.2.3.- En humanos.....</b>	<b>18</b>
<b>2.3.-LA INFECCIÓN EXPERIMENTAL EN ACUICULTURA: APLICACIONES.....</b>	<b>20</b>
<b>2.4.-MECANISMOS DE VIRULENCIA DE BACTERIAS GRAM NEGATIVAS.....</b>	<b>27</b>
<b>2.4.1.- Factores de adherencia.....</b>	<b>27</b>
2.4.1.1.- Gen <i>eae</i> .....	27
2.4.1.2.- Fimbrias.....	29
2.4.1.2.1.-Caracteres generales.....	29
2.4.1.2.2.-Relación de las fimbrias con la patogenicidad.....	32
<b>2.4.2.- Resistencia al suero.....</b>	<b>35</b>
<b>2.4.3.-Hemólisis.....</b>	<b>40</b>
<b>2.4.4.-Producción de sideróforos.....</b>	<b>42</b>
<b>2.5.-EVALUACIÓN DE LA INMUNOHISTOQUÍMICA PARA DETECTAR INFECCIONES BACTERIANAS EN LOS TEJIDOS ANIMALES.....</b>	<b>46</b>
<b>2.5.1.- Aplicaciones frente a la infección por <i>Hafnia alvei</i>.....</b>	<b>49</b>

<b>3.- MATERIAL Y MÉTODOS.....</b>	<b>51</b>
<b>3.1.- MÉTODOS MICROBIOLÓGICOS GENERALES.....</b>	<b>51</b>
3.1.1.- Cepas utilizadas en este estudio.....	51
3.1.2.- Mantenimiento y conservación de las cepas.....	51
3.1.3.- Pruebas de identificación de las cepas.....	53
<b>3.2.-ANÁLISIS DE LOS FACTORES DE VIRULENCIA DE LAS CEPAS DE <i>HAFNIA ALVEI</i>.....</b>	<b>55</b>
3.2.1.-Detección del gen <i>eae</i> mediante el método de PCR.....	55
3.2.2.- Utilización del hierro por <i>Hafnia alvei</i> .....	58
3.2.2.1.-Concentración mínima inhibitoria de 2,2'-dipyridyl.....	58
3.2.2.2.- Producción de sideróforos.....	58
3.2.3.- Producción de hemólisis.....	61
3.2.4.- Detección de fimbrias.....	62
3.2.5.- Efecto bactericida del suero.....	64
<b>3.3.- PATOGENICIDAD DE <i>HAFNIA ALVEI</i> EN DORADA...</b>	<b>66</b>
3.3.1.- Animales sometidos a estudio.....	66
3.3.2.- Determinación de la Dosis Letal 50 (DL <sub>50</sub> ).....	66
3.3.3.- Inoculación de <i>Hafnia alvei</i> para inducir una infección crónica.....	69
3.3.4.- Estudio anatomopatológico.....	71
3.3.5.- Estudio inmunohistoquímico.....	71
3.3.6.- Estudio microbiológico.....	75

<b>4.- RESULTADOS.....</b>	<b>76</b>
<b>4.1.- MEDICIÓN DE LA VIRULENCIA DE LAS CEPAS DE HAFNIA ALVEI.....</b>	<b>76</b>
<b>4.1.1.- Presencia del gen <i>eae</i> en las cepas de estudio....</b>	<b>76</b>
<b>4.1.2.- Utilización del hierro por <i>Hafnia alvei</i>.....</b>	<b>78</b>
4.1.2.1.-Cálculo de la concentración mínima inhibitoria del quelante de hierro 2,2'-dipyridyl.....	78
4.1.2.2.- Producción de sideróforos.....	81
<b>4.1.3.- Producción de hemólisis.....</b>	<b>82</b>
<b>4.1.4.- Hemaglutinación frente a eritrocitos de cobaya, dorada y trucha arcoiris.....</b>	<b>83</b>
<b>4.1.5.- Efecto bactericida del suero de dorada.....</b>	<b>86</b>
<b>4.1.6.- Efecto bactericida del suero de trucha arcoiris..</b>	<b>96</b>
<b>4.2.- EVALUACIÓN DE LA PATOGENICIDAD DE VARIAS CEPAS DE HAFNIA ALVEI EN DORADA.....</b>	<b>106</b>
<b>4.2.1.- Cálculo de las dosis letales 50.....</b>	<b>106</b>
4.2.1.1.- Resultados microbiológicos.....	107
4.2.1.2.- Resultados anatomopatológicos e inmunohistoquímicos.....	108
<b>4.2.2.- Evaluación de la infección crónica.....</b>	<b>108</b>
4.2.2.1.- Resultados microbiológicos.....	109
4.2.2.2.- Resultados anatomopatológicos e inmunohistoquímicos.....	110

<b>5.- DISCUSIÓN.....</b>	<b>128</b>
<b>5.1.- MECANISMOS DE VIRULENCIA DE <i>HAFNIA ALVEI</i></b> <b>“IN VITRO”.....</b>	<b>128</b>
<b>5.2.- COMPARACIÓN DE LA PATOGENICIDAD DE <i>HAFNIA</i></b> <b><i>ALVEI</i> EN LA ACUICULTURA MARINA Y</b> <b>CONTINENTAL.....</b>	<b>136</b>
<b>5.3.- RELACIÓN ENTRE LOS NIVELES DE VIRULENCIA</b> <b>MEDIDOS Y LOS VALORES DE PATOGENICIDAD DE</b> <b><i>HAFNIA ALVEI</i>.....</b>	<b>141</b>
<b>6.- CONCLUSIONES.....</b>	<b>146</b>
<b>7.- RESUMEN.....</b>	<b>148</b>
<b>8.- SUMMARY.....</b>	<b>150</b>
<b>9.- BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>152</b>
<b>10.- AGRADECIMIENTOS.....</b>	<b>179</b>

# *Introducción*

---

## 1.- INTRODUCCIÓN

*Hafnia alvei*, miembro de la Familia *Enterobacteriaceae*, forma parte de la microbiota gastrointestinal humana y animal, así como del medio ambiente. La bacteria ha sido descrita encontrándose de forma natural en el suelo y en el agua (ALLEN, 1982; SAKAZAKI y TAMURA, 1992). También se describe como una bacteria capaz de afectar a la calidad microbiológica de los alimentos como la leche (TEXFORD y cols., 1975; KLEEBERGER y cols., 1980), miel (SALIMOV, 1978), carne enlatada de vacuno (REFAIE y cols., 1993), o carne de porcino empaquetada (BORAH y cols., 1992).

Desde un punto de vista clínico, la bibliografía describe distintos cuadros asociados a esta especie bacteriana en varias especies animales, como mastitis en ganado vacuno (BINDE y HERMANSEN, 1982), abortos equinos (XIMENA y ORIELE, 1983; MUKHERJEE y cols., 1986), neumonía caprina (SHARMA y cols., 1991), y septicemia en gallinas ponedoras (REAL y cols., 1997). En Medicina Humana, su presencia se ha relacionado con cuadros de enteritis, septicemias e infecciones urinarias (SAKAZAKI y TAMURA, 1992; KRIEG y SNEATH, 1994).

En la acuicultura, existen algunas descripciones que detallan su presencia en el agua de empresas que desarrollan una actividad en acuicultura continental (ALLEN, 1982; ALLEN y cols., 1983) y cuadros clínicos como septicemia hemorrágica en trucha arcoiris (*Oncorhynchus mykiss*) (GELEV y cols., 1990), provocando patología renal en salmón dorado (*Oncorhynchus masou*) infectados

## Introducción

experimentalmente (TESHIMA y cols., 1992), septicemia hemorrágica en trucha común (*Salmo trutta*, L.) infectadas experimentalmente (RODRÍGUEZ y cols., 1998) y septicemias, ascitis y hemorragias hepáticas en pez gato (*Ictalurus punctatus*) (GOODWIN y KILLIAN, 1998).

Es de destacar la flexibilidad que muestra este patógeno en cuanto a los factores que afectan a su crecimiento y supervivencia: su temperatura máxima de crecimiento oscila entre 40 y 42°C, y no crecen por debajo de los 5°C, y es resistente a los agentes externos, muy poco exigente en sus necesidades nutritivas, así como capaz de crecer y desarrollarse en medios mínimos (PUMAROLA, 1993).

Factores como la temperatura y salinidad determinan en gran medida la supervivencia en el medio de las bacterias patógenas de peces (TORANZO y cols., 1982; WAKABAYASHI, 1991; FERNÁNDEZ y cols., 1992; SOLTANI y BURKE, 1994; SAKAI y cols., 1994; GUÉRIN-FAUBIÉEE y cols., 1995; LÓPEZ y ANGULO, 1995). *Hafnia alvei* es capaz de sobrevivir en agua por un periodo superior a los 3 meses, independientemente del grado de salinidad de la misma, alcanzando un mayor tiempo de supervivencia a 10°C que a 22°C (datos sin publicar).

En sanidad animal en general, y más concretamente en referencia con la ictiopatología, se conoce bastante poco sobre los mecanismos de virulencia y patogenicidad en relación con el desarrollo de la infección y/o enfermedad en especies tanto continentales como marinas producidas por este patógeno. Aunque es de presumir que

comparta muchos aspectos comunes con aquellos ya descritos para otras enterobacterias.

Por otro lado, es conocido que *Hafnia alvei* está presente de forma natural en el medio ambiente canario, y se ha relacionado, ocasionalmente, con la aparición de cuadros clínico-patológicos en otras especies animales distintas de los peces (REAL y cols., 1997). Aunque nunca se ha detectado en especies marinas de esta o de otras regiones del mundo, si bien, la proximidad de los tanques y jaulas de cría de la dorada a zonas donde se desarrollan diversas actividades humanas como baño, turismo, red de alcantarillado, etc, hace posible el contacto entre dicho agente patógeno y los peces. Además, en los últimos años, uno de los temas preponderantes de nuestro grupo de trabajo ha sido el estudio de diversos aspectos relacionados con la infección producida por *Hafnia alvei* (REAL y cols., 1997; RODRÍGUEZ y cols., 1998; RODRÍGUEZ y cols., 1999; ACOSTA y cols., 2002), por lo que parece lógico que centrásemos la finalidad de este estudio en conocer más de cerca los efectos de la infección por este patógeno en la acuicultura, con especial relevancia en la acuicultura marina.

Conocer si la dorada (*Sparus aurata*, L.) es una especie susceptible de enfermar tras su infección experimental con *Hafnia alvei* y profundizar en el conocimiento de los factores de virulencia y su relación con la patogenicidad de esta bacteria para la dorada, constituyen la finalidad básica de este trabajo.

## Introducción

---

Por todo lo expuesto, en el desarrollo del presente estudio nos hemos planteado los siguientes objetivos:

- 1.- Estudiar qué factores de virulencia posee *Hafnia alvei* con aplicación a especies de acuicultura continental (trucha arcoiris, *Oncorhynchus mykiss*) y marina (dorada, *Sparus aurata*, L.).
- 2.- Relacionar los factores de virulencia estudiados con el grado de patogenicidad mostrado por distintas cepas de *Hafnia alvei* en dorada (*Sparus aurata*, L.).
- 3.- Determinar la patogenicidad de *Hafnia alvei* en dorada (*Sparus aurata*, L.) en el curso de una infección aguda mediante experiencias de DL<sub>50</sub>.
- 4.- Verificar la patogenicidad de *Hafnia alvei* en dorada (*Sparus aurata*, L.) en el curso de una infección crónica, realizando el seguimiento mediante análisis microbiológico, anatomopatológico e inmunohistoquímico.
- 5.- Dilucidar, en su caso, el papel de esta especie (dorada) como portadora de la infección en el hábitat en el que se desenvuelve para la acuicultura.

# *Revisión Bibliográfica*

---

## 2.- REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

### 2.1- MICROBIOLOGÍA DE *HAFNIA ALVEI*

El Género *Hafnia* esta encuadrado dentro de la Familia *Enterobacteriaceae*. Este Género consta de una única especie, *Hafnia alvei*.

La actual nomenclatura de *Hafnia alvei* fue propuesta por MØLLER en 1954 (MØLLER, 1954, cit. SAKAZAKI y TAMURA, 1992), ya que hasta entonces se le denominaba *Enterobacter alvei*, así como *Enterobacter hafniae* o *Enterobacter aerogenes* subsp. *hafniae*. Estudios de taxonomía numérica demostraron que *Hafnia alvei* está lo suficientemente alejada del Género *Enterobacter* como para pertenecer a otro Género. Estos resultados quedan confirmados por modelos de hibridación ADN-ADN que confirman una homología inferior al 27% entre *Hafnia alvei* y *Enterobacter* spp. La hibridación también revela la existencia de 2 genoespecies dentro del taxón *Hafnia alvei*, pero al ser imposible la diferenciación fenotípica, estas dos genoespecies se agrupan bajo la denominación de *Hafnia alvei* (SAKAZAKI, 1984).

En extensiones teñidas por el método de GRAM se presenta como un bacilo gram negativo, de 1.0 µm de diámetro y de 2.0 a 5.0 µm de largo, no capsulado (MØLLER, 1954, cit. SAKAZAKI y TAMURA, 1992).

Presenta todas las características de *Enterobacteriaceae* spp. Cierta actividad bioquímica, metabólica y enzimática está íntimamente relacionada con la temperatura de incubación, siendo más intensa a 22°C que a 37°C. C. RICHARD y JM. ALONSO (1976) describen a *Hafnia*

### Revisión bibliográfica

*alvei* como una enterobacteria móvil por flagelos peritricos a temperaturas de 22°C, pero esta movilidad se ve anulada cuando la cultivamos a 35°C. La temperatura máxima de crecimiento oscila entre 40 y 42°C, y no crecen por debajo de los 5°C. Es anaerobia facultativa y presenta tanto metabolismo respiratorio como fermentativo (MØLLER, 1954, cit. SAKAZAKI y TAMURA, 1992).

No existen medios específicos para su aislamiento. Normalmente se utilizan medios no selectivos o poco selectivos que son usados de forma rutinaria para el aislamiento de enterobacterias (MØLLER, 1954, cit. SAKAZAKI y TAMURA, 1992). En este grupo destacamos el agar Mac Conkey, el Xilosa-Lisina-desoxicolato (XLD) y el medio Infusión Cerebro Corazón (BHI). También se usa en laboratorios clínicos el medio Agar Hektoen Entérico, inicialmente diseñado para el aislamiento selectivo de salmonelas.

En medios poco selectivos como el agar *Salmonella-Shigella* (SS) no se consigue el crecimiento en uno de cada 4 intentos de cultivo de *Hafnia alvei*. En agar Sulfato-Bismuto tampoco crece (MØLLER, 1954, cit. SAKAZAKI y TAMURA, 1992).

En Agar Nutritivo esta bacteria crece muy bien presentando unas colonias mayores de su tamaño habitual, midiendo de 2 a 3 µm de diámetro.

No existen medios de enriquecimiento para el crecimiento de *Hafnia alvei*. Algunas cepas crecen en medios como el Caldo Selenito y el

Caldo de Tetrathionato, usados habitualmente para el enriquecimiento de *Salmonella* spp. (MØLLER, 1954, cit. SAKAZAKI y TAMURA, 1992).

R. SAKAZAKI y K. TAMURA (1992) usaron agar Mac Conkey adicionado con un 1% de sorbitol para diferenciar *Hafnia alvei* de otras bacterias intestinales como *Escherichia coli*, *Klebsiella*, *Enterobacter* y *Serratia* spp., las cuales fermentan el sorbitol dando colonias rosas o rojas, cosa que no ocurre en el caso de *Hafnia alvei*.

Además, el Género *Hafnia* se caracteriza por ser bacterias oxidasa negativas y catalasa positivas. Según JJ. FARMER (1999) reducen los nitratos a nitritos, siendo positivas en más de un 90% las pruebas de la lisina y ornitina decarboxilasa. El crecimiento en el medio KCN también es positivo, así como la presencia de la enzima  $\beta$ -galactosidasa (ONPG). Fermenta la D-glucosa con producción de ácido y gas. Produce ácido, pero no gas a partir de L-arabinosa, glicerol, D-manitol, D-manosa, maltosa, L-ramnosa, trehalosa y xilosa (FARMER, 1999).

El acetilmetilcarbinol (VP) es producido, en más de un 98%, a partir de la glucosa entre 22 y 28°C, pero no a 35°C. Por el contrario, la prueba de rojo metilo da positiva a 35°C pero negativa a 22°C. Dan un resultado variable el uso del malonato, acetato, y la fermentación de la celobiosa y salicina (FARMER, 1999).

JJ. FARMER (1999) asegura que *Hafnia alvei* no produce ácido sulfhídrico (H<sub>2</sub>S) en el medio TSI. Más del 90% de las cepas son negativas para las pruebas de arginina dehidrolasa, producción de

### *Revisión bibliográfica*

indol y ureasa. No produce gelatinasa, lipasa ni desoxiribonucleasa. No utiliza el alginato ni produce fenilalanina desaminasa. La hidrólisis de la esculina es negativa. Es citrato de Simmons negativa. No produce ácido a partir de la fermentación del adonitol, inositol, rafinosa, sorbitol, sacarosa y lactosa. No obstante, aproximadamente un 5% de las cepas pueden acidificar la lactosa tras la incorporación de un plásmido metabólico por conjugación con *Salmonella typhi* y *Escherichia coli* (FARMER, 1999).

Existe cierta dificultad para diferenciar microbiológicamente esta bacteria de otros patógenos comunes en Medicina Veterinaria (REAL y cols., 1997; RODRÍGUEZ y cols., 1998; ACOSTA y cols., 2002). Las lesiones que aparecen en el curso septicémico de la infección en muchas especies animales son muy similares a las producidas por *Salmonella* spp. Según C. RIDELL (1987) y WR. KELLY (1993) y las infecciones causadas por *Salmonella* spp. pueden ser particularmente problemáticas en su diferenciación, debido a que las colonias de *Hafnia alvei* se confunden con las de *Salmonella* spp. en los medios rutinarios de cultivo causando confusión a la hora de determinar la identidad de ese microorganismo (SAKAZAKI y TAMURA, 1992). Según WC. EVELAN y JE. FABER (1953) y K. HARADA y cols. (1957) cultivos de *Hafnia* spp. han sido aglutinados con antígeno O de *Salmonella* spp. lo cual lleva a error en la identificación.

Además, también se han descrito ciertos problemas en su diferenciación con otros géneros como *Enterobacter* (*E. aerogenes* y *E. gergoviae*) y *Serratia* spp. (SAKAZAKI y TAMURA, 1992). A tales efectos ha demostrado ser extraordinariamente útil el sistema de identificación Microscan (Dade Microscan, Inic, Sacramento, California) (RODRÍGUEZ y

cols., 1999), así como la utilización de un bacteriófago específico de *Hafnia*, el fago 1672 (REAL y cols., 1997; RODRÍGUEZ y cols., 1998). Más del 96% de las cepas de *Hafnia alvei* son lisadas por este bacteriófago, que fue aislado por PAM. GUINEÉ y JJ. VALKENBURG en 1968 a partir de agua, utilizándose rutinariamente para la identificación de esta especie.

*Hafnia alvei* forma parte de la flora gastrointestinal de los seres humanos, siendo a su vez su hábitat habitual el suelo y el agua (ALLEN, 1982; ALLEN y cols., 1983; SAKAZAKI y TAMURA, 1992). También se ha aislado de diferentes alimentos (TEXDORF y cols., 1975; SALIMOV, 1978; REFAIE y cols., 1993; TORNAJADILLO y cols., 1993), siendo a veces el responsable del deterioro de carnes empaquetadas bajo una atmósfera pobre en oxígeno.

Recientes estudios le otorgan una gran importancia como agente patógeno oportunista, tanto en la especie humana como en varias especies animales (GÜNTHARD y PENNEKAMP, 1996; RODRÍGUEZ y cols., 1998).

## **2.2.- CARACTERÍSTICAS DE LA INFECCIÓN O LA ENFERMEDAD PRODUCIDA POR *HAFNIA ALVEI***

### **2.2.1.- EN ICTIOPATOLOGÍA**

I. GELEV y cols. (1990) aislaron en Bulgaria una bacteria de un brote epizootico produciendo septicemia hemorrágica en trucha arcoiris. Tras realizarle una serie de pruebas bioquímicas, fagotipia e hibridación

### Revisión bibliográfica

del DNA, logran identificar a la bacteria causante del brote como *Hafnia alvei*.

Las truchas afectadas presentaban oscurecimiento de la piel, exoftalmia, hemorragias oculares y petequias cutáneas. En la necropsia se observaron estas petequias en pared abdominal, hígado, bazo, riñón, músculos y vejiga natatoria.

Infecciones por *Hafnia alvei* también han sido descritas en salmón rojo (*Oncorhynchus masou*) (TESHIMA y cols., 1992) en una explotación situada en Japón. Los peces presentaban externamente oscurecimiento de la piel y abdomen distendido, no observándose la presencia de exoftalmia. Internamente se observó la presencia de unos forúnculos de color blanco-grisáceo en el riñón. Posteriormente estos mismos autores realizaron un estudio de patogenicidad para lo cual se inocularon vía intraperitoneal cinco lotes de salmón rojo: uno testigo, un segundo de 40 peces de unos 15 g de peso que se inoculó una sola vez, un tercer grupo de 30 peces que se inoculó dos veces con una separación de dos semanas entre ambas inoculaciones, y un cuarto grupo de 30 peces que se inoculó tres veces con una separación de cuatro días, entre cada una de las inoculaciones. Además de estos cuatro grupos se inoculó un grupo de peces juveniles de un peso de unos 60 g vía intraperitoneal con un cultivo puro de *Hafnia alvei* en cuatro ocasiones a intervalos de cuatro días. Los riñones de todos los peces fueron examinados para determinar la presencia o no de lesiones después de dos semanas a un mes de haber comenzado a mostrar síntomas clínicos. Este protocolo es el único que existe en la bibliografía para estudiar las consecuencias de este patógeno a medio plazo.

Los peces testigo no mostraron ningún signo de enfermedad. Un 40% de los peces del grupo segundo mostraron signos a los 3 meses de la inoculación mientras los peces del tercer grupo mostraron signos de enfermedad a los 32 días de la primera inoculación, y los signos fueron evidentes en un 41% de los peces después de los 57 días. Los peces del cuarto grupo comenzaron a mostrar alguna evidencia a partir del día 12 de la primera inoculación, y en un 36% de ellos los signos fueron evidentes después de 26 días. En los peces juveniles inoculados la incidencia fue de un 15% después de los 41 días de la primera inoculación.

Los signos que mostraron los peces externamente fueron oscurecimiento de la superficie corporal, abdomen hinchado y natación errática. No presentaban exoftalmia. Internamente aparecían diferentes focos blanco-grisáceos prominentes en la cara ventral del riñón.

Las lesiones anatomopatológicas encontradas sólo hacen referencia al riñón, y se pueden dividir en tres tipos diferentes: tipo I, tipo II y tipo III, en concordancia con el grado de severidad o progresión de la enfermedad.

Las lesiones tipo I corresponden al estadio más precoz de la enfermedad, caracterizándose por la aparición de focos celulares anormales con zonas de mitosis (células de proliferación), con un predominio de neutrófilos sobre los macrófagos. En estas lesiones, se observan pocas o ninguna bacteria, así como tampoco se observan células necróticas en el riñón. Se aprecia degeneración de melanocitos,

### *Revisión bibliográfica*

---

cuyos restos celulares son frecuentemente fagocitados por macrófagos. Con la tinción de azul de toluidina se ponen de manifiesto los linfocitos, estando en un número relativamente limitado.

Las lesiones tipo II presentan multitud de tipos de células renales con el núcleo foliado. Muchas de estas células presentan una tipología diferente, ya sea en forma o tamaño. Se encuentran restos celulares en mayor cuantía en los espacios intercelulares, y pocas o ninguna zona de mitosis. Las bacterias se encontraron aisladas en pequeño número o en grupos, pero su número difería considerablemente entre las áreas internas de las lesiones. Los leucocitos y los macrófagos exhibían una gran variabilidad en tamaño y proporción de inclusiones citoplasmáticas, presentando los leucocitos un marcado aumento en el número de gránulos específicos y de lisosomas primarios los macrófagos. En los límites de las lesiones se observan bacterias y gránulos de melanina fagocitados por neutrófilos y macrófagos, siendo estas células mucho más numerosas que otros tipos de células como los eritroblastos, linfocitos, reticulocitos, fibroblastos y melanocitos, existiendo un mayor predominio de los neutrófilos. Los melanocitos y unos pocos eritroblastos muestran signos morfológicos de degeneración, pero estos signos no aparecen en los neutrófilos ni en los macrófagos. En las lesiones también se pueden observar células gigantes multinucleadas, presentando en ocasiones su membrana plasmática con soluciones de continuidad.

Las lesiones tipo III son histopatológicamente las más avanzadas, conteniendo gran cantidad de restos celulares en forma de un material amorfo y finamente granular localizado entre células como neutrófilos,

macrófagos, reticulocitos y células con un núcleo picnótico, que aparentemente son eritroblastos. En las lesiones necróticas, en donde los restos celulares y demás células están en un número reducido, se encuentran un gran número de bacterias y material amorfo.

LA. RODRÍGUEZ y cols. (1998) determinaron las dosis letales 50 de siete cepas de *Hafnia alvei* de distinta procedencia mediante inoculaciones intraperitoneales experimentales en trucha común (*Salmo trutta*, L.), y encontraron diferencias en el grado de virulencia de las cepas estudiadas, las cuales estuvieron comprendidas entre  $1.3 \times 10^4$  y  $2.5 \times 10^7$  ufc/pez. En este trabajo resultó evidente la susceptibilidad de la trucha común a enfermar en el curso de una infección por dicho patógeno, que hasta entonces no se había descrito. Los peces inoculados mostraron signos de septicemia hemorrágica, con natación errática, oscurecimiento de la piel y abdomen distendido. La mortalidad comenzó a las 24 horas postinfección, y se mantuvo hasta once días postinoculación. Cultivos puros de *Hafnia alvei* se aislaron de órganos internos de todos los peces moribundos, muertos y supervivientes, indicando la posibilidad de que estos peces jueguen algún papel como portadores.

*Hafnia alvei* también ha sido descrita en el pez gato (*Ictalurus punctatus*) (GOODWIN y KILLIAN, 1998), siendo considerado un patógeno emergente. Se describen diversos brotes de enfermedad a lo largo de un periodo de dos años en granjas de cría con una temperatura cercana a los 15°C. Las lesiones externas encontradas fueron inflamación alrededor de los ojos, exoftalmia bilateral y zonas inflamadas con petequias en la región craneal. Internamente, las

### Revisión bibliográfica

lesiones incluían ascitis y petequias hemorrágicas en el hígado. Los peces con esta sintomatología morían alrededor de los 30 días, y las pérdidas en las explotaciones se consideraron desde elevadas a moderadas.

Las infecciones experimentales que se realizaron en pez gato con *Hafnia alvei* para valorar la patogenicidad de esta bacteria, e intentar reproducir la sintomatología observada en las infecciones naturales, se hicieron con pez gato inoculados vía intraperitoneal a una dosis de  $10^6$  y  $10^7$  unidades formadoras de colonia por pez, y por inmersión con una dosis de  $10^6$  y  $10^7$  células por ml, a una temperatura de 15 a 20°C. Las dosis más altas de las utilizadas ( $10^7$ ) resultaron letales entre las 24 y 48 horas postinfección, utilizando tanto la vía intraperitoneal como la inmersión, pero no produjeron las lesiones características observadas en la infección natural, en donde las lesiones craneales observadas eran muy similares a las producidas por la infección con *E. ictaluri*, y probablemente representan una forma crónica de la infección por *Hafnia alvei* (GOODWIN y KILLIAN, 1998).

### **2.2.2.- EN OTRAS ESPECIES ANIMALES**

*Hafnia alvei* ha sido descrita durante los últimos años en numerosas ocasiones asociada a diferentes cuadros de enfermedad, afectando a distintas especies animales como son:

## **Aves**

F. REAL y cols. (1997) describieron el primer caso de una septicemia originada en gallinas ponedoras por *Hafnia alvei*, con un curso muy similar al que origina en esta especie *Salmonella* spp., provocando una importante bajada en la puesta, pérdida de apetito, opistótonos y muerte. Las lesiones microscópicas halladas fueron una hepatitis necrótica multifocal e intensa esplenitis.

## **Équidos**

*Hafnia alvei* ha sido aislada en varias ocasiones asociada a abortos en équidos (KUME, 1962, cit. SAKAZAKI Y TAMURA, 1992). De esta forma se ha descrito un caso de aborto equino en el cual *Hafnia alvei* fue aislada en cultivo puro del feto y de la placenta. También se produjo un alto título de anticuerpos aglutinantes en la yegua convaleciente.

MV. XIMENA y TM. ORIELE (1983) describieron el caso de una yegua que abortó de forma espontánea al 8º mes de gestación. Al realizar la necropsia del feto su aspecto era normal y el examen macroscópico de sus vísceras sólo reveló en el hígado una pequeña zona blanquecina de unos 5 mm en su cara parietal. El examen de la placenta fue totalmente normal. Tanto del feto como de la placenta se logró aislar en cultivo puro *Hafnia alvei*, por lo que se la consideró la responsable del aborto. Además en la yegua se encontraron gran cantidad de anticuerpos aglutinantes frente a *Hafnia alvei*.

Igualmente, SR. MUKHERJEE y cols. (1986) citaron el caso de una yegua que abortó a los 122 días de gestación. El animal presentó

### Revisión bibliográfica

descarga vaginal durante 13 días y luego abortó. La única bacteria que se aisló e identificó de sangre extraída del corazón, líquido amniótico y contenido estomacal del feto fue *Hafnia alvei*.

En este último caso se realizó un ensayo de patogenicidad, usando cuatro ratones, inoculando dos ratones vía intraperitoneal con 0.5 ml de un cultivo en caldo de peptona de la bacteria aislada, y otros dos como controles. Todos los ratones fueron sacrificados a los tres días postinoculación, y su necropsia no reveló daños macroscópicos aparentes. La bacteriología de sangre extraída de corazón, bazo, hígado, riñón y pulmón no reveló la presencia de bacterias en estos órganos, pero sí el posterior cultivo que permitió el aislamiento e identificación de *Hafnia alvei*.

### **Rumiantes**

M. BINDE y O. HERMANSEN (1982) realizaron un estudio en vacas afectadas con mamitis y encontraron que además de los agentes comunes en las mamitis, se aísla un 25% de *Bacillus subtilis* y un 25% de *Hafnia alvei* asociados a mamitis de tipo crónico.

También, BC. JANSEN y M. HAYES (1983) describieron un cuadro de retraso en el crecimiento de la lana de la oveja de raza Merino debida a una infección bacteriana de la dermis por diversas especies del Género *Enterobacter* y por *Hafnia alvei*, que provocaban un cuadro de hiperemia e infiltración celular en la dermis que retrasaba el crecimiento de la lana.

RK. SHARMA y cols. (1991) hicieron un estudio sobre un colectivo de cabras afectadas de neumonía en diferentes grados, y realizaron

cultivos bacterianos de muestras de pulmón de animales sacrificados, obteniendo que *Hafnia alvei* suponía un 9.83% del total de especies bacterianas aisladas de dichas muestras.

### **Abejas**

Es una de las especies de las que más se aísla esta bacteria relacionada con casos de enfermedad y muerte.

Z. GLINSKI y cols. (1994) citan a *Hafnia alvei* como agente secundario de una infección septicémica en abejas. *Hafnia alvei* fue aislada del contenido intestinal, de los tejidos de las abejas afectadas, así como de la miel de la colmena.

L. KAUKO y Z. GLINSKI (1994) aislaron *Hafnia alvei* del tracto digestivo y tejidos de abejas. Realizaron un ensayo de patogenicidad inoculando un cultivo de *Hafnia alvei* a abejas sanas mediante inyección en el tórax provocando un cuadro septicémico con una mortalidad del 90%, y reaislando posteriormente *Hafnia alvei* en cultivo puro de los tejidos de las abejas muertas.

Z. GLINSKI y cols. (1995) describieron un caso de mortalidad en abejas. Realizaron cultivos bacterianos de varios de sus tejidos e intestinos, así como de miel de la colmena, identificando a *Hafnia alvei* como agente primario en la infección septicémica en esta especie, después de eliminar mediante estudios diferenciales otras enfermedades como infecciones virales, envenenamiento por pesticidas, infestación por *Malpighamoeba mellificae* o *Acarapis woodi*.

### 2.2.3.- EN HUMANOS

En 1957, K. HARADA y colaboradores describen un aislamiento de *H. alvei* asociado a cuadros de vómitos y diarrea, tanto en niños como adultos. Años más tarde, R. SAKASAKI (1961) describe a *H. alvei* como un potencial patógeno intestinal tras unos estudios de toxicidad realizados en conejos.

En 1991, M.J. ALBERT y colaboradores del Centro Internacional para la Investigación de la Enfermedad Diarreica, Bangladesh (ICDDR), aislaron una cepa de *Hafnia alvei* (designada *H. alvei* 19982) en cultivo puro de un caso clínico de un niño de 9 meses, con una sintomatología de vómitos, deshidratación, fiebre, distensión abdominal y diarrea con una duración de 72 horas. Se demostró que esta bacteria estaba dotada de capacidad enteropatógena en 8 de los 12 conejos inoculados experimentalmente, siendo capaz de adherirse al epitelio intestinal, causando pérdida de las vellosidades del íleon y produciendo lesiones en la mucosa, las cuales se interpretan como lesiones con “fijación y ocultación” de la bacteria (lesiones AE, del inglés “*attaching and effacing*”).

Posteriores estudios de los mismos investigadores del ICDDR identificaron otras 6 cepas de *H. alvei* con características similares (ALBERT y cols., 1992).

Al igual que los *E. coli* enteropatógenos, estas 7 cepas de *H. alvei* dieron resultados positivos a la tinción fluorescente de la actina y

a la presencia del gen *eae*, un gen involucrado directamente en la capacidad de producir las lesiones AE.

Sobre la base de estas investigaciones, diferentes casos clínicos relacionados con *H. alvei* fueron estudiados, describiéndola como un patógeno entérico (RATNAM, 1991 ; WESTBLOM y MILLIGAN, 1992; REINA y cols., 1993; RIDELL y cols., 1994), no pudiéndose confirmar la presencia del gen *eae*. En 1999, JM. JANDA y colaboradores analizaron 5 de las cepas aisladas por M.J. ALBERT en el ICDDR, y sus resultados sugieren que estas cepas son biotipos atípicos de *Escherichia coli* o por el contrario representan una nueva especie dentro del Género *Escherichia*, si bien, no está del todo claro y hoy en día se continúa la investigación, no estando descartado que pueda tratarse realmente de *H. alvei*. Lo que si está del todo demostrado es la relación epidemiológica entre cepas de *H. alvei* negativas a la presencia del gen *eae* y los casos clínicos con sintomatología de vómitos, diarrea y deshidratación.

Su aislamiento en tejidos diferentes al intestino es relativamente raro, pero representa en estos casos un agente etiológico que puede comportarse como patógeno oportunista (GÜNTARD y PENNEKAMP, 1996), pudiendo provocar cuadros septicémicos (ENGLUND, 1969), neumonías (KLAPHOLZ y cols., 1994) y abscesos (AGUSTIN y CUNHA, 1995).

### **2.3.-LA INFECCIÓN EXPERIMENTAL EN ACUICULTURA: APLICACIONES**

La experimentación animal mediante modelos de dosis-respuesta es un procedimiento utilizado para comparar la virulencia, capacidad de colonización de una bacteria o potencia de una toxina bacteriana, que en condiciones naturales produce un organismo determinado (WELKOS y O'BRIAN, 1994). La respuesta puede ser medida por muerte, infectividad o algún otro efecto cuantificable.

Un ejemplo es la determinación de la dosis letal 50 (DL<sub>50</sub>), en donde el investigador calcula la dosis (toxina, bacteria o algún otro factor) que produce la muerte del 50% de los animales sujetos a estudio. Para generar estos valores, el modelo para pequeños animales consiste en tomar 3 ó 6 grupos con 5 ó 10 animales por grupo. Cada grupo recibe una dosis diferente del microorganismo o toxina y dichas dosis deben ir en relación geométrica mediante diluciones seriadas (REED y MUENCH, 1938; WELKOS y O'BRIAN, 1994).

Como la virulencia, toxicidad, e infectividad son dependientes tanto del agente causal como del hospedador, S. WELKOS y A. O'BRIAN (1994) concluyen que los estudios de DL<sub>50</sub> requieren de la perfecta estandarización de todos los componentes que intervienen en el experimento, como es el uso de la misma cepa para todos los animales, que todos los animales inoculados sean de la misma edad y tamaño, y que todos los animales estén bajo las mismas condiciones de mantenimiento.

El método de J.L. REED y M. MUENCH (1938) es probablemente el más utilizado para la determinación de la DL<sub>50</sub>, usándose en multitud de estudios y con muy diversos animales de experimentación (WELKOS y O'BRIAN, 1994). Una dosis letal, en un procedimiento biológico, tal como la titulación de un suero o un virus, consiste en la dilución máxima del producto en la cual ciertos animales sometidos al experimento reaccionan o mueren. Según estos autores para cubrir un amplio rango de posibles variaciones en la titulación es necesario usar un gran número de pequeños grupos de animales probados en diferentes diluciones.

