



**“Desarrollo y evaluación de la eficacia de una vacuna tipo bacterina para la
prevención de la tenacibaculosis, enfermedad emergente de salmónidos en
Chile”**

Memoria para optar al título de Bioquímica

Angélica del Carmen Romero Escobar

Director de memoria:

Dr. Matías Poblete Morales

Investigación y desarrollo

Veterquímica S.A

Profesor patrocinante:

Dr. Sergio Álvarez Armijo

Departamento de Bioquímica y Biología

Molecular

Facultad de Ciencias Químicas y

Farmacéuticas

Universidad de Chile

Santiago de Chile

2023

AGRADECIMIENTOS

El fin de una etapa comienza con estas palabras, esperando que plasmen mi profundo agradecimiento a todos quienes me apoyaron, tanto intelectual como emocionalmente en este viaje llamado universidad.

Agradezco a mi madre, Nancy, quien me crio con amor e implacable tenacidad, siendo un pilar de apoyo incondicional y un motor de avance, a ella, espero hacerla sentir orgullosa. A mi hermano, Alonso, quien me enseñó la paciencia, la preocupación, y la despreocupación, por todas esas tardes de juegos y comidas deliciosas, te agradezco.

A mis perritos, copito quien partió, pero con su incondicional amor me salvo y a Luna que alegra mis días y me contagia con su excesiva energía, a ellos les agradezco.

Agradezco a mis amadas amigas de la vida, Nicole y Camila, quienes me brindaron su incondicional apoyo y me animaron a mejorar y a seguir adelante. A mis queridos Daniel, Mane, Dana, Roquesin, Pancho y Chang, con quienes me hubiera gustado disfrutar más la etapa de locura y despreocupación llamada universidad.

Agradezco a mi Victoria, mi compañera, por su amor y comprensión, con el cual me ayudo y enseñó a ver el mundo con otros ojos, ojos que reavivaron mi pasión por la bioquímica

Agradecer finalmente a quien contribuyó a mi formación profesional de manera determinante, quien me enseñó el verdadero significado de enseñanza, quien resultó ser un gran mentor en este camino lleno de dudas, quien me guió en un camino de incertidumbre e inseguridad, que logró darme claridad y un ejemplo a seguir. A Matias le dedico esta frase: *“A teacher affects eternity; he can never tell where his influence stops.” Henry Adams.*

Finalmente agradezco a los profesores parte de mi comisión evaluadora, quienes también fueron parte de mi formación, que los recuerdo impartiendo asignaturas con gran pasión y dedicación.

ÍNDICE GENERAL

AGRADECIMIENTOS.....	i
ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS.....	iv
ABREVIATURAS	v
RESUMEN.....	vii
SUMMARY	viii
I.- INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 Salmonicultura chilena.....	1
1.2 Tenacibaculosis enfermedad emergente de salmónidos en Chile.....	1
1.3 <i>Tenacibaculum</i> spp.	2
1.4 Sistema inmune de los peces	3
1.5 Vacunación en la industria acuícola	3
1.6 Desarrollo de vacunas contra la tenacibaculosis.....	4
1.7 Hipótesis y objetivos.....	5
II.- MATERIALES Y MÉTODOS.....	6
2.1 Aislados y cepas bacterianas.....	6
2.2 Extracción de ADN genómico	6
2.3 PCR convencional diagnóstico para <i>T. finnmarkense</i> y <i>T. dicentrarchi</i>	6
2.4 Caracterización fenotípica de aislados nativos	7
2.5 Secuenciación de 16S rRNA.....	7
2.6 Análisis de secuencias multilocus (MLSA).....	8
2.7 Genotipificación mediante RAPD	9
2.8 Serotipificación de aislados	9
2.9 Formulación vacunal y modelo de desafío	10
2.10 Animales para investigación.....	11
2.11 Evaluación de respuesta inmune mediante expresión génica	11

2.12 Titulación de IgM sérica posterior a la vacunación	12
2.13 Eficacia de los prototipos vacunales	13
2.14 Análisis taxonómico y estadístico.....	13
III.- RESULTADOS	14
3.1 Caracterización fenotípica y genotípica de 15 aislados chilenos estableció la pertenencia a especies de <i>T. dicentrarchi</i> , <i>T. finnmarkense</i> y <i>T. piscium</i>	14
3.2 Prototipos vacunales estimulan el sistema inmune de <i>O. mykiss</i> y <i>S. salar</i> , aumentando la expresión de marcadores moleculares y estimulando la producción de anticuerpos contra <i>Tenacibaculum</i> sp.	22
3.3 La vacunación con el prototipo 23010 resulta eficaz, ya que disminuye la mortalidad en desafíos con una cepa heteróloga.....	25
IV.- DISCUSIÓN	26
V.- CONCLUSIONES	31
VI.- REFERENCIAS.....	32
VII.- ANEXOS	39

ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS

Tabla 1. Cebadores y condiciones utilizadas para amplificación de genes asociados a MLSA.....	8
Tabla 2. Cebadores y sondas de marcadores moleculares.	12
Figura 1. Producto de amplificación de PCR Tenadi.....	14
Tabla 3. Caracterización bioquímica de aislados nativos de <i>Tenacibaculum</i> spp.	16
Figura 2. Perfil genético RAPD-PCR.	17
Tabla 4. 16S rRNA aislados <i>Tenacibaculum</i> sp.....	18
Figura 3. Reconstrucción filogenética de aislados de <i>Tenacibaculum</i> sp. basada en el 16S rRNA.	19
Figura 4. Árbol MLSA concatenado.	20
Tabla 5. Esquema de serotipificación basado en el antígeno “O”.	21
Figura 5. Evaluación inmunológica post vacunación en <i>S. salar</i>	23
Figura 6. Evaluación inmunológica post vacunación en <i>O. mykiss</i>	24
Figura 7. Supervivencia de <i>O. mykiss</i> post desafío con cepa 2206.....	25

ABREVIATURAS

% v/v – concentración porcentaje volumen-volumen

ADN – ácido desoxirribonucleico

ADNc – ADN complementario

rRNA – ácido ribonucleico ribosomal

AM – Agar marino

BLAST – Herramienta básica de búsqueda de alineamiento local.

Dot-Blot – Técnica de detección de biomoléculas por gota.

FMM – Medio/caldo de *Flexibacter maritimus*

Fw – Cebador directo

HRP – Peroxidasa de rábano

IFN- γ – Interferón gamma

IgG – Inmunoglobulina G

IgM – Inmunoglobulina M

LPS – Lipopolisacárido.

min – minutos

NCBI – Centro Nacional para la Información Biotecnológica.

NF- κ B – factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas

OD – Densidad óptica

PAMPS – patrones moleculares asociados a patógenos (siglas en ingles)

pb – pares de bases

PBS – Tampón fosfato salino.

PCR – Reacción en cadena de la polimerasa.

ppmil – partes por mil

RAPD – Amplificación aleatoria de ADN polimórfico

RPS – Porcentaje relativo de supervivencia

Rv – Cebador inverso

TBS – Solución salina tamponada con Tris

UFC – unidades formadoras de colonias

UTA – Unidades térmicas acumuladas

RESUMEN

La tenacibaculosis es una enfermedad emergente en salmónidos, con mortalidades que rondan entre el 14-35,4% de enfermedades infecciosas, producida por bacterias del género *Tenacibaculum*, siendo *T. dicentrarchi* y *T. finnmarkense* las causantes principales de brotes en Chile. En vista del impacto de esta enfermedad en la industria acuícola chilena y las consecuencias de no contar con una herramienta efectiva para su control, en esta investigación se planteó evaluar la eficacia de un prototipo vacunal fabricado a partir de aislados bacterianos chilenos.

Aislados bacterianos obtenidos de centros de cultivo de salmónidos del sur de Chile, fueron identificados inicialmente por PCR específico, catalogando 15 como *Tenacibaculum* sp., estos fueron caracterizados bioquímicamente y evaluando su clonalidad mediante PCR-RAPD. Los estudios anteriores fueron complementados con la secuenciación de 16S RNA, *rpoB*, *fusA*, *tuF*, *atpD*, *rlmN* e *ileS*, para su identificación taxonómica y análisis filogenético, determinando que estos se encontraban cercanos a especies previamente descritas en nuestra salmonicultura, a su saber *T. dicentrarchi* (3), *T. finnmarkense* (4) y *T. piscium* (8).

Si bien no existe un esquema de serotipificación para las especies antes mencionadas, esta investigación intentó determinar mediante pruebas inmunológicas clásicas si existía reactividad cruzada entre las especies señaladas, logrando determinar que los 15 aislados analizados eran homólogos entre sí incluyendo a la cepa tipo *T. dicentrarchi* CECT 7612. Además, no se logró demostrar reactividad con suero fabricado a partir de la cepa tipo *T. maritimum* CECT 4276.

Dos prototipos vacunales fueron formulados a partir de un aislado especie *T. finnmarkense* (23010) y uno *T. dicentrarchi* (LT2), determinando que ambos generan respuesta inmune en *O. mykiss* y *S. salar*, estimulando principalmente la vía molecular de NF- κ B, además de una respuesta inmune adaptativa que estimula la formación de anticuerpos IgM contra *Tenacibaculum* sp., los cuales permanecen hasta por lo menos 600 UTA post vacunación. Finalmente, la eficacia del prototipo vacunal 23010 fue corroborada mediante un desafío con *T. finnmarkense* en *O. mykiss* a las 600 UTA, presentando un RPS de 77%.

La vacuna 23010 presenta datos robustos que indican una posible solución para mitigar los futuros brotes de tenacibaculosis en Chile, requiriendo futuros estudios acerca de la protección que puede conferir contra otras especies del género y su aplicación en otras especies de salmónidos, de forma que se aclare su real alcance.

SUMMARY

“Development and evaluation of the efficacy of a bacterin-type vaccine for the prevention of tenacibaculosis, an emerging disease of salmonids in Chile”

Tenacibaculosis is an emerging disease in salmonids, with mortalities ranging from 14-35.4% of infectious diseases, produced by bacteria of the genus *Tenacibaculum*, *T. dicentrarchi* and *T. finnmarkense* being the main causes of pathogenic outbreaks in Chile. In view of the impact of this disease in the Chilean aquaculture industry and the consequences of not having an effective method to prevent and treat this pathogen, this investigation proposed to evaluate the efficacy of a vaccine prototype developed from Chilean bacterial isolates.

