

## **Estudio de la eficacia de una vacuna frente a la Lactococosis de la trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*) a diferentes temperaturas del agua.**

**D. Vendrell, I. Ruiz-Zarzuela, N. Halaihel, I. de Blas, T. Pérez, O. Gironés y J.L. Múzquiz**

Laboratorio de Ictiopatología, Facultad de Veterinaria, Universidad de Zaragoza, c/ Miguel Servet 177, 50013 Zaragoza, España. e-mail: danivendrell@yahoo.es

### **Resumen**

*Lactococcus garvieae* es el agente etiológico de la Lactococosis, considerada actualmente como una enfermedad emergente responsable de graves pérdidas económicas tanto en acuicultura continental como marina cuando la temperatura del agua supera los 16°C. En la actualidad, la vacunación con vacunas inactivadas se ha establecido como el método más eficaz para controlar el proceso.

En el presente trabajo hemos evaluado la eficacia de una vacuna comercial (Icthiovac-Lg) frente a una infección experimental con *L. garvieae* en trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*) habiendo vacunado los peces a diferentes temperaturas del agua.

Dos grupos de 50 truchas de 30-35 g de peso fueron vacunadas a temperaturas de 8 y 15°C respectivamente. Fueron mantenidas en estas condiciones junto con otras 50 truchas más sin vacunar en cada grupo durante 30 días, momento en el cual se procedió a realizar una infección experimental vía intraperitoneal con una cepa patógena de *L. garvieae*. Los peces se mantuvieron en observación durante 21 días más. Al final del estudio se obtuvo un valor de RPS (Porcentaje Relativo de Supervivencia) para el grupo vacunado a temperatura alta de 96% mientras que para el grupo vacunado a 8°C fue de 83%.

### **Abstract**

Efficacy of a vaccine against Lactococcosis in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) at two different water temperatures.

*Lactococcus garvieae* is the etiological agent of Lactococcosis, an emerging disease causing important economic losses both in marine and freshwater aquaculture when water temperature increases over 16°C. Nowadays, vaccination with inactivated vaccines has been established as the best available mean to control the disease.

In the present study, we have evaluated the efficacy of a commercial vaccine (Icthiovac-Lg) in protecting rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) against *L. garvieae* experimental at two different water temperature vaccination protocols.

Two groups of 50 rainbow trouts weighing 30-35 g were vaccinated at 8°C and 15°C water temperature, respectively. Both groups and their corresponding controls were maintained at these conditions for 30 days. Vaccinated and non-vaccinated fish were challenged by intraperitoneal injection with a virulent strain of *L. garvieae* (650 cfu/fish). Fish were observed for a period of 21 days. At the end of the experimental period, the RPS (Relative Percent Survival) was 96% for group vaccinated at 15°C and 83% for fish vaccinated at 8°C water temperature. Statistically significant differences were obtained between non vaccinated and vaccinated group. A better protection was obtained at the higher temperature vaccination condition.

### **Introducción**

La Lactococosis es en la actualidad uno de los procesos infecciosos de mayor importancia que afectan a la producción de trucha arco iris debido a las elevadas pérdidas económicas que puede ocasionar. Está incluida dentro del grupo de las Estreptococosis de aguas calientes ya que el

agente causa mortalidad cuando la temperatura del agua supera 15-16°C (Ghittino, 1999). La enfermedad se describió por primera vez a finales de los años cincuenta en trucha arco iris en Japón (Hoshina *et al.*, 1958). A partir de entonces el proceso se fue extendiendo geográficamente hasta alcanzar en la actualidad la mayoría de países donde la producción de trucha arco iris es importante (Vendrell *et al.*, 2006). En España los primeros casos se describieron a finales de los años ochenta y la enfermedad se ha ido extendiendo alcanzando prácticamente la totalidad de la Península Ibérica.

Además de a la trucha arco iris, *L. garvieae* puede afectar a otras especies piscícolas y de crustáceos ocasionando elevadas mortalidades (Vendrell *et al.*, 2006). La aparición de la enfermedad está favorecida por una serie de factores ambientales como el aumento de la temperatura del agua o la mala calidad físico-química y microbiológica de ésta (Prieta *et al.*, 1993, Hurvitz *et al.*, 1997).