El uso de la DL<sub>50</sub> en el mundo de la ictiopatología ha sido ampliamente utilizado a lo largo de los años para diversas experiencias, como son la determinación del grado de patogenicidad de una cepa determinada mediante la reproducción experimental de la enfermedad y la determinación de la patogenicidad de los productos extracelulares bacterianos mediante inoculación de los mismos. M. FAISAL y cols. (1989) describen en el bajo Egipto unas mortalidades por un proceso septicémico en *Oreochromis niloticus* que oscilaban entre el 10 y el 70%. Se lograron aislar un total de 17 *Aeromonas hydrophila*, realizándose posteriormente inoculaciones experimentales para determinar el nivel de virulencia de cada una de las cepas. Las DL<sub>50</sub> oscilaron desde 10<sup>3</sup> a 10<sup>7</sup> unidades formadoras de colonia por ml (ufc/ml). A su vez, se analizaron diferentes factores de patogenicidad, concluyéndose que fueron las cepas con DL<sub>50</sub> del orden de 10<sup>3</sup> ufc/ml las que presentaban *in vitro* mayores factores de virulencia.

### Revisión bibliográfica

GR. MALATHI y cols. (1989) determinaron las DL<sub>50</sub> de varias cepas marinas de *Vibrio vulnificus* aisladas de productos del mar, utilizando como animal de experimentación el ratón, obteniendo unos valores entre 10<sup>3</sup> a 10<sup>7</sup> ufc/ml. Al contrario que lo descrito por M. FAISAL y cols. (1989), tanto las cepas más patógenas (DL<sub>50</sub> del orden de 10<sup>3</sup>), como las menos patógenas (DL<sub>50</sub> del orden de 10<sup>7</sup>) contenían *in vitro* los mismo factores de virulencia.

Y. SANTOS y cols. (1991) describieron la patogenicidad de *Vibrio anguillarum* y sus toxinas en rodaballo (*Scophthalmus maximus*), salmón coho (*Oncorhynchus kisutch*) y trucha arcoiris (*Oncorhynchus mykiss*) con 12 cepas diferentes mediante la metodología anteriormente descrita por JL. REED y M. MUENCH (1938). Utilizaron 6 peces por grupo, con unos pesos comprendidos entre los 4.5 y 6.5 g. Los peces se inocularon intraperitonealmente con suspensiones bacterianas que oscilaron entre los 10<sup>1</sup> a 10<sup>8</sup> ufc/ml. Los resultados demostraron que era la trucha arcoiris la especie más susceptible a la infección experimental, con unos valores de DL<sub>50</sub> del orden de 10<sup>2</sup> a 10<sup>3</sup> ufc/ml.

B. FOUZ y cols. (1994) realizaron experiencias de DL<sub>50</sub> para determinar el papel que juega el hierro en la patogenicidad de *Vibrio damsela* en rodaballo (*Scophthalmus maximus*). Mediante estas experiencias se logró demostrar la correlación existente entre la adquisición de hierro por parte de las bacterias y el aumento del grado de patogenicidad de las mismas.

B. MAGARIÑOS y cols. (1995) determinaron el grado de patogenicidad de 6 cepas de *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* de probada capacidad patógena en doradas y rodaballo mediante inoculación experimental vía intraperitoneal y baño de 60 minutos en unas suspensiones bacterianas seriadas de  $10^8$  a  $10^4$  células por ml. El resultado fue la demostración de que *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* era capaz de infectar a la dorada por vía oral, obteniéndose unos valores de  $DL_{50}$  del orden de  $10^5$  a  $10^6$  ufc/ml mediante la metodología descrita por J.L. REED y M. MUENCH (1938). Las mortalidades comenzaron a los 3 ó 7 días postinfección en función de la cepa utilizada. Las  $DL_{50}$  obtenidas en dorada mediante la infección por baño fueron siempre menores que las obtenidas mediante la inoculación intraperitoneal, situándose entre  $10^4$  a  $10^5$  en dorada y  $10^3$  a  $10^5$  en rodaballo. En contraste, el rodaballo demostró ser una especie no susceptible a la pasterelosis por baño.

En Israel, en el año 1984, hubo un brote de meningitis y meningoencefalitis que afectó a varias especies piscícolas, como híbridos de tilapia, trucha arcoiris (*Oncorhynchus mykiss*) y carpa común (*Cyprinus carpus*), con alta morbilidad y una mortalidad del 50% en trucha y del 30% en tilapia. Se aislaron dos especies nuevas de *Streptococcus*, el *Streptococcus shiloi* y el *Streptococcus difficile*. La experiencia de  $DL_{50}$  se llevó a cabo para reproducir experimentalmente la enfermedad en trucha y tilapia, obteniendo unos valores de  $10^2$  a  $10^5$  ufc por ml (ELDAR y cols., 1995). Un experimento similar fue realizado por AM. BAYA y cols. (1997) en lubina (*Dicentrarchus labrax*), dorada (*Sparus aurata*, L.) y rodaballo (*Scophthalmus maximus*) para

### Revisión bibliográfica

reproducir experimentalmente la enfermedad causada por *Edwardsiella tarda* en un brote epizootico ocurrido en Maryland (Estados Unidos) en el año 1994, que fue el primero descrito para este agente patógeno en esta zona.

B. MAGARIÑOS y cols. (1996) realizaron experiencias de DL<sub>50</sub> para determinar diferencias de patogenicidad de *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* con o sin cápsula bacteriana, comprobándose que las cepas capsuladas reducían los valores de DL<sub>50</sub> en 4 logaritmos, confiriéndoles factores de virulencia tales como resistencia al suero, que no poseían cuando no estaban capsuladas. Este resultado puso de manifiesto el papel tan importante que juega la cápsula bacteriana en la patogenicidad de *Ph. damsela* subsp. *piscicida*.

La patogenicidad de *Vibrio alginolyticus* en dorada (*Sparus aurata*, L.) se cuestionaba hasta hace pocos años. MC. BALEBONA y cols. (1998) dilucidaron este aspecto. Para ello utilizaron doradas entre 5 y 10 gramos, analizando un total de 10 cepas diferentes. La DL<sub>50</sub> fue determinada mediante inoculación intraperitoneal, en grupos de 5 peces por lote, con suspensiones bacterianas de entre 10<sup>2</sup> a 10<sup>8</sup> ufc/ml, obteniéndose unos resultados de DL<sub>50</sub> que oscilaron entre los 5.4 x 10<sup>4</sup> a 1.0 x 10<sup>6</sup> unidades formadoras de colonia por gramo de pez. Este trabajo permitió considerar a *V. alginolyticus* como un agente bacteriano con capacidad patógena para la dorada.

LA. RODRÍGUEZ y cols. (1998) analizaron el grado de patogenicidad de *Hafnia alvei* en trucha común (*Salmo trutta*, L.),

usando peces con un peso comprendido entre los 6 y los 12 gramos, inoculando intraperitonealmente 0.1 ml de una suspensión bacteriana que oscilaba entre las  $10^3$  y las  $10^9$  unidades formadoras de colonia por mililitro según la metodología de J.L. REED y M. MUENCH (1938), y obtuvieron unas  $DL_{50}$  comprendidas entre  $1.3 \times 10^4$  y  $2.5 \times 10^7$  ufc/pez.

B. SOFFIENTINO y cols. (1999) realizaron una experiencia de  $DL_{50}$  con *Vibrio carchariae* tras la aparición de un brote de enfermedad con enteritis necrótica y muerte en lenguado (*Paralichthys dentatus*). El brote natural de la enfermedad cursó con signos de enteritis necrótica, produciendo petequias hemorrágicas alrededor de la zona anal, distensión abdominal con presencia de líquido serohemorrágico, enteritis y posterior necrosis del intestino distal. La experiencia de  $DL_{50}$ , cuyo valor fue  $5 \times 10^5$  ufc/pez, permitió determinar el grado de virulencia de la cepa, y confirmó que, efectivamente, *Vibrio carchariae* fue el agente responsable del brote natural de enfermedad.

Las experiencias de  $DL_{50}$  también se utilizan para determinar el papel que juegan los productos extracelulares bacterianos en la patogenia de la enfermedad, como en el estudio de B. MAGARIÑOS y cols. (1992) que compararon los datos de  $DL_{50}$  de 11 cepas de *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* ( $DL_{50}$  entre  $10^3$  y  $10^6$  células por pez), con los datos obtenidos con la inoculación experimental de los productos extracelulares (ECP) de estas mismas cepas. Los resultados fueron que los productos extracelulares de esta especie bacteriana eran extraordinariamente tóxicos para los peces, al

### Revisión bibliográfica

obtenerse unos valores de  $DL_{50}$  para los ECP del orden de 1.0 a 4.6 microgramos de proteína por gramo de pez. Otros autores que han utilizado experiencias de  $DL_{50}$  para determinar el efecto de los ECP son AH. KHALIL y cols. (1997) en Tilapia del Nilo con *Aeromonas hydrophila*, JL. ROMALDE y cols. (1993) con *Yersinia ruckeri*, LA. RODRÍGUEZ y cols. (1992) en trucha arcoiris con *Aeromonas hydrophila*, así como KK. LEE y cols. (1989) en salmón atlántico (*Salmo salar*, L.) con *Aeromonas salmonicida*.

## **2.4.- MECANISMOS DE VIRULENCIA DE BACTERIAS GRAM NEGATIVAS**

### **2.4.1.- FACTORES DE ADHERENCIA**

#### **2.4.1.1.- GEN *EAE***

Cepas de *Escherichia coli* enteropatógenas (EPEC) y enterohemorrágicas (EHEC) productoras de enteritis y enterocolitis hemorrágicas se han aislado en varias especies animales como en: perros y gatos (BROES, 1993; BEUTIN y cols., 1993; BEUTIN, 1999), ganado porcino (FAIRBROTHER, 1993; BEUTIN y cols., 1993; RIOS y cols., 1999), ganado bovino (MAINIL y cols., 1987; MAINIL y cols., 1994; WIELER y cols., 1998), conejos (MILON y cols., 1999), ganado ovino (BEUTIN y cols., 1993; HEUVELINK y cols., 1998), ciervos (RICE y cols., 1995), palomas (DELL'OMO y cols., 1998) y gallina (FUKUI y cols., 1995).

Tanto las cepas enterohemorrágicas como las enteropatógenas producen una lesión histopatológica característica conocida por "*attaching and effacing*", las cuales se interpretan como lesiones con "fijación y ocultación" de la bacteria, también denominada lesión A/E, produciendo una alteración de las células epiteliales del intestino. Esta lesión se caracteriza por la ocultación de la bacteria entre las microvellosidades intestinales provocando una destrucción focal, la íntima adherencia entre la bacteria y la membrana de los enterocitos y la acumulación de filamentos de actina polimerizada, provocando fuertes cambios en el citoesqueleto del enterocito bajo el área de localización de la bacteria (MOON y cols., 1983). A esta capacidad de producir este tipo de lesión A/E se le reconoce como un importante

### Revisión bibliográfica

factor de patogenicidad para las cepas de *E.coli* enteropatógenas (DONNENBERG y KAPER, 1992).

Las lesiones A/E están formadas por la sucesión de una serie de mecanismos. MS. DONNENBERG y JB. KAPER (1992) proponen un modelo con tres etapas en la patogénesis de las EPEC. Las dos últimas etapas están reguladas por diferentes genes localizados en el LEE (*locus of enterocyte effacement*) los cuales codifican la producción de múltiples proteínas secretoras y la adhesina bacteriana llamada íntima, codificada por el gen *eae* localizado en el LEE.

El LEE está presente en cepas enteropatógenas (EPEC) y enterohemorrágicas (EHEC), así como en otras especies bacterianas, como *Citrobacter freundii* biotipo 4280 y cepas de *Hafnia alvei* productora de lesiones A/E. La primera descripción del LEE se realizó en la cepa de *E.coli* O127 enteropatógena E2348/69 (MCDANIEL y cols., 1995). Dicho locus de la cepa EPEC E2348/69 contiene 41 genes organizados en 3 regiones mayores con funciones conocidas (ELLIOTT y cols., 1998). La región central del LEE contiene el gen *eae*, que codifica una proteína de 94-97 kilodalton conocida como "íntima" (JERSE y cols., 1990).

Genes *eae* se han clonado y secuenciado en *E.coli* enteropatógenos (EPEC) y enterohemorrágicos (EHEC) de origen humano (JERSE y cols., 1990; YU y KAPER, 1992), bovino (GOFFAUX y cols., 1997), canino (AN y cols., 1997), porcino y cunícola (AGIN y cols., 1996). También se ha conseguido en otras especies bacterianas como *Citrobacter freundii* (SCHAUER y FALKOW, 1993) y *Hafnia alvei* (FRANKEL

y cols., 1994). Los patrones de todas estas secuencias génicas demuestran tener una región N-terminal altamente conservada.

#### **2.4.1.2.- FIMBRIAS**

##### **2.4.1.2.1 CARACTERES GENERALES**

Las fimbrias (pili) son proyecciones filamentosas de la superficie de la bacteria, con un tamaño aproximado de 10µm de largo y un diámetro de 1 a 11 nm (OFEK y DOYLE, 1994). Están compuestos por unas subunidades proteicas poliméricas globulares (pilin) con un peso molecular de 15 a 26 KiloDaltons (JONES e ISAACSON, 1983).

En las bacterias Gram negativas, estos filamentos de la superficie bacteriana hacen que la bacteria se fije a las mucosas del hospedador y se mantenga íntimamente adherida por medio de una serie de adhesinas existentes en las fimbrias. Esta adhesión está basada en el reconocimiento entre componentes de la superficie bacteriana y receptores específicos en tejidos del hospedador (PODSCHUN y ULLMANN, 1998).

La adhesión bacteriana a mucosas y epitelios del hospedador es uno de los primeros pasos en numerosos procesos infecciosos. *E. coli* es el agente etiológico más frecuente en infecciones no complicadas del aparato urinario humano. Para colonizar y persistir en estos tejidos, la bacteria debe adherirse al uroepitelio. Esta adherencia es llevada a cabo por medio de las adhesinas existentes en las fimbrias.

### Revisión bibliográfica

JP. DUGUID y cols. (1979) describieron la existencia de dos tipos de hemoaglutininas en cepas de *E. coli* que se diferenciaban en base a su sensibilidad a la manosa, la manosa resistente (MR) y manosa sensible (MS). Según diferentes autores, la aglutinina más frecuente en cepas de *E. coli* uropatógenas es la manosa resistente (MR) (HAGBERG y cols., 1981; GANDER y cols., 1985). El 81% de las cepas uropatógenas de *E. coli* que expresan la adhesina MR reconocen un receptor glucolipídico encontrado en eritrocitos humanos y células del epitelio urinario (LEFFLER y SVANBORG-ÉDEN, 1981; VAISANEN y cols., 1981). Este receptor glucolipídico es  $\alpha$ -D-Gal-(1-4)- $\beta$ -D-Gal (KALLENIUS y cols., 1980).

En patología urinaria se han descrito dos tipos de adhesinas en *E. coli*, las manosa sensibles (MS) y las manosa resistentes (MR), que son indicativos de la presencia de las fimbrias tipo I y tipo III, respectivamente.

La presencia de fimbrias en cepas de *E. coli* con patogenicidad urinaria parece ser un importante factor que determina la habilidad de estas cepas para aglutinar eritrocitos humanos (HAGBERG y cols., 1981) y adherirse a células del epitelio urinario, aunque también se han descrito cepas no fimbriadas con capacidad de adherencia a diferentes epitelios (SVANBORG-ÉDEN y HANSON, 1978; DUGUID y cols., 1979).

La fimbria tipo I, codificada por el operón *pil*, está presente en multitud de miembros de la Familia *Enterobacteriaceae*, siendo comúnmente encontrada tanto en cepas comensales como patógenas.

Este pili es el más investigado dentro de las adhesinas bacterianas. La fimbria tipo I produce una adherencia manosa-específica a eritrocitos de numerosas especies animales, levaduras, y otros tipos de células (DUGUID y OLD, 1980), siendo llamada hemoaglutinina manosa sensible o fimbrina hemoaglutinante manosa-sensible (MSHA).

Es un tipo de adhesina que produce una hemoaglutinación que es inhibida por efecto de la manosa. La proteína con capacidad adhesiva en este tipo de pili está localizada sobre el eje de la fimbria y es capaz de unirse a trisacáridos compuestos de manosa en glucoproteínas del hospedador (FIRON y cols., 1984; BABU y cols., 1986).

La fimbria tipo III está codificada por el operón *pap*, *prs* o genes relacionados, siendo un tipo de adhesina que produce una hemoaglutinación resistente al efecto de la manosa (MRHA), pero al contrario que el tipo I, este pili sólo aglutina eritrocitos que han sido tratados previamente con ácido tánico. Descrito inicialmente sólo en el Género *Klebsiella*, estudios posteriores demostraron que este pili estaba presente en otros géneros de bacterias entéricas (CLEGG y GERLACH, 1987).

El pili tipo III tiene la capacidad de fijar a la bacteria a células endoteliales, epitelio respiratorio y epitelio urinario (HORNICK y cols., 1992; TARKKANEN y cols., 1997).

### *Revisión bibliográfica*

---

Por otra parte, el pili tipo III aparentemente no es idéntico en todos los géneros de las enterobacterias, ya que estudios serológicos han demostrado una considerable diversidad antigénica (OLD y cols., 1985). En el riñón, este pili es mediador en la adhesión bacteriana a la membrana de los túbulos basales, cápsula de Bowman y vasos renales.

#### **2.4.1.2.2.- RELACIÓN DE LAS FIMBRIAS CON LA PATOGENICIDAD**

La importancia que posee la fimbria tipo I en la virulencia bacteriana se debe a que es capaz de unirse al mucus o a las células del epitelio urogenital, respiratorio y tracto intestinal de varias especies animales (OFEK y BEACHEY, 1978; BALISH y cols., 1982; VENEGAS y cols., 1995). El papel de este pili en la patogenicidad urinaria ha sido demostrado ampliamente en estudios con *E. coli*, pero también en otras enterobacterias como *Klebsiella pneumoniae* (FADER y DAVIS, 1980 y 1982; MAAYAN y cols., 1985). Aunque primariamente asociada con actividad patógena en el sistema urinario inferior, el pili tipo I puede también estar involucrado en la patogénesis de la pielonefritis (FADER y DAVIS, 1982; MATSUMOTO y cols., 1990). En este sentido, esta estructura parece mostrar una alta eficacia en la unión a las células de los túbulos proximales del riñón humano (VIRKOLA y cols., 1988). En microorganismos patógenos, la colonización de las mucosas y epitelios es seguida por la invasión de tejidos subyacentes. Aun siendo muy importante la contribución del pili tipo I para la colonización del hospedador, su contribución a las demás etapas patogénicas de la infección son poco claras.

El papel de la fimbria tipo III en este proceso no es del todo conocido. Hasta ahora, esta fimbria ha sido relacionada con cepas de *E. coli* causantes de infecciones del aparato urinario en humanos (JOHNSON, 1991; MOBLEY y cols., 1994), perros (GARCÍA y cols., 1988), y septicemia en cerdos (HAREL y cols., 1993).

Las hemoaglutininas MSHA y MRHA han sido descritas, además de en *Escherichia coli*, en la mayoría de los Géneros de la Familia *Enterobacteriaceae*, como *Serratia* spp. (ADEGBOLA y OLD, 1982; OLD y cols., 1983; MIZUNOE y cols., 1988; HORNICK y cols., 1991), *Salmonella* spp. (TAVENDALE y cols., 1983), *Proteus* spp. (YAKUBU y cols., 1989; SARENEVA y cols., 1990; HORNICK y cols., 1991; LI y cols., 1999), *Klebsiella* spp. (OLD y ADEGBOLA, 1983; OLD y cols., 1985; COSAR, 1990; SORKIN y cols., 1991; HORNICK y cols., 1991), *Enterobacter* (ADEGBOLA y OLD, 1983-1985; HORNICK y cols., 1991; KELLER y cols., 1998) y *Yersinia* spp. (OLD y ADEGBOLA, 1984).

La presencia de estas hemoaglutininas también han sido descritas en *Hafnia alvei* en diferentes ocasiones (JAGIELSKI y cols., 1992; CRAVEN y WILLIAMS, 1997; PODSCHUN y cols., 2001). En el estudio de R. PODSCHUN y colaboradores (2001) se realizó una caracterización de aislamientos clínicos extraintestinales de origen humano de 70 cepas de *Hafnia alvei* en base a una serie de factores de virulencia, donde se incluía la presencia de las hemoaglutininas MSHA y MRHA. La hemoaglutinina MSHA, indicativa de la presencia de la fimbria tipo I, se detectó en el 59% de los aislamientos. Esta frecuencia no fue significativamente diferente de la detectada en otras

### Revisión bibliográfica

especies de la Familia *Enterobacteriaceae* como *Serratia marcescens* (46%), pero sí fue significativamente menor ( $p < 0.0001$ ) que las MSHA expresadas en aislamientos clínicos de *Enterobacter cloacae* (89%) o *Klebsiella pneumoniae* (86%). La hemoaglutinina MRHA, indicativa de la presencia del pili tipo III se observó en el 50% de las cepas de *Hafnia alvei*, siendo significativamente mayor ( $p < 0.05$ ) que en *Serratia marcescens*, pero significativamente menor que en *Klebsiella pneumoniae* (70%). Aunque la bibliografía existente sobre la presencia de las hemoaglutininas MSHA y MRHA en especies de la Familia *Enterobacteriaceae* es muy extensa, hasta el estudio de R. PODSCHUN y colaboradores (2001) no existían datos sobre la incidencia de estas hemoaglutininas en *Hafnia alvei*, ya que estudios anteriores de JAGIELSKI y colaboradores (1992), así como CRAVEN y WILLIAMS (1997) se limitaban a reseñar el simple hallazgo de la hemoaglutinina MSHA en algunas cepas de *Hafnia alvei* analizadas. Los datos aportados por R. PODSCHUN y colaboradores (2001) sugieren que la presencia de los pili tipo I y tipo III son una característica común a *Hafnia alvei*, encontrándose aproximadamente en la mitad de los aislamientos clínicos.

#### **2.4.2.- RESISTENCIA AL SUERO**

La acción bactericida del sistema del complemento es un importante mecanismo de defensa del hospedador frente a las infecciones causadas por bacterias Gram negativas (FRANK y cols., 1992; MCQUILLEN y cols., 1994), actuando en la primera línea de defensa del organismo junto a la fagocitosis por polimorfonucleares.

La actividad bactericida del suero está mediada principalmente por las proteínas del complemento. Tras la activación de su sistema, estas proteínas se acumulan formando el complejo C5b-C9 en la superficie de la membrana de las bacterias Gram negativas (RAMM y cols., 1983), lo cual produce una serie de poros que atraviesan dicha membrana, facilitando la entrada de iones  $\text{Na}^+$ , provocando consecuentemente la lisis osmótica de la bacteria (TAYLOR y cols., 1985). También se ha demostrado la implicación del sistema del complemento en la inactivación de la toxicidad de los productos extracelulares liberados por bacterias patógenas de peces como *Aeromonas salmonicida* (MUNRO y cols., 1980; CIPRIANO, 1983; SAKAI, 1984; ELLIS, 1987).

La activación del sistema del complemento se puede realizar mediante dos mecanismos diferentes: la vía clásica (requiere de la presencia de anticuerpos para su activación) y la vía alternativa del complemento (se activa sin la presencia de anticuerpos). Ambas vías de activación tienen como resultado final la formación del complejo C5b-C9 (RAMM y cols., 1983).

### *Revisión bibliográfica*

---

Como respuesta a esta defensa por parte del hospedador, los microorganismos patógenos han encontrado estrategias de defensa efectivas contra el efecto bactericida del suero. La mayoría de las bacterias Gram negativas saprófitas son sensibles al efecto bactericida del suero, mientras que las bacterias patógenas a menudo exhiben capacidad de resistencia (OLLING, 1977). El mecanismo de resistencia bacteriana al efecto bactericida del suero no está del todo claro, si bien se conoce que la estructura del lipopolisacárido O bacteriano juega un papel sumamente importante en dicha resistencia, al contrario que ocurre con la cápsula bacteriana y ciertas proteínas de membrana (TAYLOR, 1992).

En los mamíferos, la activación del sistema del complemento juega un papel sumamente importante en la lisis bacteriana, fagocitosis, reacción inflamatoria y producción de anticuerpos. Los peces parecen poseer una activación de este sistema similar a la de los mamíferos, y además, las proteínas del complemento identificadas en los peces son similares a las de los mamíferos (HOLLAND y LAMBRIS, 2002).

Actualmente se tiene poca información acerca de las proteínas reguladoras y receptores del complemento en los peces, siendo todavía confuso si todas las funciones del sistema del complemento identificadas en los mamíferos también las poseen los peces. Sin embargo, lo que sí ha quedado del todo demostrado es que el complemento de los peces puede lisar células no reconocidas como propias por su sistema inmune, así como opsonizar a estas células



para la destrucción por células fagocíticas y participar en reacciones inflamatorias (NONAKA y cols., 1981; HOLLAND y LAMBRIS, 2002).

Las cepas aisladas de casos clínicos suelen ser por lo general más resistentes al efecto bactericida del suero que aquellas cepas aisladas de origen no clínico. Este hecho queda demostrado en estudios como los realizados por R.J. ROANTREE y LA. RANTZ (1960), así como J. FIERER y colaboradores (1972) donde se encontró una mayor proporción de bacterias Gram negativas resistentes al efecto bactericida del suero de aislamientos clínicos de bacteriemia humana que en las aisladas de heces u orina, y en el de KL. VOSTI y E. RANDALL (1970) donde se encontraron susceptibilidades significativamente menores al efecto bactericida del suero en cepas de *E.coli* aisladas en casos clínicos con bacteriemia que en las aisladas de orina y heces.

A su vez, las cepas resistentes a los efectos bactericidas del suero presentan a menudo una mayor severidad de los síntomas observados (GOWER y cols., 1972; BJÖRKSTÉN y KALJSER, 1978).

Existen multitud de estudios realizados que analizan el efecto bactericida del suero sobre bacterias patógenas de peces, aunque la especie más investigada en este sentido es la trucha arcoiris (*Oncorhynchus mykiss*). En el estudio de HT. BOESEN y cols. (1999) se analizó la resistencia de los serogrupos O1 y O2a de *Vibrio anguillarum* frente al suero de la trucha arcoiris. Todas las cepas analizadas de *V. anguillarum* fueron capaces de activar el sistema del complemento de esta especie de pez, siendo resistentes al efecto bactericida del suero el

### Revisión bibliográfica

80% de las cepas de *V. anguillarum* serogrupo O2a, encontrándose además una correlación positiva entre el tamaño del lipopolisacárido O y la resistencia al efecto bactericida del suero.

CB. MUNN y cols. (1982) compararon la resistencia de cepas de *Aeromonas salmonicida* al efecto bactericida del suero humano, conejo y trucha arcoiris, determinándose unas resistencias que oscilaron de altas a intermedias para el suero de trucha.

La correlación entre resistencia al efecto bactericida del suero y una mayor virulencia de una determinada cepa ha sido demostrada por multitud de estudios. RL. DAVIES (1991) demostró que las cepas de mayor virulencia para trucha arcoiris de *Yersinia ruckeri* eran las que poseían una mayor resistencia al efecto bactericida del suero, comportándose las cepas virulentas como resistentes a dicho efecto, mientras que las avirulentas eran sensibles. Un estudio similar fue realizado por TJ. TRUST y cols. (1981) donde se analizó la resistencia al efecto bactericida del suero de trucha arcoiris sobre varias cepas patógenas para los peces de *Vibrio* spp., demostrándose una correlación positiva entre la menor resistencia al efecto bactericida del suero y una marcada reducción de la virulencia de la cepa.

Otros estudios que demuestran esta asociación son los de CB. MUNN y cols. (1982) con *Aeromonas salmonicida* en trucha arcoiris, M. FAISAL y cols. (1989) con *Aeromonas hydrophila* en tilapia del Nilo (*Oreochromis niloticus*), así como A. SUTTON y cols. (1982) con *Haemophilus influenzae* tipo b.

Y con respecto a *Hafnia alvei*, en un estudio realizado por S. JANKOWSKI y cols. (1996) con 26 cepas se obtuvo como resultado que sólo 5 cepas eran resistentes al efecto bactericida del suero bovino. También se puso de manifiesto el papel decisivo que juegan los lipopolisacáridos en este mecanismo de resistencia, ya que cepas sensibles al efecto bactericida del suero, aumentaban enormemente su resistencia al adicionar lipopolisacáridos de cepas de *Hafnia alvei* al suero bovino. Además, este efecto demostró ser dosis-dependiente.

Igualmente, R. PODSCHUN y cols. (2001) realizaron un estudio de la resistencia de *Hafnia alvei* al efecto bactericida del suero humano, comparando los resultados con los obtenidos en otras bacterias de la Familia *Enterobacteriaceae* como *Serratia marcescens*, *Enterobacter cloacae* y *Klebsiella pneumoniae*. La frecuencia de cepas de *Hafnia alvei* que mostraban resistencia al suero fue del 34%, asemejándose a los resultados obtenidos en *Serratia marcescens* (26%) y *Klebsiella pneumoniae* (25%), pero significativamente inferior que lo que ocurrió con las cepas de *Enterobacter cloacae* (92%).

La estructura de los lipopolisacáridos de las cepas "Le Minor" (INSTITUTO PASTEUR) de *Hafnia alvei* 1199, 1216 y 2386 fue determinada por A. ROMANOWSKA y cols. (1994), así como por A. GAMIAN y cols. (1991), poniendo de manifiesto que los lipopolisacáridos de las cepas 1199 y 2386 tenían una estructura especialmente compleja, pudiendo atribuírsele la responsabilidad de la resistencia de dichas cepas a la acción bactericida del suero encontradas en el trabajo de S. JANKOWSKI y cols. (1996). Si bien, está demostrado que la

### Revisión bibliográfica

naturaleza del carácter “resistencia al efecto bactericida del suero” es compleja (TAYLOR, 1992; MERINO y cols., 1992; JOINER, 1998).

#### **2.4.3.- HEMÓLISIS**

La actividad hemolítica de los productos extracelulares bacterianos ha sido asociada con el grado de patogenicidad en multitud de especies bacterianas, siendo una de las variables que se proponen investigar para detectar cepas virulentas (SANTOS y cols., 1989). Eritrocitos de mamíferos han sido rutinariamente usados para determinar estas capacidades no sólo en cepas virulentas de hospedadores poiquilotermos y homeotermos, sino también con patógenos primarios de peces como *Renibacterium salmoninarum*, *Aeromonas salmonicida* y *Yersinia ruckeri*.

El papel de las hemolisinas en la patogenicidad bacteriana frente animales homeotermos se ha demostrado en una gran variedad de Géneros y Familias bacterianas: *Escherichia* (WELCH y cols., 1981; CAPRIOLI y cols., 1983; HACKER y cols., 1986), *Proteus* (KORONAKIS y cols., 1987; WELCH, 1987), *Morganella* (KORONAKIS y cols., 1987), *Mycobacterium* (MASLOW y cols., 1999).

Para el caso de animales poiquilotermos como son los peces, el número de trabajos publicados no es tan abundante como en el caso de especies bacterianas patógenas en homeotermos. En el estudio de Y. SANTOS y cols. (1989) se establecieron patrones hemolíticos de *Aeromonas* spp. móviles frente a eritrocitos humanos, de oveja, cobaya, trucha arcoiris y salmón coho (*Oncorhynchus kisutch*),

determinándose que un 96% de las cepas presentaban actividad hemolítica. Un porcentaje similar de cepas de *Aeromonas hydrophila* y *A. sobria* eran capaces de lisar eritrocitos de humanos, de oveja y cobaya, siendo mucho menos frecuente esta capacidad hemolítica con eritrocitos de trucha arcoiris y salmón coho. Cepas virulentas y avirulentas de *Aeromonas* spp. móviles hemolizaron eritrocitos de peces, pero sólo seis cepas patógenas exhibieron una actividad hemolítica específica frente a los eritrocitos de trucha arcoiris. De estos resultados se desprende que la actividad hemolítica de una cepa determinada constituye un claro factor de virulencia para todas las especies de aeromonas probadas. Sin embargo, por sí sólo la presencia de este factor no contribuye a la patogenicidad que muestran las aeromonas móviles.

XH. ZHANG y B. AUSTIN (2000) realizaron un estudio que analizaba la actividad hemolítica de los productos extracelulares de *Vibrio harveyi*, y concluyeron que la capacidad hemolítica estaba íntimamente relacionada con la patogenicidad de estas cepas para los salmónidos, existiendo una correlación positiva entre la patogenicidad y la mayor titulación con actividad hemolítica frente a eritrocitos de salmón atlántico (1:256) y trucha arcoiris (1:32). En general, las hemolisinas bacterianas son consideradas importantes factores de patogenicidad en *Vibrio* spp. al causar septicemia hemorrágica y diarrea en el hospedador.

Estas hemolisinas han sido caracterizadas y clonadas a partir de *Vibrio parahaemolyticus* (NISHIBUCHI y KAPER, 1985; TANIGUCHI y

### *Revisión bibliográfica*

cols., 1986), *V. cholerae* (ARDER y MURPHY, 1988; BABA y cols., 1991), *V. hollisae* (YAMAMOTO y cols., 1990), *V. mimicus* (KIM y cols., 1997), *V. vulnificus* (YAMAMOTO y cols., 1990), y *V. anguillarum* (HIRONO y cols., 1996).

*Vibrio anguillarum* serotipo O1 y O2 es el agente etiológico más importante de las vibriosis, causando pérdidas millonarias en las industrias piscícolas de todo el mundo (SORENSEN y LARSEN, 1986; TORANZO y cols., 1997). Este agente bacteriano es productor de hemolisinas, existiendo varios estudios que relacionan su mayor actividad productora con su capacidad patógena (KODAMA y cols., 1984; KROVACEK y cols., 1987).

#### **2.4.4.- PRODUCCIÓN DE SIDERÓFOROS**

El hierro es un componente fundamental para el crecimiento y metabolismo microbiano. Limitar las concentraciones del hierro libre extracelular es una estrategia de defensa del hospedador contra los microorganismos patógenos (BULLEN y cols., 1978; FINKELSTEIN y cols., 1983; KONGOIORGHES y WEINBERG, 1995; WEINBERG y WEINBERG, 1995). La fuente de hierro libre disponible es extremadamente baja, ya que la mayor parte del hierro se encuentra retenido intracelularmente en proteínas como la hemoglobina, ferritina, hemosiderina y mioglobina, y extracelularmente en proteínas de alta afinidad por el hierro como lactoferrina y transferrina. La cantidad de hierro libre biodisponible es de  $1 \times 10^{-18}$  M, insuficiente para el normal crecimiento bacteriano (BULLEN y cols., 1978).

La habilidad de las bacterias para obtener hierro a partir de las proteínas del hospedador es absolutamente esencial para el crecimiento bacteriano y para garantizar el curso de la infección (BULLEN, 1981; NEILANDS, 1981-a). Bajo condiciones restrictivas de hierro, muchas bacterias patógenas liberan al medio pequeñas moléculas de alta afinidad por el hierro llamadas sideróforos (NEILANDS, 1981-b y 1995) capaces de obtener hierro a partir de las proteínas del hospedador (GRIFFITHS y cols., 1988). Las bacterias también pueden obtener hierro a partir de proteínas del hospedador mediante una serie de receptores específicos para dichas proteínas y mediante una serie de hemolisinas o citotoxinas que liberan componentes sanguíneos que se fijan a las bacterias mediante receptores específicos (MARTÍNEZ y cols., 1990; OTTO y cols., 1992; WOOLDRIDGE y WILLIAMS, 1993).

Las enterobacterias son capaces de sintetizar una gran variedad de sideróforos, los cuales pertenecen a 2 grupos, los sideróforos tipo fenolados y los sideróforos tipo hidroxamato. El grupo más importante de sideróforos son los tipo fenolados, siendo su representante más importante la enterobactina (trímero cíclico de 2,3- dihidroxi-benzoyl-serina). Este sideróforo es sintetizado por la mayoría de las cepas clínicas de *Escherichia coli* y *Salmonella* spp. (GRIFFITHS, 1987). Los estudios realizados sobre la contribución en el grado de virulencia bacteriana por parte de la enterobactina son contradictorios. R.J. YANCEY y cols. (1979) describen que un mutante de *Salmonella typhimurium* incapaz de secretar este sideróforo es menos virulento en ratón, mientras que W.H. BENJAMIN y cols. (1985) no encontraron relación

### Revisión bibliográfica

alguna entre virulencia y capacidad de sintetizar la enterobactina por parte de esta especie bacteriana. AA. MILES y PL. KHIMJI (1975) tampoco encontraron diferencias de patogenicidad entre cepas del Género *Klebsiella* positivas y negativas a la producción de enterobactina. A día de hoy, el papel de la enterobactina como factor de virulencia bacteriano es todavía incierto (PODSCHUN y ULLMANN, 1998).

En el grupo de los sideróforos tipo hidroxamato, los más importantes son los ferricromos (sintetizados por hongos), ferrioxaminas y aerobactinas. La producción de aerobactina se describía en un inicio asociada con el plásmido *Col V* (WILLIAMS, 1979; WARNER y cols., 1981). Si bien hoy en día se sabe que la producción de aerobactina puede estar codificado por cualquier tipo de plásmido, o en el ADN cromosómico de multitud de bacterias entéricas (LAWLOR y PAYNE, 1984; MACDOUGALL y NEILANDS, 1984; VALDANO y CROSA, 1984; BINDEREIF y NEILANDS, 1985; COLONNA y cols., 1985).