Bacterial isolates obtained from salmonid farming centers in southern Chile were identified by specific PCR, determining 15 as *Tenacibaculum* sp., characterizing them biochemically and evaluating their clonality by RAPD-PCR. The previous studies were complemented with the sequencing of 16S RNA, *rpoB*, *fusA*, *tuF*, *atpD*, *rlmN* and *ileS*, for their taxonomic identification and phylogenetic analysis, determining that these were close to species previously described in Chilean aquaculture, namely *T. dicentrarchi* (3), *T. finnmarkense* (4) and *T. piscium* (8).

Although there is no serotyping scheme for the aforementioned species, this investigation tried to determine by means of classical immunological tests if there was cross-reactivity between the indicated species, managing to determine that the 15 isolates analyzed were homologous to each other together, including the type strain *T. dicentrarchi* CECT 7612. Furthermore, no reactivity was demonstrated with serum developed from the type strain *T. maritimum* CECT 4276.

Two vaccine prototypes were formulated from an isolated species *T. finnmarkense* (23010) and one *T. dicentrarchi* (LT2), determining that both generate an immune response in *O. mykiss* and *S. salar*, mainly stimulating the NF- κ B molecular pathway, in addition to an adaptive immune response that stimulates the formation of IgM antibodies against *Tenacibaculum* sp. which remain for at least 600 ATU post-vaccination. Finally, the efficacy of the 23010-vaccine prototype was confirmed by a bath challenge with *T. finnmarkense* in *O. mykiss* at 600 ATU, presenting an RPS of 77%.

The 23010 vaccine presents robust data that indicate a possible solution to mitigate future outbreaks of tenacibaculosis in Chile, requiring future studies on the protection it can confer against other species of the genus and its application in other salmonid species, as to clarify its real scope.

I.- INTRODUCCIÓN

1.1 Salmonicultura chilena

En los últimos años, Chile se ha posicionado como el segundo mayor exportador de salmónidos, sólo por debajo de Noruega, generando cerca del 27% de la producción mundial. Solo durante la última década, las exportaciones de salmónidos se han duplicado, llegando en el 2021 a representar un 12,5% de las exportaciones chilenas distintas del cobre (SUBREI, 2021). Para satisfacer la alta demanda de este alimento, la industria salmonera ha aumentado drásticamente su producción, logrando en 2021 producir cerca de 970 mil toneladas de salmónidos (SERNAPESCA, 2022a). Para sustentar esta producción, la industria chilena ha aumentado la biomasa en producción, lo que puede propiciar el surgimiento de brotes de enfermedades infecciosas en los salmónidos cultivados (Avendaño-Herrera y cols., 2020; Pettersen y cols., 2015).

1.2 Tenacibaculosis enfermedad emergente de salmónidos en Chile

La tenacibaculosis es una enfermedad infecciosa que causa lesiones cutáneas ulcerosas y/o necróticas, aletas podridas y boca erosionada, que ha sido reportada en la mayoría de los países productores de salmón, causada por bacterias del género *Tenacibaculum* (Fernandez-Alvarez y Santos, 2018b; Avendaño-Herrera y cols., 2016). En Chile, la tenacibaculosis es una enfermedad infecciosa emergente, tomando importancia debido al aumento de los brotes de esta enfermedad y a la alta mortalidad producida en salmónidos de cultivo ligada a la falta de tratamientos eficaces para combatirla (Flores-Kossack y cols., 2020; Irgang y cols., 2021).

Durante el año 2021, en la producción de salmón del Atlántico (*Salmo salar*), la mortalidad producida por enfermedades infecciosas fue del 23,3%, de las cuales la tenacibaculosis representó el 35,4%, aumentando un 1,4% respecto al ciclo productivo anterior (SERNAPESCA, 2022a). Para la producción de salmón coho (*Oncorhynchus kisutch*) en 2021, la mortalidad atribuida a la tenacibaculosis fue de 5,5%, disminuyendo un 9% en el primer semestre de 2022 (SERNAPESCA, 2023). En tanto para la producción de trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*), la tenacibaculosis no tuvo gran impacto en el ciclo productivo 2021, pero en el primer semestre de 2022 se posicionó con un 14% como la segunda causa de mortalidad, casi un 9% más que en el primer semestre de 2021 (SERNAPESCA, 2023).

El tratamiento para esta patología se basa en el uso de terapias antibióticas vía alimento, utilizando 3,1 toneladas de oxitetraciclina y 6,2 toneladas de florfenicol durante el 2020 en

Chile (Irgang y cols., 2021), cifras que resultan preocupantes ya que en la última década el uso de antibióticos se ha duplicado en la salmonicultura, llegando a 463 toneladas solo para el ciclo productivo 2021 (SERNAPESCA, 2022b). El uso de antimicrobianos genera inquietud, debido a que cerca del 80% de los antimicrobianos son excretados y terminan sedimentados en el suelo marino (Hektoen y cols., 1995), sedimentos que además albergan depósitos de nitrógeno derivados de desechos orgánicos que promueven la tasa de replicación de algunos patógenos e influyen negativamente en la respuesta inmune de los animales (Leung y Bates, 2013). En consecuencia, se generan las condiciones propicias para la selección de aislados resistentes y surgimiento de brotes infecciosos.

1.3 *Tenacibaculum* spp.

Las bacterias del género *Tenacibaculum* forman parte de la familia de las Flavobacteriaceae filo Bacteroidetes. Algunas características de esta familia son: ser bacilos filamentosos Gram negativos, catalasa y oxidasa positivos, aeróbicos estrictos y usualmente forman colonias pigmentadas amarillas, que varían en tamaño (Suzuki y cols., 2001). Los bacilos tienen un diámetro entre 0,3 y 0,6 μm y un largo no mayor a 10 μm . Si bien carecen de flagelos algunas especies pueden presentar motilidad del tipo deslizante (Bernardet y Nakagawa, 2006). Se pueden cultivar en los medios *flexibacter maritimus* (FMM) y agar marino (AM) (Fernández-Álvarez y Santos, 2018b). Los aislados varían en su capacidad de soportar la temperatura, salinidad y reducción de nitrato, sin embargo, su tolerancia al pH es similar (Bernardet y Nakagawa, 2006). Este género se encuentra ampliamente distribuido en el mundo, formando parte de la microbiota de una gran variedad de fauna (Fernández-Álvarez y Santos, 2018b; Karlsen y cols., 2017; Småge y cols., 2016b) y flora marina (Apablaza y cols., 2017).

Hasta el momento existen 31 especies parte de este género (<https://lpsn.dsmz.de/genus/tenacibaculum>), de las cuales siete especies son patogénicas para peces, *Tenacibaculum maritimum*, *Tenacibaculum dicentrarchi*, *Tenacibaculum discolor*, *Tenacibaculum soleae*, *Tenacibaculum gallaicum* y *Tenacibaculum ovolyticum* (Habib, C. y cols., 2014), además de *Tenacibaculum finnmarkense* (Småge y cols., 2016a).

Es reconocido que las especies bacterianas que afectan a los salmónidos son oportunistas, ya que ante estresores inmunológicos y/o condiciones de disbiosis en el hospedero generan un cuadro patológico (Wynne y cols., 2020). *T. maritimum* fue la especie mayormente asociada a la tenacibaculosis (Frisch y cols., 2018) en salmónidos, no obstante, los reportes más

actuales identifican *T. dicentrarchi* y *T. finnmakense* como los causantes principales de brotes en salmónidos cultivados en Chile (Avendaño-Herrera y cols., 2020) y Noruega (Klakegg y cols., 2019; Spilsberg y cols., 2022).

1.4 Sistema inmune de los peces

Los salmónidos son vertebrados de a la infraclase de los teleósteos, no poseen médula ósea, por lo que la hematopoyesis se lleva a cabo en el riñón cefálico, actuando además como un órgano linfoide primario y secundario. Otros órganos linfoides que participan en el sistema inmune de los teleósteos son las branquias, el timo y el bazo, considerando este último un órgano linfoide secundario primordial (Bjørngen y Koppang, 2021).

Esta infraclase comparte algunas características inmunes con los mamíferos, tales como linfocitos T y B, complejo mayor de histocompatibilidad y citoquinas, entre otros. En comparación con el sistema inmune de los mamíferos, la respuesta inmune secundaria de los teleósteos es significativamente menor, además de no poseer IgG, reconocida inmunoglobulina de memoria en mamíferos. Si bien los peces no poseen esta glicoproteína, son capaces de expresar otras inmunoglobulinas, tales como IgM, IgD e IgT/IgZ (Yu y cols., 2020). IgM resulta ser la inmunoglobulina de mayor abundancia sérica y se la ha relacionado con la respuesta inmune adaptativa, debido a que luego de un proceso de vacunación se produce un cambio en su conformación y un aumento de su afinidad por antígenos específicos (Costa y cols., 2019).

Es importante señalar que el sistema inmunológico de los peces teleósteos aún no se encuentra completamente dilucidado, lo que ha conllevado a un retraso en los avances de la vacunación y hace necesario complementar la investigación con seguimientos de marcadores moleculares para determinar como un patógeno, o inclusive una vacuna, estimula o inhibe la respuesta primaria y secundaria de los peces.

1.5 Vacunación en la industria acuícola

En los sistemas acuícolas de producción intensiva, la vacunación de peces es una práctica bastante utilizada para prevenir enfermedades bacterianas y virales, contribuyendo a la reducción del uso de antibióticos (Adams, 2019; Ma y cols., 2019). Para el desarrollo de vacunas se deben tomar en cuenta diversos factores, tales como la especie del patógeno, la identificación de antígenos, el método de administración, modelo de desafío y la especie de pez, ya que cada especie hospedera tiene diferentes respuestas inmunológicas ante los patógenos (Avendaño-Herrera y cols., 2016; Adams, 2019; Flores-Kossack y cols., 2020).

Existen tres métodos principales de inmunización: vacunas inyectables, orales y de inmersión. Estas últimas resultan ser mucho más convenientes en cuanto a manejo de los animales, sin embargo, las inyectables generan una respuesta inmune más duradera y eficaz, que necesita de dosis mucho menores (Chettri y cols., 2013; Toranzo y cols., 1995), reflejándose su mayoritario uso en 43 de las 55 vacunas registradas en Chile (Flores-Kossack y cols., 2020). Diferentes tipos de vacunas son utilizadas en la acuicultura: vacunas vivas atenuadas, recombinantes e inactivadas (bacterinas y virinas), siendo estas últimas las más usadas en la industria (Ma y cols., 2019) debido a su alta efectividad. Sin embargo, la efectividad de las vacunas está íntimamente ligada a la adición de adyuvantes, los cuales optimizan y elevan la respuesta inmune de los peces (Adams, 2019).