El tratamiento de la Lactococosis se ha basado históricamente en el uso de antibióticos como la oxitetraciclina, amoxicilina, eritromicina, ampicilina, entre otros, obteniendo distinto grado de efectividad (Vendrell *et al.*, 2006). La profilaxis está basada en el mantenimiento de unas buenas condiciones higiénico-sanitarias, diagnósticos preventivos y cuarentenas en las importaciones de peces a la explotación, y en la vacunación. Históricamente se han elaborado autovacunas inactivadas con formalina que han dado buenos resultados al aplicarse por vía intraperitoneal obteniendo un periodo de protección en torno a los 3 a 5 meses (Bercovier *et al.*, 1997). Posteriormente, estas vacunas han ido evolucionando con la adición de adyuvantes de distinta naturaleza que han incrementado su efectividad y alargado el periodo de protección (Ravelo *et al.*, 2005; Vendrell *et al.*, 2007).

Por lo general, al tratarse de un proceso estacional los peces son vacunados cuando la temperatura del agua está alrededor de 12-15 °C, un mes antes del incremento de la temperatura del agua para que así los peces estén protegidos durante los meses de verano, cuando el riesgo de aparición de brotes de Lactococosis es mayor. Esto conlleva una elevada demanda de mano de obra en un corto periodo de tiempo que dificulta el normal desarrollo del trabajo en las explotaciones.

El objetivo del presente trabajo fue evaluar la eficacia de una vacuna inactivada comercial (Icthiovac-Lg, Laboratorios Hipra S.A.) frente a una infección experimental con una cepa patógena de *L. garvieae* en dos grupos de truchas arco iris vacunadas a diferentes temperatura del agua, un grupo a 15 °C y el otro a 8°C, con el propósito de determinar si la vacunación a temperatura baja del agua confiere un nivel aceptable de protección frente a la enfermedad.

### Material y Métodos

El experimento se llevó a cabo en la Piscifactoría experimental del Laboratorio de Ictiopatología de la Univesidad de Zaragoza. Para ello se prepararon 2 tanques de 1000 l de capacidad con circuito abierto de agua (renovación diaria del 25% del agua) y oxigenación forzada. En cada uno de los tanques se introdujeron 100 truchas arco iris de 30-35 g de peso. El grupo 1 se mantuvo a una temperatura de 8°C mientras que el grupo 2 se mantuvo a 15°C. Antes de la vacunación los animales se mantuvieron en periodo de aclimatación durante una semana con el fin de evitar la intervención del estrés del transporte y el cambio de hábitat en los resultados. Cincuenta peces de cada grupo fueron vacunados por vía intraperitoneal con una dosis de 0.1 ml de Icthiovac-Lg, posteriormente antes de devolverlos al tanque fueron marcados mediante corte de la aleta adiposa para diferenciarlos del resto de peces de su grupo que no fueron vacunados.

Durante los días sucesivos hasta el día 30, se mantuvieron en observación, momento en el cual se procedió a realizar la infección experimental de todos los peces de cada grupo por vía intraperitoneal con una cepa patógena de *L. garvieae*, a razón de 650 UFC (Unidades Formadoras de Colonias) por animal. Entre el día 29 al día 32 se fue aumentando progresivamente la temperatura del agua e los dos grupos hasta dejarla estabilizada en 20±1°C, que se considera como temperatura idónea para el desarrollo de la enfermedad.

Durante los días sucesivos a la infección experimental se realizó una recogida de datos cada 12 horas para evaluar la mortalidad en ambos grupos y diferenciar de si se trataba de animales vacunados o sin vacunar, así como recogida de muestras de los animales muertos para evaluar la causa de muerte y los síntomas y lesiones.

Primero se estimó el porcentaje relativo de supervivencia (RPS) (Amend, 1981; European Pharmacopoeia, 2002) para cada grupo para evaluar la eficacia vacunal de cada grupo. Además se realizó un análisis de supervivencia utilizando la técnica de Kaplan-Meier, y el contraste estadístico de log-rank. Se estableció el error alfa en 0.05. Los cálculos estadísticos se realizaron con SPSS 12.0 para Windows.

## Resultados

La supervivencia final, el tiempo de supervivencia y RPS para cada grupo se muestran en la Tabla I.

Tabla I. Supervivencias observadas para cada uno de los grupos tratados.