Al contrario que para el caso de la enterobactina, la contribución de la aerobactina a la virulencia bacteriana ha sido claramente demostrada (NASSIF y SANSONETTI, 1986; DE LORENZO y MARTÍNEZ, 1988).

Por otro lado, el papel que juegan los sideróforos en la virulencia se ha descrito en una gran variedad de agentes bacterianos patógenos, como en *Vibrio cholerae* (HENDERSON y PAYNE, 1994), *Escherichia coli* (WILLIAMS, 1979; GADO y cols., 1989; VIDOTTO y cols., 1990), *Vibrio vulnificus* (WRIGHT y cols., 1981; STELMA y cols., 1992),

*Klebsiella pneumoniae* (NASSIF y SANSONETTI, 1986), *Pseudomonas aeruginosa* (MEYER y cols., 1996)

Las observaciones de JL. MARTÍNEZ y cols. (1987) indican que la Familia *Enterobacteriaceae* puede dividirse en dos grupos de acuerdo a la mayor o menor frecuencia en la síntesis de aerobactina. El grupo de cepas con menor frecuencia en la producción de aerobactina (<20%) incluye a los Géneros *Serratia*, *Proteus* y *Salmonella*. El segundo grupo incluye al género *Escherichia*, mostrando una frecuencia de síntesis de aerobactina superior al 40%.

Tanto la enterobactina como la aerobactina han sido aisladas en cepas de *Hafnia alvei* (MARTÍNEZ y cols., 1987; RUTZ y cols., 1991; PODSCHUN y cols., 2001). En el estudio de MARTÍNEZ y cols. (1987) se analizó la proporción de bacterias gram negativas productoras de aerobactina en aislamientos hospitalarios, destacando géneros bacterianos como *Enterobacter* y *Shigella* con más del 50% de cepas productoras de aerobactina. En el Género *Escherichia*, producían aerobactina el 45% de las cepas analizadas. El resto de géneros, en donde se incluía a *Klebsiella*, *Citrobacter*, *Proteus*, *Morganella*, *Yersinia*, *Serratia*, *Salmonella*, *Acinetobacter* y *Pseudomonas*, el porcentaje de producción de aerobactina fue menor del 20%. En el caso de *Hafnia alvei*, sólo se analizó una cepa, y ésta fue positiva a la producción de aerobactina.

R. REISSBRODT y cols. (1990) describen a *Hafnia alvei* como una especie bacteriana capaz de sintetizar los sideróforos ferrioxaminas

### Revisión bibliográfica

tipo G y E. La significación de estos sideróforos en la patogenicidad de las enterobacterias no está del todo clara.

R. PODSCHUN y cols. (2001) realizaron un estudio analizando un total de 70 cepas de *Hafnia alvei*, encontrándose que el 100% de las mismas sintetizaba algún tipo de sideróforo, pero sólo una de ellas sintetizaba enterobactina y ninguna la aerobactina, considerándose entonces que los sideróforos sintetizados debían ser las ferrioxaminas tipo G y E. En el mismo estudio, un 100% de las cepas analizadas de *Serratia marcescens* sintetizaban enterobactina, el 100% en *Enterobacter cloacae* y el 99% de *Klebsiella pneumoniae*. La aerobactina, era sintetizada por el 8.6% de las cepas de *Serratia marcescens*, el 92% de las cepas de *Enterobacter cloacae* y el 5.3% de las cepas analizadas de *Klebsiella pneumoniae*.

## **2.5.- EVALUACIÓN DE LA INMUNOHISTOQUÍMICA PARA DETECTAR INFECCIONES BACTERIANAS EN LOS TEJIDOS ANIMALES**

La inmunohistoquímica es una técnica novedosa como medio diagnóstico en enfermedades infecciosas que se ha utilizado con una elevada fiabilidad en muchos casos. Las técnicas inmunohistoquímicas combinan métodos anatomopatológicos, inmunológicos y bioquímicos, con el objetivo de localizar componentes del microorganismo en tejidos infectados, mediante el empleo de anticuerpos específicos y moléculas marcadoras. Estas técnicas han sido y siguen siendo de gran aplicación en el estudio de la etiopatogenia de las enfermedades infecciosas,

aportando valiosa información en la localización e interacción entre el patógeno y el hospedador.

Existe una gran variedad de posibles aplicaciones de técnicas inmunohistoquímicas, como son la inmunoperoxidasa indirecta (IPI), peroxidasa-antiperoxidasa (PAP) y el complejo Avidina-Biotina (CAB).

La técnica inmunohistoquímica se ha utilizado en multitud de especies animales para el diagnóstico de diversas infecciones. A continuación describimos algunas de las aportaciones hechas de este método como técnica de diagnóstico de agentes infecciosos en diferentes especies animales.

### **Especie bovina**

*Chlamydia psittaci* en tejido uterino, vaginal, oviducto y ganglio prefemoral izquierdo de ovejas (BUXTON y cols., 1996; PAPP y SHEWEN, 1996), *Bacillus cereus* en áreas necróticas de la ubre de vacas que padecían un cuadro de mamitis aguda (FABBI y cols., 1989); *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* en ganado caprino y bovino (NAVARRO y cols., 1991; GUTIÉRREZ CANCELA y cols., 1993; THORENSEN y cols., 1994; STABEL y cols., 1996); micoplasmas caprinos (RODRÍGUEZ y cols., 1996) y bovinos (ADEGBOYE y cols., 1996; RODRÍGUEZ y cols., 1996).

### **Especie porcina**

*Streptococcus suis* en tonsilas de cerdos enfermos (SCANZIANI y cols., 1993); *Erysipelothrix rhusiopathiae* en los condrocitos y células

### Revisión bibliográfica

sinoviales de articulaciones con artritis en cerdos infectados experimentalmente (FRANZ y cols., 1996); *Leptospira interrogans* en tejidos porcinos infectados experimentalmente (SCANZIANI y cols., 1989).

#### **Especie aviar**

*Chlamydia psittaci* en gallinas (THEIL y cols., 1996); micoplasmas aviáres (MARTIN DE LAS MULAS y cols., 1990; NUNOYA y cols., 1995).

#### **Especie cunícola**

*Pasteurella multocida* en conejos (RICHARDSON y cols., 1997).

#### **Animales salvajes**

*Brucella abortus* en focas del Pacífico (*Phoca vitulina richardsi*) (GARNER y cols., 1997); *Chlamydia psittaci* en tejido urogenital y conjuntival de Koalas (HEMSLEY y CAMFIELD, 1997).

#### **Peces**

*Piscirickettsia salmonis* en tejidos de salmón atlántico (*Salmo salar*) (ALDAY-SANZ y cols., 1994); *Renibacterium salmoninarum* en tejidos de trucha arcoiris (*Oncorhynchus mykiss*) (WHITE y cols., 1996; LORENZEN y cols., 1997); *Vibrio salmonicida* en salmón atlántico (*Salmo salar*) infectado de forma experimental y natural (EVENSEN y cols., 1991); *Flexibacter psychrophilus* en tejidos de trucha arcoiris (EVENSEN y LORENZEN, 1996 y 1997) y salmón atlántico (OSTLAND y cols., 1997).

**2.5.1.- APLICACIONES FRENTE A LA INFECCIÓN POR *H.ALVEI***

F. REAL y colaboradores (1997) emplearon el método inmunohistoquímico para demostrar la asociación existente entre la cepa clínica 187/95 de *Hafnia alvei*, aislada en un colectivo enfermo de gallinas ponedoras en la Región Canaria, con las lesiones detectadas en el estudio anatomopatológico. Como método inmunohistoquímico se empleó el descrito por MARTÍN de las MULAS y colaboradores (1990), utilizándose un antisuero policlonal frente a la cepa 187/95, según el protocolo descrito por E. HARLOW y D. LANE (1988). La inmunoreactividad frente *Hafnia alvei* fue particularmente intensa alrededor de las zonas necróticas de hígado y bazo. También demostró tener una inmunoreactividad positiva émbolos bacterianos en vasos sanguíneos del sistema renal, pulmonar, nervioso, cardiaco y pleura.

F. ACOSTA y colaboradores (2002) emplearon el uso de la inmunohistoquímica para comparar la utilidad de los métodos inmunohistoquímicos y microbiológicos en el diagnóstico de la infección experimental por *Hafnia alvei* en trucha común (*Salmo trutta*, L.). Para la detección de *Hafnia alvei* en los tejidos de las truchas inoculadas, se empleó el suero de un conejo hiperinmunizado contra *Hafnia alvei* tal y como describen E. HARLOW y D. LANE (1988), utilizándose la peroxidasa-antiperoxidasa (PAP) como método inmunohistológico según lo descrito por MARTÍN de las MULAS y colaboradores (1990).

En este trabajo se demostró la enorme utilidad del método inmunohistoquímico en detectar la infección por *H. alvei* en distintos

### *Revisión bibliográfica*

---

tejidos, incluso en las fases iniciales. Además, el método fue capaz de confirmar la presencia de la bacteria en intestino, a pesar de que no existían lesiones a nivel macroscópico ni microscópico en dicho tejido, ocasionados por *Hafnia alvei*.

# *Material y Métodos*

---

### 3.- MATERIAL Y MÉTODOS

#### 3.1.- MÉTODOS MICROBIOLÓGICOS GENERALES

##### 3.1.1.- CEPAS UTILIZADAS EN ESTE ESTUDIO.

Las cepas de *Hafnia alvei* utilizadas en este trabajo fueron un total de 23, 12 pertenecientes a colecciones privadas de laboratorio, 9 a la colección "Le Minor" de cultivos tipo del Instituto Pasteur y 2 a la colección americana de cultivos tipo (ATCC), que proceden de fuentes diferentes como puede comprobarse en la Tabla 1. En dicha tabla se refleja igualmente su origen, año de aislamiento y la referencia completa de su donante y/o vendedor.

##### 3.1.2.- MANTENIMIENTO Y CONSERVACIÓN DE LAS CEPAS

Para el mantenimiento y conservación de las cepas en el laboratorio, se usó el medio de cultivo Mac Conkey Agar (Laboratorios Difco, Detroit, Michigan). Los medios fueron incubados durante 24 horas a 37°C. Las cepas aisladas en cultivo puro se resuspendieron en Caldo Triptona de Soja (TSB) (Laboratorios Cultimed, Montcada i Reixac, Barcelona, España) adicionado con un 15% de glicerol y fueron congeladas a -80°C para su conservación.

## Material y Métodos

Tabla 1.- Relación de cepas de *H. alvei* utilizadas en este estudio

CEPA	ORIGEN	AISLAMIENTO	DONADOR
187	Septicemia en gallina ponedora, España	1995	F.Real
C34	Trucha arcoiris, España	1990	J.L.Múzquiz
OR-1	Crema pastelera, España	1996	L.A.Rodríguez
F4319	Enteritis humana, Reino Unido	1995	T.G.Winstanley
X1	Enteritis humana, Reino Unido	1996	T.G.Winstanley
4256	Sangre humana, E.E.U.U	1983	C.D.C
4094	Espuito humano, E.E.U.U	1983	C.D.C
1967	Heces humanas, E.E.U.U	1982	C.D.C
842	Vejiga humana, E.E.U.U	1981	C.D.C
23	Heces humanas, Francia	1965	Le Minor
24	Líquido gástrico humano, Francia	1965	Le Minor
25	Heces humanas, Francia	1965	Le Minor
30	Humano (desconocido), Francia	1965	Le Minor
7	Heces humanas, Francia	1967	Le Minor
14	Heces humanas, Francia	1967	Le Minor
7	Heces humanas, Marruecos	1968	Le Minor
11	Heces humanas, Francia	1969	Le Minor
OU-3	Urología	1999	L.A. Rodríguez
OU-4	Urología	1999	L.A. Rodríguez
2566	Septicemia en trucha arcoiris	1983	Gelev
19	Lagarto, Italia	1968	Le Minor
ATCC 13337	Heces humanas, E.E.U.U	1965	ATCC
ATCC 9760	Paracolon humano, E.E.U.U	1943	ATCC

F.Real. Facultad de Veterinaria. Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. España.

J.L.Múzquiz. Facultad de Veterinaria, Universidad de Zaragoza. España.

L.A.Rodríguez. Facultad de Ciencias. Universidad de Vigo, Orense. España

T.G.Winstanley. Hospital Royal Hallamshire, Sheffield. Reino Unido.

ATCC. American Type Culture Collection, Rockville, MD. Estados Unidos.

CDC. Center for Disease Control and Prevention, Atlanta. Estados Unidos

Le Minor. Instituto Pasteur, Paris. Francia

Gelev. Veterinary Institute, Plovdiv, Bulgaria

### 3.1.3.- PRUEBAS DE IDENTIFICACIÓN DE LAS CEPAS

Las cepas fueron sometidas para su identificación a pruebas bioquímicas convencionales en tubo y placa (SMIBERT y KRIEG, 1981) y sistemas miniaturizados (API 20E) (BioMérieux, Madrid, España).

Estas pruebas se utilizaron para garantizar la identificación de las cepas objeto de estudio, con la finalidad de distinguir *H. alvei* de otras bacterias taxonómicamente cercanas como *Salmonella* spp., *Serratia* spp., *Edwardsiella* spp. y *Yersinia ruckeri*, tanto a la llegada de las cepas al laboratorio, como cada vez que una cepa se recuperó en el medio de aislamiento en todas las inoculaciones experimentales realizadas en dorada.

Se aplicaron un número de pruebas reducidas pero “suficientes” (REAL y cols., 1997) para garantizar este hecho, como fue la tinción de Gram por el método de HUCKER modificado, citocromo-oxidasa por el método de KOVACS (1956), la prueba de la catalasa, oxidación-fermentación de los azúcares glucosa, arabinosa, meliobiosa, sacarosa, sorbitol, manitol e inositol en el medio basal de HUGH-LEIFSON (SMIBERT y KRIEG, 1981), decarboxilación de aminoácidos arginina, lisina y ornitina mediante el caldo de MØLLER (Difco) (MØLLER, 1955, cit. SEELEY y cols., 1991), producción de gas a partir de la glucosa mediante el caldo de HUGH-LEIFSON adicionado con un 1% de glucosa (SMIBERT y KRIEG, 1981), utilización del citrato mediante la prueba Citrato de SIMMONS (Difco), reacción de Voges-Proskauer, producción de Indol (KOVACS, 1956), detección de la  $\beta$ -galactosidasa (Oxoid,

## *Material y Métodos*

Basingstoke, Hampshire, RG24 8PW, England) y reducción de nitratos mediante el empleo del caldo nitrato (Difco).

Como prueba complementaria, al comenzar este estudio se realizó la lisis de todas las cepas por el fago 1672 según el método descrito por PAM. GUINEE y JJ. VALKENBURG (1968), prueba que nos permitió confirmar que nuestras cepas de estudio pertenecían a la especie *Hafnia alvei*, diferenciándolas así de otras enterobacterias que bioquímicamente son muy parecidas.

A su vez, utilizamos el sistema API 20E (BioMérieux) para comparar, y corroborar en su caso, los resultados de identificación, con respecto a la metodología clásica, de las cepas que recibimos en el laboratorio, y, colonias aisladas a partir de la siembra de riñón y otros órganos de los animales sacrificados después de las inoculaciones experimentales realizadas en dorada, durante todo este trabajo.

### 3.2.- ANÁLISIS DE LOS FACTORES DE VIRULENCIA DE LAS CEPAS DE *HAFNIA ALVEI*

#### 3.2.1.- DETECCIÓN DEL GEN *EAE* MEDIANTE EL MÉTODO DE PCR

Un total de 23 cepas de *Hafnia alvei* fueron analizadas para la detección del gen *eae*. Los datos que hacen referencia a la procedencia y origen de las cepas estudiadas se presentan en la Tabla 1. Las cepas analizadas se cultivaron en Agar Infusión Cerebro Corazón (BHI agar) (Cultimed) durante 18-24 horas a 37°C para posteriormente proceder a la extracción de su ADN mediante el Kit comercial *Wizard Genomic DNA Purification* (Promega, Innogenetics Diagnóstica y Tecnología, Barcelona, España).

Para detectar la presencia de este gen nos hemos basado en la descripción del método previamente hecha por A. ISMAILI y cols. (1996).

Se emplearon dos juegos de cebadores, que fueron producidos por la casa comercial Genset S.A. (París, Francia), y fueron diseñados siguiendo las directrices de trabajos previos (LOUIE y cols., 1994) (Tabla 2).

Se aplicaron dos tipos de prueba de PCR. La primera con los cebadores C1E y C2E que debían amplificar un fragmento de 1,1 Kb y que fue realizada previamente por A. ISMAILI y cols. (1996) sobre cepas de *Hafnia alvei* con la presencia del gen *eae*. El segundo método incluyó los cebadores P<sub>20</sub> y P<sub>40</sub>, que debían amplificar un fragmento de 0,4 kb,

## Material y Métodos

según la descripción que LOUIE y cols. (1994) hicieron para el serotipo O111:H8 de *E. coli* con la presencia de este gen.

Las amplificaciones fueron realizadas en un volumen de 25  $\mu$ l, conteniendo 1x de tampón (Biorad), 250  $\mu$ M de cada nucleótido, 2 mM de  $\text{Cl}_2\text{Mg}$  (Biorad), 1U de Taq DNA polimerasa (Biorad), 25 ng de ADN, 40 nM para los cebadores C1E-C2E, 10 nM para los cebadores P<sub>20</sub>-P<sub>40</sub>, y el resto hasta 25  $\mu$ l de agua ultrapura estéril.

Como controles positivos de la amplificación fueron utilizadas las cepas de *Escherichia coli* E2348/69 y RC541. Como control negativo fue utilizado un eppendorf con agua estéril en sustitución del ADN. Como marcador de peso molecular se utilizó uno de 100 pares de bases (Amersham, Pharmacia Biotech Inc).

Los geles se prepararon disolviendo agarosa (Sigma) por calentamiento en Tampón Tris-Acetato (TAE). La disolución se vierte en una placa en la que se ha dispuesto el peine para formar los pocillos en los que se depositará la muestra. La concentración de agarosa utilizada fue del 1%.

Muestras de 5  $\mu$ l del producto de PCR se depositan en los pocillos de los geles y se sumergen en el tampón Tris-Acetato (TAE). La electroforesis la realizamos a 100 voltios durante 30 minutos.

Los geles fueron teñidos durante 30 minutos en una solución de agua destilada con 0.5  $\mu$ g de bromuro de etidio por mililitro, lavadas

en agua destilada, y fotografiadas con una cámara Polaroid MP-4 Land Camera, usando una película tipo Polaroid 665.

Los tiempos, temperaturas y número de ciclos de las experiencias de PCR se muestran en la Tabla 3.

**Tabla 2.- Cebadores utilizados por cada una de las técnicas de PCR**

<b>CEBADOR</b>	<b>SECUENCIA 5'-3'</b>	<b>TAMAÑO PRODUCTO AMPLIFICADO</b>
<b>C1E</b>	<b>TCGTCACAGTTGCAGGCCTGGT</b>	<b>1,1 Kb</b>
<b>C2E</b>	<b>CGAAGTCTTATCCGCCGTAAAGT</b>	
<b>P<sub>20</sub></b>	<b>TATTTTATCAGCTTCAGT</b>	
<b>P<sub>40</sub></b>	<b>ACGTTACTGGTGACTTA</b>	<b>0,4 Kb</b>

**Tabla 3.- Protocolo de ciclos que se usaron en los dos métodos**

<b>TEMPERATURA (°C)</b>	<b>TIEMPO (seg)</b>	<b>Nº DE CICLOS</b>
<b>94</b>	<b>120</b>	<b>1</b>
<b>94</b>	<b>30</b>	
<b>55</b>	<b>30</b>	<b>35</b>
<b>72</b>	<b>60</b>	
<b>72</b>	<b>600</b>	<b>1</b>

**3.2.2.- UTILIZACIÓN DEL HIERRO POR *H. ALVEI***

**3.2.2.1.- CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA DE 2,2'-DIPYRIDYL**

La capacidad de crecimiento de cepas de *Hafnia alvei* bajo condiciones restrictivas de hierro mediante la adición al medio de cultivo (BHI agar) de un quelante del hierro, el 2,2'dipyridyl (Sigma), valoró la dependencia del hierro para la actividad metabólica de *H. alvei*, determinándose así la concentración mínima del quelante que es capaz de inhibir el crecimiento bacteriano (CMI).

Se preparó BHI agar con concentraciones decimales crecientes de 2,2'dipyridyl, desde 0,2 hasta 10 mM, observando la mínima concentración del quelante que era capaz de inhibir el crecimiento bacteriano de las diferentes cepas de *Hafnia alvei* tras una incubación durante 24-48 horas a 37°C.

**3.2.2.2.- PRODUCCIÓN DE SIDERÓFOROS**

La producción de sideróforos por parte de las diferentes cepas de *H. alvei* se analizó mediante el medio de cultivo descrito por B. SCHWYN y JB. NEILANDS (1987). El método que hemos utilizado es el universal para la detección de sideróforos, basándose en el cambio de color que experimenta el medio CAS agar (Chrome Azurol S) al producirse una disminución en el contenido del hierro presente en el medio, ya que está siendo utilizado por el metabolismo de la cepa bacteriana que está

creciendo. Los sideróforos, que presentan una alta afinidad por el hierro, extraen hierro del medio produciendo un cambio en la coloración del mismo de azul hacia anaranjado.

La composición del medio CAS agar es la siguiente:

		<u>Composición del medio MM9 x 10</u>	
Agua destilada	750 ml		
NaOH	6 g	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	3g
PIPES	30,24 g	NaCl	5g
10x MM9	100 ml	NH <sub>4</sub> Cl	10g
Agar	15 g	Agua destilada	1litro

Autoclavar y dejar enfriar hasta 50°C para posteriormente añadir:

Ácidos casamínos	30 ml
Glucosa al 20%	10 ml
1 M MgCl <sub>2</sub>	1 ml
100 mM CaCl <sub>2</sub>	1 ml
CAS-HDTMA	100 ml

pH final 6,8

A los ácidos casamínos, a una concentración del 10%, se les eliminó el exceso de hierro por agitación con igual volumen de cloroformo con un 3% de 8-hidroxiquinolina. La glucosa se esterilizó por filtración, mientras que el MgCl<sub>2</sub> y el CaCl<sub>2</sub> se esterizaron en autoclave a 121°C durante 15 minutos. El medio CAS-HDTMA está compuesto por una solución A que se prepara mezclando 605 mg de Chrome Azurol S en 500 ml de agua destilada, para posteriormente añadirle 100 ml de

### Material y Métodos

una solución 1mM de  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ . Una vez hecha esta solución, se añade lentamente la solución B, compuesta por 729 mg de HDTMA en 400 ml de agua destilada estéril.

Con las cepas de *Hafnia alvei* positivas a la síntesis de sideróforos por el método descrito por B. SCHWYN y JB. NEILANDS (1987) se procedió a la detección posterior de aerobactina y enterobactina mediante el método de R. PODSCHUN y cols. (1992). Dicho método consiste en elaborar un agar nutritivo suplementado con  $200\mu\text{M}$  de 2,2'-dipyridyl como agente quelante del hierro presente en el medio. Una vez autoclavado dicho medio, y cuando se alcance la temperatura de 40-50 grados se introduce una suspensión bacteriana del agente indicador de la producción de aerobactina o enterobactina. Dichos agentes indicadores son bacterias mutantes incapaces de crecer bajo condiciones restrictivas de hierro ( $200\mu\text{M}$  de 2,2'-dipyridyl), salvo que se encuentre presente en el medio aerobactina (cepa mutante de *E. coli* LG 1522) o enterobactina (cepa mutante de *Salmonella typhimurium* WR 1332). Ambas cepas mutantes fueron cedidas gentilmente por el Dr. RABSCH del ROBERT KOCH INSTITUT. Posteriormente, una vez solidificado el medio de cultivo con el agente indicador, y mediante un palillo estéril sembramos cada una de las cepas de *Hafnia alvei*. La aparición de un halo alrededor del crecimiento de *Hafnia alvei* representa un resultado positivo a la producción de aerobactina (con la cepa LG 1522 como agente indicador) o enterobactina (con la cepa WR 1332 como agente indicador) ya que ha permitido el crecimiento de la bacteria mutante indicadora. Como controles positivos y negativos hemos utilizado distintas cepas de *E. coli* productoras y no productoras de aerobactina y enterobactina.

### 3.2.3.- PRODUCCIÓN DE HEMÓLISIS

La obtención de la sangre se realizó mediante la punción de la vena caudal de dorada y trucha arcoiris, previa anestesia con 2-fenoxietanol (Panreac), en ejemplares de 300-400 gramos aproximadamente a los que se extrajo 3 ml de sangre entera. Mediante centrifugación y sucesivos lavados con PBS estéril obtenemos los eritrocitos lavados de ambas especies de peces. Para comparar los resultados, también se realizó esta prueba con hematíes de oveja a partir de sangre entera desfibrinada comercial (Oxoid).

Cada cepa de *Hafnia alvei* se cultivó a 37°C durante 48 horas en tubos con 10 ml de BHI líquido, adicionando 0.1 ml de diferentes suspensiones bacterianas de cada cepa de *Hafnia alvei* a una concentración de  $2 \times 10^8$  ufc/ml medidas en el espectrofotómetro (Spectra Shell) a una densidad óptica de 0.2 y longitud de onda de 620 nm. Posteriormente el medio se centrifugó, retirándose el sobrenadante para ser utilizado en el experimento. De este sobrenadante se realizan diluciones seriadas (1:2) desde  $\frac{1}{2}$  hasta  $\frac{1}{256}$  en microplacas de ELISA (Costar, Biosigma), adicionando igual cantidad (50µl) de una solución de eritrocitos al 3% en PBS, previamente lavados dos veces. Con los eritrocitos de las especies probadas las placas se incubaron a 25° y 18°C durante una hora, según el protocolo anteriormente descrito por PGH. PEERBOOMS y cols. (1983). El título con poder hemolítico queda definido como la última dilución del sobrenadante en el cual no son visibles los eritrocitos, es decir, la última dilución en la cual se produce la lisis completa de los hematíes. Como control positivo de la hemólisis se utilizó la cepa *Aeromonas hydrophila* J7 cedida gentilmente por el Dr.

### 3.2.4.- DETECCIÓN DE LAS FIMBRIAS

La expresión de las fimbrias tipo I (MSHA) y tipo III (MRHA) fue determinada tal y como describieron anteriormente R. PODSCHUM y H. SAHLY (1991), empleándose eritrocitos de cobaya y también de dorada y trucha arcoiris con la finalidad de comparar los resultados.

Para la detección de las fimbrias tipo I, sembramos cada cepa en 5 ml de TSB (Cultimed) y las incubamos en agitación a 37°C durante 8 horas. Obtenemos una suspensión bacteriana de  $2 \times 10^8$  ufc/ml mediante espectrofotometría (Spectra Shell) a una densidad óptica de 0.2 y longitud de onda de 620 nm. Posteriormente centrifugamos a 3000 rpm durante 20 minutos a 4°C. Lavamos el precipitado con PBS y volvemos a centrifugar, resuspendiéndolo en PBS en una cantidad 100 veces menor que la inicial para obtener una concentración de  $10^{10}$  ufc/ml. La hemoaglutinación se observa mezclando 15 microlitros de la suspensión bacteriana con igual volumen de una suspensión de PBS con un 3% de eritrocitos de cobaya, para posteriormente agitarlo suavemente durante 3 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente se incuba durante 10 minutos a 4°C y se procede a su lectura. La hemaglutinación positiva aparecerá en los casos en que existan adhesinas presentes, y la observaremos como una película homogénea de eritrocitos que se depositan en el fondo de la placa. Una vez determinadas las cepas con poder hemoaglutinante con los hematíes de las distintas especies

probadas, repetimos el experimento pero adicionando 50 mM de D-manosa a la suspensión bacteriana antes de su mezcla con los eritrocitos. Aquellas cepas que con la adición de la D-manosa se les inhiba su capacidad hemoaglutinante frente a los eritrocitos de cobaya se les considerará como cepa MSHA (hemaglutinación sensible a la manosa), determinándose así la presencia del pili tipo I (PODSCHUN y SAHLY, 1991).

Para la detección de las fimbrias tipo III, procedemos de igual manera que en el caso anterior, pero sometiendo a los hematíes a un baño en PBS con un 0.001% de ácido tánico (Sigma) durante 15 minutos, previo a la mezcla con la bacteria. Una vez determinadas las cepas con poder hemoaglutinante en hematíes sometidos a este tratamiento previo, repetimos el experimento adicionando un 4% de D-manosa a la suspensión bacteriana antes de su mezcla con los eritrocitos. Aquellas cepas que con la adición de la D-manosa no se les inhiba su capacidad hemoaglutinante frente a los eritrocitos de cobaya tratados con ácido tánico se les considerará como cepa MRHA (hemaglutinación resistente a la manosa), determinándose así la presencia del pili tipo III (PODSCHUN y SAHLY, 1991).

Estos mismos experimentos los hemos realizado a modo comparativo utilizando también eritrocitos de dorada y de trucha arcoiris.

Los sueros de los que hemos medido el efecto bactericida frente a las distintas cepas de *Hafnia alvei* fueron extraídos a partir de 10 doradas de un peso aproximado de 300 gramos, mezclándose a continuación con el fin de homogeneizar los resultados. Utilizamos la metodología descrita anteriormente por C. HUGHES y cols. (1982) modificada por R. PODSCHUN y cols. (1991). Para ello realizamos una suspensión bacteriana a una concentración de  $2 \times 10^6$  ufc por ml en PBS a partir de un cultivo previo en BHI agar (Cultimed) incubado durante 18 horas a 37°C para obtener la fase de estado de crecimiento exponencial. Una vez realizada la suspensión ajustamos el inóculo a  $2 \times 10^8$  ufc por ml en el espectrofotómetro (Spectra Shell) a una densidad óptica de 0.2, leído con una longitud de onda de 620 nm, para posteriormente, y por medio de su dilución centesimal, llevar el inóculo hasta  $2 \times 10^6$  ufc/ml, comparando los resultados mediante el conteo directo de una alícuota en placa de cultivo. Añadimos 25  $\mu$ l de esta suspensión a 75  $\mu$ l de suero, y lo mezclamos en una microplaca. Finalmente incubamos a 25 y 18°C respectivamente durante un periodo máximo de 3 horas, cuantificando el número de bacterias que contiene el inóculo tras cada hora de incubación. Este experimento lo realizamos tanto con suero de dorada (*Sparus aurata*, L.) como con suero de trucha arcoiris (*Oncorhynchus mykiss*).

Como control se realiza la descomplementación del suero sometiéndolo a 55°C durante 30 minutos, procediendo a realizar el mismo experimento que en el apartado anterior para determinar la existencia o no de diferencias en el índice de viabilidad final entre el

suero problema y el suero control.

La viabilidad, para el suero problema se determinó inmediatamente (a tiempo cero) y 1, 2 y 3 horas tras la incubación, mientras que para el suero control se determinó a tiempo cero, 1 y 3 horas. Después de mezclar, las muestras se diluyen seriadamente, y se llevan sobre BHI agar para realizar el conteo directo tras la incubación. Según la viabilidad bacteriana, los niveles de resistencia al efecto bactericida del suero que presenta cada cepa se representaron en una gráfica, donde el eje de las “*y*” representa el % de viabilidad, y el eje de las “*x*” el tiempo transcurrido de incubación.

Cada cepa fue analizada por triplicado, considerándose resistentes al efecto bactericida del suero aquellas cepas que tras 3 horas de incubación mostraban un porcentaje de viabilidad superior al 100% (DAVIES, 1991), respecto al inóculo inicial.

### 3.3.- PATOGENICIDAD DE *HAFNIA ALVEI* EN DORADA

#### 3.3.1.- ANIMALES SOMETIDOS A ESTUDIO

Para nuestro estudio hemos utilizado la dorada (*Sparus aurata*, L.). Los peces eran ejemplares de aproximadamente 15 gramos procedentes de la empresa ADSA, S.A. situada en la localidad Juan Grande del sur de la Isla de Gran Canaria, siendo transportados al laboratorio en lotes pequeños para evitar el estrés en tanques con oxígeno puro mediante difusores. Los animales fueron mantenidos en tanques de 100 litros en circuito cerrado con cambios parciales de agua cada 2 días con aireación del agua mediante difusores durante un periodo de 10 días para su aclimatación previa a los ensayos, comprobándose la ausencia de algún signo que hiciera sospechar el desarrollo de alguna enfermedad. Durante este periodo se seleccionaron aleatoriamente algunos de estos animales y se comprobó que estaban libres de patógenos mediante análisis microbiológico de sus órganos internos.

#### 3.3.2.- DETERMINACIÓN DE LA DOSIS LETAL 50 (DL50)

Con la finalidad de conocer la susceptibilidad de la dorada frente a *Hafnia alvei* realizamos experiencias de dosis letal 50 para determinar la respuesta de la dorada frente a una infección aguda frente a distintas cepas de esta bacteria. Los peces se mantuvieron en tanques de 30 litros a 18-21°C con aireación constante mediante difusores alimentados por un compresor de aire. Durante la experiencia los animales se

mantuvieron en circuito cerrado con cambios parciales de agua cada dos días.

Para cada cepa estudiada se hacen siete lotes de 8 peces cada uno, los cuales se corresponden con cada una de las diluciones seriadas de *Hafnia alvei* a utilizar en la experiencia de dosis letal 50 (de  $10^8$  hasta  $10^2$  ufc/pez) más un lote control.

Cada cepa a utilizar se siembra en medio Infusión Cerebro Corazón líquido (Cultimed) y se deja en agitación a 22-25°C durante 18-24 horas para obtener un cultivo fresco en fase exponencial. Al cabo de ese tiempo se centrifuga el medio a 4000 r.p.m. durante 20 minutos, se retira el sobrenadante y el precipitado se lava dos veces con PBS. El precipitado obtenido se resuspende en la misma solución tampón, y se ajusta a una concentración final aproximada de  $3 \times 10^9$  u.f.c./ml por medio del espectrofotómetro Spectronic 20D. A partir de aquí, se hacen diluciones seriadas decimales hasta una concentración de  $3 \times 10^3$  u.f.c./ml. De cada una de estas diluciones hemos sembrado una alícuota en BHI agar para contabilizar y conocer el número exacto de ufc/ml en cada caso.

Cada lote recibe 0.1 ml de una suspensión bacteriana a concentraciones decrecientes desde  $10^9$  hasta  $10^3$  ufc/ml en el procedimiento de inoculación vía intraperitoneal, mientras que los ocho peces del grupo control se inocularon con 0.1 ml de PBS por la misma vía.

## Material y Métodos

Las cepas de *Hafnia alvei* utilizadas en la inoculación experimental para determinar su DL<sub>50</sub> en dorada fueron un total de siete: 2566/83, OR-1/96, 187/95, 1967/82, C34/90, X1/96 y F4319/95. Los datos sobre el origen y procedencia de estas cepas pueden apreciarse en la Tabla 1. Hemos seleccionado estas cepas por cumplir uno o varios de los siguientes motivos: 1) haber sido aisladas en el Archipiélago Canario (187/95), 2) haberse aislado a partir de peces enfermos o no enfermos (2566/83 y C34/90), y 3) comprobada virulencia previa en peces (X1/96, OR-1/96, 1967/82 y F4319) (RODRÍGUEZ y cols., 1998).

Para el cálculo de la DL<sub>50</sub> seguimos la metodología descrita anteriormente por J.L. REED y M. MUENCH (1938), expresando su valor la dosis de *Hafnia alvei* capaz de matar al 50% de los peces inoculados. Para la determinación de la DL<sub>50</sub>, primero se calcula la distancia proporcional (DP), para posteriormente, y mediante la fórmula  $x = \logaritmo \text{ de la dosis que mata más del } 50\% - DP$ , determinar la DL<sub>50</sub> como  $10^x$ , siendo la DP:

$$DP = \frac{\%mortalidad >50\% - 50\%}{\% mortalidad >50\% - \%mortalidad}$$

La mortalidad de los peces fue tenida en cuenta hasta quince días después de que cesaran las muertes de todos los grupos inoculados. Los peces inoculados y los peces control que tuvieron que ser sacrificados al final de la fase experimental fueron mantenidos a temperatura de refrigeración y sometidos a necropsia reglada, y seguidamente se obtuvieron muestras para su posterior estudio microbiológico, histopatológico e inmunohistoquímico.

### 3.3.3.- INOCULACIÓN DE *HAFNIA ALVEI* PARA INDUCIR UNA INFECCIÓN CRÓNICA

Con la finalidad de conocer las consecuencias epidemiológicas y patogénicas de la infección de curso crónico de esta especie bacteriana en dorada realizamos varias experiencias de inoculaciones experimentales. Utilizamos doradas con un peso aproximado de 15 gramos. Los peces se mantuvieron en tanques de 100 litros a 18-21°C con aireación constante mediante difusores alimentados por un compresor. También en este caso los peces se mantuvieron con un circuito cerrado, realizando cambios parciales de agua cada dos días.

Para cada cepa estudiada hicimos 6 lotes de 25 peces cada uno, de los cuales 3 se inocularon con una suspensión bacteriana de *Hafnia alvei* a una concentración  $10^7$ - $10^6$  ufc/pez, mientras que los otros 3 lotes correspondían a los peces controles. La inoculación se hizo de la siguiente manera: un lote con una sola inoculación al comienzo de la experiencia (a tiempo cero), otro lote con dos inoculaciones a un intervalo de 15 días entre una inoculación y la siguiente (a tiempo cero y día 15), y el tercer lote mediante 3 inoculaciones separadas con 4 días entre una y otra (a tiempo cero, día 4 y día 8). Los tres lotes del grupo control se inocularon con el mismo procedimiento pero con PBS estéril y fueron mantenidos en las mismas condiciones que los peces inoculados con la bacteria hasta el final de la experiencia (TESHIMA y cols., 1992).