1.6 Desarrollo de vacunas contra la tenacibaculosis

Los reportes de vacunas para la prevención de la tenacibaculosis son limitados, enfocándose principalmente en *T. maritimum*, destacando tres vacunas que presentaron un RPS mayor al 70%. La vacuna comercial ICTHIOVAC®-TM (Hipra *Laboratories*), fabricada para ser usada en *Scophthalmus maximus* (rodaballo), reporta porcentajes relativos de supervivencia del 75%. Una autovacuna diseñada en Singapur el año 2015, usada en *Dicentrarchus labrax* (lubina) reportó un RPS de 95% (Rafidah y cols., 2015). Finalmente, el reporte de una vacuna viva atenuada usada en *Paralichthys olivaceus* (fletán), que proporcionó porcentajes relativos de supervivencia de entre 77% y 100% (Lee y cols., 2019). Los estudios antes mencionados son un precedente de la efectividad de vacunas contra tenacibaculosis, sin embargo *T. maritimum* no presenta una amenaza en la acuicultura chilena.

En consideración a vacunas contra otras especies del género, existe el reporte de una vacuna tipo bacterina contra *T. finnmarkense*, la cual, si bien presentó aumento de anticuerpos, no fue efectiva en la prevención de la mortalidad. No obstante, los autores destacan que la mortalidad observada en grupos control, podría indicar que las condiciones experimentales afectaron la virulencia de los microorganismos, o bien, afectaron negativamente el metabolismo de los animales y en consecuencia no se pudo comprobar la efectividad de la vacuna (Småge y cols., 2018).

Lo anterior nos permite dilucidar lo complejo de obtener una fórmula vacunal, ya que la elección de un antígeno, su dosis, la vía de administración, como los adyuvantes resultan primordiales para la efectividad de la vacuna, ya que pueden estimular en diferente grado el sistema inmune y con ello la protección contra la enfermedad. Por consiguiente, resulta

importante realizar estudios polifásicos de las cepas bacterianas candidatas para la producción de antígenos, con el fin de encontrar características que nos indiquen una mayor probabilidad de eficacia de la vacuna.

Entonces, la tenacibaculosis es una enfermedad que causa una alta tasa de mortalidad, es una enfermedad de difícil tratamiento y prevención, que en los últimos años ha provocado pérdidas a la industria salmonera nacional. Con el fin de encontrar una solución preventiva eficiente contra esta enfermedad, se decidió utilizar aislados bacterianos de *Tenacibaculum* sp. obtenidos desde peces enfermos en Chile, para el desarrollo de una vacuna que confiera protección contra esta enfermedad, caracterizando mediante un estudio polifásico distintos aislados del patógeno, desarrollando distintos formulados vacunales inyectables y evaluando su efectividad inmunológica mediante técnicas moleculares.

1.7 Hipótesis y objetivos

HIPÓTESIS

Vacunas inyectables formuladas a partir de aislados chilenos de *Tenacibaculum* spp. inducen respuestas inmunitarias y anticuerpos específicos en *O. mykiss* y *S. salar*, lo que resulta en una disminución significativa de la mortalidad en desafíos experimentales.

OBJETIVO GENERAL

Evaluar bacterinas inyectables y su capacidad de inducir respuesta inmune específica en *O. mykiss* y *S. salar*, además de evaluar su efectividad contra infecciones experimentales de *Tenacibaculum* spp. bajo condiciones controladas.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Caracterizar aislados chilenos de *Tenacibaculum* spp. mediante pruebas bioquímicas, enzimáticas y moleculares, con el fin de seleccionar candidatos para formulados vacunales.
2. Evaluar el establecimiento de respuesta inmune en ejemplares de *O. mykiss* y *S. salar* vacunados con formulados vacunales, mediante análisis de la expresión génica de marcadores de inmunidad y la identificación de anticuerpos específicos en suero.
3. Determinar la eficacia de prototipos vacunales en ejemplares de trucha arcoíris, evaluando la disminución de mortalidad en desafíos.

II.- MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Aislados y cepas bacterianas

Se estudió un total de 51 aislados bacterianos de peces sintomáticos, provenientes de brotes de la Región de Los Lagos, de los cuales 15 aislados coincidían, mediante técnicas clásicas de microbiología, como características morfológicas de colonias, tinción Gram, motilidad y PCR convencional (Avendaño-Herrera y cols., 2019), con especies del género *Tenacibaculum*. Los 15 aislados purificados fueron analizados, caracterizados y comparados en esta investigación. A modo de control y comparación se emplearon las cepas tipo *T. dicentrarchi* CECT 7612^T y *T. maritimum* CECT 4276^T. Los aislados y cepas fueron crecidos rutinariamente en medios FMM y AM (BD, EE. UU.) en sus versiones líquidas o sólidas (Avendaño-Herrera y cols., 2016), e incubados a 18 °C entre 24 a 72 horas.

2.2 Extracción de ADN genómico

Los aislados fueron sembrados en placas FMM e incubados a 18 °C por 24 a 72 horas. Cumplido el tiempo de incubación, cuatro o cinco colonias de cada aislado fueron suspendidas en 700 µL de tampón fosfato salino (PBS) y centrifugadas por 2 min a 10.000 g. A partir de las células sedimentadas se realizó la extracción con *InstaGeneTM DNA Purification Matrix* (Bio-Rad, EE. UU), según las instrucciones del fabricante. El ADN fue almacenado a -20 °C hasta su posterior uso.

2.3 PCR convencional diagnóstico para *T. finnmarkense* y *T. dicentrarchi*

Como prueba rápida para confirmar que los aislados pertenecían a *T. finnmarkense* o *T. dicentrarchi*, se usó el PCR convencional de diagnóstico utilizando los cebadores Tenadi Fw [5'-ATA CTG ACG CTG AGG GAC-3'] y Tenadi Rv [5'-TGT CCG AAG AAA ACT CTA TCT CT-3'] (Avendaño-Herrera y cols., 2019). Cada reacción de PCR contenía 12,5 µL de 2X *GoTaq[®] Green Master Mix* (Promega, EE. UU), 0,4 µM de cada cebador, 200 ng de ADN y completando 25 µL con agua ultrapura. Las muestras fueron introducidas en un termociclador de punto final (Techne, TC-512) utilizando el programa de ciclado indicado por Avendaño-Herrera y cols. (2019). Los productos de PCR fueron visualizados en geles de agarosa al 2% con tinción fluorescente *MaestroSafe Nucleic Acid Prestained* (Maestrogen).

2.4 Caracterización fenotípica de aislados nativos

Se realizó una caracterización tendiente a categorizar los aislados y, a la vez, diferenciarlos entre sí. Con esto en mente, se realizaron diferentes pruebas, utilizando técnicas microbiológicas clásicas, como análisis morfológico de colonias, microscopía, tinción Gram y motilidad, observada con el microscopio Olympus C35 (Japón). Se realizaron pruebas bioquímicas de rutina, como catalasa, oxidasa y se determinó el crecimiento de los aislados en diferentes medios tales como FMM, AM y Muller-Hinton (BD, EE. UU). También se evaluó el crecimiento bacteriano con diferentes concentraciones de NaCl en caldo FMM, utilizando como control las cepas tipo *T. dicentrarchi* CECT 7612^T y *T. maritimum* CECT 4276^T.

Se utilizaron galerías API-ZYM (Biomerieux, Francia) según lo descrito por el fabricante, para detectar la presencia de enzimas bacterianas en los aislados y las cepas control. La actividad hemolítica se evaluó sembrando los aislados en AM, suplementado con sangre de cordero desfibrinada al 5% v/v y NaCl al 2% p/v a 18 °C por 48 horas. Para determinar la actividad enzimática lipasa se observó el crecimiento y formación de halo en placas de AM suplementado al 0,5 y 1 % v/v con Tween 80 (Sigma) durante 48 horas a 18 °C.

2.5 Secuenciación de 16S rRNA

Se realizó la amplificación del 16S rRNA, componente de la subunidad menor del ribosoma, con el fin de identificar de forma preliminar y no determinante, la taxonomía de los aislados. Para lo anterior, se realizó un PCR con los cebadores pA (5- AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG-3) and pH (5-AAG GAG GTG ATC CAG CCG CA-3) (Edwards, U. y cols., 1989). Cada reacción de PCR contenía 22,5 µL de 2X *GoTaq® Green Master Mix* (Promega, EE. UU), 0,4 µM de cada cebador, 200 ng de ADN y se completaron 45 µL con agua ultrapura. Las muestras fueron introducidas en un termociclador de punto final y se utilizó el siguiente programa; desnaturación inicial, 95 °C por 10 minutos, seguida de 30 ciclos de desnaturación, 95 °C por 30 segundos, alineamiento 55 °C por 1 minuto, y extensión, 72 °C por 2 minutos, con una extensión final de 72 °C por 10 minutos. Los productos de PCR fueron visualizados en geles de agarosa al 2% con tinción fluorescente *MaestroSafe Nucleic Acid Prestained* (Maestrogen).

Los productos de amplificación de los 15 aislados fueron purificados usando el sistema *Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up* (Promega, EE. UU) y los productos se secuenciaron por ambos extremos directamente en Macrogen, Inc. Corea. Las secuencias resultantes se ensamblaron y compararon empleando los programas SeqMan y MEGA 11 (Tamura y cols.,

2018). Finalmente, se les realizó un BLAST en la base de datos EzTaxon, disponible en <http://www.ezbiocloud.net/eztaxon> (Yoon et al., 2017).

2.6 Análisis de secuencias multilocus (MLSA)

La taxonomía obtenida del 16S rRNA no es resolutive (Gupta y Sharma, 2015), entonces, para determinar la especie y dilucidar la relación evolutiva entre los aislados, se analizaron genes constitutivos mediante un análisis de secuencias del multilocus (Lagadec y cols., 2021). Se realizó la secuenciación propuesta por Småge y cols. (2016a) de los genes *rpoB*, *fusA*, *tuF* y *atpD* y de los genes *rlmN* e *ileS* propuestos por Habib y cols. (2014). Las reacciones de PCR, visualización de los productos, purificaciones y análisis se llevaron a cabo del mismo modo que el punto anterior. Las secuencias de cebadores y temperatura de alineamiento se describen en la **tabla 1**.