Grupo	Supervivencia (horas) media $\pm$ DS	Supervivencia final	RPS
Control positivo 8°C	179 $\pm$ 17	10%	83%
Vacunados 8°C	448 $\pm$ 18	84%	
Control positivo 15°C	161 $\pm$ 13	6%	96%
Vacunados 15°C	489 $\pm$ 10	96%	

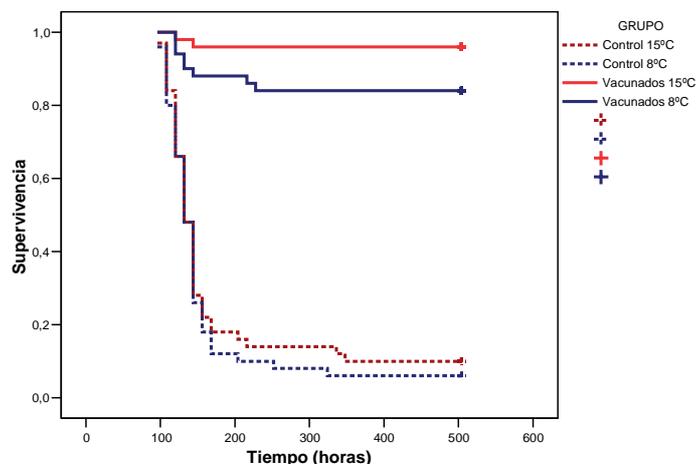


Figura 1. Curvas de supervivencia para los cuatro grupos de tratamiento.

Se observaron diferencias significativas entre los cuatro grupos ( $p < 0.0001$ ). Esto indica que al menos uno de los grupos presentó una curva de supervivencia significativamente distinta que el resto (Figura 1).

Al realizar la comparación por las mismas técnicas entre los dos grupos controles no se observó diferencia significativa ( $p = 0.5456$ ), mientras que al comparar los dos grupos vacunados se observó que la temperatura influía significativamente ( $p = 0.0471$ ) siendo el grupo vacunado a 15°C el que presentó mayor supervivencia.

### Conclusiones

La vacunación se considera efectiva en ambos grupos independientemente de la temperatura a la que se administra la vacuna ya que se obtiene un RPS superior a 70%, que es el valor que se considera como aceptable para vacunas inactivadas de aplicación por vía intraperitoneal .

Además se ha observado que el hecho de vacunar a una temperatura superior hace que la efectividad sea mayor que cuando se vacuna a temperaturas bajas del agua, aunque la protección conferida en este caso es adecuada.

### Agradecimientos

Los autores desean expresar su agradecimiento a Laboratorios Hipra S.A.

### Bibliografía

- Amend, D.F. 1981. Potency testing of fish vaccines. En: *Fish Biologics: Serodiagnostics and Vaccines*. Hennessen W, ed. Basel: Karger, 447-454.
- Bercovier, H., C. Ghittino, y A. Eldar, 1997. Immunization with bacterial antigens: infection with streptococci and related organisms. *Developments in Biological Standardization*. 90: 153-160.
- European Pharmacopoeia, 2002. Furunculosis vaccine (inactivated, oil-adjuvanted, injectable) for salmonids. *European Pharmacopoeia*, 4th edn, Strasbourg, France.
- Ghittino, C. 1999. La estreptococosis en los peces. *Revista AquaTIC*, 6, febrero 1999. URL: <http://aquatic.unizar.es>.
- Hoshina, T., T. Sano e Y.A Morimoto, *Streptococcus* pathogenic to fish. 1958. *Journal of Tokio University Fisheries* 44: 57-58.
- Hurvitz, A., H. Bercovier, y J. Van Rijn, 1997. Effect of ammonia on the survival and the immune response of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) vaccinated against *Streptococcus iniae*. *Fish & Shellfish Immunology* 7: 45-53.
- Prieta, J., A.M. Doménech, J.F. Fernández-Garaizábal, M.D. Collins, U.M. Rodríguez, D. Jones, A. Rodríguez y L. Domínguez. 1993. Lactococcosis de la trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*). *Medicina Veterinaria* 10: 367-373.
- Ravelo, C., B. Magariños, M.C. Herrero, L. Costa, A.E. Toranzo, y J.L. Romalde, 2005. Use of adjuvanted vaccines to lengthen the protection against lactococcosis in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture* 251: 153-158.
- Vendrell, D., J.L. Balcázar, I. Ruiz-Zarzuela, I. de Blas, O. Gironés, y J.L. Múzquiz, 2006. *Lactococcus garvieae* in fish: a review. *Comparative Immunology Microbiology and Infectious Diseases* 29: 177-198.
- Vendrell, D., J.L. Balcázar, I. Ruiz-Zarzuela, I. de Blas, O. Gironés, y J.L. Múzquiz, 2007. Safety and efficacy of and inactivated vaccine against *Lactococcus garvieae* in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Preventive Veterinary Medicine* 80: 222-229.