Cada cepa a utilizar se sembró en medio BHI Agar (Cultimed) y se incubó en agitación a 22-25°C durante 18-24 horas para obtener un cultivo fresco en fase exponencial. Al cabo de ese tiempo centrifugamos

## *Material y Métodos*

el medio a 4000 r.p.m. durante 20 minutos, retiramos el sobrenadante y el precipitado se lavó dos veces con PBS. El precipitado obtenido lo resuspendimos en la misma solución tampón, y se ajustó a una concentración final aproximada entre  $10^8$  y  $10^7$  u.f.c./ml. Cada pez experimental se inoculó con 0.1 ml de la suspensión bacteriana por vía intraperitoneal, mientras que los peces de los grupos control se inocularon con 0.1 ml de PBS utilizando la misma vía.

Las cepas de *Hafnia alvei* utilizadas en la inoculación experimental para determinar la patogenicidad de *Hafnia alvei* en el curso crónico de la infección fueron tres: 2566/83, 187/95 y C34/90. Los datos sobre el origen y procedencia de estas cepas pueden apreciarse en la Tabla 1. Estas cepas las seleccionamos de todas las utilizadas en la experiencia anterior en función de haber sido aisladas de cuadros de enfermedad en peces (2566/83 y C34/90) o haberla aislado directamente en nuestras islas (187/95).

Para la determinación del grado de patogenicidad de *Hafnia alvei* en dorada en una infección experimental de curso crónico seguimos la metodología descrita anteriormente por C.TESHIMA y cols. (1992). La posible mortalidad de los peces inoculados fue evaluada entre 1-90 días postinoculación. Los peces inoculados y los testigos, que tuvieron que ser sacrificados al final de la fase experimental, fueron mantenidos a temperatura de refrigeración y sometidos a necropsia reglada, y seguidamente se obtuvieron muestras para su posterior estudio microbiológico, histopatológico e inmunohistoquímico.

### 3.3.4.- ESTUDIO ANATOMOPATOLÓGICO

Para el análisis anatomopatológico se tomaron muestras de riñón, hígado, bazo, intestinos y sistema nervioso, que fueron fijadas en solución tamponada de formol al 10%, embebidas en parafina y posteriormente cortadas con el microtomo en láminas de unas 4  $\mu\text{m}$ . A continuación se procedió a la tinción de los cortes histológicos con hematoxilina-eosina para su estudio histopatológico. Esta fase fue realizada en coordinación con la Unidad de Anatomía Patológica de la Facultad de Veterinaria de Las Palmas de Gran Canaria. La evaluación de la intensidad de la reacción inflamatoria encontrada se hizo atendiendo a que los campos visualizados mostraran aproximadamente un 100% (muy intensa), 50-75% (intensa), 25-50% (ligera) y menos del 25% de reacción (muy ligera), respectivamente.

### 3.3.5.- ESTUDIO INMUNOHISTOQUÍMICO

De todas las técnicas inmunohistoquímicas existentes, la peroxidasa-antiperoxidasa (PAP) según describen J. MARTÍN DE LAS MULAS y cols. (1990) fue la técnica de elección a la hora de realizar dicho estudio con las adaptaciones descritas por F. ACOSTA y cols. (2002) a partir de las muestras tomadas en las experiencias anteriores de infección aguda o crónica de dorada con *Hafnia alvei*. La finalidad fue demostrar la presencia de *Hafnia alvei* en estos tejidos con independencia de las lesiones encontradas. Para ello tuvimos que elaborar previamente un antisuero policlonal anti-*Hafnia alvei*.

## Material y Métodos

La obtención del antisuero policlonal anti-*Hafnia alvei* se realizó según la metodología descrita por E. HARLOW y D. LANE (1988) y F. ACOSTA y cols. (2002), utilizándose 2 conejos de unos 2 Kg de peso de raza californiana, procedentes de una explotación con un alto nivel sanitario. La granja corresponde a un colectivo que desparasita y vacuna sus ejemplares periódicamente frente a mixomatosis, enfermedad vírica hemorrágica y enterotoxemia. Ambos animales fueron adaptados a nuestro animalario y periódicamente inspeccionados para garantizar su buen estado de salud previo a la inmunización durante dos semanas.

A cada animal se le administró 2 ml de un inóculo compuesto por 1ml de una suspensión de *Hafnia alvei* inactivada y 1 ml de Adyuvante de Freund incompleto (Sigma). La suspensión inactivada de *Hafnia alvei* se realizó con un cultivo en el medio BHI líquido (Cultimed) de la cepa de *Hafnia alvei* 187/95, a 37°C durante 24 horas con agitación continua y suave. Posteriormente se lavó dos veces la suspensión bacteriana centrifugando el medio a 3000 rpm durante 5 minutos, retiramos el sobrenadante y resuspendemos el centrifugado en PBS. Finalmente, tomamos el centrifugado y se resuspende en PBS adicionándole un 5°/∞ de formol e incubando durante 24 horas a 37°C para inactivar las bacterias. A las 24 horas tomamos una alícuota de la suspensión y la sembramos en un Agar Sangre (Cultimed) a 37°C durante 24 horas para garantizar la inexistencia de bacterias vivas.

Cada conejo recibió los 2 ml del inóculo (1ml de la suspensión de *Hafnia alvei* inactivada y 1 ml de Adyuvante de Freund incompleto) repartidos en 10 puntos de inyección subcutánea por diversas zonas del cuerpo.

Tras 5 semanas desde la primera inoculación, se les aplicó una segunda dosis con el mismo inóculo, para provocar así una buena hiperinmunización. A los 15 días de esta segunda inoculación se procedió a la sangría completa de los conejos (previamente anestesiados mediante la aplicación subcutánea de una solución compuesta por 0.2 ml de acepromacina y 0.4 ml de ketamina) por punción cardíaca.

Una vez obtenida la sangre se centrifugó a 3000 rpm durante 5 minutos, y el suero se conservó a -80°C para ser usado en el estudio inmunohistoquímico.

El procesado de las secciones de los órganos para el análisis inmunohistoquímico comienza con el desparafinado de las muestras sometiéndolas a baños de xilol en tres pases de 10, 5 y 5 minutos respectivamente. Posteriormente se sumergen en una solución de alcohol al 100% y se procede al bloqueo de la peroxidasa endógena sumergiendo las secciones de los órganos en una solución de metanol absoluto con un 3% de peróxido de hidrógeno durante 30 minutos. Tras este periodo se somete a las secciones a baños de 5 minutos en alcohol de graduación decreciente (100%, 96% y 70% respectivamente). Las secciones posteriormente se aclaran en agua destilada (2 pases) y PBS durante 5 minutos antes de someterlas a la acción de la pronasa al 0.1% durante 10 minutos. Posteriormente, las secciones se someten a baño en PBS durante otros 5 minutos.

Tras el baño con PBS se somete a los tejidos a la acción de suero normal de cabra al 10% en PBS durante 30 minutos para posteriormente exponerlos durante toda la noche al anticuerpo primario,

## Material y Métodos

que en este caso es el antisuero policlonal anti-*Hafnia alvei* obtenido de los conejos. Este antisuero policlonal, a título 1:500, se encontraba a su vez diluido en suero normal de cabra al 10% en PBS.

A la mañana siguiente, las secciones se aclaran 3 veces durante 5 minutos cada una en PBS, para posteriormente incubarlas 30 minutos en el anticuerpo secundario (anticuerpos biotinilados frente a IgG de conejo obtenidos en cerdo a título 1:200) diluido en suero normal de cabra al 10%.

Después de aclarar tres veces durante 5 minutos con PBS las secciones fueron expuestas al anticuerpo terciario (complejo avidina-biotina) durante 60 minutos en oscuridad y temperatura ambiente. Tras esta incubación se someten a las secciones a dos baños de 5 minutos en PBS y uno de acetato buffer durante 10 minutos.

Tras estos pasos se procede al revelado con 3-amino-9-etil-carbazol (Sigma) durante 5 minutos en agitación suave. Después de este proceso se lava durante 5 minutos en agua corriente y se sumergen las secciones durante 5 minutos en una solución de Hematoxilina de Mayer. Tras unos lavados de 10 minutos en agua destilada y agua corriente, se procede al montaje de las secciones en medio acuoso (Immunount; Shandon, Pittsburgh, PA).

Tejido hepático de aves infectadas de forma natural y de ratones infectados de forma experimental con la cepa de *Hafnia alvei* 187/95 fueron usados como controles positivos. Los controles negativos

consistieron en la sustitución del suero anti-*H. alvei* por suero normal de cabra al 10%.

La intensidad de la respuesta obtenida en cada muestra evaluada se determinó como muy intensa, intensa o ligera en función de que los campos visualizados mostraran aproximadamente un 100%, 50-75% y menos de un 25% de reacción positiva, respectivamente.

### 3.3.6.- ESTUDIO MICROBIOLÓGICO

Para el estudio microbiológico, se tomaron muestras de riñón, hígado y bazo, que sembramos en Mac Conkey agar (Difco) y Agar Sangre (Cultimed) adicionado con un 2% de cloruro sódico. Las placas fueron incubadas a 25 °C durante 24-48 horas en ambiente aerobio. Para confirmar que la bacteria aislada se correspondía con *Hafnia alvei*, cada aislamiento fue sometido a una batería de pruebas clásicas de identificación (SMIBERT y KRIEG, 1981), ayudándonos en ocasiones con el perfil que nos facilitó el sistema API-20E (Biomerieux, Madrid, España). Estas pruebas fueron enumeradas con detalle en el punto 3.1.3 del presente capítulo.

# *Resultados*

---

## 4.- RESULTADOS

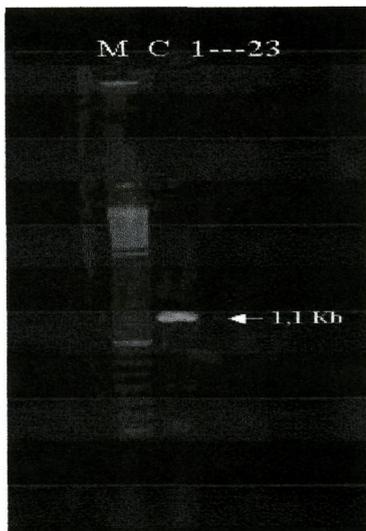
### 4.1.- FACTORES DE VIRULENCIA DE LAS CEPAS DE *HAFNIA ALVEI*

#### 4.1.1.-PRESENCIA DEL GEN *EAE* EN LAS CEPAS DE ESTUDIO

Una vez realizada la prueba de la PCR con los dos juegos de cebadores, el C1E-C2E y P<sub>20</sub>-P<sub>40</sub>, en ninguno de los dos casos se detectó el gen *eae* en alguna de las 23 cepas de *Hafnia alvei* analizadas (Figuras 1 y 2. Tabla 13). Así pues, ninguna de las cepas analizadas presenta en su genoma la existencia de este gen que le atribuye a las cepas que lo poseen mayor virulencia, permitiéndole a la bacteria ocultarse entre las microvellosidades intestinales provocando una destrucción focal, la íntima adherencia entre la bacteria y la membrana de los enterocitos y la acumulación de filamentos de actina polimerizada, provocando fuertes cambios en el citoesqueleto del enterocito bajo el área de localización de la bacteria. Los controles positivos de cada reacción amplificaron el fragmento del gen *eae* esperado, siendo de 1,1 Kb para el juego de cebadores C1E-C2E (Figura 1) y 0,4 Kb para los cebadores P<sub>20</sub>-P<sub>40</sub> (Figura 2).

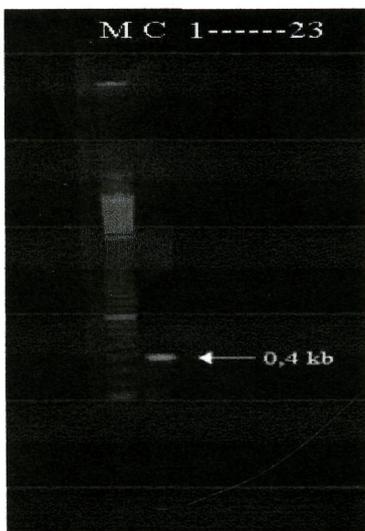
## Resultados

### Figura 1.- PCR con el juego de cebadores C1E y C2E



- M Marcador de peso molecular de 100 pares de bases
- C Cepa control positiva 2348/69
- 1---23 Resultado de las cepas analizadas de *H. alvei*

### Figura 2.- PCR con el juego de cebadores P<sub>20</sub> y P<sub>40</sub>



- M Marcador de peso molecular de 100 pares de bases
- C Cepa control positivo *E. coli* RC541
- 1-----23 Resultado de las cepas analizadas de *H. alvei*

**4.1.2.- UTILIZACIÓN DEL HIERRO POR *HAFNIA ALVEI*****4.1.2.1.-CÁLCULO DE LA CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA DEL QUELANTE DE HIERRO 2,2'-DIPYRIDYL**

Las distintas cepas de *Hafnia alvei* estudiadas mostraron diferente susceptibilidad frente a la escasa disponibilidad de hierro producida por la adición al medio de cultivo del quelante 2,2'-dipyridyl. La cepa que mostró una mayor resistencia frente a la acción del quelante fue la LM 25/65, siendo capaz de crecer con concentraciones de 1 mM de 2,2'-dipyridyl (Figuras 3 y 4). Por el contrario, la cepa X1 fue la que mostró una mayor susceptibilidad frente a la falta de hierro biodisponible para el metabolismo bacteriano, ya que era incapaz de crecer con una concentración de 2,2'-dipyridyl en el medio por encima de los 0.2 mM.

Si agrupamos todas las cepas estudiadas en función de su resistencia a iguales concentraciones del quelante 2,2'-dipyridyl, tenemos en el Grupo I las cepas con una concentración mínima inhibitoria (CMI) de 0,2 mM de 2,2'-dipyridyl, estando representada únicamente por la cepa X1 (Figuras 3 y 4) . Con una CMI de 0,4 mM de 2,2'-Dipyridyl (Grupo II) encontramos a las cepas LM 14/67, LM 30/65, ATCC 9760 y 2566/83 (Figuras 3 y 4). Las cepas con una CMI de 0,6 mM se incluyen en el grupo III, que abarca a las cepas LM 11/69, OR-1, 4094/83, 1967/83, 842/81, LM 7/67, LM 24/65, LM 23/65, F4319, C34, LM 19/68, LM 7/68, 4256/83, OU-3 y OU-4 (Figuras 3 y 4). Con una CMI de 0,8 mM de 2,2'-Dipyridyl se

### Resultados

encuentran las cepas ATCC 13337 y 187/95 (Grupo IV), mientras que la cepa LM 25/65 es la que posee una CMI superior, siendo posible su crecimiento cuando se alcanza en el medio una concentración de 2,2'-Dipyridyl de 1 mM (Grupo V) (Figuras 3 y 4).

**Figura 3. Agrupación de las cepas de *Hafnia alvei* según la capacidad de crecimiento con una determinada concentración mínima inhibitoria de 2,2'-dipyridyl presente en el medio**

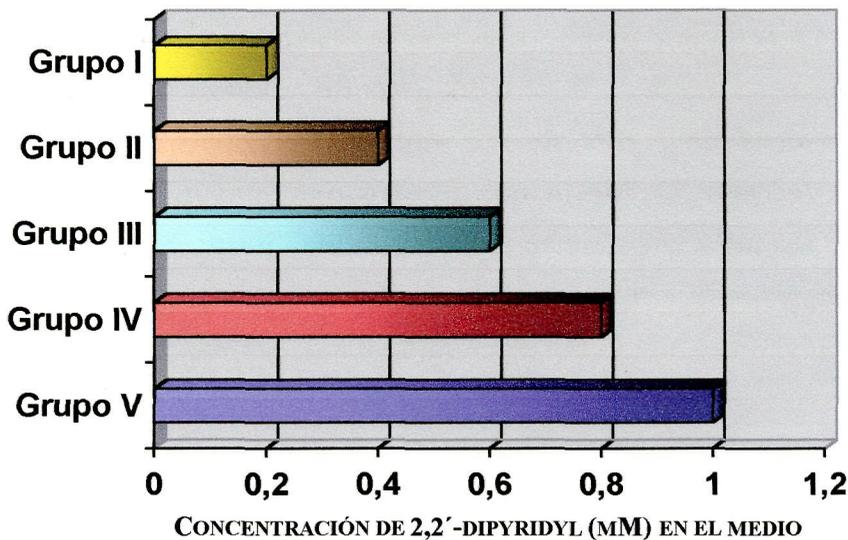
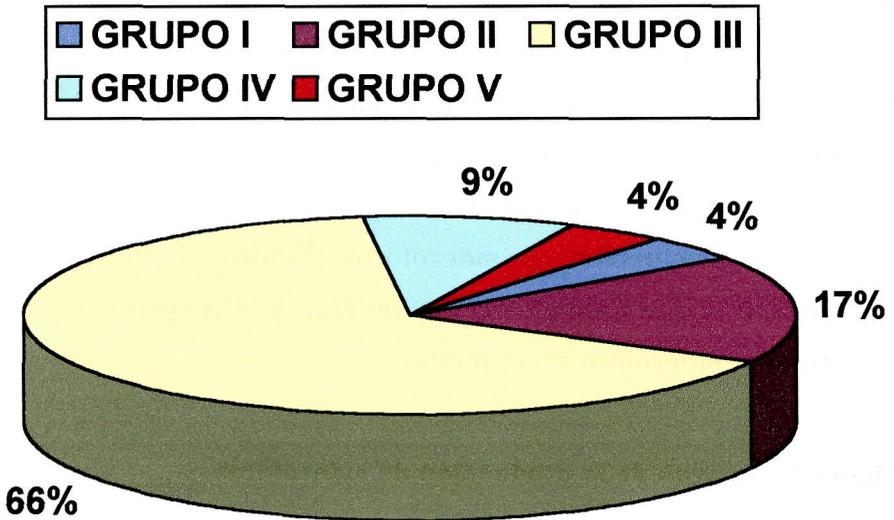


Figura 4.- Porcentaje de las cepas de *Hafnia alvei* encuadradas en los diferentes grupos por su comportamiento frente a 2,2'-dipyridyl presente en el medio

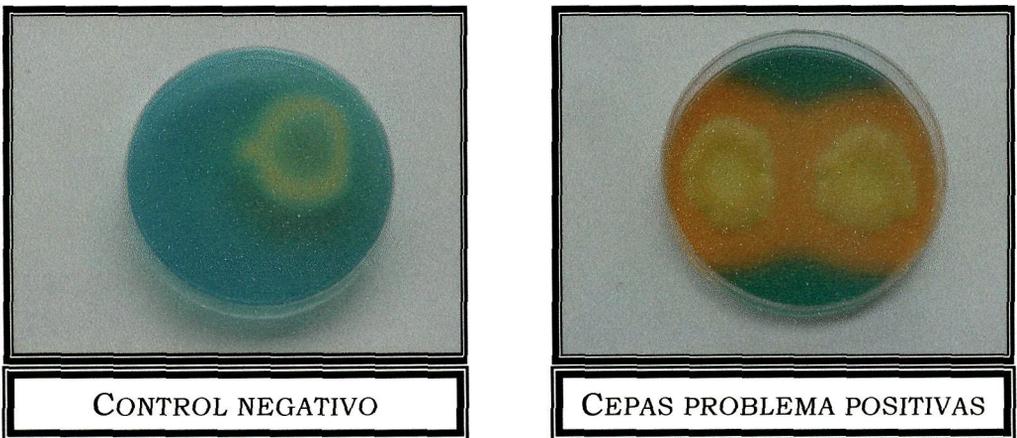


## Resultados

### 4.1.2.2.- PRODUCCIÓN DE SIDERÓFOROS

Tras el ensayo realizado según la metodología anteriormente descrita por B. SCHWYN y JB. NEILANDS (1987), el 100% de las cepas de *Hafnia alvei* analizadas produjeron una reacción positiva en el medio Chrome Azurol S agar por medio del viraje de coloración de azul hacia un halo amarillo alrededor de cada cepa de *Hafnia alvei* analizada, evidenciándose así la capacidad de captación de hierro del medio mediante la producción de sideróforos (Figura 5). Podemos de esta forma asegurar que todas las cepas de *Hafnia alvei* probadas producen algún tipo de sideróforo en el medio.

**Figura 5.- Imagen de la producción de sideróforos**



Una vez detectada la capacidad de síntesis de sideróforos por parte de cada una de las cepas de *Hafnia alvei*, se procedió al análisis individual de cada cepa para determinar si alguna de estas cepas era

capaz de sintetizar aerobactina y/o enterobactina, dos tipos de sideróforos producidos por enterobacterias relacionados con aumento en la virulencia de las cepas.

Ninguna de las 23 cepas de *Hafnia alvei* analizadas (100%) demostró la capacidad de sintetizar aerobactina o enterobactina. Los controles positivos y negativos representados por las cepas K311 (control positivo para la producción de aerobactina), W112 (control negativo aerobactina), cepa 390 (control positivo para la producción de enterobactina) y la cepa H1887 (control negativo de enterobactina) dieron los resultados esperados.

#### 4.1.3.- PRODUCCIÓN DE HEMÓLISIS

Ninguna de las titulaciones realizadas de los diferentes sobrenadantes de las 23 cepas de *Hafnia alvei* empleadas hemolizaron los hematíes de dorada. En el caso de los hematíes de trucha arcoiris los resultados fueron los mismos al no producirse la hemólisis de los eritrocitos de trucha. En ambos casos, estos resultados los obtuvimos tanto tras la incubación a 18°C como a 25°C. La cepa empleada como control positivo, *Aeromonas hydrophyla* J7, produjo hemólisis hasta la titulación 1/4 de su sobrenadante.

## *Resultados*

### **4.1.4.- HEMAGLUTINACIÓN FRENTE A ERITROCITOS DE COBAYA, DORADA Y TRUCHA ARCOIRIS**

El efecto hemaglutinante de las cepas probadas frente a eritrocitos de cobaya, dorada y trucha arcoiris fue muy similar con pequeños matices de diferencia, aunque la hemaglutinación resultó ser más sensible cuando se utilizaron hematíes de cobaya.

La hemaglutinación de eritrocitos de cobaya sensible a la manosa (MSHA) fue detectada en las cepas ATCC 13337, LM 11/69, 4256/83, 1967/82, LM 7/67, LM 24/65, F4319, LM 7/68 y OU-4, representando el 39% de las cepas de *Hafnia alvei* analizadas (Tablas 4 y 13), por lo que hemos considerado en estas cepas la presencia de las fimbrias pili tipo I.

En la experiencia de detección del pili tipo III, la resistencia a la hemaglutinación de hematíes de cobaya con un tratamiento previo de ácido tánico con la adición de un 4% de manosa (MRHA) se evidenció en las cepas 4256/83, 1967/82, LM 7/67, LM 24/65, LM 7/68 y LM 11/69, representando un 26% del total de cepas de *Hafnia alvei* analizadas (Tablas 4 y 13). Como se observa en la tabla 4 en casi todas las cepas en las que detectamos el pili tipo III habíamos encontrado también el tipo I, salvo en las cepas ATCC 13337, F4319 y OU-4.

De una forma similar a los resultados expuestos, en la experiencia realizada con hematíes de dorada la hemaglutinación sensible a manosa sólo fue observada en las cepas 4256/83, 1967/82

y LM 7/67, representando el 13% de total de cepas analizadas (Tabla 4). En la experiencia con hematíes de trucha arcoiris, sólo la cepa 4256/83 produjo una hemaglutinación sensible a la presencia de la manosa (Tabla 4).

En la experiencia realizada con hematíes de dorada previamente tratados con el ácido tánico, la hemaglutinación resistente a la manosa sólo fue observada en las cepas 4256/83 y LM 24/65 representando el 8.6% de total de cepas analizadas (Tabla 4). En esta misma experiencia con hematíes de trucha arcoiris, ninguna cepa produjo una hemaglutinación resistente a la manosa (Tabla 4).

## Resultados

**Tabla 4.- Hemaglutinación de las cepas de *Hafnia alvei* con eritrocitos de cobaya, dorada y trucha arcoiris**

CEPA	COBAYA		DORADA		TRUCHA ARCOIRIS	
	MSHA	MRHA	MSHA	MRHA	MSHA	MRHA
187/95	-	-	-	-	-	-
C34	-	-	-	-	-	-
2566/83	-	-	-	-	-	-
ATCC 13337	+	-	-	-	-	-
X1	-	-	-	-	-	-
LM 14/67	-	-	-	-	-	-
LM 30/65	-	-	-	-	-	-
LM 25/65	-	-	-	-	-	-
OR-1	-	-	-	-	-	-
ATCC 9760	-	-	-	-	-	-
4094/83	-	-	-	-	-	-
4256/83	+	+	+	+	+	-
1967/82	+	+	+	-	-	-
842/81	-	-	-	-	-	-
LM 7/67	+	+	+	-	-	-
LM 24/65	+	+	-	+	-	-
LM 23/65	-	-	-	-	-	-
F4319	+	-	-	-	-	-
LM 19/68	-	-	-	-	-	-
LM 7/68	+	+	-	-	-	-
OU-3	-	-	-	-	-	-
OU-4	+	-	-	-	-	-
LM 11/69	+	+	-	-	-	-

**MSHA.** - HEMAGLUTINACIÓN SENSIBLE A MANOSA  
**MRHA.** - HEMAGLUTINACIÓN RESISTENTE A MANOSA

**(+)** HEMAGLUTINACIÓN POSITIVA  
**(-)** HEMAGLUTINACIÓN NEGATIVA

**4.1.5.- EFECTO BACTERICIDA DEL SUERO DE DORADA**

Los resultados de la sensibilidad de las 23 cepas de *Hafnia alvei* analizadas frente al efecto bactericida del suero se pueden observar en las Tablas 5 a 8. Los resultados se expresan como porcentaje de bacterias viables de la cepa analizada en las dos temperaturas de incubación utilizadas. En ambos casos se representan a su vez los controles de cada una de las experiencias. Los resultados muestran el valor medio de cada lectura, que fue realizado por triplicado.

Según la interpretación de RL. DAVIES (1991), únicamente se considera a una cepa resistente al efecto bactericida del suero cuando tras 3 horas de incubación presenta un porcentaje de viabilidad superior al 100%. De aquí que sólo dos cepas clínicas de *Hafnia alvei* 187/95 (Tabla 5 y 13) y 4256/83 (Tabla 6 y 13) fueron resistentes al efecto bactericida del suero a las dos temperaturas analizadas (18 y 25°C), representando un 8.7% del total de las cepas analizadas. Sin embargo, las cepas de colección LM 23/65 (Tabla 7 y 13), LM 25/65 (Tabla 6 y 13), LM 24/65 (Tabla 7 y 13), LM 19/68 (Tabla 8 y 13) y F4319 (Tabla 7 y 13) sólo fueron resistentes a la temperatura de 25°C, representando el 21.7% del total de las cepas analizadas, que junto a las cepas 187/95 y 4256/83 (resistentes a ambas temperaturas), hacen que un total del 30.4% de las cepas sea resistente al efecto bactericida del suero de dorada a la temperatura de 25°C.

De las tres cepas utilizadas en la experiencia de infección experimental crónica, la cepa 187/95 es la que presenta una mayor

## Resultados

resistencia al efecto bactericida del suero de dorada con índices de viabilidad a las tres horas del 101.2% a 18°C y 142.5% a 25°C (Tabla 5). La cepa 2566/83 presenta una sensibilidad intermedia a la acción del complemento del suero puesto que tras tres horas de incubación, el porcentaje de bacterias viables se situó en el 37.6% a 18°C y 52% a 25°C (Tabla 5). Por el contrario, la cepa C34 muestra una elevadísima sensibilidad a la acción del complemento del suero de dorada puesto que la viabilidad se sitúa a las citadas temperaturas en el 9.7% y 5.3%, respectivamente (Tabla 5).

De las cepas empleadas en la experiencia de infección aguda, la única que presenta resistencia al efecto bactericida del suero a las dos temperaturas analizadas es la cepa 187/95 ya mencionada anteriormente, mientras que la cepa F4319 sólo presentó resistencia al citado efecto a la temperatura de 25°C con un nivel de bacterias viables del 134.4%, mientras que a 18°C el índice se situó en el 61.5% (Tabla 7). Por el contrario, con una sensibilidad intermedia están la cepa 2566/83 ya mencionada anteriormente, así como la X1, ésta última con unos índices de viabilidad del 47% a 18°C y 57.5% a 25°C (Tabla 5), la cepa OR-1 que muestra unos valores de 33.8% y 64.6%, respectivamente (Tabla 6) y la cepa 1967/82 con unos valores de viabilidad del 19.1% y 49%, respectivamente (Tabla 7). La otra cepa empleada en el estudio de la infección aguda por *Hafnia alvei* en dorada (cepa C34, ya citada) presentó una elevada sensibilidad al efecto bactericida del suero de la dorada.

De las cepas no empleadas en las experiencias de inoculación, las que presentaron resistencia al efecto bactericida del suero a la temperatura de 18° y/o 25°C fueron la LM 25/65 (Tabla 6), 4256/83 (Tabla 6), LM 24/65 (Tabla 7), LM 23/65 (Tabla 7), y la cepa LM 19/68 (Tabla 8), cuyos resultados se reflejan con exactitud en las tablas correspondientes. Por el contrario, mostraron sensibilidad al efecto bactericida del suero de dorada haciendo la lectura a 18 y a 25°C las cepas LM 11/69 (Tabla 8), OU-4 (Tabla 8), OU-3 (Tabla 8), LM 7/68 (Tabla 8), 842/81 (Tabla 7), LM 30/65 (Tabla 6), 4094/83 (Tabla 6), LM 7/67 (Tabla 7), LM 14/67 (Tabla 5), ATCC 13337 (Tabla 5) y ATCC 9760 (Tabla 6 ).

Haciendo la lectura a 25°C el suero control se comportó, como era de esperar, con unos valores similares a una cepa que diera resistencia frente al suero, lo cual nos permite ratificar los resultados obtenidos con todos los sueros problemas a esta temperatura, mientras que haciendo la lectura tras la incubación a 18°C, algunos sueros control no alcanzaron el límite superior del 100% que representaría el nivel de resistencia frente al suero problema.

A modo de resumen hemos agrupado el global de cepas analizadas en tres modelos diferentes de resistencia al efecto bactericida del suero de dorada que expresan gráficamente lo ocurrido a lo largo de las tres horas de duración de la experiencia (Figuras 6 a 8). El modelo I agrupa a todas aquellas cepas que presentan resistencia al efecto bactericida del suero de dorada medido a 25°C (porcentaje de viabilidad a las tres horas superior al 100%), mientras

## *Resultados*

---

que los modelo II y III agrupan cepas de *Hafnia alvei* con diferente grado de sensibilidad, incluyendo el modelo II a cepas con sensibilidad intermedia (viabilidad entre el 100 y el 20%), mientras que en el modelo III se incluyen aquellas cepas de *Hafnia alvei* con elevada sensibilidad al efecto bactericida del suero de dorada (viabilidad inferior al 20%).

**Tabla 5.- Resistencia al efecto bactericida del suero de dorada de las cepas 187/95, C34, 2566/83, ATCC 13337, X1 y LM 14/67, medido como porcentaje de viabilidad en diferentes tiempos de incubación.**

CEPA	18° C		25° C	
	SUERO PROBLEMA	SUERO CONTROL	SUERO PROBLEMA	SUERO CONTROL
<b>187/95</b>				
UNA HORA	106.2	126.2	87.5	153.7
DOS HORAS	80	----	72.5	----
TRES HORAS	101.2	167.5	142.5	231.2
<b>C34</b>				
UNA HORA	80.7	92.1	45.6	122.1
DOS HORAS	23.1	----	11.6	----
TRES HORAS	9.7	101.3	5.3	141.9
<b>2566/83</b>				
UNA HORA	55.6	95.7	43	106.8
DOS HORAS	34.1	----	41.6	----
TRES HORAS	37.6	112.8	52	122.9
<b>ATCC 13337</b>				
UNA HORA	44	65	59	74.5
DOS HORAS	15	----	19.7	----
TRES HORAS	10	171	16.1	190
<b>X1</b>				
UNA HORA	35	106	30	108
DOS HORAS	35.5	----	37.7	----
TRES HORAS	47	166.5	57.5	190.5
<b>LM 14/67</b>				
UNA HORA	16	103	31.5	147
DOS HORAS	8.6	----	13.1	----
TRES HORAS	6.2	159.5	12	207

## Resultados

**Tabla 6.- Resistencia al efecto bactericida del suero de dorada de las cepas LM 30/65, LM 25/65, OR-1, ATCC 9760, 4094/83 y 4256/83, medido como porcentaje de viabilidad en diferentes tiempos de incubación.**

CEPA	18° C		25° C	
	SUERO PROBLEMA	SUERO CONTROL	SUERO PROBLEMA	SUERO CONTROL
<b>LM 30/65</b>				
UNA HORA	78.5	101	75	132.5
DOS HORAS	73	----	67	----
TRES HORAS	83.5	112.5	85	157
<b>LM 25/65</b>				
UNA HORA	66.5	83.7	79.8	117.5
DOS HORAS	63.5	----	93.4	----
TRES HORAS	74.3	90.1	130.7	162.5
<b>OR-1</b>				
UNA HORA	34.8	91.2	48.2	105.1
DOS HORAS	38.9	----	38.4	----
TRES HORAS	33.8	127.1	64.6	160.4
<b>ATCC 9760</b>				
UNA HORA	57.9	92	59.7	102.7
DOS HORAS	24.6	----	12	----
TRES HORAS	13.4	96.1	7.3	148.3
<b>4094/83</b>				
UNA HORA	30.2	82.4	57.5	106.8
DOS HORAS	46	----	42.3	----
TRES HORAS	43.9	119.7	27.2	169.6
<b>4256/83</b>				
UNA HORA	121.1	126	109	169.6
DOS HORAS	72.6	----	98.1	----
TRES HORAS	111.4	270.6	140.5	314.5

**Tabla 7.- Resistencia al efecto bactericida del suero de dorada de las cepas 1967/82, 842/81, LM 7/67, LM 24/65, LM 23/65 y F4319 medido como porcentaje de viabilidad en diferentes tiempos de incubación.**

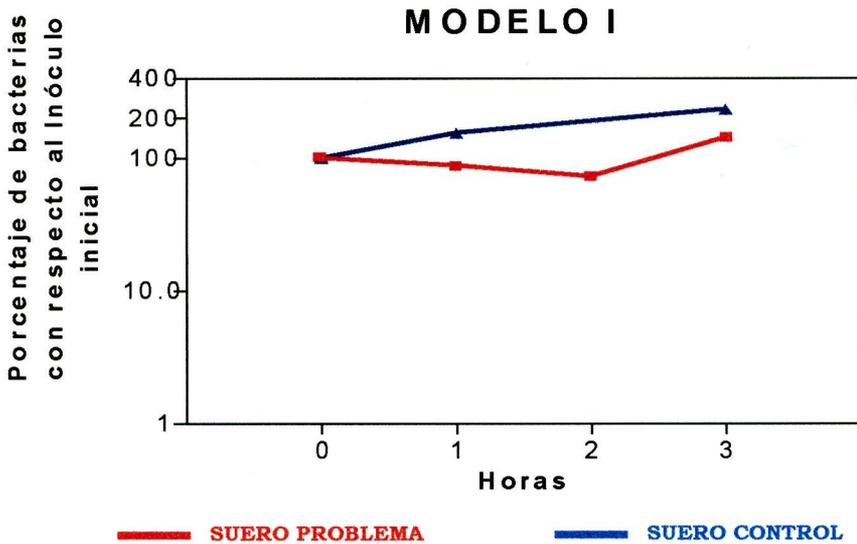
CEPA	18° C		25° C	
	SUERO PROBLEMA	SUERO CONTROL	SUERO PROBLEMA	SUERO CONTROL
<b>1967/82</b>				
UNA HORA	41.7	57.1	55.1	86.5
DOS HORAS	35.2	---	37.5	---
TRES HORAS	19.1	78.6	49	120.4
<b>842/81</b>				
UNA HORA	59.3	86.1	87	101.4
DOS HORAS	72.8	---	82.6	---
TRES HORAS	74.6	128.4	79.9	142.3
<b>LM 7/67</b>				
UNA HORA	50.1	67.6	46.6	87.4
DOS HORAS	38.4	---	57.9	---
TRES HORAS	32	92.6	52.7	107.7
<b>LM 24/65</b>				
UNA HORA	106.2	127.8	98.2	158.5
DOS HORAS	113.2	---	135.8	---
TRES HORAS	97.5	156.5	157	285.6
<b>LM 23/65</b>				
UNA HORA	72.1	77.9	72.7	94.2
DOS HORAS	62.3	---	62.3	---
TRES HORAS	63.8	195.8	109	230.4
<b>F4319</b>				
UNA HORA	90.2	117.9	138.4	174.3
DOS HORAS	116.8	---	126.1	---
TRES HORAS	61.5	137.4	134.4	208.2

## Resultados

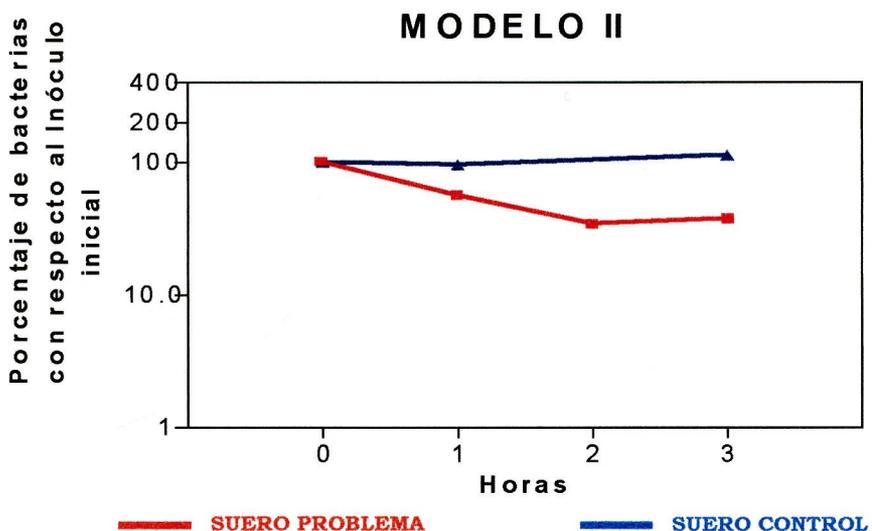
**Tabla 8.- Resistencia al efecto bactericida del suero de dorada de las cepas LM 19/68, LM 7/68, OU-3, OU-4 y LM 11/69, medido como porcentaje de viabilidad en diferentes tiempos de incubación**

CEPA	18° C		25° C	
	SUERO PROBLEMA	SUERO CONTROL	SUERO PROBLEMA	SUERO CONTROL
<b>LM 19/68</b>				
UNA HORA	78.2	104.3	114.7	121.9
DOS HORAS	90.4	----	94.7	----
TRES HORAS	74.7	132.6	105.2	169.9
<b>LM 7/68</b>				
UNA HORA	64.8	82.1	31.5	109.1
DOS HORAS	25.3	----	68	----
TRES HORAS	19.4	94.2	73.7	283.7
<b>OU-3</b>				
UNA HORA	112.5	160.5	82.1	196.6
DOS HORAS	62.6	----	57.2	----
TRES HORAS	59.7	193.6	37.1	213.1
<b>OU-4</b>				
UNA HORA	88.7	90.2	79.1	138.6
DOS HORAS	30.6	----	38.6	----
TRES HORAS	23.4	118.8	20.4	180.6
<b>LM 11/69</b>				
UNA HORA	68.8	69.9	42.8	54.2
DOS HORAS	42.8	----	51.2	----
TRES HORAS	52.1	87.8	57.1	140

**Figura 6.- Modelo I de resistencia al efecto bactericida del suero de dorada (cepas 187/95, LM 25/65, 4256/83, LM 24/65, LM 23/65, F4319 y LM 19/68)**

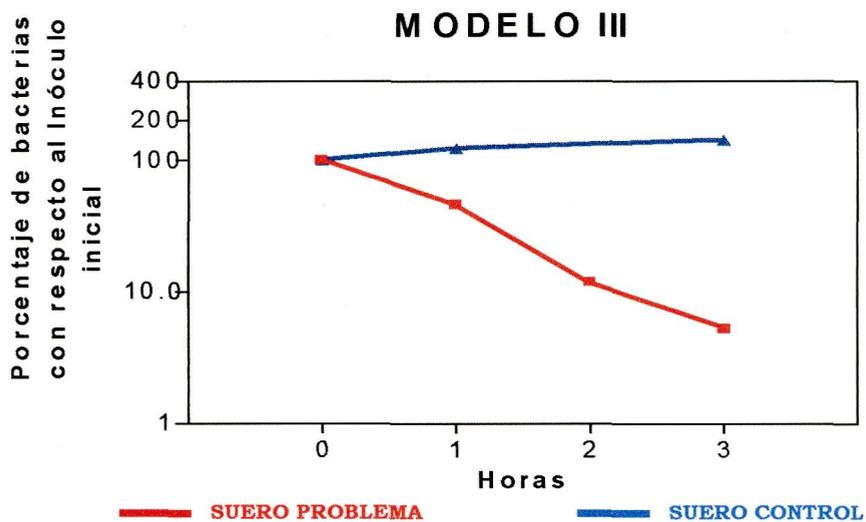


**Figura 7.- Modelo II de resistencia al efecto bactericida del suero de dorada (cepas 2566/83, X1, LM 30/65, OR-1, 4094/83, LM 11/69, 1967/82, 842/81, 7/67, 7/68, OU-3 y OU-4)**



## Resultados

**Figura 8.- Modelo III de resistencia al efecto bactericida del suero de dorada (cepas C34, ATCC 13337, LM 14/67 y ATTCC 9760)**



**4.1.6.- EFECTO BACTERICIDA DEL SUERO DE TRUCHA ARCOIRIS**

En los experimentos realizados con el suero de trucha arcoiris, la resistencia al efecto bactericida del suero fue mayor que en el caso de la experiencia con suero de dorada. Las cepas de *Hafnia alvei* que presentaron resistencia a dicho efecto en la lectura realizada a las temperaturas de 18 y 25°C fueron la 2566/83 (Tabla 9 y 13), ATCC 9760 (Tabla 10 y 13), 4094/83 (Tabla 10 y 13), LM 24/65 (Tabla 11 y 13), F4319 (Tabla 11 y 13), LM 14/67 (Tabla 9 y 13) y LM 7/68 (Tabla 12 y 13), representando un 30,4% del total de cepas analizadas, mientras que las cepas 1967/82 (Tabla 11 y 13), 842/81 (Tabla 11 y 13) y LM 19/68 (Tabla 12 y 13) sólo fueron resistentes a la temperatura de 25°C, representando un total del 43,4% de cepas resistentes a la temperatura de 25°C.