Tabla 1. Cebadores y condiciones utilizadas para amplificación de genes asociados a MLSA. Los nucleótidos degenerados corresponden a la siguiente nomenclatura: H: A o C o T; K: G o T; R: A o G; W: A o T; Y: C o T.

Gen	Nombre	Secuencia	Producto esperado (pb)	Temperatura hibridación	Referencia
<i>ileS</i>	Tb_ileS_F	CCW ACH TTT GGW GCH GAY GA	694	53 °C	Habib y cols., 2014
	Tb_ileS_R	GAA TCR AAC CAW ACA TCA AT			
<i>rlmN</i>	Tb_rlmN_F	GCK TGT GTD TCD AGY CAR GT	597		
	Tb_rlmN_R	CCR CAD GCD GCA TCW ATR TC			
<i>fusA</i>	Tb_fusA_F	ATG GTA ACT CAC CCA TTC CAG A	798	58 °C	Småge y cols. (2016a)
	Tb_fusA_R	TGG CAT GAT GCA ACA CAA GG			
<i>tuF</i>	Tb_tuf_F	ACC TCC TTC ACG GAT AGC	946		
	Tb_tuf_R	TTA CGA TCG TTC GAA GCC CC			
<i>atpD</i>	Tb_atpD_F	TGG YCC AGT WAT CGA TGT TGA	816		
	Tb_atpD_R	AAT ACG YTC TTG CAT TGC TC			
<i>rpoB</i>	Tb_rpoB F1	ATY TCT CCA AAA CGC TGA CC	760		
	Tb_rpoB R1	AAA ACG AAT CAA GGW ACG AAY A			
	Tb_rpoB F2	ACC CTT TCC AAG GCA TAA AGG			
	Tb_rpoB R2	GAG CCA TYG GTT TTG AAA GAG A			

Tb_rpoB F3	CTC TTG CTG TCT CCT CAT CTG			
Tb_rpoB R3	ATCCACCAAGATATAGCATC CA	-		

2.7 Genotipificación mediante RAPD

Con la finalidad de dilucidar la clonalidad de los aislados se realizó la amplificación aleatoria del ADN, usando el sistema comercial *Ready-to-Go RAPD Beads* (Amersham Biosciences, EE. UU) como describe Valdés y cols. (2009). En este estudio se utilizó el cebador P5 (AACGCGCAAC). Cada reacción de RAPD incluyó 100 ng de ADN, 25 μ mol del cebador, y agua ultrapura para alcanzar un volumen total de reacción de 25 μ L.

La amplificación se realizó en el termociclador de punto final marca Techne modelo TC-512, comenzando el programa con un ciclo de desnaturalización inicial de 95 °C por 5 min; seguido por 30 ciclos de 95 °C por 1 min, 35°C por 1 min y 72 °C por 2 min, para terminar con una etapa de extensión final a 72 °C por 5 min. Los productos de amplificación obtenidos fueron visualizados en geles de agarosa como se señaló anteriormente. Finalmente se realizó una reconstrucción filogenética con los fragmentos de amplificación mediante el algoritmo *Neighbor Joining* con el programa PyElph (Pavel y Vasile, 2012).

2.8 Serotipificación de aislados

Con la finalidad de dilucidar la relación serológica entre los diferentes aislados bacterianos estudiados, mediante la técnica *dot-blot* se analizó la reacción de sueros hiperinmunes de conejo contra: célula completa, LPS y la fracción “O” del LPS. Los sueros fueron fabricados a partir de *T. maritimum* CECT 4276^T, *T. dicentrarchi* CECT 7612^T, *T. finnmarkense* 23010 y *Tenacibaculum piscium* (Olsen y cols., 2020) 13996.

Se realizaron suspensiones bacterianas de cada aislado en PBS, midiendo la O.D a 600 nm y ajustándose a 0,1. Las muestras de célula completa se obtuvieron agregando formaldehído a una concentración final de 0,4% v/v, a 1 mL de suspensión bacteriana y almacenadas a 4 °C hasta su posterior uso. Para la extracción de LPS, 1 mL de la suspensión bacteriana fue centrifugada a 13.000 g por 5 min y suspendida en 100 μ L de PBS, tratada con 10 μ L de proteinasa K (100 mg/mL) e incubada a 56 °C durante toda la noche. Para la extracción de antígeno "O", 5 mL de la suspensión bacteriana se hirvieron a 100 °C por 1 hora, posteriormente 1 mL fue centrifugado a 13.000 g por 5 min, eliminando el debris celular y obteniendo el

sobrenadante, finalmente se almacenó a 4 °C hasta su utilización (Avendaño-Herrera y cols., 2004).

Para la comparación entre los aislados, se agregaron 2 µL de los componentes bacterianos de cada cepa control y cada aislado a un filtro de nitrocelulosa, secando por 10 min a 37 °C. Posteriormente se ocupó una solución de bloqueo con gelatina al 2% por 30 min a temperatura ambiente y se lavó tres veces con TBS-Tween por 10 min para bloquear. Se prepararon membranas iguales para ser incubadas individualmente con los sueros hiperinmunes, diluidos 1:200 en una solución TBS-Tween y gelatina al 1% p/v por 2 horas. Se lavaron tres veces con TBS-Tween por 10 min y se incubó por 2 horas con un suero anti-IgG de cabra anti-conejo, unido a fosfatasa alcalina. Se utilizaron dos diluciones del suero antes mencionado con el fin de dilucidar el título al cual se alcanza especificidad, las diluciones fueron 1:2500 y 1:5000 realizadas en una solución TBS-Tween y gelatina al 1%. Finalmente, el experimento fue revelado con NBT/BCIP por 15 min.

2.9 Formulación vacunal y modelo de desafío

Basado en la caracterización realizada a los aislados, se seleccionaron la cepa representante de *T. finnmarkense* 23010 y una cepa representante de *T. dicentrarchi* LT2. Ambos aislados fueron incubados y crecidos individualmente en medio líquido FMM, a 18°C por 72 horas con 180rpm de agitación, la concentración de bacterias de los cultivos se determinó mediante recuento de unidades formadoras de colonias (UFC/mL). Los cultivos fueron inactivados mediante formaldehído a concentración final 0,4% v/v. Tres vacunas fueron diseñadas con diferentes concentraciones de antígeno (alta, media y baja) y formuladas junto a un adyuvante oleoso, la concentración exacta y la naturaleza del adyuvante no será revelada debido a acuerdos de confidencialidad con Veterquímica S.A. La dosis de administración es de 0,1 mL.

Luego de inyectar las vacunas de forma intraperitoneal, se esperaron 600 UTA para realizar un desafío (esquema Veterquímica S.A). Los peces fueron expuestos mediante inmersión a una suspensión bacteriana de *T. finnmarkense* 2206 con una concentración de 1×10^7 UFC/mL, por un tiempo determinado y bajo condiciones controladas de temperatura y oxígeno. Se esperaron 21 días y los peces sobrevivientes fueron sacrificados. Se utilizan UTA para referirse a la cantidad de tiempo necesario a una temperatura deseada para que se complete el desarrollo inmunológico y se habla de días cuando sólo se requiere evaluar la activación del sistema inmune.

2.10 Animales para investigación

Los estudios de establecimiento de inmunidad se realizaron en ejemplares pre-smolt de trucha arcoíris (*O. mykiss*) y salmón del Atlántico (*S. salar*), de aproximadamente 20 gramos, en la Unidad de Acuarios y Bioterios de Veterquímica S.A. Se procuró utilizar la menor cantidad de animales posibles y respetar los principios de bienestar animal. Igualmente, las experiencias de desafío se realizaron en la unidad experimental de Chiquihue de Veterquímica S.A.

Los peces fueron anestesiados con una solución acuosa de BZ-20[®] para la vacunación, se utilizó una sobredosis de este para realizar los sacrificios y los peces fueron sangrados desde la arteria dorsal para la obtención de suero. Los estudios de marcadores moleculares, tanto en *O. mykiss* como *S. salar*, fueron realizados con ocho peces por grupo. Las pruebas de IgM serológico post 600 UTA fueron realizadas con seis peces por grupo en *O. mykiss* y con ocho peces por grupo para *S. salar*. El desafío post 600 UTA se realizó con 100 peces control y 100 peces vacunados.

2.11 Evaluación de respuesta inmune mediante expresión génica

Se establecieron cuatro grupos experimentales con ocho peces cada uno, obteniendo muestras seis días post-vacunación. Las muestras consistieron en una mezcla de riñón cefálico y bazo de cada pez. Se realizó una extracción de ARN total mediante el sistema de extracción comercial *High Pure RNA* y luego se cuantificó mediante un espectrofotómetro MaestroGene.

Para la retro transcripción a ADNc se usó un sistema comercial *Transcriptor First Strand cDNA Synthesis* (Roche) según las indicaciones del fabricante. Para la cuantificación de la expresión relativa de los genes que codifican CD8- α , CD4, NF- κ B, INF- γ y EF-1, utilizando las secuencias de cebadores específicos y sondas señaladas en la **tabla 2**. La reacción de qPCR se llevó a cabo con la mezcla comercial para PCR *LightCycler[®] 480 Probes Master* (Roche), añadiendo 0,4 μ l de cada cebador (10 μ M), 0,2 μ l de sonda (10 μ M), 4 μ l de agua libre de nucleasas y 2 μ l de ADNc de cada pez.

Tabla 2. Cebadores y sondas de marcadores moleculares.