De las tres cepas utilizadas en la experiencia de infección crónica en dorada, la cepa 2566/83 es la única que presenta resistencia al efecto bactericida del suero de trucha con índices de viabilidad a las tres horas del 124.7% a 18°C y 175.2% a 25°C (Tabla 9). La cepa 187/95 presenta una sensibilidad intermedia al suero de trucha ya que tras tres horas de incubación, la viabilidad se sitúa en el 40.3% a 18°C y 56% a 25°C (Tabla 9). Al igual que ocurre en la experiencia con suero de dorada, la cepa C34 presenta una elevadísima sensibilidad a la acción del complemento del suero de trucha arcoiris puesto que la viabilidad se sitúa por debajo del 0.1% para ambas temperaturas (Tabla 9).

## *Resultados*

---

De las cepas empleadas en la inoculación experimental para la determinación de la dosis letal 50 ( $DL_{50}$ ) en dorada, las cepas F4319, y 2566/83 presentaron resistencia al efecto bactericida del suero a las dos temperaturas analizadas, mostrando la última citada una viabilidad del 124.7% y del 175.2 %, respectivamente (Tabla 9), y del 138.9% y 172.9% la cepa F4319 (Tabla 11), mientras que la cepa 1967/82 sólo presentó resistencia a la temperatura de 25°C con una viabilidad del 151.9% (Tabla 11). Por el contrario, las cepas X1 (5.1 y 0.5%, respectivamente) (Tabla 9), OR-1 (6.6 y 6.6%, respectivamente) (Tabla 2), y C34 (0.1 y 0.1%, respectivamente) (Tabla 9) mostraron una elevadísima sensibilidad, mientras que la otra cepa empleada en este estudio (187/95), presentó una sensibilidad intermedia, con una viabilidad del 40.3 y 56% (Tabla 9).

De las cepas no empleadas en las experiencias de inoculación experimental en dorada para determinar la  $DL_{50}$ , las que presentaron resistencia al efecto bactericida del suero de trucha arcoiris a las dos temperaturas empleadas fueron las cepas LM 7/68 (Tabla 12), LM 14/67 (Tabla 9), 4094/83 (Tabla 10), ATCC 9760 (Tabla 10) y LM 24/65 (Tabla 11), mientras que las cepa 842/81 (Tabla 11) y LM 19/68 (Tabla 12) sólo lo fueron a la temperatura de 25°C . Por el contrario, mostraron una sensibilidad intermedia a las dos temperaturas las cepas ATCC 13337 (Tabla 9), 4256/83 (Tabla 10) y OU-3 (Tabla 12), mientras que con una elevada sensibilidad a ambas temperaturas se encuentran las cepas LM 30/65 (Tabla 10), LM 25/65 (Tabla 10), LM 7/67 (Tabla 10), LM 23/65 (Tabla 11), OU-4 (Tabla 12) y LM 11/69 (Tabla 12).

Al igual que con la experiencia realizada con suero de dorada, hemos agrupado al global de cepas en tres diferentes modelos de resistencia al efecto bactericida del suero de trucha arcoiris que expresan gráficamente lo ocurrido a lo largo de las tres horas de duración de la experiencia (Figuras 9 a 11). El modelo I agrupa a todas aquellas cepas que presentan resistencia al efecto bactericida del suero de trucha medido a 25°C (viabilidad superior al 100%), mientras que los modelo II y III agrupan cepas de *Hafnia alvei* con diferente grado de sensibilidad, incluyendo el modelo II a cepas con sensibilidad intermedia (viabilidad entre el 100 y el 20%), mientras que en el modelo III se incluyen aquellas cepas de *Hafnia alvei* con elevada sensibilidad al efecto bactericida del suero de dorada (viabilidad inferior al 20%).

## Resultados

**Tabla 9.- Resistencia al efecto bactericida del suero de trucha arcoiris de las cepas 187/95, C34, 2566/83, ATCC 13337, X1, LM 14/67 y LM 30/65, medido como porcentaje de viabilidad en diferentes tiempos de incubación.**

CEPA	18° C		25° C	
	SUERO PROBLEMA	SUERO CONTROL	SUERO PROBLEMA	SUERO CONTROL
<b>187/95</b>				
UNA HORA	50.4	125.4	64.9	132.2
DOS HORAS	48.7	----	67.2	----
TRES HORAS	40.3	156.9	56	399.9
<b>C34</b>				
UNA HORA	15.5	91.9	31.1	145.5
DOS HORAS	0.2	----	2±	----
TRES HORAS	0.1	111.6	0.1	272.7
<b>2566/83</b>				
UNA HORA	112.5	137.7	109.2	187.9
DOS HORAS	122.4	----	141.07	----
TRES HORAS	124.7	208.1	175.24	310.94
<b>ATCC 13337</b>				
UNA HORA	91.6	120.3	73.3	147.8
DOS HORAS	58.4	----	32	----
TRES HORAS	59.5	132.9	26.9	469.9
<b>X1</b>				
UNA HORA	98.6	99.9	8.6	107.9
DOS HORAS	21.7	----	2.1	----
TRES HORAS	5.1	109.3	0.5	433.3
<b>LM 14/67</b>				
UNA HORA	55.1	98.6	63.2	134.3
DOS HORAS	67.3	----	97.9	----
TRES HORAS	129.9	192.9	157.3	222.4

**Tabla 10.- Resistencia al efecto bactericida del suero de trucha arcoiris de las cepas las cepas LM 25/65, OR-1, ATCC 9760, 4094/83, 4256/83 y 1967/82, medido como porcentaje de viabilidad en diferentes tiempos de incubación.**

CEPA	18° C		25° C	
	SUERO PROBLEMA	SUERO CONTROL	SUERO PROBLEMA	SUERO CONTROL
<b>LM 30/65</b>				
UNA HORA	47.9	118	80.2	141.34
DOS HORAS	6.8	----	43.1	----
TRES HORAS	0.1	155.5	6.9	160.3
<b>LM 25/65</b>				
UNA HORA	54.4	83.6	29.9	141.6
DOS HORAS	40.8	----	14.2	----
TRES HORAS	19	111.1	16.3	285.7
<b>OR-1</b>				
UNA HORA	28.6	99.9	15.3	166.6
DOS HORAS	9.9	----	9.3	----
TRES HORAS	6.6	104.9	6.6	213.3
<b>ATCC 9760</b>				
UNA HORA	116.4	170.3	114.83	236
DOS HORAS	141.4	----	165.52	----
TRES HORAS	161.7	279.3	258.1	570.3
<b>4094/83</b>				
UNA HORA	114.9	166.7	50.2	149.6
DOS HORAS	124.9	----	113.8	----
TRES HORAS	167.7	257.8	182.4	273.4
<b>4256/83</b>				
UNA HORA	79.7	93.8	76.8	142.5
DOS HORAS	68.3	----	38.4	----
TRES HORAS	56.9	115.2	79.7	247.6

## Resultados

**Tabla 11.- Resistencia al efecto bactericida del suero de trucha arcoiris de las cepas 842/81, LM 7/67, LM 24/65, LM 23/65, F4319, LM 19/68 y LM 7/68, medido como porcentaje de viabilidad en diferentes tiempos de incubación.**

CEPA	18° C		25° C	
	SUERO PROBLEMA	SUERO CONTROL	SUERO PROBLEMA	SUERO CONTROL
<b>1967/82</b>				
UNA HORA	72.8	90.4	91.3	180.4
DOS HORAS	70.1	----	59.5	----
TRES HORAS	62.2	120.4	151.9	358.9
<b>842/81</b>				
UNA HORA	71.4	107.5	78.9	139.4
DOS HORAS	70.1	----	82.3	----
TRES HORAS	85.9	121	179.8	529.4
<b>LM 7/67</b>				
UNA HORA	2.3	61.9	1.4	85.8
DOS HORAS	0.9	----	0.5	----
TRES HORAS	0.1	67	0.1	270.9
<b>LM 24/65</b>				
UNA HORA	139.3	212.4	177.5	332.4
DOS HORAS	150.3	----	99.3	----
TRES HORAS	153.1	357.2	111.7	499.4
<b>LM 23/65</b>				
UNA HORA	7.6	103.2	2.1	105.9
DOS HORAS	1.2	----	0.3	----
TRES HORAS	0.8	124.1	0.1	285.7
<b>F4319</b>				
UNA HORA	120.9	135.8	108.2	170.8
DOS HORAS	98.6	----	166.5	----
TRES HORAS	138.9	274.7	172.9	790.4

**Tabla 12.- Resistencia al efecto bactericida del suero de trucha arcoiris de las cepas OU-3 LM 19/68, LM 7/68, OU-3, OU-4 y LM 11/69, medido como porcentaje de viabilidad en diferentes tiempos de incubación.**

CEPA	18° C		25° C	
	SUERO PROBLEMA	SUERO CONTROL	SUERO PROBLEMA	SUERO CONTROL
<b>LM 19/68</b>				
UNA HORA	72.7	79.9	84	129
DOS HORAS	71.8	----	100.8	----
TRES HORAS	65.4	117.2	104.5	332.6
<b>LM 7/68</b>				
UNA HORA	85.3	104.1	146.6	171.6
DOS HORAS	46.4	----	119.1	----
TRES HORAS	127.3	182.4	172.3	447.9
<b>OU-3</b>				
UNA HORA	110	156.2	80.6	192.5
DOS HORAS	59.3	----	51.8	----
TRES HORAS	53.7	187.5	27.5	286.8
<b>OU-4</b>				
UNA HORA	7.6	94	6.1	153
DOS HORAS	0.1	----	3	----
TRES HORAS	0	153.8	0.1	223.4
<b>LM 11/69</b>				
UNA HORA	18.4	73.8	51.6	159.9
DOS HORAS	0.2	----	2.4	----
TRES HORAS	0.1	98.4	0.1	246.1

Resultados

Figura 9.- Modelo I de resistencia al efecto bactericida del suero de trucha arcoiris (cepas 2566/83, LM 14/67, ATCC 9760, 4094/83, LM 24/65, F4319, 1967/82, 842/81, LM 19/68 y LM 7/68)

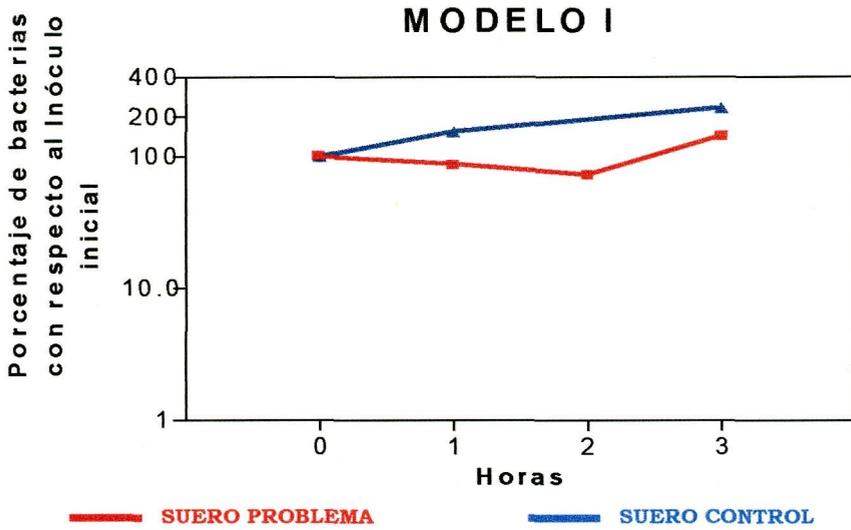


Figura 10.- Modelo II de resistencia al efecto bactericida del suero de trucha arcoiris (cepas 187/95, ATCC 13337, 4256/83 y OU-3)

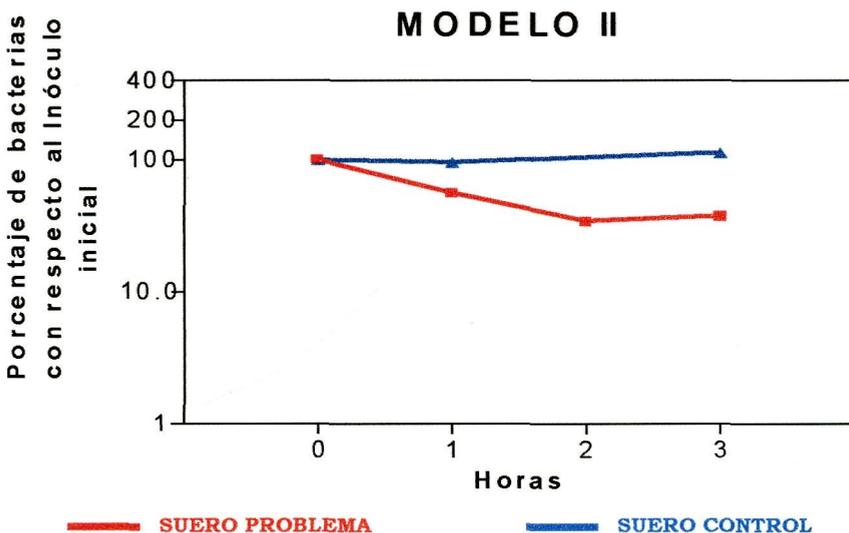
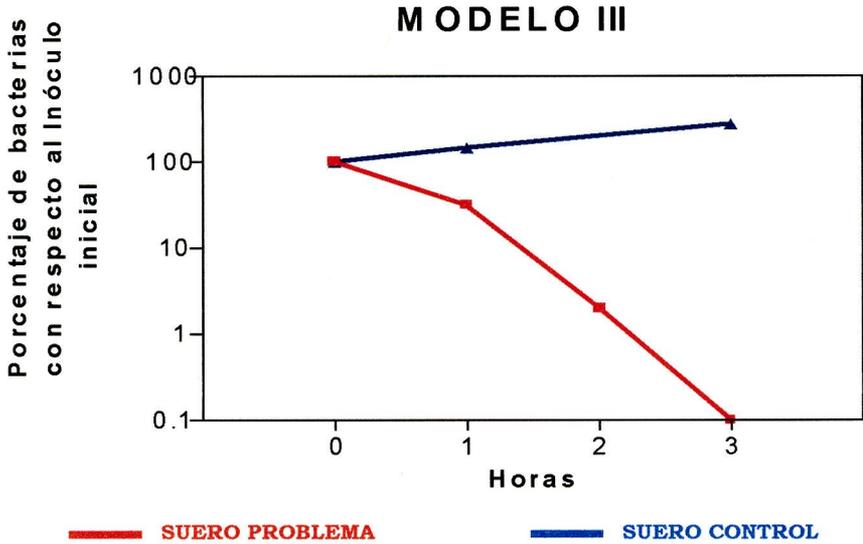


Figura 11.- Modelo III de resistencia al efecto bactericida del suero de trucha arcoiris (cepas C34, X1, LM 7/67, LM 23/65, LM 25/65, OR-1, LM 30/65, OU-4 y LM 11/69)



*Resultados*

**TABLA 13.- RESUMEN DE EXPRESIÓN DE FACTORES DE VIRULENCIA DE HAFNIA ALVEI EN LAS CEPAS DE NUESTRO ESTUDIO**

	187/95	2566/83	C34	ATCC 13337	X1	LM 14/67
GEN EAE	-	-	-	-	-	-
ENTEROBACTINA	-	-	-	-	-	-
AEROBACTINA	-	-	-	-	-	-
HEMÓLISIS**	-	-	-	-	-	-
MSHA***	-	-	-	+	-	-
MRHA***	-	-	-	-	-	-
RESISTENCIA SUERO*	+	-	-	-	-	-

	LM 30/65	LM 25/65	OR-1	ATCC 9760	4094/83	4256/83
GEN EAE	-	-	-	-	-	-
ENTEROBACTINA	-	-	-	-	-	-
AEROBACTINA	-	-	-	-	-	-
HEMÓLISIS**	-	-	-	-	-	-
MSHA***	-	-	-	-	-	+
MRHA***	-	-	-	-	-	+
RESISTENCIA SUERO*	-	+	-	-	-	+

	1967/82	842/81	LM 7/67	LM 24/65	LM 23/65	F4319
GEN EAE	-	-	-	-	-	-
ENTEROBACTINA	-	-	-	-	-	-
AEROBACTINA	-	-	-	-	-	-
HEMÓLISIS**	-	-	-	-	-	-
MSHA***	+	-	+	+	-	+
MRHA***	+	-	+	+	-	-
RESISTENCIA SUERO*	-	-	-	+	+	+

	LM 19/68	LM 7/68	OU-3	OU-4	LM 11/69
GEN EAE	-	-	-	-	-
ENTEROBACTINA	-	-	-	-	-
AEROBACTINA	-	-	-	-	-
HEMÓLISIS**	-	-	-	-	-
MSHA***	-	+	-	+	+
MRHA***	-	+	-	-	+
RESISTENCIA SUERO*	+	-	-	-	-

\*RESISTENCIA AL SUERO.- MEDIDA A 25°C EN SUERO DE DORADA

\*\*HEMOLISIS.- MEDIDA CON HEMATÍES DE DORADA

\*\*\*MSHA Y MRHA.- MEDIDA CON HEMATÍES DE COBAYA

## 4.2.- EVALUACIÓN DE LA PATOGENICIDAD DE VARIAS CEPAS DE HAFNIA ALVEI EN DORADA

### 4.2.1.- CÁLCULO DE LAS DOSIS LETALES 50

En ninguna de las experiencias de inoculación experimental en dorada para determinar la dosis letal 50 con las cepas de *Hafnia alvei* 2566/83, OR-1, 187/95, 1967/82, C34, X1 y F4319 se produjo alguna mortalidad mientras duró la experiencia, a las dosis inoculadas vía intraperitoneal de  $10^8$  a  $10^2$  ufc/pez, determinándose así que las  $DL_{50}$  de todas las cepas analizadas se situaban por encima de  $10^8$  ufc/pez. La dosis exacta inicial de inóculo que se utilizó en cada caso, a partir de la que se hicieron las posteriores diluciones para cada cepa, puede apreciarse en la Tabla 14.

**Tabla 14.- Dosis inicial de *Hafnia alvei* inoculada en la experiencia de  $DL_{50}$**

CEPA	DOSIS INICIAL INOCULADA*
<b>187/95</b>	4.3 X $10^8$ ufc/pez
<b>C34</b>	2.1 X $10^8$ ufc/pez
<b>X1</b>	3.3 X $10^8$ ufc/pez
<b>OR-1</b>	3.7 X $10^8$ ufc/pez
<b>F4319</b>	2.8 X $10^8$ ufc/pez
<b>1967/82</b>	4.9 X $10^8$ ufc/pez
<b>2566/83</b>	2.6 X $10^8$ ufc/pez

\* dosis calculada con posterioridad mediante el contejo en placa

En ninguna de las experiencias de inoculación se observó sintomatología clínica evidente como natación errática, hemorragias oculares, petequias cutáneas, exoftalmia o hinchazón del abdomen. El único signo clínico evidente fue el oscurecimiento externo del pez hasta

## Resultados

los 2 ó 3 días postinoculación, que hemos achacado al estrés de su manipulación, ya que los controles presentaron igual sintomatología durante el mismo periodo de tiempo.

Una vez acabada la experiencia (15 días postinoculación sin que se produjera muerte alguna) de inoculación experimental y seguimiento de los peces inoculados para la determinación de la DL<sub>50</sub> se procedió al sacrificio de todos los animales mediante la sobredosificación anestésica con 2-fenoxietanol para su posterior estudio microbiológico, anatomopatológico e inmunohistoquímico.

### **4.2.1.1.- RESULTADOS MICROBIOLÓGICOS**

En todas las experiencias de inoculación con las diferentes cepas de *Hafnia alvei* empleadas para la determinación de sus DL<sub>50</sub>, se recuperó la cepa inoculada tras la finalización de la experiencia, en cultivo puro a partir de riñón, hígado y bazo, en los peces que correspondían a los lotes que recibieron las dosis comprendidas entre 10<sup>5</sup> y 10<sup>8</sup> ufc/pez. Las cepas se aislaron en cultivo puro tras el sacrificio de los animales, y se identificaron como *Hafnia alvei* tras someterlas a una batería de pruebas clásicas (REAL y cols., 1997) y complementarias como el sistema de identificación API-20E. A dosis de 10<sup>2</sup>, 10<sup>3</sup> y 10<sup>4</sup> ufc/pez, la recuperación de la cepa inoculada en la experiencia sólo fue posible para las cepas 187/95, 2566/83, F4319 y OR-1.

#### **4.2.1.2.- RESULTADOS ANATOMOPATOLÓGICOS E INMUNO-HISTOQUÍMICOS**

Desde el punto de vista anatomopatológico las lesiones que se observan en todas las doradas de las experiencias de inoculación con las cepas 2566/83, OR-1, 187/95, 1967/82, C34, X1 y F4319 para la determinación de sus DL<sub>50</sub>, se corresponden a procesos inflamatorios granulomatosos de tipo local en donde predominan las células de tipo mononuclear (macrófagos y linfocitos), linfoblastos y células polimorfonucleares en los tejidos que a continuación detallamos.

En dichas experiencias las lesiones se localizan fundamentalmente en el mesenterio en forma de peritonitis granulomatosa (Figura 12) en todos los ejemplares, aunque también se han podido observar lesiones inflamatorias focales en hígado, así como nefritis granulomatosa en riñón (Figura 13) y ligera esplenitis granulomatosa. En todos estos casos, la técnica inmunohistoquímica demostró la asociación entre las lesiones observadas y la presencia de bacterias en estos tejidos.

#### **4.2.2.- EVALUACIÓN DE LA INFECCIÓN CRÓNICA**

En ninguna de las tres experiencias de inoculación experimental para determinar la patogenicidad a largo plazo (3 meses) de la infección por *Hafnia alvei* con las cepas 2566/83, 187/95 y C34, se produjeron muertes entre los animales sujetos a estudio. Asimismo, tampoco se observó la aparición de sintomatología clínica evidente en los grupos de

## Resultados

peces inoculados una, dos y tres veces con las diferentes cepas de *Hafnia alvei* probadas en esta experiencia.

Igual que ocurrió en la experiencia de determinación de la DL<sub>50</sub>, sólo se apreció el oscurecimiento de los peces 2 ó 3 días postinoculación, siendo al igual que en el caso anterior debido al estrés producido por la manipulación de los animales en las etapas previas.

Finalizada la experiencia y sacrificados todos los peces mediante sobredosis anestésica realizamos su estudio microbiológico, anatomopatológico e inmunohistoquímico.

### **4.2.2.1.- RESULTADOS MICROBIOLÓGICOS**

En las tres experiencias de inoculación realizadas en esta fase, indistintamente con cada una de las cepas de *Hafnia alvei* probadas se recuperaron de todos los peces y en todos los tiempos de muestreo (uno, dos y tres meses) las cepas inoculadas, en cultivo puro, a partir de riñón e hígado, así como en el bazo pero en menor medida, identificándose como *Hafnia alvei* mediante metodología clásica de pruebas bioquímicas (REAL y cols., 1997) y el sistema API 20-E, excepto en la experiencia realizada con la cepa C34, en la que no se logró el aislamiento de la cepa inoculada en el segundo y tercer muestreos realizados a los 60 y 90 días respectivamente de iniciada la experiencia en el lote de peces inoculados una sola vez al inicio de la misma. Por el contrario, en los lotes de peces inoculados con esa cepa C34 dos y tres veces según el protocolo de

infección experimental, sí fue posible el aislamiento de la cepa en cultivo puro a partir de riñón. En las experiencias con las cepas 187/95 y 2566/83 se recuperó la bacteria en todos los lotes y en los tres tiempos de muestreo (a los 30, 60 y 90 días de iniciada la experiencia, respectivamente).

#### **4.2.2.2.- RESULTADOS ANATOMOPATOLÓGICOS E INMUNO-HISTOQUÍMICOS**

##### **Experiencia de inoculación con la cepa 187/95**

Debido a que los resultados obtenidos son bastante diferentes con cada cepa utilizada, expondremos los datos obtenidos para cada una de ellas.

##### a) Inoculados una sola vez al inicio de la experiencia

En el primer muestreo (a los 30 días) se observa una intensa reacción inflamatoria granulomatosa en peritoneo, así como pequeños focos inflamatorios en parénquima hepático caracterizados por la presencia de macrófagos y linfocitos. En riñón medio se observan centros melano-macrófagicos fagocitando bacterias. Con la técnica inmunohistoquímica se detectan abundantes bacterias intracelulares.

Treinta días después, en el segundo muestreo, la reacción

## Resultados

inflamatoria es mucho menor que en los peces sacrificados a los 30 días, observándose pequeños focos inflamatorios granulomatosos en los márgenes del hígado y en el mesenterio. En riñón la presencia de centros melanomacrofágicos positivos a la inmunohistoquímica es menos marcada. En la técnica inmunohistoquímica se detectan abundantes bacterias intracelulares.

En el último muestreo realizado (90 días) la intensidad de las lesiones es similar a la observada en los peces sacrificados a los dos meses, observándose focos inflamatorios granulomatosos en los márgenes del hígado y en el peritoneo, así como centros melanomacrofágicos en riñón medio positivos a la técnica de inmunohistoquímica demostrándose por lo tanto la presencia de la bacteria en el organismo tras 3 meses de producida la infección experimental.

b) Inoculados dos veces, al inicio y a los 15 días de comenzada la experiencia

Tras los primeros 30 días de iniciada la infección experimental, en este grupo de peces inoculados se observan abundantes focos inflamatorios granulomatosos en el hígado y peritoneo positivos a la técnica inmunohistoquímica (Figura 14), así como centros melanomacrofágicos marcados en riñón medio.

A los 60 días de iniciada la experiencia de inoculación las lesiones observadas son semejantes a las del primer muestreo, detectándose reacción inflamatoria granulomatosa en peritoneo,

hígado y riñón anterior con presencia de abundantes bacterias intracelulares detectadas por la técnica inmunohistoquímica (Figura 15).

Tras 3 meses de iniciada la experiencia se detecta una intensa reacción inflamatoria granulomatosa, con presencia de granulomas, en peritoneo e hígado, siendo positivos a la técnica inmunohistoquímica. En riñón medio, la presencia de inflamación granulomatosa no es tan intensa como en peritoneo e hígado.

c) Inoculados tres veces, al inicio, 4º y 8º día de comenzada la experiencia.

En los peces sacrificados a los 30 días de iniciada esta experiencia se observa una reacción inflamatoria granulomatosa muy intensa en peritoneo (Figura 16), hígado y riñón medio con gran presencia de bacterias intracelulares. En riñón medio se observan abundantes centros melanomacrofágicos positivos a la técnica inmunohistoquímica.

30 días más tarde los hallazgos son similares a los encontrados en los peces sacrificados anteriormente, con presencia de granulomas con bacterias en su centro.

A los 90 días del comienzo de la experiencia se mantiene esa reacción inflamatoria granulomatosa muy intensa, con presencia de granulomas, localizada en hígado (Figura 17), mesenterio y riñón

## *Resultados*

---

medio, con importante presencia bacteriana detectada por la técnica inmunohistoquímica (Figura 18).



**Tabla 15.- Resumen de los resultados microbiológicos, anatomopatológicos e inmunohistoquímicos de los peces de la experiencia de infección crónica con la cepa 187/95 de *Hafnia alvei*.**

<u>MUESTREO</u> (a)	<u>PECES INOCULADOS</u>		
	<u>1 VEZ</u>	<u>2VECES</u>	<u>3 VECES</u>
<b>30 DIAS</b>	MP,H,R ↑↑↑	MP,H,R ↑↑↑	MP,H,R ↑↑↑↑
	IMC ++	IMC ++	IMC +++
	AISLAM +	AISLAM +	AISLAM +
<b>60 DIAS</b>	MP,H,R ↑↑	MP,H,R ↑↑↑	MP,H,R ↑↑↑↑
	IMC ++	IMC ++	IMC +++
	AISLAM +	AISLAM +	AISLAM +
<b>90 DIAS</b>	MP,H,R ↑↑	MP,H ↑↑↑ R↑↑	MP,H,R ↑↑↑↑
	IMC ++	IMC ++	IMC +++
	AISLAM +	AISLAM +	AISLAM +

- (a) Tiempo en que se realizó cada muestreo (en días postinoculación)

- **MP** Reacción inflamatoria en mesenterio y/o peritoneo

- **H** Reacción inflamatoria en hígado

- **R** Reacción inflamatoria en riñón

- Intensidad de la reacción:

↑ muy ligera ↑↑ ligera ↑↑↑ intensa ↑↑↑↑ muy intensa

- **IMC** Resultado de la técnica inmunohistoquímica

- Intensidad de la respuesta:

+ligera ++ intensa +++ muy intensa

- **AISLAM** Aislamiento de la cepa de *H. alvei* probada en los peces de la experiencia

**Experiencia de inoculación con la cepa 2566/83**

---

a) Inoculados una sola vez al inicio de la experiencia

Por lo general, en los peces inoculados con la cepa 2566/83, en el primer muestreo encontramos las mismas lesiones que en los peces inoculados con la cepa 187/95, si bien la reacción inflamatoria es menos marcada.

A los 60 días postinoculación hay menor reacción inflamatoria que en los animales sacrificados a los 30 días, siendo las lesiones encontradas similares a las observadas en los animales pertenecientes a la cepa 187/95 aunque de menor intensidad.

En el último muestreo, las lesiones encontradas son similares a las halladas en la cepa 187/95 aunque de menor intensidad.

---

b) Inoculados dos veces, al inicio y a los 15 días de comenzada la experiencia

A los 30 días de iniciada la experiencia, el peritoneo apenas presenta reacción inflamatoria, siendo muy pocos los macrófagos con bacterias que se llegan a apreciar con la técnica inmunohistoquímica. La reacción inflamatoria presente en el hígado es menor que la que se apreciaba en la cepa 187/95.

A los 60 días postinoculación las lesiones encontradas se limitan a unos pocos focos de inflamación granulomatosa localizados en el mesenterio, hígado y riñón positivos a la técnica inmunohistoquímica.

En el último muestreo realizado (90 días postinoculación) se observa una ligera inflamación granulomatosa en peritoneo, hígado y riñón medio (Figura 19). Todas estas lesiones son positivas a la técnica inmunohistoquímica.

## Resultados

c) Inoculados tres veces, al inicio, 4º y 8º día de comenzada la experiencia

A los 30 días de comenzada esta experiencia de inoculación experimental con *Hafnia alvei* con la cepa 2566/83, las lesiones son muy similares, aunque ligeramente inferiores, a las observadas en la cepa 187/95 en el mismo tiempo de muestreo.

A los 60 días se observan pocas lesiones y apenas se detectan bacterias con la técnica de inmunohistoquímica.

Al final de la experiencia (90 días) observamos una ligera reacción inflamatoria granulomatosa positiva a la inmunohistoquímica.

**Tabla 16.- Resumen de los resultados microbiológicos, anatomopatológicos e inmunohistoquímicos de los peces de la experiencia de infección crónica con la cepa 2566/83 de *Hafnia alvei*.**

<u>MUESTREO</u> (a)	<u>PECES INOCULADOS</u>		
	<u>1 VEZ</u>	<u>2VECES</u>	<u>3 VECES</u>
<b>30 DIAS</b>	MP,H,R ↑↑ IMC + AISLAM +	MP,H,R ↑↑ IMC + AISLAM +	MP,H,R ↑↑↑ IMC ++ AISLAM +
<b>60 DIAS</b>	MP,H,R ↑ IMC + AISLAM +	MP,H,R ↑↑ IMC ++ AISLAM +	MP,H,R ↑↑ IMC + AISLAM +
<b>90 DIAS</b>	MP,H,R ↑ IMC + AISLAM +	MP,H,R ↑↑ IMC ++ AISLAM +	MP,H,R ↑↑ IMC + AISLAM +

- (a) Tiempo en que se realizó cada muestreo (en días postinoculación).
- **MP** Reacción inflamatoria en mesenterio y/o peritoneo
- **H** Reacción inflamatoria en hígado
- **R** Reacción inflamatoria en riñón
  - Intensidad de la reacción:  
↑ muy ligera    ↑↑ ligera    ↑↑↑ intensa    ↑↑↑↑ muy intensa
- **IMC** Resultado de la técnica inmunohistoquímica
  - Intensidad de la respuesta:  
+ligera    ++ intensa    +++ muy intensa
- **AISLAM** Aislamiento de la cepa de *H. alvei* probada en los peces de la experiencia.

**Experiencia de inoculación con la cepa C34**

---

a) Inoculados una sola vez al inicio de la experiencia

En los animales sacrificados a los 30 días la reacción inflamatoria se localiza preferentemente en peritoneo e hígado, siendo predominantemente de tipo polimorfonuclear, aunque también se observan abundantes macrófagos. Con la técnica inmunohistoquímica apenas se detecta la presencia de bacterias.

En los peces sacrificados a los 60 días observamos algunos focos inflamatorios granulomatosos en los márgenes del hígado y en el peritoneo, con predominio de polimorfonucleares sobre macrófagos, sin que se hayan detectado bacterias con la técnica inmunohistoquímica (Figura 20).

En el último muestro realizado, a los 90 días postinoculación, únicamente se observa un ligero infiltrado polimorfonuclear en el peritoneo y en los márgenes del hígado, siendo negativos a la técnica inmunohistoquímica para la detección de antígeno bacteriano de *Hafnia alvei*.

---

b) Inoculados dos veces, al inicio y a los 15 días de comenzada la experiencia

En los animales sacrificados a los 30 días observamos una ligera reacción inflamatoria granulomatosa en el peritoneo y en los márgenes del hígado donde predominan los macrófagos sobre los polimorfonucleares. Con la técnica inmunohistoquímica observamos que el número de bacterias intracelulares es escaso.

A los 60 días de iniciada la experiencia de inoculación se aprecia poca reacción inflamatoria en el peritoneo, con predominio de macrófagos y polimorfonucleares. Con la técnica inmunohistoquímica apenas se detectan bacterias intracelulares.

En los peces de esta experiencia sacrificados a los 90 días observamos poca reacción inflamatoria y escasa presencia de bacterias detectadas por inmunohistoquímica.

## *Resultados*

---

c) Inoculados tres veces, al inicio, 4º y 8º día de comenzada la experiencia

En los peces analizados en el primer muestreo se observan pequeños focos de inflamación granulomatosa en hígado y en peritoneo si bien la presencia de bacterias por medio de la inmunohistoquímica es escasa. En uno de los animales se apreció necrosis del tejido adiposo.

A los 60 días de iniciada esta experiencia con la cepa C34 se observa una ligera reacción inflamatoria granulomatosa en hígado y peritoneo con escasa presencia de bacterias según la técnica de inmunohistoquímica

A los 90 días se observa una ligera reacción inflamatoria granulomatosa en mesenterio. Con la técnica inmunohistoquímica se detectan bacterias intracelulares.

**Tabla 17.- Resumen de los resultados microbiológicos, anatomopatológicos e inmunohistoquímicos de los peces de la experiencia de infección crónica con la cepa C34 de *Hafnia alvei*.**

<b>MUESTREO (a)</b>	<b>PECES INOCULADOS</b>		
	<b><u>1 VEZ</u></b>	<b><u>2VECES</u></b>	<b><u>3 VECES</u></b>
<b>30 DIAS</b>	MP, H ↑↑ IMC + AISLAM +	MP, H ↑↑ IMC + AISLAM +	MP, H ↑↑ IMC + AISLAM +
<b>60 DIAS</b>	MP, H ↑ IMC - AISLAM -	MP, H, ↑ IMC + AISLAM +	MP, H ↑↑ IMC + AISLAM +
<b>90 DIAS</b>	H ↑ IMC - AISLAM -	MP, H ↑ IMC + AISLAM +	MP ↑↑ IMC + AISLAM +

- (a) Tiempo en que se realizó cada muestreo (en días postinoculación).

- **MP** Reacción inflamatoria en mesenterio y/o peritoneo

- **H** Reacción inflamatoria en hígado

- **R** Reacción inflamatoria en riñón

- Intensidad de la reacción:

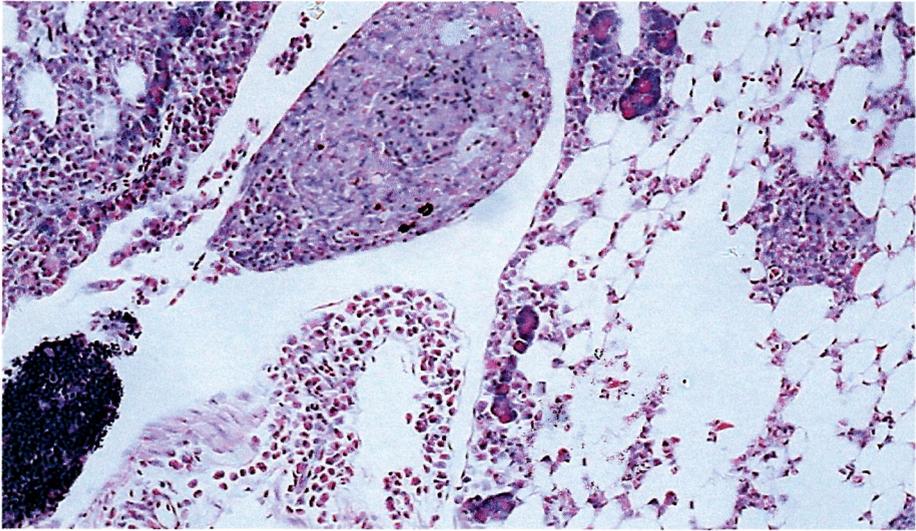
↑ muy ligera ↑↑ ligera ↑↑↑ intensa ↑↑↑↑ muy intensa

- **IMC** Resultado de la técnica inmunohistoquímica

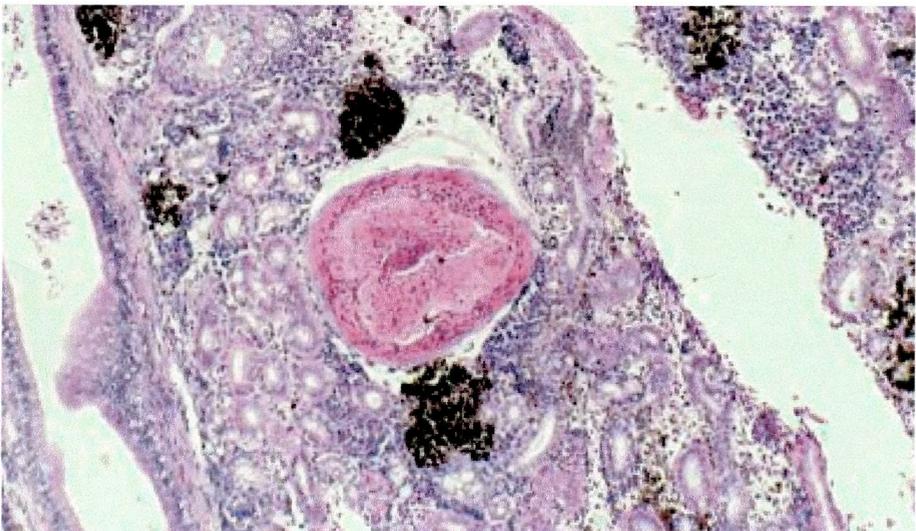
- Intensidad de la respuesta:

+ligera ++ intensa +++ muy intensa

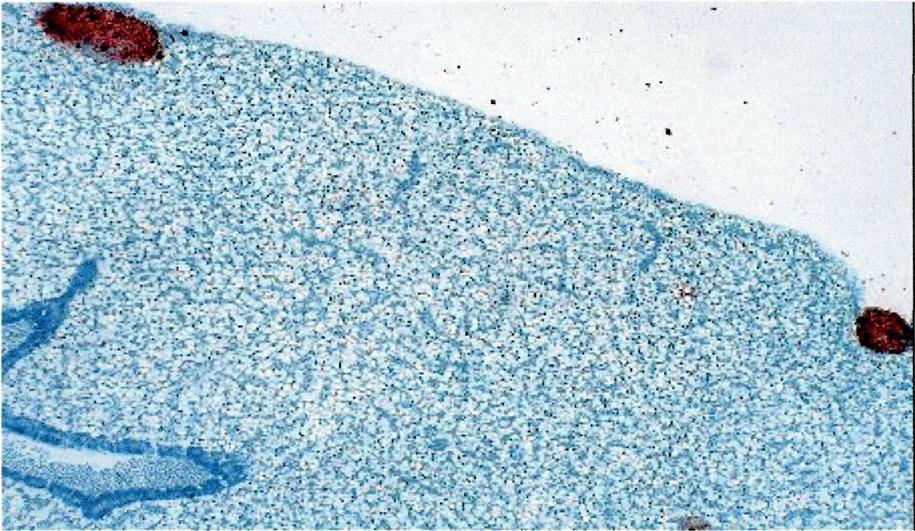
- **AISLAM** Aislamiento de la cepa de *H. alvei* probada en los peces de la experiencia



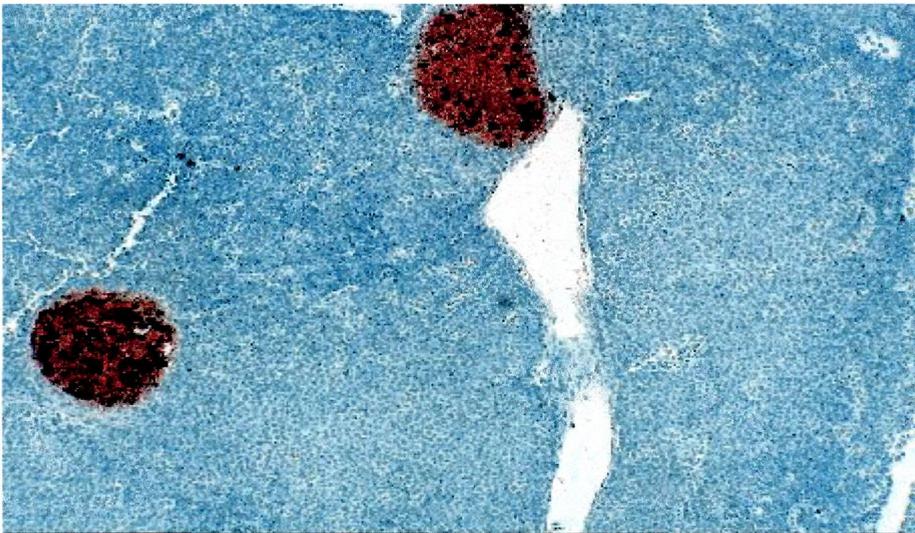
**Figura 12.- Peritonitis granulomatosa x 10. Hematoxilina- Eosina**



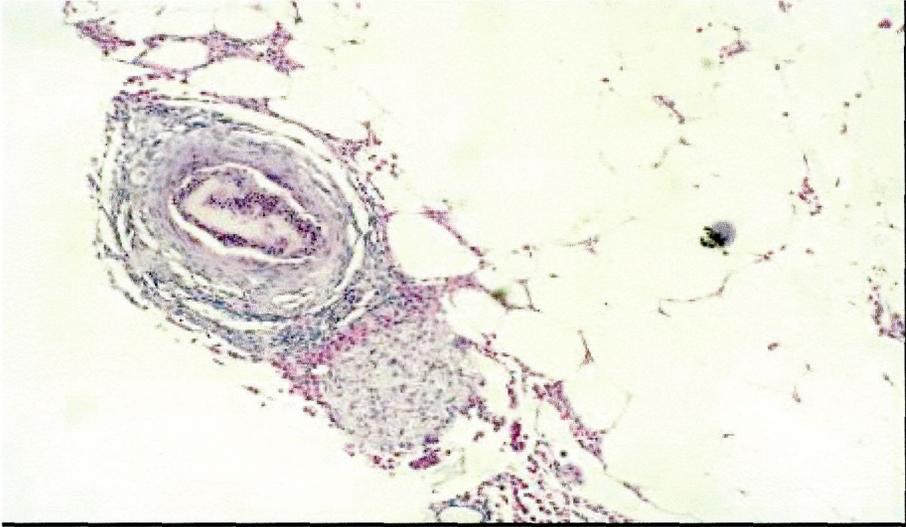
**Figura 13.- Nefritis granulomatosa x 10. Hematoxilina- Eosina**



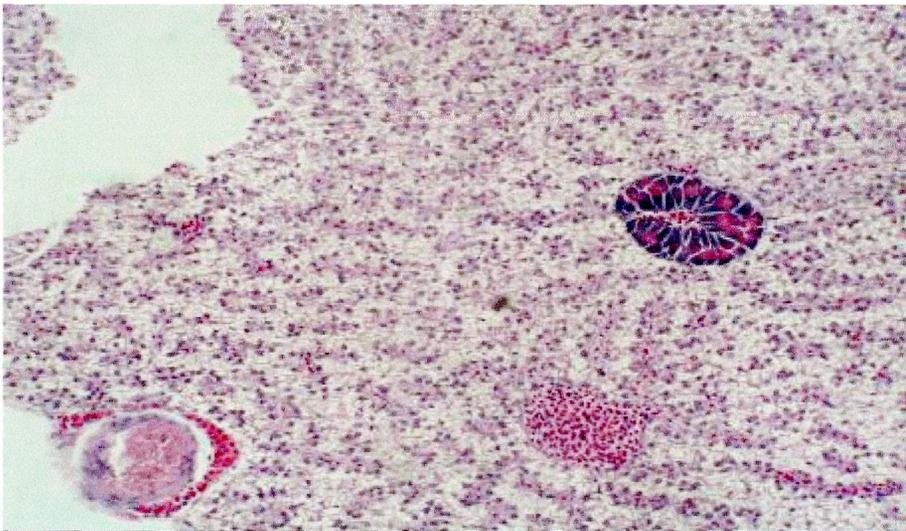
**Figura 14.- Inmunoreactividad positiva en el hígado 10x**



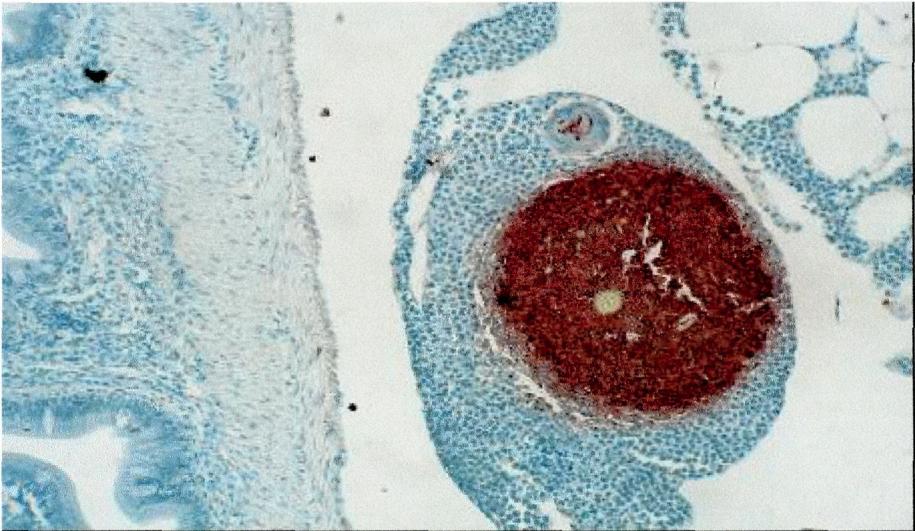
**Figura 15.- Inmunoreactividad positiva en riñón anterior 20x**



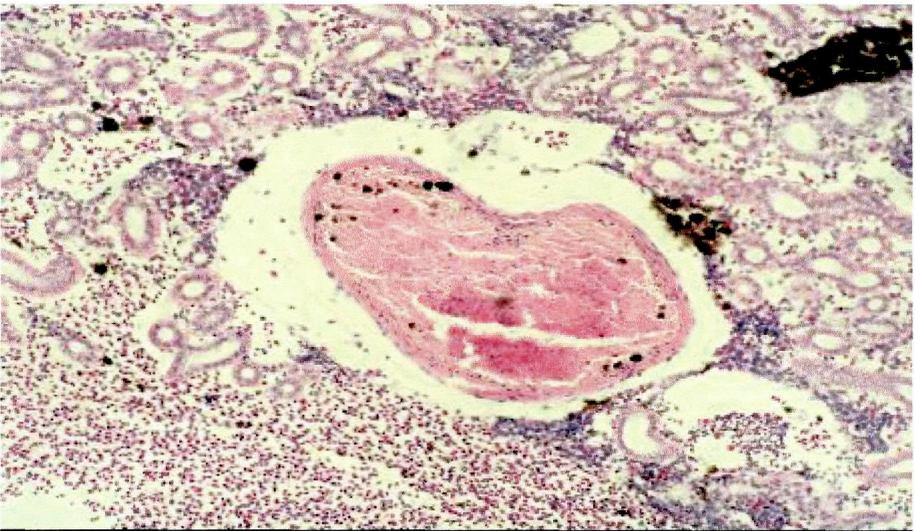
**Figura 16.- Peritonitis con presencia de granulomas 20x. Hematoxilina-Eosina**



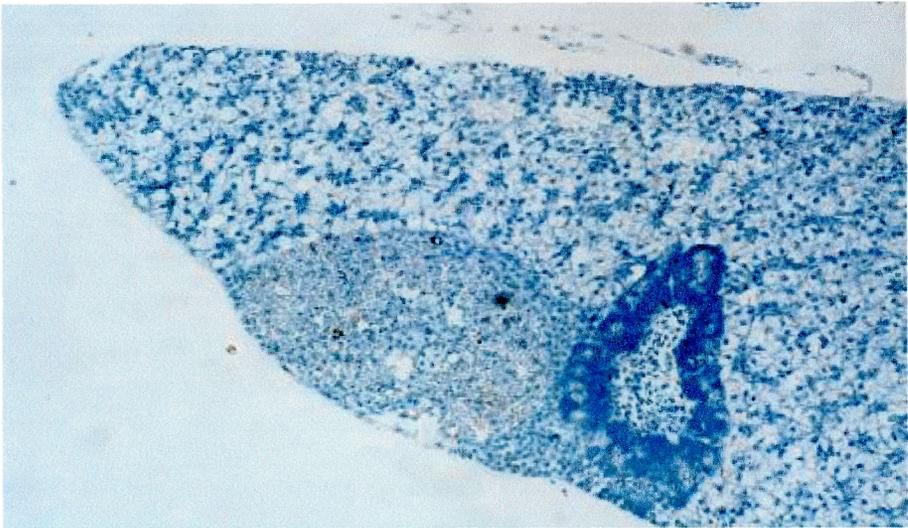
**Figura 17.- Focos localizados de hepatitis y presencia de granulomas 20x. Hematoxilina-Eosina**



**Figura 18.- Inmuno reactividad positiva en mesenterio 20x**



**Figura 19.- Inflamación granulomatosa en riñon 20x. Hematoxilina-Eosina**



**Figura 20.- Ausencia de respuesta a la técnica inmunohistoquímica. Corte de hígado 20x.**

## Discusión

---

---

**5.1.- MECANISMOS DE VIRULENCIA DE *HAFNIA ALVEI* "IN VITRO"**

En el estudio realizado hemos comprobado como ninguna de las 23 cepas analizadas mediante la prueba del PCR fue positiva a la presencia del gen *eae*, al igual que ha ocurrido en todos aquellos trabajos en los que se intentó la identificación del gen *eae* en cepas de *Hafnia alvei* no aisladas en Bangladesh, como en el estudio de C. SERAL y cols. (2001) en Aragón (España) donde analizaron 102 cepas de *Hafnia alvei* aisladas de pacientes humanos que presentaban diarrea, aunque entonces aún no estaba claro que fuera este gen el responsable del incremento de la virulencia en las cepas de *Hafnia alvei* que lo poseían. Tampoco se logró demostrar la presencia del gen en aislamientos de Finlandia, Canadá y Suecia (RIDELL y cols., 1995; ISMAILI y cols., 1996).

Sin embargo, se ha puesto de manifiesto la lesión característica de cepas enterohemorrágicas de *E. coli* y su relación con diferentes cepas de *Hafnia alvei* aisladas en Bangladesh, y con similar consecuencia patogénica, cuyo origen eran cuadros diarreicos humanos (ALBERT y cols., 1991 y 1992). La relación entre ambos patógenos se encontró en la presencia del gen *eae* en todas las cepas estudiadas. Pero la identificación de las cepas de *Hafnia alvei* se realizó entonces de forma exclusiva mediante pruebas bioquímicas convencionales y mediante el sistema API 20E.

Trabajos posteriores (RIDELL y cols., 1995; ISMAILI y cols., 1996) demostraban la existencia del gen *eae* en las cepas analizadas por MJ. ALBERT (1991 y 1992), estableciéndose una correlación positiva entre

### Discusión

las cepas de *Hafnia alvei* productoras de lesiones AE (del inglés *attaching and effacing*) con la presencia de dicho gen, si bien, no se lograban identificar otras cepas de *Hafnia alvei* fuera de Bangladesh que tuvieran el gen *eae*, a la vez que se detectaban bajas homologías entre las secuencias ribosómicas parciales de la subunidad 16S entre cepas de *Hafnia alvei* positivas y negativas a la presencia del gen *eae*, cuestionándose por entonces la correcta posición taxonómica de las cepas de *Hafnia alvei* “*eae* positivas”.

A finales de 1999, JM. JANDA en colaboración con MJ. ALBERT analizaron 5 cepas de *Hafnia alvei* productoras de diarrea con la presencia del gen *eae*, de aquellas aisladas por MJ. ALBERT en Bangladesh mediante el estudio de proteínas de membrana, lisis por un fago específico de *Hafnia alvei* (1672 ATCC) y susceptibilidad a la cefalotina. Llegaron a la conclusión de que estas cepas estaban más cercanas a *Escherichia coli* que a *Hafnia alvei*, a pesar de diferenciarse estas a las cepas típicas de *E. coli* en su incapacidad de producir ácido a partir de la lactosa y el D-sorbitol, no sintetizar la enzima  $\beta$ -D-glucoronidasa y no poseer otros factores de virulencia vinculados a las cepas enterohemorrágicas de *E.coli*.

Pero un análisis de las características fenotípicas y genotípicas del Género *Hafnia*, comparando 73 cepas de *Hafnia alvei* con 5 de las cepas aisladas por MJ. ALBERT (1991 y 1992) en Bangladesh e identificadas en su momento como *Hafnia alvei* (JANDA y cols., 2002) ha corroborado la correcta posición taxonómica dentro del Género *Escherichia* de las cepas de *Hafnia alvei* positivas al gen *eae* aisladas en Bangladesh. No obstante, estos estudios continúan, y así, en el

trabajo de R. ESERSTAM y cols. (2002) en el que analizan la estructura de los lipopolisacáridos O de las cepas de Bangladesh, hay claras diferencias con las cepas de *Escherichia coli* y *Hafnia alvei* en cuanto a su estructura. También realizaron estudios de hibridación, sugiriendo que los aislamientos de Bangladesh requerirían de la designación de una nueva especie dentro del Género *Escherichia*.

Por todo lo expuesto, y a pesar de que hoy en día se sigue intentando aclarar la posición taxonómica de las cepas aisladas en Bangladesh (ALBERT y cols., 1991 y 1992), los trabajos de este último año, unido al hecho de que nunca se hayan identificado cepas de *Hafnia alvei* con la presencia del gen *eae* fuera de los aislamientos de Bangladesh a comienzos de la década de los '90, ni en nuestro estudio ni en ningún otro, y atendiendo al hecho de que todas nuestras cepas fueron debidamente identificadas como *H. alvei* mediante el fago ATCC 1672 (GUINÉE y VALKENBURG, 1968) deja absolutamente en duda la posición real de las cepas aisladas en Bangladesh dentro del Género *Hafnia*, e invita a la realización de estudios posteriores que clarifiquen tal cuestión, como el realizado recientemente por G. HUYS y cols. (2003) proponiendo el nombre de *Escherichia albertii* para las cepas sorbitol y lactosa negativas aisladas en Bangladesh por M.J. ALBERT.

Nuestro estudio ha corroborado que el 100% de las cepas analizadas de *Hafnia alvei* son productoras de algún tipo de sideróforo, hecho confirmado con anterioridad en los trabajos de R. PODSCHUN y cols. (2001), así como R. REISSBRODT y cols. (1990). R. PODSCHUN y cols. (2001) analizaron un total de 70 cepas de *Hafnia alvei*, siendo el

## Discusión

---

100% de las mismas productoras de algún tipo de sideróforo mediante la misma metodología empleada en nuestro estudio.

En el estudio realizado por R. REISSBRODT y cols. (1990) se analizaron un total de 11 cepas de *Hafnia alvei*, determinándose que la ferrioxamina era producida por el 100% de las cepas analizadas, con un predominio de la ferrioxamina G sobre la E.

El hecho de la no producción de aerobactina ni enterobactina por parte de las cepas de *Hafnia alvei* analizadas en nuestro estudio no es ni mucho menos un resultado inusual ya que otros autores a pesar de lograr aislar estos sideróforos en cepas de *Hafnia alvei*, su frecuencia fue siempre muy baja. Así, en el estudio de R. PODSCHUN y cols. (2001), del total de las 70 cepas investigadas, sólo una cepa (1.4% del total analizado) sintetizaba la enterobactina, mientras que la aerobactina no se detectó en las cepas analizadas. JL. MARTÍNEZ y cols. (1987) demostraron que en bacterias Gram negativas de los Géneros *Enterobacter* y *Shigella* la frecuencia en la producción de aerobactina era superior al 50%, mientras que en Géneros como *Proteus*, *Yersinia*, *Serratia*, *Salmonella*, *Citrobacter*, *Klebsiella* y *Escherichia* dicha frecuencia era inferior al 50%. La única cepa de *Hafnia alvei* analizada en este estudio fue positiva a la producción de aerobactina, pero debido al escaso número de cepas analizadas de esta especie, lógicamente no se le otorgaron porcentajes de frecuencia en la producción de este sideróforo.

En el trabajo de JM. RUTZ y cols. (1991) también se detecta la producción de enterobactina en *Hafnia alvei*, pero con una frecuencia muy baja, similar a la del trabajo de R. PODSCHUN y cols. (2001).

Una vez descartada la producción de aerobactina o enterobactina en las cepas de *H. alvei* analizadas en nuestro estudio, junto con el hecho de que todas ellas dieran un resultado positivo en el medio universal de B. SCHWYN y JB. NEILANDS (1987) para la detección de sideróforos, nos hace pensar que dicha reacción pueda estar producida por un sideróforo como la ferrioxamina, detectada en cepas de *Hafnia alvei* con una frecuencia del 100% en trabajos anteriores como el de R. REISSBRODT y cols. (1990). Sin embargo, este tipo de sideróforo nunca se ha relacionado con un aumento en la virulencia bacteriana, careciendo por tanto de valor en nuestro estudio haberlo incorporado en nuestra metodología de trabajo para describir factores de virulencia en *Hafnia alvei* y su posible relación con el incremento de su patogenicidad en la dorada (*Sparus aurata*, L.) y trucha arcoiris (*Oncorhynchus mykiss*).

Nuestras cepas de *Hafnia alvei* no han demostrado la capacidad de hemolizar eritrocitos de dorada, trucha arcoiris u oveja. Dicha capacidad hemolítica está limitada (BONDARENKO y cols. 1983) a la adquisición por parte de *Hafnia alvei* del plásmido *pIE 567* también presente en *Enterobacter aerogenes* y *Salmonella typhimurium* que codifica la síntesis de una  $\alpha$ -hemolisina, por lo que no es posible la correlación entre mayor grado de patogenicidad de *Hafnia alvei* en dorada y este factor de virulencia analizado.

## Discusión

---

La fimbrias tipo I son un importante factor de virulencia que facilita la adherencia bacteriana a las mucosas y se ha encontrado involucrada en la patogénesis de infecciones relacionadas con el aparato urinario causadas por *E. coli* (IWAHI y cols., 1983; MATSUMOTO y cols., 1990; MIZUNOE y cols., 1997). Por otro lado, las fimbrias tipo III facilitan la adhesión bacteriana a las células endoteliales, epitelio del tracto respiratorio y células uroepiteliales. Aunque los estudios realizados sobre la presencia de las fimbrias tipo I y tipo III en enterobacterias son muy abundantes, los datos referidos a *Hafnia alvei* se limitan al estudio que en el año 2001 realizaron R. PODSCHUN y colaboradores. Nuestros resultados son en valores absolutos ligeramente inferiores a los obtenidos por R. PODSCHUN y cols. (2001) ya que en su estudio la frecuencia de cepas de *Hafnia alvei* positivas a la presencia del pili tipo I se situaba en el 59%, mientras en nuestro estudio sólo encontramos un 39%. Respecto al pili tipo III, R. PODSCHUN y cols. (2001) describieron una frecuencia de presentación del 50%, mientras que en nuestro estudio únicamente detectamos la presencia de este pili en el 26% de las cepas analizadas. Esta diferencia podría estar influenciada por el origen de las cepas del estudio de R. PODSCHUN y cols. ya que se obtuvieron exclusivamente de aislamientos extraintestinales de *Hafnia alvei*, mientras que en nuestro estudio un 52% de las cepas analizadas tenían un origen intestinal, ya sean provenientes de heces humanas, como de casos clínicos de enteritis humanas. Otra posible causa que pueda explicar esta diferencia podría estar en el tamaño de la muestra, ya que el estudio de R. PODSCHUN y cols. (2001) se realizó con 70 cepas, frente a las 23 analizadas en el nuestro.

En nuestro estudio, el porcentaje de cepas que han mostrado poseer resistencia al efecto bactericida del suero de dorada a 25°C se sitúa en el 30.4%, resultado similar al obtenido por otros autores con *Hafnia alvei* en otras especies animales, como R. PODSCHUN y cols. (2001) con suero humano con un porcentaje de cepas resistentes del 34%, y S. JANKOWSKI y cols. (1996) en ganado vacuno con una resistencia del 19%. Si bien, en este último estudio la concentración final de suero empleada fue del 50% y no del 75% que es la más frecuente y la que usamos en nuestro estudio y en el realizado por R. PODSCHUN y cols. (2001).

El nivel de resistencia mostrado por *Hafnia alvei* en dorada se presenta inferior al observado en trucha arcoiris, pues frente a esta última especie la resistencia se situó en el 43%. Dado que se ha demostrado la correlación entre efecto bactericida del suero con la mayor viabilidad del proceso infeccioso (ROANTREE y cols. 1960), la dorada mostraría una mayor resistencia a la infección por *Hafnia alvei* que la trucha arcoiris. Ya que en las experiencias de  $DL_{50}$  en dorada no se encontraron diferencias significativas de patogenicidad con las diferentes cepas de *Hafnia alvei* empleadas en la experiencia, mostrando todas las cepas empleadas una  $DL_{50}$  superior a  $10^8$  ufc/pez, estableceremos la comparación entre virulencia de cada cepa y resistencia al efecto bactericida de suero respecto a la experiencia de infección crónica donde sí encontramos diferencias significativas entre las tres cepas analizadas. De estas, la que ha demostrado poseer un mayor poder patógeno en dorada ha sido la cepa 187/95, siendo la única de las tres que presentó resistencia al efecto bactericida del suero de dorada. Además, es la cepa aislada de forma natural en

## Discusión

---

nuestro Archipiélago (Tabla 1). Por el contrario, la cepa más sensible al suero de dorada, la cepa C34, fue la que demostró poseer un menor poder patógeno en la experiencia de inoculación experimental para producir una infección crónica. La cepa 2566/83 mostró en nuestro estudio una patogenicidad intermedia entre la 187/95 y la C34, y presentó a su vez una resistencia al efecto bactericida del suero intermedia entre las cepas 187/95 y C34. Existe, por tanto, una elevada correlación entre el daño mostrado por cada cepa en la infección crónica en dorada y su grado de virulencia representado por la resistencia al efecto bactericida del suero de esta especie.

Estos resultados se corresponden con lo descrito por otros autores que tras analizar la virulencia para peces frente a cepas de distintas especies, encuentran que aquellas con mayor poder patógeno se corresponden a su vez con las que poseen una mayor resistencia al efecto bactericida del suero. En el estudio de RL. DAVIES (1991) se analizó la virulencia de cepas de *Yersinia ruckeri* en trucha arcoiris, demostrándose que las cepas virulentas en experiencias de inoculación se correspondían con aquellas que en experiencias “*in vitro*”, mostraban una mayor resistencia al efecto bactericida del suero de trucha arcoiris.

## 5.2.- COMPARACIÓN DE LA PATOGENICIDAD DE *HAFNIA ALVEI* EN LA ACUICULTURA MARINA Y CONTINENTAL

La dorada (*Sparus aurata*, L.) como especie marina es muy susceptible frente a diferentes enfermedades causadas por patógenos como *Photobacterium damsela* subespecie *piscicida* (TORANZO y cols., 1991; BAPTISTA y cols., 1996; REAL y cols., 1997), *Aeromonas salmonicida* (REAL y cols., 1994) y *Vibrio* spp. (BALEBONA y cols. 1998).

Por otro lado, la actividad patógena de *Hafnia alvei* en el curso de infecciones naturales en peces continentales es cada vez más relevante. I. GELEV y cols. (1990) describieron un brote epizoótico de septicemia hemorrágica en trucha arcoiris. Dos años más tarde, TESHIMA y cols. (1992) describieron otro brote septicémico, pero esta vez en salmón rojo (*Oncorhynchus masou*). En pez gato (*Ictalurus punctatus*), *Hafnia alvei* es considerada un patógeno emergente que cada día cobra mayor importancia (GOODWIN y KILLIAN, 1998).

En infecciones experimentales, *Hafnia alvei* también ha demostrado ser un agente patógeno oportunista frente a peces de aguas continentales como la trucha común (*Salmo trutta*, L.) (RODRÍGUEZ y cols., 1998) y pez gato (*Ictalurus punctatus*) (GOODWIN y KILLIAN, 1998). En pez gato (*Ictalurus punctatus*), *Hafnia alvei* es letal a una dosis por inmersión o vía intraperitoneal de  $10^7$  ufc/ml y  $10^7$  ufc/pez, respectivamente, entre las 24 y 48 horas postinoculación (GOODWIN y KILLIAN, 1998). Además, se ha comprobado también la enorme susceptibilidad de la trucha común (*Salmo trutta*, L.), a la infección (RODRÍGUEZ y cols., 1998; ACOSTA y cols., 2002), e incluso, la

## Discusión

enorme variabilidad que muestran las distintas cepas de *Hafnia alvei* en cuanto a su virulencia establecida por la determinación de la DL<sub>50</sub> en esta especie, mediante inoculación intraperitoneal (RODRÍGUEZ y cols., 1998). Uno de los principales objetivos de nuestro estudio, una vez conocida la susceptibilidad a la infección por *Hafnia alvei* de especies continentales como trucha arcoiris, salmón rojo, trucha común y pez gato, era saber si especies de aguas marinas como la dorada, eran o no susceptibles a la infección de curso agudo o crónico por *Hafnia alvei*, y como hemos demostrado, la dorada es muy poco o no es sensible a la infección aguda. En la Tabla 18 observamos la comparación de las DL<sub>50</sub> entre nuestra experiencia de inoculación con *Hafnia alvei* en dorada, y las realizadas por L.A. RODRÍGUEZ y cols. (1998) y F. ACOSTA y cols. (2002)\* en trucha común con las mismas cepas.

Tabla 18.- Comparación de las DL<sub>50</sub> de diferentes cepas de *Hafnia alvei* en dorada y trucha común.

CEPA	DL <sub>50</sub> EN DORADA	DL <sub>50</sub> EN TRUCHA COMÚN
187/95	> 10 <sup>8</sup>	2.5 x 10 <sup>7</sup>
C34	> 10 <sup>8</sup>	7.4 x 10 <sup>8</sup>
X1	> 10 <sup>8</sup>	2.15 x 10 <sup>4</sup>
OR-1	> 10 <sup>8</sup>	1.3 x 10 <sup>4</sup>
F4319	> 10 <sup>8</sup>	1.8 x 10 <sup>6</sup>
1967/82	> 10 <sup>8</sup>	1.05 x 10 <sup>5</sup>
2566/83*	> 10 <sup>8</sup>	2.6 x 10 <sup>4</sup>

L.A. RODRÍGUEZ y cols. (1998)  
F. ACOSTA y cols. (2002)\*

Observamos en dicha Tabla 18, que existe una clara diferencia entre la susceptibilidad de la dorada y trucha común a la infección de curso agudo por *Hafnia alvei*, pues la primera se comporta como una especie poco receptiva y no sensible a enfermar, pues en ningún caso los peces infectados mostraron alguno de los síntomas anteriormente descritos en peces de aguas continentales como trucha arcoiris, salmón rojo y pez gato. Como vemos, para el caso de la trucha común existen cepas con distintos grados de virulencia, siendo la cepa 1967/82 con una  $DL_{50}$  de  $1.05 \times 10^3$  ufc/pez la más virulenta, frente a la cepa C34, que con una  $DL_{50}$  de  $7.4 \times 10^8$  es considerada según el baremo de OP. DAILY y cols. (1981) como una cepa avirulenta. Mientras tanto, en el caso de la dorada no hemos encontrado diferencias de las distintas cepas probadas en el nivel de virulencia de las mismas, referido a sus valores de dosis letal 50 tras la inoculación vía intraperitoneal.

La patogenicidad de otras cepas de *Hafnia alvei* no empleadas en nuestra experiencia de inoculación, ha sido analizada en trucha común por CS. GALLARDO y cols. (2001), cuyas  $DL_{50}$  se muestran en la Tabla 19.