Gen	Cebador sentido Fw 5'-3'	Cebador anti sentido Rv 5'-3'	Sonda 5'-3'	Referencia
EF-1	ACC CTC CTC TTG GTC GTT TC	TGA TGA CAC CAA CAG CAA CA	GCT GTG CGT GAC ATG AGG CA	Raida y Buchmann, 2007.
CD8- α	ACA CCA ATG ACC ACA ACC ATA GAG	GGG TCC ACC TTT CCC ACT TT	ACC AGC TCT ACA CTG CCA AGT CGT GC	Jørgensen y cols., 2009
NF- κ B	AGT AGA GGC AAA GTG AAG ATG GGC	AGG TGA AGT CCA GCG GGT AG	AAA GCA CGC ATC GGG CAT CTG GC	Cebadores previamente diseñados en Veterquímica S. A
CD4	CAT TAG CCT GGG TGG TCA AT	CCC TTT CTT TGA CAG GGA GA	CAG AAG AGA GAG CTG GAT GTC TCC G	Jørgensen y cols., 2009
INF- γ	AAG GGC TGT GAT GTG TTT CTG	TGT ACT GAG CGG CAT TAC TCC	TTG ATG GGC TGG ATG ACT TTA GGA	Jørgensen y cols., 2009

2.12 Titulación de IgM sérica posterior a la vacunación

Para determinar el título serológico posterior a la vacunación, se realizó un ensayo por inmunoadsorción ligada a enzima (ELISA), modificando el protocolo interno para otros patógenos bacterianos propios de la empresa. Brevemente, placas de poliestireno estériles fueron incubadas con suspensión bacteriana de aislados homólogos a los prototipos vacunales, la suspensión se preparó con una D.O de 0,1 (600 nm), incubando por 24 horas a 4 °C, posteriormente se incubo con una solución de glutaraldehído al 0,05% v/v para fijar el anticuerpo a la superficie. Se preparó una solución stock para realizar lavados usando PBS-Tween 20 al 1% v/v, además se preparó una solución de bloqueo con PBS-suero fetal bovino al 2%v/v. Las placas fueron lavadas tres veces y bloqueadas por tres horas a temperatura ambiente, para ser almacenadas a -20 °C hasta su posterior uso.

A partir de los sueros de peces obtenidos post vacunación, se realizó una dilución inicial 1:4 de los sueros en solución de bloqueo colocando 100 μ L en el primer pocillo, diluyendo consecutivamente 1:2 en pocillos con solución de bloqueo. El ultimo pocillo fue utilizado como control negativo para cada muestra. Las placas fueron incubadas por 16 horas a 4 °C y lavadas cinco veces. Luego se incubaron las placas por 45 min con un anticuerpo secundario comercial ratón anti-IgM de salmón (*MyBioSource*), en una dilución 1:1000, y se volvieron a lavar cinco veces las placas. Finalmente se incubaron por 30 min con un tercer anticuerpo comercial, anti-IgG de ratón conjugado con HRP (*Santa Cruz Biotechnology*) diluido 1:10000. Las placas

fueron lavadas nuevamente cinco veces. La reacción se reveló con 3,3,5,5-tetrametilbencidina (*Thermo Fisher*) por 15 min y deteniendo la reacción con ácido sulfúrico 2 M. La absorbancia fue medida en espectrofotómetro a 450 nm (Biotek EL800).

2.13 Eficacia de los prototipos vacunales

El prototipo vacunal evaluado fue *T. finnmarkense* 23010, el cual fue inoculado de forma intraperitoneal a 100 peces distribuidos en dos tanques diferentes. El grupo placebo correspondió a 100 peces distribuidos en dos tanques, inoculados con una formulación que contenía PBS como fracción antigénica. Luego de 600 UTA, ambos grupos fueron desafiados por baño con una cepa virulenta de *T. finnmarkense* 2206.

Se calculó el porcentaje relativo de supervivencia de punto final (RPS), índice que permite comparar la mortalidad de los peces vacunados con los controles, hasta que ya no hay mortalidad en el grupo control. Se utilizó la fórmula de $RPS = (1 - \% \text{ de mortalidad del grupo vacunado} / \% \text{ de mortalidad del grupo no vacunado}) \times 100$ (Toranzo y cols., 1995).

2.14 Análisis taxonómico y estadístico

Las construcciones filogenéticas fueron realizadas en el programa MEGA 11 (Tamura y cols., 2021) utilizando el método de máxima verosimilitud. Para cuantificar marcadores moleculares de inmunidad se utilizó el método de expresión relativa de genes descrito en Livak y Schmittgen (2001), para lo que se determinó como control interno EF-1 (Raida y Buchmann, 2007). Los gráficos de expresión relativa de marcadores moleculares, anticuerpo IgM sérico y RPS, fueron realizados en Graphpad Prism 8.0.2., ejecutando un análisis ANOVA de dos vías junto con una prueba de Dunnett's para marcadores moleculares y un ANOVA de dos vías junto con una prueba de Sidak para expresión relativa en log base 2 de IgM sérico.

III.- RESULTADOS

3.1 Caracterización fenotípica y genotípica de 15 aislados chilenos estableció la pertenencia a especies de *T. dicentrarchi*, *T. finnmarkense* y *T. piscium*.

Seis de los 15 aislados estudiados habían sido previamente identificados por PCR como *Tenacibaculum* spp. y se encontraban criopreservados a -80 °C en el cepario de Veterquímica S.A. Los restantes aislados fueron obtenidos desde peces con sintomatología concordante con tenacibaculosis, sembrando de forma directa desde sus lesiones y órganos sobre medios FMM o AM. Posteriormente y luego de hasta seis días de incubación a 18°C, se seleccionaron colonias con características morfológicas concordantes al género (**anexo 1A**). Una vez obtenidos cultivos puros se realizó extracción de ADN y PCR para la detección de *T. finnmarkense* y *T. dicentrarchi*, obteniendo nueve aislados con un producto de amplificación concordante con lo esperado (**figura 1**).

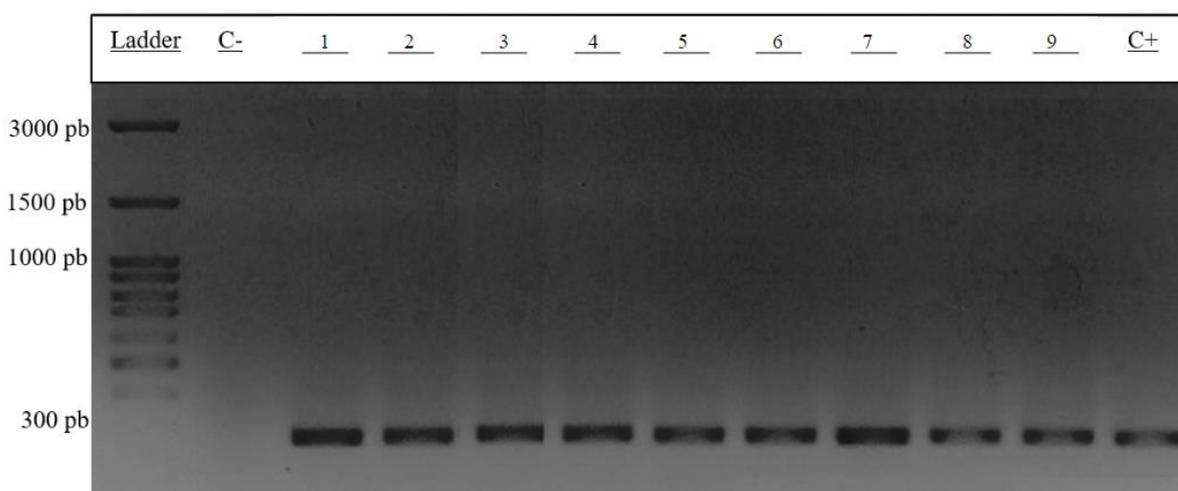


Figura 1. Producto de amplificación de PCR Tenadi. Primer carril *ladder*, patrón estándar de pares de bases. Segundo carril, C- corresponde al control negativo (sin ADN), los carriles 1-9 corresponden a los productos de amplificación de los aislados RAH, AL1-I, 14198, 4270, 191-A, AL3-I, AL1-II, L3 y PA-2881, respectivamente. El carril C+ corresponde al control positivo, cepa tipo *T. dicentrarchi* CECT 7612.

Los 15 aislados positivos a *Tenacibaculum* spp. presentaron crecimiento en medios de cultivo previamente descritos para para este patógeno, caldo marino (BD) y FMM. Al comparar los perfiles electroforéticos (**anexo 2**) de aislados crecidos en los medios antes mencionados, se determinó que eran similares y no presentaban diferencias importantes, por lo que los siguientes estudios se realizaron en medio FMM. En los estudios de requerimiento de salinidad de los aislados, se observó un rango amplio y variable de crecimiento que va desde los 17 a 65

ppmil. Se determinó un rango común de crecimiento para los aislados entre 30 a 38 ppmil de NaCl (**tabla 3**), destacando que el aislado L3 no crece bajo 30 ppmil y los aislados RAH, 2206, 23010, 3140, AL1-II, 13996 y 14513 no crecen sobre los 38 ppmil.

Se determinó que todos los aislados estudiados son capaces de crecer en medios sólidos de AM suplementados con sangre de cordero desfibrinada (**anexo 3**), pero solamente los aislados RAH, LT2, AL1I, L3 y las cepas control, presentaron hemólisis completa. Los mismos cuatro aislados mencionados anteriormente, presentan hidrólisis de tween 80 al 0,5 y 1% v/v, indicando la actividad lipasa en los aislados. La cepa tipo *T. dicentrarchi* CECT 4276 también mostró actividad lipasa positiva, mientras que para la cepa tipo *T. maritimum* CECT 7612 solo se observó hidrólisis a 0,5% v/v de Tween 80.

En cuanto a las actividades enzimáticas de los aislados, el análisis mediante API-ZYM permitió determinar que el 100% de los aislados tienen actividad positiva para: fosfatasa alcalina, esterasa C4 (exceptuando AL1-II siendo no concluyente), leucina arilamidasa, cisteína arilamidasa, fosfatasa ácida y naftol-as-bi-fosfatasa. La actividad esterasa C14 es positiva para las cepas control y para el 26% de los aislados: RAH, LT2, AL1I y PA-2881. Por otra parte, la actividad esterasa C8 fue positiva para las cepas control y para los aislados, sin embargo, se presentaron resultados no reproducibles en los aislados 191-A, AL1-II, 13996 y 14513, los que fueron clasificados como no concluyentes. En relación con las enzimas tripsina, quimiotripsina y α -galactosidasa, resultaron ser positivas para la cepa tipo de *T. maritimum* y negativas para la mayoría de los aislados analizados, exceptuando para LT2 y 4270, que fueron clasificados como no concluyentes. En cuanto a las enzimas responsables del metabolismo de azúcares, tanto las cepas tipo como los 15 aislados estudiados fueron negativos para la presencia de estas (**anexo 4**).

La clonalidad de los aislados bacterianos se estableció mediante RAPD-PCR (**figura 2, izq.**), creando un dendograma con el programa PyElph (Pavel y Vasile, 2012) para dilucidar la cercanía genética de los aislados. El árbol filogenético obtenido del procesamiento de datos permite obtener cuatro clados principales. El primer clado tiene dos subclados, uno constituido por 14513, 13996 y 4270 y el otro por LT2 y AL1-I. El segundo clado está constituido por PA-2881, AL3, AL1-II y 191-A. El tercer clado dividido en dos subclados, uno constituido por CECT 7612, RAH y L3 y el otro por 3140, 2206 y 14198. Finalmente, el cuarto clado está compuesto por 23010 y CECT 4276.