**Tabla 19.- Resultados de las  $DL_{50}$  en trucha común con otras cepas de nuestra colección.**

CEPA	$DL_{50}$ EN TRUCHA COMUN
ATCC 9760	$1.3 \times 10^6$
ATCC 13337	$> 10^8$
842/81	$3 \times 10^7$
LM 25/65	$6.5 \times 10^7$
LM 7/67	$> 10^8$

CS. GALLARDO y cols. (2001)

## Discusión

---

Tal y como se observa, estas cepas no mostraron capacidad patógena en trucha común, por lo que para la inoculación de *Hafnia alvei* en dorada seleccionamos aquellas que habían mostrado mayor grado de patogenicidad en trucha común.

Al contrario de lo ocurrido en la experiencia de infección crónica realizada por C. TESHIMA y cols. (1992) con salmón rojo (*Oncorhynchus masou*) no detectamos sintomatología clínica evidente en las doradas inoculadas, salvo el ligero oscurecimiento del pez, siendo esto último achacable al estrés ya que los grupos controles presentaron este mismo signo clínico. Dada la enorme resistencia mostrada por la dorada a la infección de curso agudo con *Hafnia alvei* en la que tampoco evidenciamos signos clínicos algunos, era de esperar que sucediera algo similar en el curso de la infección crónica. En la experiencia realizada por C. TESHIMA y cols. (1992) la sintomatología clínica aparecía ya desde el día 12 postinoculación en el grupo inoculado 3 veces a intervalos de 4 días y en un 36% de ellos los signos fueron evidentes tras 26 días postinoculación.

El resto de sintomatología clínica descrita por C. TESHIMA y colaboradores como abdomen distendido y natación errática no fue detectada durante los meses que duró nuestra experiencia. Tampoco encontramos las lesiones renales descritas por C. TESHIMA y colaboradores en salmón rojo (focos blanco-grisáceos prominentes en la cara ventral del riñón).

A pesar de no presentar sintomatología alguna de enfermedad, la infección experimental demostró la capacidad de *Hafnia alvei* para

persistir en el organismo en un posible estado de portador, ya que tras 3 meses de producida la infección en todas las experiencias se logró aislar la cepa inoculada, excepto en la realizada con la cepa C34, en la que no se logró el aislamiento en el segundo y tercer muestreos realizados a los 60 y 90 días respectivamente de iniciada la experiencia en el lote de peces inoculados una sola vez al inicio de la misma.

En las experiencias con las cepas 187/95 y 2566/83, así como la C34 con dos y tres inoculaciones, sí fue posible el aislamiento de la cepa en cultivo puro a partir de riñón e hígado. El estudio realizado por C. TESHIMA y cols. (1992) se limitaba al análisis de la patogenicidad renal de *Hafnia alvei* en salmón rojo, detectándose en riñón la cepa inoculada varios meses después de realizada la inoculación experimental. En nuestro caso, hemos detectado la presencia de la cepa inoculada en otros tejidos como hígado y bazo, demostrándose a su vez mediante la técnica inmunohistoquímica la correlación entre lesiones producidas y presencia de bacteria en dicho tejido (Tablas 15 a 17. Figuras 15 a 21). Sin embargo, queda por dilucidar si la inoculación de este patógeno por otras vías diferentes a la intraperitoneal suponen un efecto similar respecto a la permanencia del agente en tejidos de la dorada.

Con respecto a la diferente patogenicidad mostrada por las 3 cepas inoculadas para determinar el grado de susceptibilidad frente a una infección crónica, hay que señalar que ha sido la cepa 187/95 la que ha producido un mayor número de lesiones de tipo inflamatorio en los animales inoculados, siendo las mismas desde intensas a muy intensas en los animales inoculados dos y tres veces, e inflamaciones intensas a ligeras en los animales inoculados una sola vez al inicio de

## *Discusión*

la experiencia. Las lesiones inducidas tras la inoculación de la cepa 2566/83 fueron de menor intensidad que con la cepa 187/95, mientras que la cepa C34 ha sido la menos patógena para la dorada en la infección de curso crónico con *Hafnia alvei*, presentando los peces inoculados lesiones inflamatorias de intensidad ligera.

En peces de aguas continentales la infección por *Hafnia alvei* produce una serie de lesiones renales muy semejantes a las causadas por *Renibacterium salmoninarum* (TESHIMA y cols., 1992). Macroscópicamente se caracterizan por la aparición de una serie de forúnculos blanco-grisáceos en riñón. La apariencia histopatológica de las lesiones producidas por *Renibacterium salmoninarum* es también similar a las lesiones tipo III detectadas en la experiencia de C. TESHIMA y colaboradores (1992). En nuestras experiencias no hemos encontrado ninguna de esas lesiones descritas por otros autores, si bien, estuvieron presentes otras lesiones tales como inflamaciones granulomatosas en peritoneo, hígado y riñón, y hepatitis focal.

### **5.3.- RELACIÓN ENTRE LOS NIVELES DE VIRULENCIA MEDIDOS Y LOS VALORES DE PATOGENICIDAD DE *HAFNIA ALVEI***

En la Tabla 20 observamos a modo comparativo la frecuencia de expresión de factores de virulencia observados en las cepas de *Hafnia alvei* de nuestro estudio y las cepas de *Hafnia alvei* del trabajo realizado por R. PODSCHUN y cols. (2001), y su relación con otras especies de la familia *Enterobacteriaceae*.

**Tabla 20.- Comparación de la frecuencia de presentación de factores de virulencia (en porcentaje) detectados en cepas de *H. alvei* empleadas en nuestro estudio y las analizadas por R. PODSCHUN, incluyendo distintas especie de la Familia *Enterobacteriaceae*.**

	<i>Hafnia alvei</i>	<i>Hafnia alvei</i> *	<i>Serratia marcescens</i> *	<i>Enterobacter cloacae</i> *	<i>Klebsiella pneumoniae</i> *
<b>GEN EAE</b>	0	ND	ND	ND	ND
<b>SIDERÓFOROS</b>	100	100	100	100	99.5
<b>ENTEROBACTINA</b>	0	1.4	100	100	99
<b>AEROBACTINA</b>	0	0	8.6	92	5.3
<b>HEMÓLISIS</b>	0	ND	ND	ND	ND
<b>MSHA</b>	39	59	46	89	86
<b>MRHA</b>	26	50	29	50	70
<b>RESISTENCIA SUERO</b>	30	34	26	92	25

ND.- Factor de virulencia no analizado

\* PODSCHUN y cols. (2001)

La baja expresión de factores de virulencia mostrada por las cepas de *Hafnia alvei* utilizadas en nuestro estudio, en relación a otras especies bacterianas de la Familia *Enterobacteriaceae* como *Serratia marcescens*, *Enterobacter cloacae* y *Klebsiella pneumoniae* coincide con trabajos anteriores como el realizado por R. PODSCHUN y colaboradores (2001). En dicho estudio las cepas de *Hafnia alvei* analizadas muestran una expresión de factores de virulencia mucho más baja que otras especies de gran importancia en la clínica humana como *Klebsiella pneumoniae* y *Enterobacter cloacae*. Su comportamiento es más similar al de *S. marcescens* que posee una limitada expresión de estos factores.

Observamos que las grandes diferencias respecto a *Klebsiella pneumoniae* y *Enterobacter cloacae* se producen a nivel de la expresión

## Discusión

de enterobactina y aerobactina, donde *Hafnia alvei* presenta una frecuencia muy baja (cercasas al 0%) frente a frecuencias cercanas al 100% de *Klebsiella pneumoniae* y *Enterobacter cloacae*. Por el contrario, *Hafnia alvei* presenta frecuencias de expresión de factores de virulencia similar a *Serratia marcescens*, cuya importancia clínica es mucho menor que *K. pneumoniae* y *E. cloacae*. En el estudio de R. PODSCHUN y cols. (2001) se sugiere que la baja patogenicidad mostrada por *Hafnia alvei* se debe en gran medida a la baja expresión de factores de virulencia investigados en su trabajo.

En la Tabla 21 observamos un resumen de los factores de virulencia encontrados en las cepas de *Hafnia alvei* utilizadas en la experiencia de infección crónica en dorada.

Tabla 21.- Factores de virulencia analizados en las cepas empleadas en la experiencia de infección crónica

	187/95	2566/83	C34
<b>PATOGENICIDAD</b>	+++	++	+
<b>GEN EAE</b>	-	-	-
<b>ENTEROBACTINA</b>	-	-	-
<b>AEROBACTINA</b>	-	-	-
<b>HEMÓLISIS</b>	-	-	-
<b>MSHA</b>	-	-	-
<b>MRHA</b>	-	-	-
<b>RESISTENCIA SUERO</b>	++	+	-

### Patogenicidad mostrada

- +++ Alta patogenicidad
- ++ Mediana patogenicidad
- + Baja patogenicidad

### Resistencia al suero

- ++ Resistente
- + Sensibilidad moderada
- Sensible

Como observamos en la Tabla 21, la única relación posible entre el grado de patogenicidad para la dorada y la expresión de factores de

virulencia de una cepa se establece en la mayor o menor resistencia al efecto bactericida del suero de dorada que poseen las cepas de nuestro estudio. Si bien no podemos descartar la existencia de otros factores de virulencia, no analizados en nuestro estudio, como el tipo de antígeno somático y el antígeno flagelar que puedan contribuir a la mayor patogenicidad de *Hafnia alvei* en dorada u otras especies animales.

La relación entre una mayor resistencia al efecto bactericida del suero mostrada por una cepa y la mayor patogenicidad que deriva de este hecho, se establece por medio de experiencias de inoculación como la DL<sub>50</sub> donde se analiza el efecto de una cepa de forma aguda. En nuestras experiencias de inoculación, hemos observado que los peces se protegen mejor frente al curso de la infección aguda con *Hafnia alvei*, mientras que la bacteria es capaz de permanecer durante 3 meses en diferentes tejidos de la dorada. De ahí que nosotros encontremos mayor relación entre el aumento de resistencia al efecto bactericida del suero de dorada y aumento de la virulencia de la cepa referida a una infección crónica. Por ello, no hemos encontrado alguna relación posible entre expresión de factores de virulencia de una cepa, y sus consecuencias patogénicas en el curso de la infección aguda.

Hemos demostrado que *Hafnia alvei* es capaz de persistir en los tejidos de la dorada un mínimo de 3 meses independientemente de la cepa utilizada (187/95, 2566/83 y C34) y sus niveles de resistencia al efecto bactericida del suero. Sin embargo, el estudio inmunohistoquímico fue más sensible con las cepas 187/95 y 2566/83 que con la cepa C34, correspondiéndose a su vez con el mayor grado de resistencia mostrado por las dos primeras cepas al

### *Discusión*

---

efecto bactericida del suero de dorada. No logramos aislar ni detectar por inmunohistoquímica la cepa C34 en el lote de peces inoculados una sola vez durante la experiencia de infección crónica, siendo por tanto la dorada capaz de eliminar dicha cepa de su organismo con más rapidez.

## *Conclusiones*

---

**PRIMERA.-** Ninguna de las cepas de *Hafnia alvei* utilizadas en nuestro estudio posee alguno de los factores de virulencia enunciados a continuación: presencia del gen *eae* en su genoma, aerobactina, enterobactina, hemólisis sobre hematíes de dorada (*Sparus aurata*, L.) y trucha arcoiris (*Oncorhynchus mykiss*).

**SEGUNDA.-** Todas las cepas de *Hafnia alvei* utilizadas en nuestro estudio producen algún tipo de sideróforo.

**TERCERA.-** La presencia de las fimbrias tipo I, detectada por hemaglutinación de eritrocitos de cobaya sensibles a la manosa ocurrió en el 39% de las cepas estudiadas.

**CUARTA.-** La presencia de la fimbria tipo III, detectada mediante la hemaglutinación de hematíes de cobaya resistente a la manosa sucedió en el 26% de las cepas probadas.

**QUINTA.-** El nivel de resistencia mostrado por *Hafnia alvei* al efecto bactericida del suero es menos frecuente en dorada (*Sparus aurata*, L.) (30.4% de cepas resistentes a 25°C) que en trucha arcoiris (*Oncorhynchus mykiss*) (43% de cepas resistentes a 25°C).

**SEXTA.-** *Hafnia alvei* ha demostrado ser una bacteria poco o nada virulenta para la dorada (*Sparus aurata*, L.), presentando unos valores de DL<sub>50</sub> superiores a 10<sup>8</sup> ufc/pez tras la inoculación intraperitoneal.

## *Conclusiones*

---

**SÉPTIMA.-** La dorada (*Sparus aurata*, L.) es una especie muy resistente a enfermar tras inducir un proceso crónico después de la inoculación de este patógeno, con independencia del número de dosis de inoculación recibidas y los intervalos de las mismas.

**OCTAVA.-** Las lesiones microscópicas originadas por esta bacteria en los tejidos de doradas (*Sparus aurata*, L.) infectadas se caracterizan por ser procesos inflamatorios de tipo local principalmente localizados en peritoneo y mesenterio, hígado, riñón y bazo.

**NOVENA.-** La dorada (*Sparus aurata*, L.) puede comportarse como una especie portadora de *Hafnia alvei* en los lugares de cultivo durante un periodo mínimo de 3 meses, tras la inoculación intraperitoneal del patógeno.

**DÉCIMA.-** En todos los casos hemos encontrado una correspondencia absoluta entre los resultados obtenidos con la técnica inmunohistoquímica y el aislamiento e identificación microbiológica de *Hafnia alvei* a partir de las muestras de tejidos.

**UNDÉCIMA.-** Las cepas de *Hafnia alvei* que presentaron una mayor virulencia medida por el efecto bactericida del suero, mostraron también una mayor patogenicidad para la dorada (*Sparus aurata*, L.) evaluada en base a la intensidad de las lesiones histológicas encontradas en sus tejidos.

# *Resumen*

---

---

**7.- RESUMEN**

*Hafnia alvei* está presente de forma natural en el medio ambiente canario, aunque nunca se ha detectado en especies marinas de esta u otras regiones del mundo. Conocer si la dorada (*Sparus aurata*, L.) es una especie susceptible de enfermar tras su infección experimental con *Hafnia alvei* y profundizar en el conocimiento de los factores de virulencia y su relación con la patogenicidad de esta bacteria para la dorada y para la trucha arcoiris (*Oncorhynchus mykiss*) constituyen la finalidad básica de este trabajo.

Nuestro estudio lo hemos realizado en dos fases. En la primera, hemos analizado *in vitro* la presencia de factores de virulencia (gen *eae*, capacidad hemolítica, fimbrias tipo I y III, resistencia al efecto bactericida del suero y producción de sideróforos) en 23 cepas de *Hafnia alvei* con distinta procedencia y fuente de origen. En la segunda, hemos evaluado la patogenicidad de diferentes cepas de *Hafnia alvei* para la dorada (*Sparus aurata*, L.) mediante la determinación de sus dosis letales 50 (cepas 187/95, 2566/83, C34, X1, OR-1, F4319 y 1967/82) y mediante el estudio de la evolución de la infección crónica con dosis repetidas de bacterias (cepas 187/95, 2566/83 y C34).

Ninguna de las siete cepas empleadas en las experiencia de dosis letal 50 mostró ser virulenta en dorada al presentar todas ellas una  $DL_{50}$  superior a  $10^8$  unidades formadoras de colonia por pez. En las experiencias de inoculación crónica, si bien no se observó la sintomatología clínica descrita por otros autores en infecciones naturales

## Resumen

y/o experimentales en peces de aguas continentales como salmón rojo, trucha común y pez gato, si observamos en el estudio anatomopatológico e inmunohistoquímico diferencias de patogenicidad entre las distintas cepas empleadas, siendo la cepa de *Hafnia alvei* 187/95 la que produjo un mayor daño en los tejidos de la dorada, mientras que la cepa C34 fue la que se evidenció como la menos patógena. La cepa 2566/83 mostró una patogenicidad intermedia entre las dos anteriores. Relacionando estas diferencias del grado de patogenicidad de *Hafnia alvei* en dorada con los distintos factores de virulencia estudiados únicamente hemos podido establecer una correlación positiva entre grado de patogenicidad y resistencia al efecto bactericida del suero, siendo en este caso la lectura realizada a 25°C la que dio un resultado más fiable.

Por otra parte, hemos puesto de manifiesto la capacidad de *Hafnia alvei* de permanecer viable tras la inoculación intraperitoneal en diferentes tejidos de la dorada durante un tiempo superior a tres meses y sin que existan signos clínicos evidentes, por lo que resulta claro el riesgo que puede constituir esta especie como animal portador, y en su caso reservorio de la infección en las áreas de difusión del patógeno.

## *Summary*

---

---

## 8.- SUMMARY

*Hafnia alvei* is present in the canary environments, but it has never been detected in marine species of this or other regions in the world. Knowing if gilthead seabream (*Sparus aurata*, L.) is a susceptible specie to ill after *Hafnia alvei* challenge, and increasing the knowledge about the virulence factors and their relationship with the pathogenicity of this bacterium for gilthead seabream and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) are the basic aims of this work.

Our study have been made it in two phases. First, we have analyzed *in vitro* the presence of virulence factors (*eae* gene, haemolytic capacity, fimbriae type I and III, resistance to the bactericidal effect of the serum and siderophores production) in 23 *Hafnia alvei* strains with different origin and sources. Second, we have evaluated the pathogenicity of different *Hafnia alvei* strains by determination of their lethal dose 50 (strains 187/95, 2566/83, C/34, X1, OR1, F4319 and 1967/82) and by the study of chronic infection challenge evolution with repeated doses of bacteria (strains 187/95, 2566/83 and C/34).

No one of the 7 strains used in lethal dose 50 experiences showed to be virulent in seabream showing  $LD_{50} > 10^8$  cfu/fish. In the experiences of chronic challenge, although the clinical signs described by other authors in natural and/or experimental infections in continental water fish was not observed, like cherry salmon, brown trout and cat fish, we observed anatomopathologic and immuno-histochemical study differences of pathogenicity among different used

### *Summary*

---

strains, being 187/95 strain that producing the biggest damage in organs of seabream, whereas C/34 strain was the less pathogenic. 2566/83 strain showed an intermediate pathogenicity between the two previous strains. In the base of the relationship of the degree of pathogenicity of *Hafnia alvei* in seabream with the different virulence factors analyzed we have only been able to establish a positive correlation between pathogenicity degree and resistance to the bactericidal effect of the serum, being in this case the reading made to 25°C the best giving the more reliable results.

On the other hand, we have shown the capacity of *Hafnia alvei* to remain viable in different organs from seabream for longer to three months, without clinical signs showed, and in this way this specie (seabream, *Sparus aurata*, L.) could contribute like a clear risk as a carrier for human health, in those areas where this pathogen exists.

## *Bibliografía*

---

Acosta, F. Real, F. Caballero, MJ. Sieiro, C. Fernández, A. Rodríguez, LA. 2002. Evaluation of Immunohistochemical and Microbiological methods for the diagnosis of Brown Trout infected with *Hafnia alvei*. *J. Aquat. Anim. Hlth.* 14: 77-83.

Adegbola, RA. Old, DC. 1982. New fimbrial hemagglutinin in *Serratia* species. *Infect Immun.* 38(1):306-15.

Adegbola, RA. Old, DC. 1983. Fimbrial haemagglutinins in *Enterobacter* species. *J Gen Microbiol.* 129 (7):2175-80.

Adegbola, RA Old, DC. 1985. Fimbrial and non-fimbrial haemagglutinins in *Enterobacter aerogenes*. *J Med Microbiol.* 19(1):35-43.

Agin, TS. Cantey, JR. Boedeker, EC. Wolf, MK. 1996. Characterization of the *eaeA* gene from rabbit enteropathogenic *Escherichia coli* strain RDEC-1 and comparison to other *eaeA* genes from bacteria that cause attaching-effacing lesions. *FEMS Microbiol. Lett.* 144:249-258.

Agustin, ET. Cunha, BA. 1995. Buttock abscess due to *Hafnia alvei*. *Clin. Infect. Dis.*, 20, 1426.

An, H. Fairbrother, JM. Dubreuil, JD. Harel, J. 1997. Cloning and characterization of the *eae* gene from a dog attaching and effacing *Escherichia coli* strain 4221. *FEMS Microbiol. Lett.* 148:239-245.

Albert, MJ. Alam, K. Islam, M. Montanaro, J. Rahaman, AS. Haider, K. Hossain, MA. Kibriya, AK. Tzipori, S. 1991. *Hafnia alvei*, a probable cause of diarrhea in humans. *Infect Immun*; 59(4) : 1507-13.

Albert, MJ. Faruque, SM. Ansaruzzaman, M. Islam, MM. Haider, K. Alam, K. Kabir, I. Robins-Browne, R. 1992. Sharing of virulence-associated properties at the phenotypic and genetic levels between enteropathogenic *Escherichia coli* and *Hafnia alvei*. *J. Med. Microbiol.* 37 (5) :310-4.

Allen, DA. 1982. Bacteria associated with freshwater fish farming, with emphasis on the fish pathogen, *Aeromonas salmonicida*. *Diss. Abstr. Int.* 45, 3163.

Allen, DA. Austin, B. Cowell, RR. 1983. Numerical taxonomy of bacterial isolates associated with freshwater fishery. *J. Gen. Microbiol.* 129: 7, 2043-2062.

Arder, AE. Murphy, JR. 1988. Nucleotide sequences and comparison of the hemolysin determinants of *Vibrio cholerae* E1 Tor RV79 (Hly-) and classical 569B (Hly-). *Infect. Immun.* 56:1414-1419.

Baba, K. Shirai, H. Terai, A. Takeda, Y. Nishibuchi, M. 1991. Similarity of the *tdh* gene-bearing plasmids of *Vibrio cholerae* non-O1 and *Vibrio parahaemolyticus*. *Microb. Pathog.* 10: 61-70.

Babu, JP. Abraham, SN. Dabbous, MK. Beachey, EH. 1986. Interaction of a 60-kilodalton D-mannose-containing salivary glycoprotein with type I fimbriae of *Escherichia coli*. *Infect Immun.* 54(1):104-8.

Balebona, MC. Andreu, MJ. Bordas, MA. Zorrilla, I. Moriñigo, MA. Borrego, JJ. 1998. Pathogenicity of *Vibrio alginolyticus* for cultured gilthead seabream (*Sparus aurata*, L.). *App. Env. Microbiol.* p 4269-4275.

Balish, MJ. Jensen, J. Uehling, DT. 1982. Bladder mucin: a scanning electron microscopy study in experimental cystitis. *J. Urol.* 128(5):1060-3.

Baptista, T. Romalde, JL. Toranzo, AE. (1996). First occurrence of pasteurellosis in Portugal affecting cultured gilthead seabream (*Sparus aurata*). *Bull. Eur. Assoc. Fish Pathol.* 16: 92-95.

Baya, AM. Romalde, JL. Green, DE. Navarro, RB. Evans, J. May, EB. Toranzo, AE. 1997. Edwardsiellosis in wild striped bass from the Chesapeake Bay. *Wildl Dis.* 33(3):517-25

Benjamin, WH. Turnbough, CL. Posey, BS. Briles, DE. 1985. The ability of *Salmonella typhimurium* to produce the siderophore enterobactin is not a virulence factor in mouse typhoid. *Infect Immun.* 50(2):392-7.

Beutin, L. Geier, D. Steinrück, H. Zimmermann, S. Scheutz, F. 1993. Prevalence and some properties of verotoxin (Shiga-like-toxin)-producing *Escherichia coli* in seven different species of healthy domestic animals. *J.Clin. Microbiol.* 31:2483-2488.

Beutin, L. 1999. *Escherichia coli* as a pathogen in dogs and cats. Inra/Elsevier.

Binde, M. Hermansen, O. 1982. *Hafnia alvei* in mastitis secretion, a case report. *Norsk Veterin.*, 94: 569-570.

Bindereif, A. Neilands, JB. 1985. Aerobactin genes in clinical isolates of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 161: 727-735.

Björkstén, B. Kaijser, B. 1978. Interaction of human serum and neutrophils with *Escherichia coli* strains: differences between strains isolated from urine of patients with pyelonephritis or asymptomatic bacteriuria. *Infect. Immun.* 22: 308-311.

Boesen, HT. Pedersen, K. Larsen, JL. Koch, C. Ellis, AE. 1999. *Vibrio anguillarum* resistance to rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) serum: role of O-antigen structure of lipopolysaccharide. *Infect. Immun.* 67 (1): 294-301.

Borah, P. Patgiri, GP. Boro, BR. 1992. Bacteriological quality of market pork in Guwahati city. *Indian Vet. J.* 69: 9, 773-775.

Broes, A. 1993. Les *Escherichia coli* pathogènes du chien et du chat. *Ann. Méd. Vét.* 137, 337-384

Bullen, JJ. Rogers, HJ. Griffiths, E. 1978. Role of iron in bacterial infection. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 80: 1-35.

## Bibliografía

Bullen, JJ. 1981. The significance of iron in infection. *Rev. Infect. Dis.* 3(6):1127-38.

Caprioli, A. 1998. Feral pigeons as a source of verocytotoxin-producing *Escherichia coli*. *Vet. Rec.* 142:309-310.

Clegg, S. Gerlach, GF. 1987. Enterobacterial fimbriae. *J. Bacteriol.* 169(3):934-8.

Cipriano, RC. 1983. Resistance of salmonids to *Aeromonas salmonicida*: relation between agglutinins and neutralizing activities. *Trans. Am. Fish. Soc.* 112, 95-99.

Colonna, B. Nicoletti, M. Casalino, M. Valenti, P. Maimone, F. 1985. Composite IS1 elements encoding hydroxamate-mediated iron uptake in FIme plasmids from epidemic *Salmonella* spp. *J. Bacteriol.* 162: 307-316.

Cosar, G. 1990. Fimbrial hemagglutinins in *Klebsiella pneumoniae*. *J. Hyg. Epidemiol. Microbiol. Immunol.* 34(3):315-21.

Craven, SE. Williams, DD. 1997. Inhibition of *Salmonella typhimurium* attachment to chicken cecal mucus by intestinal isolates of *Enterobacteriaceae* and *Lactobacilli*. *Avian Dis.* 41(3):548-58.

Daily, OP. Joseph, SW. Coolbaugh, JC. Walker, RI. Merrell, BR. Rollins, DM. Seidler, RJ. Colwell, RR. Lissner, CR. 1981. Association of *Aeromonas sobria* with human infection. *J. Clin. Microbiol.* 13(4):769-77.

Davies, RL. 1991. Virulence and serum-resistance in different clonal groups and serotypes of *Yersinia ruckeri*. *Vet. Microbiol.* 29(3-4):289-97.

De Lorenzo, V. Martínez, JL. 1988. Aerobactin production as a virulence factor: a reevaluation. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 7(5):621-9.

Dell'Omo, G. Morabito, S. Quondam, R. Agrimi, U. Ciuchini, F. Macri, A. Caprioli, A. 1998. Feral pigeons as a source of verocytotoxin-producing *Escherichia coli*. *Vet. Rec.* 142(12):309-10.

Donnenberg, MS. Kaper, JB. 1992. Enteropathogenic *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* 60:3953-3961.

Duguid, JP. Clegg, S. Wilson, MI. 1979. The fimbrial and non-fimbrial haemagglutinins of *Escherichia coli*. *J. Med. Microbiol.* 12(2):213-27.

Duguid, JP. Old, DC. 1980. Adhesive properties of *Enterobacteriaceae*. En *Bacterial adherence*, series B, vol 6, p. 186-227. E.H. Beachey (ed). Chapman & Hall, Ltd., London.

Eldar, A. Bejerano, Y. Livoff, A. Horovitz, A. Bercovier, H. 1995. Experimental streptococcal meningo-encephalitis in cultured fish. *Vet Microbiol.* 43(1):33-40.

Elliott, SJ. Wainwright, LA. MacDaniel, TK. Jarvis, KG. Deng, YK. Lai, LC. McNamara, BP. Donnenberg, MS. Kaper, JB. 1998. The complete sequence of the locus of enterocyte effacement (LEE) from enteropathogenic *Escherichia coli* E2348/69. *Mol. Microbiol.* 28:1-4.

Ellis, AE. 1987. Inhibition of the *Aeromonas salmonicida* extracellular protease by alpha 2-macroglobulin in the serum of rainbow trout. *Microb. Pathog.* 3(3):167-77.

Englund, G.W. 1969. Persistent septicemia due to *Hafnia alvei*. Report of a case. *Am. J. Clin. Pathol.* 51:717-9.

## Bibliografía

Eserstam, R. Rajaguru, TP. Jansson, PE. Weintraub, A. Albert, MJ. 2002. The structure of the O-chain of the lipopolysaccharide of a prototypal diarrheagenic strain of *Hafnia alvei* that has characteristics of a new specie under the genus *Escherichia*. *Eur. J. Biochem.* 269(13):3289-95.

Eveland, WC. Faber, JE. 1953. Antigenic studies of the group of paracolon bacteria (32011 group). *J. Infect. Dis.* 93:226-236.

Fader, RC. Davis, CP. 1980. Effect of piliation on *Klebsiella pneumoniae* infection in rat bladders. *Infect. Immun.* 30(2):554-61.

Fader, RC. Davis, CP. 1982. *Klebsiella pneumoniae*-induced experimental pyelitis: the effect of piliation on infectivity. *J. Urol.* 128(1):197-201.

Fairbrother, JM. 1993. Les colibacilloses du porc. *Ann. Méd. Vét.* 137, 369-375.

Faisal, M. Popp, W. Refai, M. 1989. *Aeromonas hydrophila*-related septicemia in the Nile tilapia *Oreochromis niloticus*. *Berl. Munch. Tierarztl. Wochenschr.* 1;102(3):87-93.

Farmer, JJ. 1999. *Enterobacteriaceae*: Introduction and identification. En: Manual of clinical microbiology, 7th edition. P.R. Murray, E.J. Baron, M.A. Pfaller, F.C. Tenover et R.H. Tenover (éd.). ASM. Press, Washington, D.C., pp. 442-458.

Fernández, AIG.; Rodríguez, LA. Nieto, TP. (1992). Survival of bacterial fish pathogens in sea water. *Aquacult.* 107: 271-276.

Fierer, J. Finley, F. Braude, AI. 1972. A plaque assay on agar for detection of gram-negative bacilli sensitive to complement. *J. Immunol.* 109(5):1156-8.

Finkelstein, RA. Sciortino, CV. McIntosh, MA. 1983. Role of iron in microbe-host interactions. *Rev. Infect. Dis.* 5: 5759-5777.

Firon, N. Ofek, I. Sharon, N. 1984. Carbohydrate-binding sites of the mannose-specific fimbrial lectins of enterobacteria. *Infect. Immun.* 43(3):1088-90.

Fouz, B. Toranzo, AE. Biosca, EG. Mazoy, R. Amaro, C. 1994. Role of iron in the pathogenicity of *Vibrio damsela* for fish and mammals. *FEMS. Microbiol. Lett.* 15;121(2):181-8.

Frank, MM. 1992. The mechanism by which microorganisms avoid complement attack. *Curr. Opin. Immunol.* 4, 14-19.

Frankel, G. Candy, DCA. Everest, P. Dougan, G. 1994. Characterization of the C-terminal domains of intimin-like proteins of enteropathogenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli*, *Citrobacter freundii*, and *Hafnia alvei*. *Infect. Immun.* 62:1835-1842.

Fukui, H. Sueyoshi, M. Haritani, M. Nakazawa, M. Naitoh, S. Tani, H. Uda, Y. 1995. Natural infection with attaching and effacing *Escherichia coli* (O103:h-) in chicks. *Avian. Dis.* 39:912-918.

Gado, I. Milch, H. Czirok, E. Herpay, M. 1989. The frequency of aerobactin production and its effect on the pathogenicity of human *Escherichia coli* strains. *Acta Microbiol. Hung.* 36(1):51-60.

Gamian, A. Romanowska, E. Dabrowski, U. Dabrowski, J. 1991. Structure of the O-specific, sialic acid containing polysaccharide chain and its linkage to the core region in lipopolysaccharide from *Hafnia alvei* strain 2 as elucidated by chemical methods, gas-liquid chromatography/mass spectrometry, and <sup>1</sup>H NMR spectroscopy. *Biochem.* 30(20):5032-8.

Gander, RM. Thomas, VL. Forland, M. 1985. Mannose-resistant hemagglutination and P receptor recognition of uropathogenic *Escherichia coli* isolated from adult patients. *J. Infect. Dis.* 151(3):508-13.

## Bibliografía

- Gallardo, CS. González, JA. Real, F. Acosta, F. y Rodríguez, LA. Toxicity and pathological effects of intraperitoneal inoculation of *Hafnia alvei* strains in *Salmo trutta*, L. 10<sup>th</sup> International Conference of the EAAP "Diseases of fish and shellfish". Dublín (Irlanda). Septiembre de 2001.
- García, E. Bergmans, HE. Van den Bosch, JF. Orskov, I. Van der Zeijst, BA. Gastar, W. 1988. Isolation and characterisation of dog uropathogenic *Escherichia coli* strains and their fimbriae. *Antonie Van Leeuwenhoek*. 54(2):149-63.
- Gelev, I. Gelev, E. Steigerwalt, AG. Carter, GP. Brenner, DJ. 1990. Identification of the bacterium associated with haemorrhagic septicaemia in rainbow trout as *Hafnia alvei*. *Res. Microbiol*. 141: 573-576.
- Glinski, Z. Kauko, L. Buczek, J. Gacek, G. 1994. *Hafnia alvei* infection of the honey bee, *Apis mellifera* L.. *Med. Weterynaryjna*. 50:74-77.
- Glinski, Z. Chmielewski, M. Kauko, L. 1995. The causative agents of septicaemia of the honey bee, isolation and identification. *Pszczelnicze Zeszyty Naukowe*. 39: 1, 107-112.
- Goffaux, F. Mainil, J. Pirson, V. Charlier, G. Pohl, P. Jacquemin, E. China, B. 1997. Bovine attaching and effacing *Escherichia coli* possess a pathogenesis island related to the LEE of human enteropathogenic *Escherichia coli* strain E2348/69. *FEMS. Microbiol. Lett*. 154:415-421.
- Goodwin, AE Killian, HS. *Hafnia alvei*, an Emerging Pathogen Of Channel Catfish. *Twenty-third Annual Eastern Fish Health Workshop*. John Carver Inn, Plymouth, Ma 30 March - 2 April. 1998
- Gower, PE. Taylor, PW. Koutsaimanis, KG. Roberts, AP. 1972. Serum bactericidal activity in patients with upper and lower urinary tract infections. *Clin. Sci*. 43: 13-22.

Griffiths, E. 1987. The iron-uptake systems of pathogenic bacteria. En: Iron and infection. JJ Bullen and E. Griffiths (ed.). John Wiley & Sons, Inc., New York, N.Y. pp 69-137.

Griffiths, E. Chart, H. Stevenson, P. 1988. High-affinity iron uptake systems and bacterial virulence. En: J.A. Roth (ed.), Virulence mechanisms of bacterial pathogens. *Am. Soc. Microb.* Washington, DC. pp 121-137.

Guérin-Faubleé, V. Rosso, L. Vigneulle, M. Flandrois, JP. (1995). The effect of incubation temperature and sodium chloride concentration on the growth kinetics of *Vibrio anguillarum* and *Vibrio anguillarum*-related organisms. *J. Appl. Bacteriol.* 78: 621-629.

Guinée, PAM. Valkenburg, JJ. 1968. Diagnostic value of a *Hafnia*-specific Bacteriophage. *J. Bact.* 96: 564.

Günthard, H. Pennekamp, A. 1996. Clinical significance of extraintestinal *Hafnia alvei* isolates from 61 patients and review of the literature. *Clin. Infect. Dis.*, 22, 1040-1045.

Hacker, J. Hof, H. Emody, L. Goebel, W. 1986. Influence of cloned *Escherichia coli* hemolysis genes, S-fimbriae and serum resistance on pathogenicity in different animal models. *Microbiol. Pathogenesis.* 1: 533-547.

Hagberg, L. Jodal, U. Korhonen, TK. Lidin-Janson, G. Lindberg, U. Svanborg Eden, C. 1981. Adhesion, hemagglutination, and virulence of *Escherichia coli* causing urinary tract infections. *Infect. Immun.* 31(2):564-70.

Harada, K. Shimizu, K. Matsuyama, T. 1957. *Hafnia* isolated from man. *Gunma. J. Med. Sci.* 6:109-112.

Harel, J. Fairbrother, J. Forget, C. Desautels, C. Moore, J. 1993. Virulence factors associated with F165-positive *Escherichia coli* strains isolated from piglets and calves. *Vet. Microbiol.* 38(1-2):139-55.

## Bibliografía

Harlow, E. Lane, D. 1988. Immunizations. In "Antibodies, a laboratory manual". Ed. By E. Harlow and D. Lane. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York. Pp.53-138.

Henderson, DP. Payne, SM. 1994. *Vibrio cholerae* iron transport systems: roles of heme and siderophore iron transport in virulence and identification of a gene associated with multiple iron transport systems. *Infect. Immun.* 62(11):5120-5.

Heuvelink, AE. Van Den Biggelaar, FL. De Boer, E. Herbes, RG. Melchers, WJ. Huis in 't Veld, JH. Monnens, LA. 1998. Isolation and characterization of verocytotoxin-producing *Escherichia coli* O157 strains from Dutch cattle and sheep. *J. Clin. Microbiol.* 36: 878-882.

Hirono, I, Masuda, T. Aoki, T. 1996. Clonig and detection of the hemolysin gene of *Vibrio anguillarum*. *Microb. Pathog.* 21:173-182.

Holland, MC. Lambris, JD. 2002. The complement system in teleosts. *Fish Shell. Immunol.* 12(5): 399-420.

Hornick, DB. Allen, BL. Horn, MA. Clegg S. 1991. Fimbrial types among respiratory isolates belonging to the family *Enterobacteriaceae*. *J. Clin. Microbiol.* 29(9):1795-800.

Hornick, DB. Allen, BL. Horn, MA. Clegg, S. 1992. Adherence to respiratory epithelia by recombinant *Escherichia coli* expressing *Klebsiella pneumoniae* type III fimbrial gene products. *Infect. Immun.* 60(4):1577-88.

Hughes, C. Phillips, R. Roberts, AP. 1982. Serum resistance among *Escherichia coli* strains causing urinary tract infection in relation to O type and the carriage of hemolysin, colicin, and antibiotic resistance determinants. *Infect. Immun.* 35: 270-275.

Ismaili, A. Bourke, B. DE Azavedo, JCS. Ratnam, S. Karmali, MA. Sherman, PM. 1996. Heterogeneity in phenotypic and genotypic characteristics among strains of *Hafnia alvei*. *J. Clin. Microbiol.*, 34, 2973-2979.

Iwahi, T. Abe, Y. Nakao, M. Imada, A. Tsuchiya, K. 1983. Role of type I fimbriae in the pathogenesis of ascending urinary tract infection induced by *Escherichia coli* in mice. *Infect. Immun.* 39:1307-15.

Jagielski, M. Sztabinska-Koncka, H. Rastawicki, W. Szych, J. Kaluzewski, S. Mrozowska, A. 1992. Occurrence of P.fimbrii in strains from selected genera of *Enterobacteriaceae*. *Med. Dosw. Mikrobiol.* 44(3-4):97-107.

Janda, JM. Abbott, SL. Albert, MJ. 1999. Prototypal diarrheagenic strains of *Hafnia alvei* are actually members of the genus *Escherichia*. *J. Clin. Microbiol.*, 37, 2399-2401.

Jankowski, S. Rowinski, S. Cisowska, A. Gamian, A. 1996. The sensitivity of *Hafnia alvei* strains to the bactericidal effect of serum. *FEMS. Immunol. Med. Microbiol.* 13: 59-64.

Jansen, BC. Hayes, M. 1983. Retardation of wool growth in Merino sheep caused by bacteria. Onderstepoort *J. Vet. Res.* 50:271-274.

Jerse, AE. Yu, J. Tall, BD. Kaper, JB. 1990. A genetic locus of enteropathogenic *Escherichia coli* necessary for the production of attaching and effacing lesions on tissue culture cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87:7839-7843.

Johnson, JR. 1991. Virulence factors in *Escherichia coli* urinary tract infection. *Clin. Microbiol. Rev.* 4(1):80-128.

Jones, GW. Isaacson, RE. 1983. Proteinaceous bacterial adhesins and their receptors. *Crit. Rev. Microbiol.* 10:229-260.

## Bibliografía

- Joiner, KA. 1988. Complement evasion by bacteria and parasites. *Annu. Rev. Microbiol.* 42, 201-230.
- Kallenius, G. Mollby, R. Svenson, SB. Winberg, J. Hultberg, H. 1980. Identification of a carbohydrate receptor recognized by uropathogenic *Escherichia coli*. *Infec.* 8, 3:288-93.
- Kauko, L. Glinski, Z. 1994. *Hafnia alvei* infection in honeybees. *Suomen Elainlaakarilehti.* 100: 5, 314-317.
- Keller, R. Pedroso, MZ. Ritchmann, R. Silva, RM. 1998. Occurrence of virulence-associated properties in *Enterobacter cloacae*. *Infect. Immun.* 66(2):645-9.
- Kelly, WR. 1993. Patterns of hepatic necrosis. In K.V.F. Jubb, P.C. Kennedy and N. Palmer (ed), *Pathology of Domestic Animals*, vol II, 4<sup>th</sup> ed., *Academic Press*, San Diego. Pp 337-346
- Khalil, AH. Mansour, EH. 1997. Toxicity of crude extracellular products of *Aeromonas hydrophila* in tilapia (*Tilapia nilotica*). *Lett. Appl. Microbiol.* 25(4):269-73.
- Kim, GT. Lee, JY. Huh, SH. Yu, JH. Kong, IS. 1997. Nucleotide sequence of the *vmhA* gene encoding hemolysin from *Vibrio mimicus*. *Biochim. Biophys. Acta.* 1360: 102-104.
- Klapholz, A. Lessnau, KD. Huang, B. Talavera, W. Boyle, JF. 1994. *Hafnia alvei*, respiratory tract isolates in a community hospital over a three-year period and a literature review. *Chest.* 105:1098-1100.
- Kleberger, A. Braatz, R. Busse, M. 1980. Taxonomy and ecology *Enterobacteriaceae* in milk. *Milchwissenschaft.* 35: 8, 457-460.
- Kodama, H. Moustafa, M. Ishiguro, S. Mikami, T. Izawa, H. 1984. Extracellular virulence factors of fish *Vibrio*: relationships between toxic material, hemolysin, and proteolytic enzyme. *Am J. Vet. Res.* 45(10):2203-2207.

Kontoghiorghes, G.J. Weinberg, ED. 1995. Iron: mammalian defense systems, mechanisms of disease, and chelation therapy approaches. *Blood Rev.* 9:33-45.

Koronakis, V. Cross, M. Senior, B. Koronakis, E. Hughes, C. 1987. The secreted hemolysins of *Proteus mirabilis*, *Proteus vulgaris*, and *Morganella morganii* are genetically related to each other and to the alpha-hemolysin of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 169: 1509-1515.

Kovacs, N. 1956. Identification of *Pseudomonas pyogenes* by the oxidase reactions. *Nature.* 178, 703.

Krieg, NR. Sneath, PH. 1994. The genus *Hafnia*. En: Bergey's manual of determinative bacteriology, 9<sup>th</sup> ed. J.G. Holt, N. R. Krieg, P. H. Sneath, J. T. Staley and S. T. Williams, eds. Williams & Wilkins, Baltimore,MD. pp. 180-234.

Krovacek, K. Faris, A. Eriksson, L. Jansson, E. Ljungberg, O. Mansson, I. 1987. Virulence, cytotoxic and inflammatory activities of *Vibrio anguillarum* and *Aeromonas salmonicida* isolated from cultivated salmonid fish in Sweden. *Acta Vet. Scand.* 28(1):47-54.

Lawlor, KM. Payne, SM. 1984. Aerobactin genes in *Shigella* species. *J. Bacteriol.* 160: 266-272.

Lee, KK. Ellis, AE. 1989. The quantitative relationship of lethality between extracellular protease and extracellular haemolysin of *Aeromonas salmonicida* in Atlantic salmon (*Salmo salar*, L.). *FEMS Microbiol Lett.* 1; 52(1-2):127-31.

Leffler, H. Svanborg-Eden, C. 1981. Glycolipid receptors for uropathogenic *Escherichia coli* on human erythrocytes and uroepithelial cells. *Infect. Immun.* 34(3):920-9.

Levine, MM. 1999. Clonal diversity of chilean isolates of enterohemorrhagic *Escherichia coli* from patients with hemolytic-uremic syndrome, asymptomatic subject, animal reservoirs, and food product. *J. Clin. Microbiol.* 37:778-781

## Bibliografía

Li, X. Jonson, DE. Mobley, HL. 1999. Requirement of MrpH for mannose-resistant *Proteus*-like fimbria-mediated hemagglutination by *Proteus mirabilis*. *Infect. Immun.* 67(6):2822-33.

López, JE. Angulo, L. (1995). Survival of *Vibrio splendidus* biotype I in sea water. *Bull. Europ. Ass. Fish. Pathol.* 15: 70-72.

Liu, PC. Lee, KK. Chen, SN. 1996. Pathogenicity of different isolates of *Vibrio harveyi* in tiger prawn, *Penaeus monodon*. *Lett. Appl. Microbiol.* 22:413-416.

Maayan, MC. Ofek, I. Medalia, O. Aronson, M. 1985. Population shift in mannose-specific fimbriated phase of *Klebsiella pneumoniae* during experimental urinary tract infection in mice. *Infect. Immun.* 49(3):785-9.

MacDougall, S. Neilands, JB. 1984. Plasmid and chromosome-coded aerobactin synthesis in enteric bacteria: insertion sequences flank operon in plasmid-mediated systems. *J. Bacteriol.* 159:300-305.

Magariños, B. Santos, Y. Romalde, JL. Rivas, C. Barja, JL. Toranzo, AE. 1992. Pathogenic activities of live cells and extracellular products of the fish pathogen *Pasteurella piscicida*. *J. Gen. Microbiol.* 138 (12):2491-8.

Magariños, B. Toranzo, AE. Romalde, JL. 1995. Different susceptibility of gilthead seabream and turbot to *Pasteurella piscicida* infection by the water route. *Bull. Eur. Ass. Fish Pathol.* 15(3), 88.

Magariños, B. Bonet, R. Romalde, JL. Martinez, MJ. Congregado, F, Toranzo, AE. 1996. Influence of the capsular layer on the virulence of *Pasteurella piscicida* for fish. *Microb. Pathog.* 21(4):289-97.

Mainil, JG. Duschesnes, CJ. Whipp, SC. Marques, LR. O'Brian, AD. Casey, TA. Moon, HW. 1987. Shiga-like toxin production and attaching effacing activity of *Escherichia coli* associated with calf diarrhea. *Am. J. Vet. Res.* 48:743-748.

Mainil, JG. Pohl, P. 1994. Les souches attachantes et effacantes d' *Escherichia coli* d'origine bovine. *Ann. Méd. Vét.* 138:419-429.

Malathi, GR. Karunasagar, I. Karunasagar, I. 1989. Virulence of *Vibrio vulnificus* strains isolated from seafoods. *Indian J. Med. Res.* 89:128-31.

Martín de las Mulas, J. Fernández, MA. Sierra, J. Poveda, B. Carranza, J. 1990. Immunohistochemical demonstration of *Mycoplasma gallinarum* and *Mycoplasma gallinaceum* in naturally infected hen oviducts. *Res. Vet. Sci.* 49, 339-345.

Martínez, JL. Cercenado, E. Baquero, F. Pérez-Díaz, JC. Delgado-Iribarren, A. 1987. Incidence of aerobactin production in Gram-negative hospital isolates. *FEMS. Microbiol. Lett.* 43: 351-355.

Martínez, JL. Delgado-Iribarren, A. Baquero, F. 1990. Mechanisms of iron acquisition and bacterial virulence. *FEMS. Microbiol. Rev.* 75: 45-56.

Maslow, JN. Dawson, D. Carlin, EA. Holland, SM. 1999. Hemolysin as a virulence factor for systemic infection with isolates of *Mycobacterium avium* complex. *J. Clin. Microbiol.* 37 (2): 445-446.

Matsumoto, T. Mizunoe, Y. Sakamoto, N. Tanaka, M. Kumazawa, J. 1990. Increased renal scarring by bacteria with mannose-sensitive pili. *Urol. Res.* 18:299-303.

McDaniel, TK. Jarvis, KG. Donnenberg, MS. Kaper, JB. 1995. A genetic locus of enterocyte affacement conserved among diverse enterobacterial pathogens. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92:1664-1668.

McQuillen, DP. Gulati, S. Rice, PA. 1994. Complement mediated bacterial killing assays. En: *Methods in Enzymology* vol. 236, *Acad. Press*, New York, pp. 137-147.

Merino, S. Camprubi, S. Alberti, S. Benedi, V. Tomas, JM. 1992. Mechanisms of *Klebsiella pneumoniae* resistance to complement mediated killing. *Infect. Immun.* 60, 2529-2535.

## Bibliografía

- Meyer, JM. Neely, A. Stintzi, A. Georges, C. Holder, IA. 1996. Pyoverdinin is essential for virulence of *Pseudomonas aeruginosa*. *Infect. Immun.* 64: 518-523.
- Miles, AA. Khimji, PL. 1975. Enterobacterial chelators of iron: their occurrence, detection, and relation to pathogenicity. *J. Med. Microbiol.* 8(4):477-90.
- Milon, A. Oswald, E. DeRycke, J. 1999. Rabbit EPEC: a model for the study of enteropathogenic *Escherichia coli*.
- Mizunoe, Y. Nakabeppu, Y. Sekiguchi, M. Kawabata, S. Moriya, T. Amako, K. 1988. Cloning and sequence of the gene encoding the major structural component of mannose-resistant fimbriae of *Serratia marcescens*. *J. Bacteriol.* 170(8):3567-74.
- Mizunoe, Y. Matsumoto, T. Sukumoto, M. 1997. Renal scarring by mannose-sensitive adhesin of *Escherichia coli* type 1 pili. *Nephron.* 77:412-416.
- Mobley, HL. Island, MD. Massad, G. 1994. Virulence determinants of uropathogenic *Escherichia coli* and *Proteus mirabilis*. *Kidney Int Suppl.* 47:S129-36.
- Moll, A. Cabello, F. Timmis, K. 1979. Rapid assay for the determination of bacterial resistance to the lethal activity of serum. *FEMS. Microbiol. Lett.* 6:673-676.
- Moon, HW. Whipp, SC. Argenzio, RA. Levine, MM. Giannella, RA. 1983. Attaching and effacing activities of rabbit and human enteropathogenic *Escherichia coli* in pig and rabbit intestines. *Infect. Immun.* 1340-1351.
- Mukherjee, SR. Das, AM. Paranjape, VL. Marwah, SR. 1986. *Hafnia alvei* isolated from an equine aborted foetus. *Indian J. Vet. Med.* 6:101-102.

Munn, CB. Ishiguro, EE. Kay, WW. Trust, TJ. 1982. Role of surface components in serum resistance of virulent *Aeromonas salmonicida*. *Infect. Immun.* 36(3): 1069-75.

Munro, ALS. Hasting, TS. Ellis, AE. Liversidge, J. 1980. Studies on an ichthyotoxic material produced extracellularly by the furunculosis bacterium, *Aeromonas salmonicida*. En: Fish Diseases, Thrid COPRAQ- session (ed. By W. Ahne). *Springer Verlag*. Berlin. Pp,98-106

Nassif, X. Sansonetti, PJ. 1986. Correlation of the virulence of *klebsiella pneumoniae* K1 and K2 with the presence of a plasmid encoding aerobactin. *Infect. Immun.* 54:603-608.

Neilands, JB. 1981-a. Iron absorpction and transport in microorganisms. *Annu. Rev. Nutr.* 1: 27-46.

Neilands, JB. 1981-b. Microbial iron compounds. *Annu. Rev. Biochem.* 50:715-731.

Neilands, JB. 1995. Siderophores: structure and function of microbial iron transport compounds. *J. Biol. Chem.* 270: 26723-26726.

Nishibuchi, M. Kaper, JB. 1985. Nucleotide sequence of the thermostable direct hemolysin gene of *Vibrio parahaemolyticus*. *J. Bacteriol.* 162:558-564.

Nonaka, M. Yamaguchi, N. Natsuume-Sakai, S. Takahashi, M. 1981. The complement system of rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *J.Immunol.* 126 (4): 1489-1494.

Ofek, I. Beachey, EH. 1978. Mannose binding and epithelial cell adherence of *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* 22: 247-254.

Ofek, I. y Doyle, RJ. 1994. Bacterial adhesión to cells and tissues. Chapman & Hall, Ltd., London, United Kingdom.

## Bibliografía

Old, DC. Adegbola, RA. 1983. A new mannose-resistant haemagglutinin in *Klebsiella*. *J. Appl. Bacteriol.* 55(1):165-72.

Old, DC. Adegbola, R. Scott, SS. 1983. Multiple fimbrial haemagglutinins in *Serratia* species. *Med. Microbiol. Immunol.* 172(2):107-15.

Old, DC. Adegbola, RA. 1984. Relationships among broad-spectrum and narrow-spectrum mannose-resistant fimbrial hemagglutinins in different *Yersinia* species. *Microbiol. Immunol.* 28(12):1303-11.

Old, DC. Tavendale, A. Senior, BW. 1985. A comparative study of the type-III fimbriae of *Klebsiella* species. *J. Med. Microbiol.* 20(2):203-14.

Olling, S. 1977. Sensitivity of gram-negative bacilli to the serum bactericidal activity: a marker of the host parasite relationship in acute and persisting infections. *Scand. J. Infect. Dis.* 10:1-40.

Otto, BR. Verweij-Van Vudht, AMJJ. MacLaren, DM. 1992. Transferrin and heme-compounds as iron sources for pathogenic bacteria. *Crit. Rev. Microbiol.* 18: 217-233.

Payne, SM. 1988. Iron and virulence in the Family *Enterobacteriaceae*. *Crit. Rev. Microbiol.* 16: 81-111.

Peerbooms, PGH. Verweij, AMJJ. MacLaren, DM. Investigation of the haemolytic activity of *Proteus mirabilis* strains. *Antonie Van Leeuwenhoek.* 49:1-11.

Perna, NT. Mayhew, GF. Posfai, G. Elliott, S. Donnenberg, MS. Kaper, JB. Blattner, FR. 1998. Molecular evolution of a pathogenicity island from enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *Infect. Immun.* 66: 3810-3817.

Podschun, R. Sahly, H. 1991. Hemagglutinins of *Klebsiella pneumoniae* and *K. oxytoca* isolated from different sources. *Zentralbl. Hyg. Umweltmed.* 191: 46-52.

Podschun, R. Teske, E. Ullman, U. 1991. Serum resistance properties of *Klebsiella pneumoniae* and *Klebsiella oxytoca* isolated from different sources. *Zentralbl. Hyg. Umweltmed.* 192:279-285.

Podschun, R. Ullmann, U. 1998. *Klebsiella* spp. as nosocomial pathogens: epidemiology, taxonomy, typing methods, and pathogenicity factors. *Clin. Microbiol Rev.* 11(4):589-603

Podschun, R. Fischer, A. Ullman, U. 2001. Characterisation of *Hafnia alvei* isolates from human clinical extra-intestinal specimens: haemagglutinins, serum resistance and siderophore synthesis. *J. Med. Microbiol.* 50. 208-214.

Pumarola, A. 1993. Enterobacterias oportunistas. En: Microbiología y Parasitología Médica. 2ª Edición. Pumarola, A. Rodríguez Torres, A. García Rodríguez, JA. Piedrola Angulo, G. *Ediciones Científicas y Técnicas*, SA. Barcelona, España. pp 441-448.

Ramm, LE. Whitlow, MB. Mayer, MM. 1983. Size distribution and stability of the trans-membrane channels formed by complement complex C5b-9. *Mol. Immunol.* 20(2):155-60.

Ratnam S. 1991. Etiologic role of *Hafnia alvei* in human diarrheal illness. *Infect. Immun.* 59 (12): 4744-5.

Real, F. Oros, J. Acosta, F. Acosta, B. Santana, P. Déniz, S. (1997). Pasteurellosis of gilthead seabream (*Sparus aurata*) in Gran Canaria Island, Spain. *Bull. Eur. Ass. Fish Pathol.* 17(5): 153-157.

Real, F. Fernández, A. Acosta, F. Acosta, B. Castro, P. Déniz, S. Orós, J. 1997. Septicemia associated with *Hafnia alvei* in laying hens. *Avian Dis.* 41 : 741-747.

Reed, JL. Muench, M. 1938. A simple method of estimating fifty percent end points. *Am. J. Hyg.* 27, 493-497.

Reina, J. Hervas, J. Borrell, N. 1993. Acute gastroenteritis caused by *Hafnia alvei* in children. *Clin. Infect. Dis.* 16 (3): 443.

## Bibliografía

Reissbrodt, R. Rabsch, W. Chapeaurouge, Alexander. Jung, G. Winkelmann, G. 1990. Isolation and identification of ferrioxamine G and E in *Hafnia alvei*. *Biol. Metals*. 3:54-60.

Refaie, RS. Abou, AA. Seham, MA Sayed, AM. 1993. Microbiological quality of suspected corned beef in Assiut. *Vet. Med. J.* 28: 205-210.

Rice, DH. Hancock, DD. Besser, TE. 1995. Verotoxigenic *Escherichia coli* O157 colonisation of wild deer and range cattle. *Vet. Rec.* 137:524.

Richard, C. Alonso, JM. 1976. Une entérobactérie méconnue : *Enterobacter hafniae*. *Bull. Inst. Pasteur*, 74, 339-352.

Ridell, C. 1987. Bacterial hepatitis. In American Association of Avian Pathologists, (ed), Avian Histopathology, 1st ed. *Allen Press*, Lawrence. , p. 61.

Ridell, J. Siitonen, A. Paulin, L. Mattila, L. Korkeala, H. Albert, MJ. 1994. *Hafnia alvei* in stool specimens from patients with diarrhea and healthy controls. *J. Clin. Microbiol.* 32 (9): 2335-7.

Rios, M. Prado, V. Trucksis, M. Arellano, C. Borie, C. Alexandre, M. Fica, A. Roantree, RL. Rantz, LA. 1960. A study of the relationship of the normal bactericidal activity of human serum to bacterial infection. *J. Clin. Invest.* 39:72-81.

Rios, M. Prado, V. Trucksis, M. Arellano, C. Borie, C. Alexandre, M. Fica, A. Levine, MM. 1999. Clonal diversity of Chilean isolates of enterohemorrhagic *Escherichia coli* from patients with hemolytic-uremic syndrome, asymptomatic subjects, animal reservoirs, and food products. *J. Clin. Microbiol.* 37(3):778-81.

Roantree, RJ. Rantz, LA. 1960. A study of the relationship of the normal bactericidal activity of human serum to bactericidal infection. *J. Clin. Invest.* 39: 72-81.

Rodríguez, LA. Ellis, AE. Nieto, TP. 1992. Purification and characterisation of an extracellular metalloprotease, serine protease and haemolysin of *Aeromonas hydrophila* strain B32: all are lethal for fish. *Microb. Pathog.* 13(1):17-24.

Rodríguez, LA. Gallardo, CS. Acosta, F. Nieto, TP. Acosta, B. Real, F. 1998. *Hafnia alvei* as a opportunistic pathogen causing mortality in brown trout (*Salmo trutta*). *J. Fish Dis.* 21: 365-370.

Rodríguez, LA. Vivas, J. Gallardo, CS. Acosta, F. Barbeyto, L. Real, F. 1999. Identification of *Hafnia alvei* with the MicroScan WalkAway system. *J. Clin. Microbiol.* 37(12):4186-8.

Romalde, JL. Toranzo, AE. 1993. Pathological activities of *Yersinia ruckeri*, the enteric redmouth (ERM) bacterium. *FEMS. Microbiol. Lett.* 15;112(3):291-9.

Romanowska, A. Gamian, A. Witkowska, D. Katzenellenbogen, E. Romanowska, E. 1994. Serological and structural features of *Hafnia alvei* lipopolysaccharides containing D-3-hydroxybutyric acid. *FEMS. Immunol. Med. Microbiol.* 8(1):83-8.

Rutz, JM. Abdullah, T. Singh, SP. Kalve, VI. Klebba, PE. 1991. Evolution of the ferric enterobactin receptor in gram-negative bacteria. *J. Bacteriol.* 173(19):5964-74.

Sakai, DK. 1984. The non-specific activation of rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson, complement by *Aeromonas salmonicida* extracellular products and the correlation of complement activity with the inactivation of lethal toxicity products. *J. Fish. Dis.* 7:5, 329-338.

Sakai, M. Atsuta, S. Kobayashi, M. 1994. Survival of fish pathogen *Edwardsiella tarda* in seawater and freshwater. *Bull. Europ. Ass. Fish Pathol.* 14 : 188-190.

Sakazaki, R. 1961. Studies on the *Hafnia* group of *Enterobacteriaceae*. *J. Med. Sci. Biol.* 14:223-241.

## Bibliografía

- Sakazaki, R. Genus IX. 1984. *Hafnia* (Møller 1954). In : N.R. KRIEG and J.G. HOLT (ed.), *Bergey's manual of systematic bacteriology*, vol. 1, *The Williams & Wilkins Co*, Baltimore, , pp. 484-486.
- Sakazaki, R. Tamura, K. 1992. The Genus *Hafnia*. In A. Balows, H.G. Trüper, M. Dworkin, W. Harder and K. Schleifer (ed.), *The Prokaryotes*, 2nd ed., vol.1. *Springer-Verlag*, New York. , Pp. 2816-2821.
- Salimov, RM. 1978. *Hafnia* strains isolated from honey. *Veterinar.* 4:44-46.
- Santos, Y. Bandin, I. Nieto, T. Núñez. S. Toranzo, AE. 1989. Haemolytic and agglutinating activities of motile *Aeromonas* from fish culture systems. *Bull. Eur. Ass. Fish. Pathol.* 9:31-34.
- Santos, Y. Lallier, R. Bandin, I. Lamas, J. Toranzo, AE. 1991. Susceptibility of turbot (*Scophthalmus maximus*), coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*) and rainbow trout (*O. mykiss*) to strains of *Vibrio anguillarum* and their exotoxins. *J. Appl. Ichthyol.* 7: 160-167.
- Sareneva, T. Holthofer, H. Korhonen, TK. 1990. Tissue-binding affinity of *Proteus mirabilis* fimbriae in the human urinary tract. *Infect. Immun.* 58(10):3330-6.
- Schauer, DB. Falkow, S. 1993. The eae gene of *Citrobacter freundii* biotype 4280 is necessary for colonization in transmissible murine colonic hyperplasia. *Infect. Immun.* 61:4654-4661.
- Schwyn, B. Neiland, JB. 1987. Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores. *Anal. Biochem.* 160:47-56.
- Seeley, HW. Van Demark, PJ. Lee, JJ. 1991. *Microbes in action*. En: A laboratory manual of microbiology, 4<sup>a</sup> ed. Freeman, WH. New York.

Sharma, RK. Boro, BR. Borah, P. 1991. Incidence of caprine pneumonia and associated bacterial species. *Indian J. Anim. Sci.* 61:54-55.

Smibert, RM. Krieg, NR. 1981. Systematics: general characterization, In P. Herhardt, R.G.E. Murray, R.N. Costilow, E.W. Nester, N.A. Wood, N.R. Krieg and G.B. Phillips (ed.), *Manual of Methods for General Bacteriology*. Am. Soc. Microbiol., Washington, D.C. Pp 409-443.

Soffientino, B. Gwaltney, T. Nelson, DR. Specker, JL. Mauel, M. Gomez-Chiarri, M. 1999. Infectious necrotizing enteritis and mortality caused by *Vibrio carchariae* in summer flounder *Paralichthys dentatus* during intensive culture. *Dis. Aquat. Organ.* 30;38(3):201-10.

Soltani, M. Burke, M. (1994). Responses of fish-pathogenic *Cytophaga/Flexibacter*-like bacteria (CFLB) to environmental conditions. *Bull. Europ. Ass. Fish Pathol.* 14: 185-187.

Sorensen, UB. Larsen, JL. 1986. Serotyping of *Vibrio anguillarum*. *Appl. Environ. Microbiol.* 51(3):593-7.

Sorkin, VM. Reshilov, LN. Baturo, AP. Salov, VF. 1991. The hemagglutinating activity of bacteria in the genus *Klebsiella* and the morphofunctional characteristics of their fimbriae. *Zh. Mikrobiol. Epidemiol. Immunobiol.* (6):18-22.

Stelma, GN. Reyes, AL. Peeler, JT. Johson, CH. Spaulding, PL. 1992. Virulence characteristics of clinical and environmental isolates of *Vibrio vulnificus*. *Appl. Environ. Microbiol.* 58: 2776-2782.

Sutton, A. Schneerson, R. Kendall-Morris, S. Robbins, JB. 1982. Differential complement resistance mediates virulence of *Haemophilus influenzae* type b. *Infect. Immun.* 35(1):95-104.

Svanborg-Éden, C. Hanson, HA. 1978. *Escherichia coli* pili as possible mediators of attachment to human urinary tract epithelial cells. *Infect. Immun.* 21:229-237.

## Bibliografía

- Taniguchi, H. Hirano, H. Kubomura, S. Higashi, K. Mizuguchi, Y. 1986. Comparison of the nucleotide sequences of the genes for the thermostable direct hemolysin and the thermolabile hemolysin from *Vibrio parahaemolyticus*. *Microb. Pathog.* 1: 425-432.
- Tarkkanen, AM. Virkola, R. Clegg, S. Coronen, TK. 1997. Binding of the type 3 fimbriae of *Klebsiella pneumoniae* to human endothelial and urinary bladder cells. *Infect. Immun.* 65(4):1546-9.
- Tavendale, A. Jardine, CK. Old, DC. Duguid, JP. 1983. Haemagglutinins and adhesion of *Salmonella typhimurium* to HEp2 and HeLa cells. *J. Med. Microbiol.* 16(3):371-80.
- Taylor, PW. Kroll, HP. 1983. Killing of an encapsulated strain of *Escherichia coli* by human serum. *Infect. Immun.* 39, 122-131.
- Taylor, PW. Kroll, HP. 1985. Effect of lethal doses of complement on the functional integrity of target enterobacteria. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 121: 135-158.
- Taylor, PW. 1992. Complement mediated killing os susceptible Gram-negative bacteria. An elusive mechanism. *Exp. Clin. Immunogenet.* 9, 48-56.
- Teshima, C. Kudo, S. Ohtani, Y. Saito, A. 1992. Kidney pathology from the bacterium *Hafnia alvei*: experimental evidence. *Trans. Am. Fish. Soc.*, 121 : 599-607.
- Texdorf, VI. Kielwein, G. Ergüllü, E. 1975. Differentiation of enterobacteria isolated from milk. *Archiv. Für. Lebensmit.* 26: 46-49.
- Thorsen, B. Enger, K. Norland, Q. Kjellarnehoff, S. 1992. Long-Term starvation survival of *Yersinia ruckeri* at different salinities studies by microscopical and flow cytometric methods. *Appl. Environ. Microbiol.* 5: 1624-1628.

Toranzo, AE. Barja, L. Hetrick, FM. 1982. Survival of *Vibrio anguillarum* and *Pasteurella piscicida* in estuarine and fresh waters. *Bull. Eur. Ass. Fish Pathol.* 3 : 43-45

Toranzo, AE. Barreiro, S. Casal, JF. Figueras, A. Magariños, B. Barja, J. 1991. Pasteurellosis in cultured gilthead seabream (*Sparus aurata*): First report in Spain. *Aquac.* 99, 1-15.

Toranzo, AE. Santos, Y. Barja, JL. 1997. Immunization with bacterial antigens: *Vibrio* infections. *Dev. Biol. Stand.* 90:93-105.

Tornajadillo, E. Fresno, J.M. Carballo, J. Martín, R. 1993. Study of *Enterobacteriaceae* throughout the manufacturing and ripening of hard goat's cheese. *J. Appl. Bacteriol.* 75: 240-246.

Trust, TJ. Courtice, ID. Khouri, AG. Crosa, JH. Schiewe, MH. 1981. Serum resistance and hemagglutination ability of marine vibrios pathogenic for fish. *Infect. Immun.* 34: 702-707.

Vaisanen, V. Elo, J. Tallgren, LG. Siitonen, A. Makela, PH. Svanborg-Eden. C. Kallenius, G. Svenson, SB. Hultberg, H. Korhonen, T. 1981. Mannose-resistant haemagglutination and P antigen recognition are characteristic of *Escherichia coli* causing primary pyelonephritis. *Lancet.* 19-26; 2(8260-61):1366-9.

Valdano, MA. Crosa, JH. 1984. Aerobactin iron transport genes commonly encoded by certain Col V plasmids occur in the chromosome of a human invasive strain of *Escherichia coli* K1. *Infect. Immun.* 46: 159-167.

Venegas, MF. Navas, EL. Gaffney, RA. Duncan, JL. Anderson, BE. Schaeffer, AJ. 1995. Binding of type I-piliated *Escherichia coli* to vaginal mucus. *Infect. Immun.* 63(2):416-22.

Vidotto, MC. Muller, EE. de Freitas, JC. Alfieri, AA. Guimaraes, IG. Santos, DS. 1990. Virulence factors of avian *Escherichia coli*. *Avian Dis.* 34(3):531-8.

## Bibliografía

- Virkola, R. Westerlund, B. Holthofer, H. Parkkinen, J. Kekomaki, M. Korhonen, TK. 1988. Binding characteristics of *Escherichia coli* adhesins in human urinary bladder. *Infect. Immun.* 56(10):2615-22.
- Vosti, KL. Randall, E. 1970. Sensitivity of serologically classified strains of *Escherichia coli* of human origin to the serum bactericidal system. *Am. J. Med. Sci.* 259: 114-119.
- Wakabayashi, H. 1991. Effect of environmental conditions on this infectivity of *Flexibacter columnaris* to fish. *J. Fish Dis.*, 14: 279-290.
- Warner, PJ. Williams, PH. Bindereif, A. Neilands, JB. 1981. Col V plasmid-specified aerobactin synthesis by invasive strains of *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* 33: 540-545.
- Weinberg, ED. Weinberg, GA. 1995. The role of iron in infection. *Curr. Opin. Infect. Dis.* 8:164-169.
- Welch, RA. Dellinger, RP. Minshew, B. Falkow, S. 1981. Hemolysin contributes to virulence of extra-intestinal *E.coli* infections. *Nature.* 294:665-667.
- Welch, RA. 1987. Identification of two different hemolysin determinants in uropathogenic *Proteus* isolates. *Infect. Immun.* 55: 2183-2190.
- Welkos, S. O'Brian, A. 1994. Determination of Median Lethal and Infectious Doses in Animal Model Systems. En: *Methods in Enzymology. Bacterial Pathogenesis. Part A. Identification and Regulation of Virulence factors.* ( ed. Clark, V.L & Bavoil, P.). *School of Medicine and Dentistry University of Rochester, Rochester, New York.* pp. 29-47
- Westblom, TU. Milligan, TW. 1992. Acute bacterial gastroenteritis caused by *Hafnia alvei*. *Clin. Infect. Dis.* 14 (6): 1271-2.

Wieler, LH. Schwanitz, A. Vieler, E. Busse, B. Steinruck, H. Karper, JB. Baljer, G. 1998. Virulence properties of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) strains of serogroup O118, a major group of STEC pathogens in calves. *J. Clin. Microbiol.* 36: 1604-1607.

Williams, PH. 1979. Novel iron uptake system specified by *Col V* plasmid: an important component in the virulence of invasive strains of *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* 26: 295-335.

Wooldridge, KG. Williams, PH. 1993. Iron uptake mechanisms of pathogenic bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* 12: 325-348.

Wright, AC. Simpson, LM. Oliver, JD. 1981. Role of iron in the pathogenesis of *Vibrio vulnificus* infections. *Infect. Immun.* 34(2):503-7.

Ximena, MV. Oriele, TM. 1983. *Hafnia alvei* aislada en un caso de aborto equino. *Arch. Med. Vet.*, 15: 90-91.

Yakubu, DE. Old, DC. Senior, BW. 1989. The haemagglutinins and fimbriae of *Proteus penneri*. *J. Med. Microbiol.* 30(4):279-84.

Yamamoto, K. Wright, AC. Kaper, JB. Morris, JG. 1990. The cytolysin gene of *Vibrio vulnificus*: sequence and relationship to the *Vibrio cholerae* E1 Tor Hemolysin gene. *Infect. Immun.* 58:2706-2709.

Yancey, RJ. Breeding, SA. Lankford, CE. 1979. Enterochelin (enterobactin): virulence factor for *Salmonella typhimurium*. *Infect. Immun.* 24(1):174-80.

Yu. J. Kaper, JB. 1992. Cloning and characterization of the *eae* gene of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *Mol Microbiol.* 6(3):411-7.

Zhang, XH. Austin, B. 2000. Pathogenicity of *Vibrio harveyi* to salmonids. *J. Fish. Dis.* 23:93-102.



---

A D. Fernando Real Valcárcel, por su dirección, asesoramiento y apoyo para la realización de este trabajo de investigación.

A Feluco, compañero de trabajo y sin embargo amigo, es una persona en la que puedes confiar para todo y siempre estará ahí para ayudarte en lo que necesites.

A Eva y a Pedro por su inestimable ayuda a la hora de realizar el estudio inmunohistoquímico.

A Inma, Vilma, Miriam, Eduardo y Dani, cinco locos con quien coincidí en el laboratorio y hacían más agradables esos momentos en los que tus neuronas decían “ya no puedo más”.

A Patricia, Soraya, Begoña, Ana, Luigi, Bismarck, Christian y María José por echarme una mano siempre que lo necesité.

A Noemí, Ángeles, Tacho, Raúl, Petri, Nicolás, Jose, Victor, Juanma, Rafa, Juan Luis, Pablo, Maite, Zoilo y María Jesús, por la ayuda prestada y hacer la estancia en la Facultad un poco más agradable.

A D. Antonio Fernández, por todo su apoyo a lo largo de todos estos años.

A las empresas de acuicultura ADSA S.A. y GRAMACAN S.A. por facilitarnos los animales que han permitido el desarrollo de esta tesis.

## *Agradecimientos*

Al Instituto Canario de Ciencias Marinas por facilitarnos el lugar donde se han realizado parte de las experiencias de infección experimental.

A los técnicos de la Sección de Pesca de la Consejería de Agricultura, Pesca y Alimentación del Gobierno de Canarias por la estrecha colaboración prestada en el desarrollo de este trabajo.

Y a todos aquellos que de una u otra forma han colaborado a llevar a buen término este trabajo.