	Tm		Td		AL1-I		2206		23010		3140		14198		4270		191a		AL3-I		AL1-II		L3		13996		14513		PA-2881	
	CECT	4276	CECT	7612	RAH	LT2	AL1-I	28-65	14-38	20-38	20-38	17-38	17-65	17-65	17-65	17-65	17-65	17-65	17-65	17-65	17-65	17-38	17-38	30-65	17-38	17-38	11-38	11-38	17-65	
NaCl ppmil	nt	nt	β	β	β	β	β	γ	γ	γ	γ	γ	γ	γ	γ	γ	γ	γ	γ	γ	γ	γ	γ	β	β	γ	γ	γ	γ	
Hemólisis sangre	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	
Tween 80 0,5%	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	
Tween 80 1%	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
Catalasa	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
Oxidasa	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
Fosfatasa alcalina	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
Esterasa C4	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	nc	nc	+	+	+	+	+	+	
Esterasa C8	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	nc	nc	+	+	nc	nc	+	+	nc	nc	+	+	
Esterasa C14	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Leucina aramidasa	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
Valina aramidasa	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
Cisteína aramidasa	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
Tripsina	+	-	-	-	-	nc	-	-	-	-	-	-	nc	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
α-quinotripsina	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Fosfatasa acida	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
Naftol-AS-Bi-fosfato	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
α-galactosidasa	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
β-galactosidasa	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
β-glucuronidasa	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
α-glucosidasa	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
β-glucosidasa	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
N-acetil-β-glucosaminidasa	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
α-manosidasa	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
α-fucosidasa	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	

Tabla 3. Caracterización bioquímica de aislados nativos de *Tenacibaculum* spp. Se muestran los perfiles fenotípicos y bioquímicos de 15 aislados nativos, además se incluyen las cepas tipo CECT 4276 y 7612. nc= no concluyente; (+) = positivo; (-) = negativo; β = beta hemólisis; γ = gamma hemólisis.

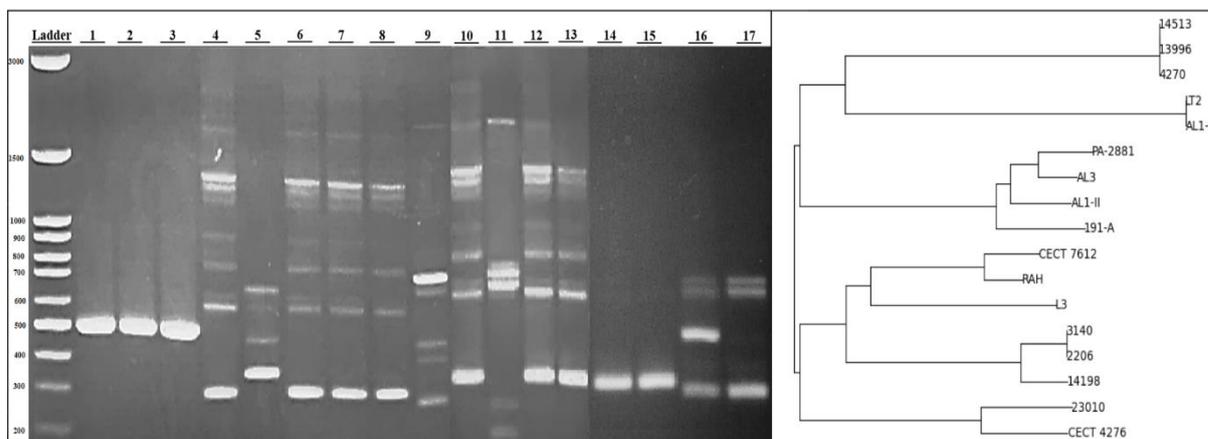


Figura 2. Perfil genético RAPD-PCR. Izq. Producto de amplificación RAPD-PCR de aislados *Tenacibaculum* sp. La primera línea corresponde al estándar de pesos moleculares. Los carriles 1-17 corresponden respectivamente a 13996, 14513, 4270, 191-A, L3, AL1-II, AL3, PA-2881, CECT 4276, 2206, 23010, 3140, 14198, AL1-I, LT2, RAH Y CECT 7612. **Der.** Árbol filogenético con el algoritmo *neighbor joining tree*.

El 16S rRNA de los aislados fue secuenciado en Macrogen Inc. Corea y las secuencias consenso fueron comparadas en la base de datos mediante BLAST (**tabla 4**). Todos los aislados tienen un porcentaje de identidad mayor a 99% con cepas bacterianas del género *Tenacibaculum* previamente reportadas como patógenos de peces. Tres aislados fueron cercanos a *T. dicentrarchi*, cuatro aislados a *T. finnmarkense* y ocho a *T. piscium*.

Se realizó una reconstrucción filogenética con el 16S rRNA, para lo cual se incluyeron en el análisis 41 secuencias totales: las secuencias de los 15 aislados, 25 secuencias de *Tenacibaculum* spp. obtenidas de NCBI y la secuencia de *Kordia algicida* usada como grupo externo (Habib y cols., 2014; Småge y cols., 2016a; Olsen y cols, 2017). En la **figura 3** se puede observar que los aislados RAH, AL1 y LT2 tienen cercanía evolutiva con *T. dicentrarchi* 35/09 (NR 108475.1). El aislado 23010 se encuentra más cercano a *T. finnmarkense* TNO010 (GU124765) y el resto de los aislados tienen un ancestro común más cercano con la especie *T. piscium* TNO020T (GU124766).

Tabla 4. 16S rRNA aislados *Tenacibaculum* sp. Resultados BLAST en EZBiocloud. s/i= sin información

Cepa	Origen	Especie	Similitud (%)	Cobertura (%)	Cepa tipo	Pares de bases
RAH	<i>Salmon salar</i>	<i>T. dicentrarchi</i>	99,64	98,1	35/09	1410
LT2	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	<i>T. dicentrarchi</i>	99,43	100	35/10	1410
AL1I	Agua	<i>T. dicentrarchi</i>	99,00	98,0	35/09	1408
2206	<i>Salmon salar</i>	<i>T. finnmarkense</i>	99,11	97,9	DSM 28541	1407
23010	<i>Oncorhynchus kisutch</i>	<i>T. finnmarkense</i>	98,89	98,0	DSM 28541	1470
3140	s/i	<i>T. finnmarkense</i>	98,96	98,2	DSM 28541	1410
14198	s/i	<i>T. finnmarkense</i>	98,48	97,4	TNO010	1405
4270	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	<i>T. piscium</i>	98,82	97,5	TNO020	1403
191-A	<i>Oncorhynchus kisutch</i>	<i>T. piscium</i>	98,37	97,6	TNO020	1405
AL3 I	Agua	<i>T. piscium</i>	98,52	97,0	TNO020	1397
Al1 II	Agua	<i>T. piscium</i>	98,30	98,1	TNO020	1407
L3	Agua	<i>T. piscium</i>	98,75	97,8	TNO020	1410
13996	s/i	<i>T. piscium</i>	98,60	95,6	TNO020	1412
14513	s/i	<i>T. piscium</i>	98,60	95,6	TNO020	1417
PA-2881	s/i	<i>T. piscium</i>	98,59	98,1	TNO020	1411

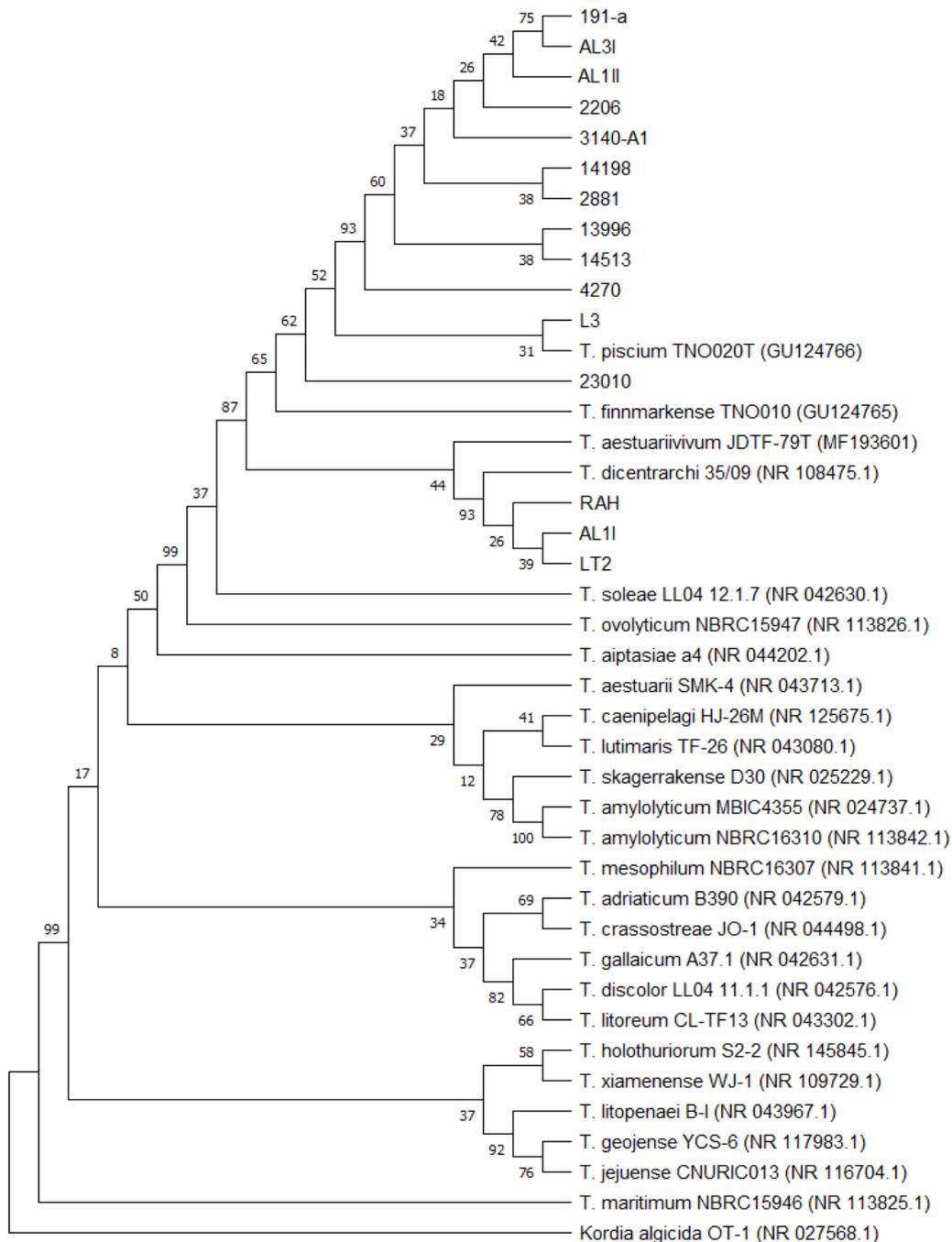


Figura 3. Reconstrucción filogenética de aislados de *Tenacibaculum* sp. basada en el 16S rRNA. Árbol realizado utilizando el método máxima verosimilitud y el modelo de Tamura Nei. El porcentaje de replicaciones que coincidieron en las posiciones de las cepas se encuentra bajo los nodos. Se analizaron 41 secuencias de nucleótidos con un total de 1524 nucleótidos finales.

Los genes *rpoB*, *fusA*, *tuF*, *atpD*, *rlmN* e *ileS* fueron secuenciados para todos los aislados con el fin de obtener una identificación de especie resolutive, sin embargo, debido a la calidad de las secuencias obtenidas, solo se realizó MLSA para los aislados 2206, 23010, 14513, 191A, RAH y LT2. Las secuencias fueron ensambladas y concatenadas, generando una secuencia única para cada cepa las cuales fueron alineadas mediante CLUSTAL (Olsen y cols, 2017).

Se incluyeron en el análisis las secuencias de *T. maritimum* (NCIMB 2154), *T. dicentrarchi* (CECT 7612), *T. finnmarkense* (TNO010), *T. piscium* (TNO020) y *K. algicida* (OT-1), obtenidas desde NCBI. En la **figura 4** se observan dos clados que indican una distancia clara entre los aislados en estudio y las cepas de la base de datos. Resulta concordante que LT2 y RAH se encuentren en el mismo nodo, ya que ambas presentan un alto porcentaje de similitud con la especie *T. dicentrarchi* (**tabla 4**). También resulta concordante que 14513 y 191-A se encuentren en el mismo nodo, ya que ambas son similares a *T. piscium*.

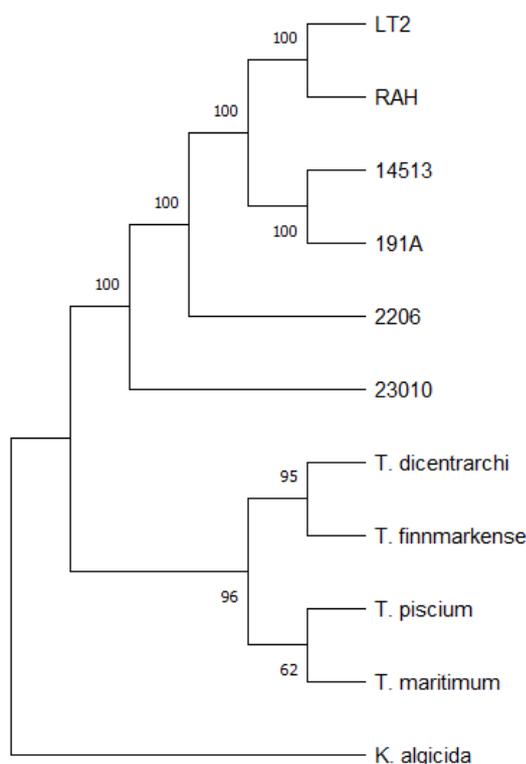


Figura 4. Árbol MLSA concatenado. Reconstrucción filogenética realizado utilizando el método máxima verosimilitud y el modelo de Jukes Cantor. Este análisis involucró 11 secuencias con un total de 10242 nucleótidos en el conjunto de datos final.

Mediante sueros hiperinmunes contra el antígeno “O” de diferentes cepas y aislados, se evaluó si existía homología entre los aislados. Los sueros pre-inoculación reaccionaron con todas las muestras de célula completa y LPS (datos no mostrados), posiblemente por compartir patrones moleculares con otras bacterias (PAMPS), los que reaccionan con anticuerpos de respuesta generalizada propios de los conejos.

Se observó un cambio en la reactividad de sueros de conejo pre y post inoculados, siendo positiva solamente para estos últimos. Se determinó que la unión antígeno anticuerpo de la cepa *T. maritimum* y su suero homólogo es específica. Además de que existe una reactividad cruzada

entre las especies *T. dicentrarchi*, *T. finnmarekense* y *T. piscium*, ya que todos sus sueros presentan unión antígeno-anticuerpo con todas las muestras, exceptuando la muestra de la cepa tipo *T. maritimum* CECT 7612. El aislado PA-2881 presentó reactividad con todos los sueros, por ende, con las especies *T. dicentrarchi*, *T. finnmarekense* y *T. piscium*

Tabla 5. Esquema de serotipificación basado en el antígeno “O”. Resultados Dot-Blot de sueros hiperinmunes de cepas *T. maritimum* (Tm), *T. dicentrarchi* (Td), *T. finnmarekense* (Tf) y *T. piscium* (Tp), contra fracción “O” de cepas y aislados estudiados. Los resultados se muestran como positivos (+) y negativos (-).

Cepa	Suero anti-Tm	Suero anti-Td	Suero anti-Tf	Suero anti-Tp
CECT 7612	-	+	+	+
CECT 4276	+	-	-	-
RAH	-	+	+	+
LT2	-	+	+	+
AL1I	-	+	+	+
2206	-	+	+	+
23010	-	+	+	+
3140	-	+	+	+
14198	-	+	+	+
4270	-	+	+	+
191-A	-	+	+	+
AL3 I	-	+	+	+
AlI II	-	+	+	+
L3	-	+	+	+
13996	-	+	+	+
14513	-	+	+	+
PA-2881	+	+	+	+

Tras analizar los datos obtenidos se decidió por dos cepas como antígenos vacunales representantes de las especies con mayores casos descritas en Chile, el aislado *T. finnmarekense* 23010 y el aislado *T. dicentrarchi* LT2, ambos obtenidos de peces enfermos por tenacibaculosis (Tabla 4). Lo anterior podría indicar la expresión de factores de virulencia más efectivos para el desarrollo de la enfermedad, los que a su vez podrían desencadenar anticuerpos específicos y eficientes para impedir o retardar la progresión de la tenacibaculosis.

3.2 Prototipos vacunales estimulan el sistema inmune de *O. mykiss* y *S. salar*, aumentando la expresión de marcadores moleculares y estimulando la producción de anticuerpos contra *Tenacibaculum* sp.

La respuesta inmune se determinó de dos formas, midiendo la expresión relativa de algunos genes determinantes de inmunogenicidad seis días posterior a la inmunización y mediante la titulación de IgM en suero posterior a las 600 UTA de la inmunización. Los experimentos fueron llevados a cabo en especies de *S. salar* y *O. mykiss* con un tamaño muestral de ocho peces por condición. Debido a la baja calidad del suero (restos de sangre) y por consecuencia a la poca cantidad obtenida, las muestras utilizadas para los análisis fueron menores.

Cuatro grupos vacunales fueron definidos: el grupo inicial sin vacunar (T0), el grupo placebo (G0), el grupo vacunado con el formulado tipo *T. finnmarkense* 23010 (G1) y el grupo vacunado con el formulado *T. dicentrarchi* LT2 (G2). Tres prototipos vacunales con diferentes concentraciones fueron formulados, decidiendo proseguir con los experimentos solamente con la concentración media y alta de los formulados. Los resultados de la dosis media no presentaron diferencias significativas con los grupos control en ningún grupo vacunal (datos no mostrados), se decidió realizar los siguientes experimentos con la dosis alta.

Para *S. salar*, CD4 no pudo ser analizado debido a problemas con los reactivos. La expresión relativa de INF- γ se encontraba en valores elevados que apantallaban la visualización del resto de resultados, por lo que se decidió eliminar el gráfico bajo la premisa que los resultados no presentan diferencias significativas (datos no mostrados). En cuanto a CD8 y NF- κ B, solo este último presentó una diferencia significativa de $P < 0,001$ entre el grupo control y el grupo vacunado con *T. dicentrarchi* LT2 (**figura 5A**), además de presentar diferencia significativa con el grupo placebo (datos no mostrados).

En el gráfico de anticuerpos IgM en suero de peces 600 UTA post vacunación, se observa que el prototipo vacunal 23010 (G1) induce el desarrollo de anticuerpos que reaccionan significativamente contra *T. finnmarkense* (**figura 5B**) y *T. dicentrarchi* (**figura 5C**). Mientras tanto, el prototipo LT2 (G2), solo induce significativamente ($P < 0,001$) el desarrollo de anticuerpos específicos para *T. dicentrarchi* (**figura 5C**).

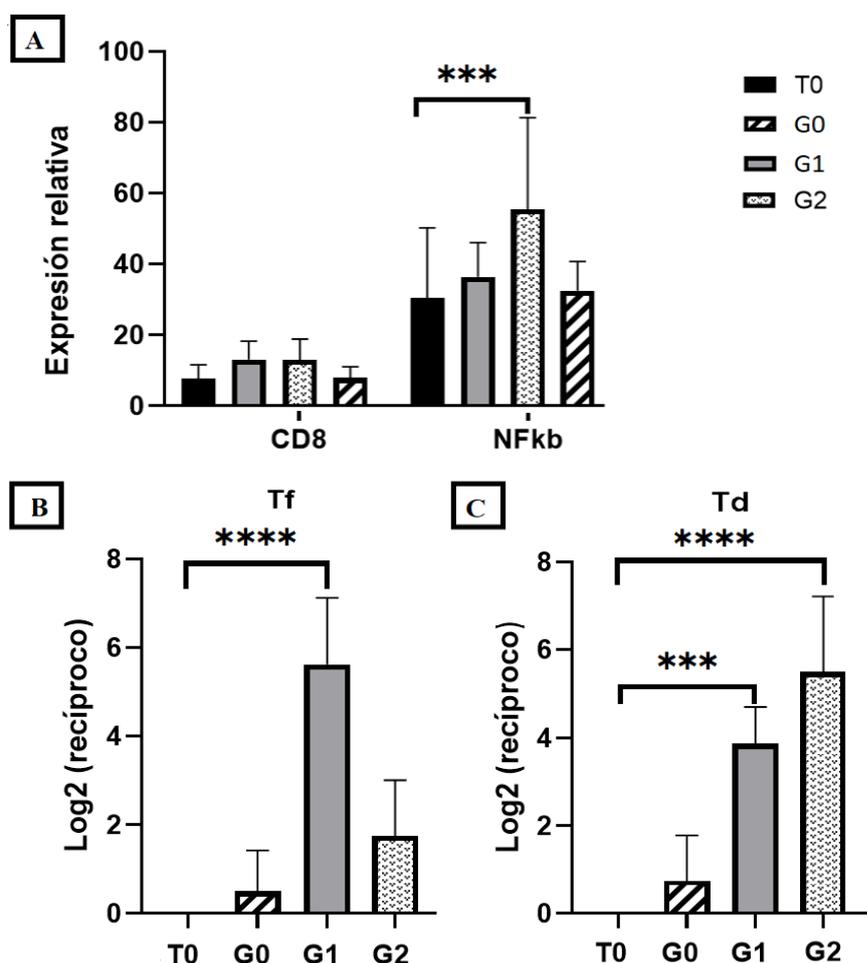


Figura 5. Evaluación inmunológica post vacunación en *S. salar*. A) Expresión relativa de marcadores moleculares para diferentes grupos vacunales. B) Título del IgM sérico específico contra *T. finnmarkense*. C) Título IgM sérico específico contra *T. dicentrarchi*. B y C se presentan como logaritmo en base 2 del recíproco de diluciones positivas. Los grupos T0 y G2 tienen un tamaño muestral de 4 y los grupos G0 y G1 de 8. Para los tres gráficos T0 corresponde a la muestra control inicial, G0 el grupo de peces inyectados con placebo, G1 inyectados con vacuna 23010 y G2 inyectados con vacuna LT2. Las barras representan la desviación estándar de cada grupo. *: P<0,05, **: P<0,01, ***: P<0,001, ****: P<0,0001.

Para la especie *O. mykiss* no se presentan resultados para INF- γ , dado que algunas mediciones se encontraban en el límite del ciclo umbral y otras presentaron una expresión relativa cercana a 0, entonces, asociado al limitado volumen de muestra, reproducir los experimentos modificando variables para obtener mejores lecturas fue imposible. La expresión relativa de CD8 no tuvo cambios significativos en ningún grupo. El grupo vacunado con el prototipo 23010 mostró un aumento significativo (P<0,0001) de la expresión relativa de CD4 y NF-kB (figura 6A).

El aumento de la expresión relativa de NF-kB en ambos salmónidos, asociado a la inducción de anticuerpos contra *T. finnmarkense* y *T. dicentrarchi* en *S. salar*, llevó a deducir que el candidato vacunal con mayor alcance puede ser formulado *T. finnmarkense* 23010 (G1).

Por las razones antes mencionadas, se decidió vacunar a *O. mykiss* solamente con el prototipo vacunal 23010. El suero obtenido de estos animales luego de 600 UTA reacciona tanto con la especie *T. finnmarkense* (figura 6B), como con *T. dicentrarchi* (figura 6C), mostrando un aumento significativo de anticuerpos específicos.

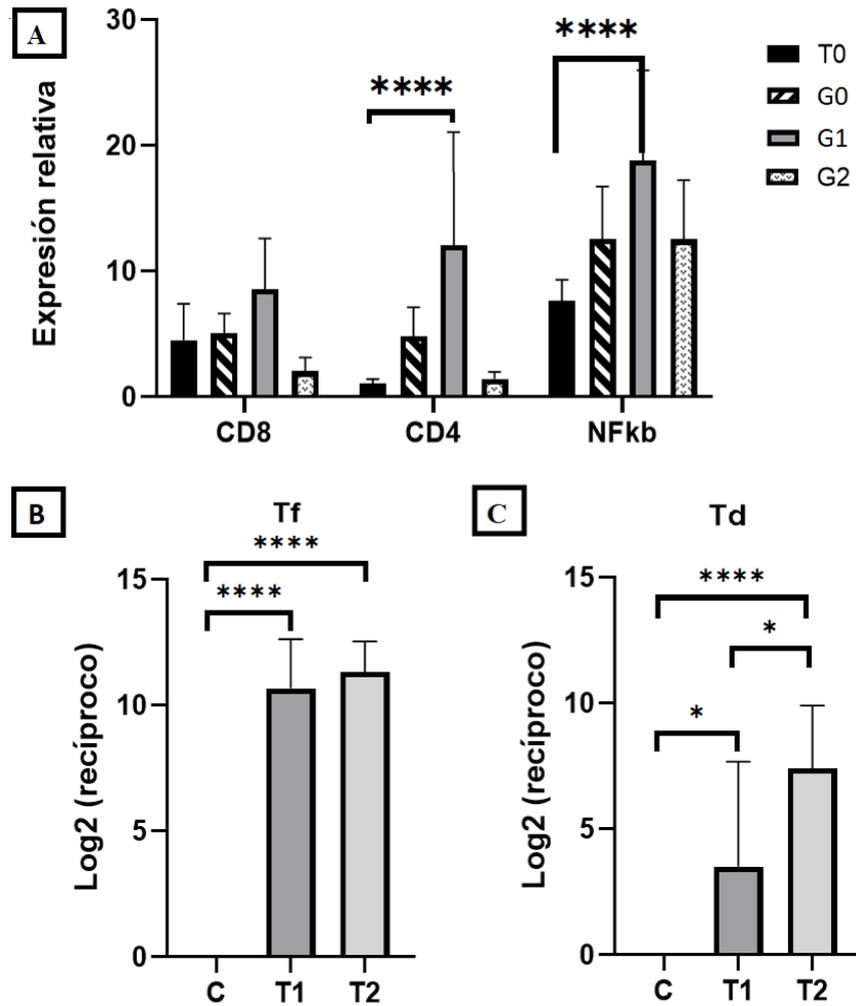


Figura 6. Evaluación inmunológica post vacunación en *O. mykiss*. A) Expresión relativa de marcadores moleculares de inmunidad para diferentes grupos vacunales. B) Titulo IgM sérico específico contra *T. finnmarkense*. C) Titulo IgM sérico específico contra *T. dicentrarchi*. Figuras B y C, se presentan como logaritmo en base 2 del recíproco de diluciones positivas, T1 y T2 corresponden a grupos de peces vacunados con prototipo vacunal 23010 provenientes de diferentes estanques y C corresponde al grupo control a tiempo cero. El tamaño muestral es de 6 peces por grupo. Las barras representan la desviación estándar de cada grupo. *: P<0,05, **: P<0,01, ***: P<0,001, ****: P<0,0001.

3.3 La vacunación con el prototipo 23010 resulta eficaz, ya que disminuye la mortalidad en desafíos con una cepa heteróloga.

Para determinar la protección producida por la vacuna, se evaluó la supervivencia de truchas inmunizadas que luego de 600 UTA se desafiaron mediante baño con la cepa tipo *T. finnmarkense* 2206. Los datos de supervivencia se presentan en la **figura 7**. El análisis de los mismos datos mediante Mantel-Cox y de Gehan-Breslow-Wilcoxon, indican que las curvas obtenidas entre los peces vacunados y control son significativamente diferentes ($P < 0,0001$). Además, la mortalidad acumulada de los peces vacunados fue en promedio 15%, mientras que los grupos control alcanzaron en promedio un 67%, por ende, el cálculo del RPS resultó ser de 77,6%. Cabe destacar que las mortalidades acumuladas son el promedio de dos tanques con 50 peces cada uno, tanques que, entre sí, tienen una diferencia de cerca de un 10%.

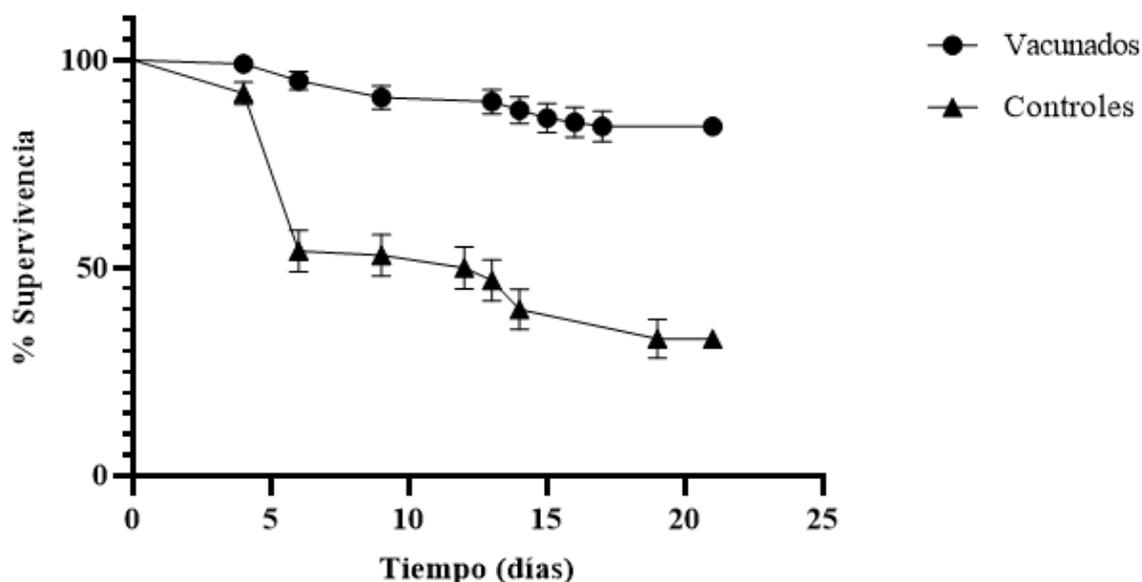


Figura 7. Supervivencia de *O. mykiss* post desafío con cepa 2206. Porcentaje de supervivencia obtenido luego del desafío de 100 peces de 600 UTA post vacunación con formulado *T. finnmarkense* 23010 y 100 peces control de 600 UTA post vacunación con formulado placebo. Las barras indican la desviación estándar de la mortalidad obtenida entre estanques.

IV.- DISCUSIÓN

Los aislados caracterizados comparten algunas características fenotípicas tales como como su morfología de bacilo filamentosos, su requerimiento de agua de mar e inclusive su ausencia de enzimas que degraden azúcares. Sin embargo, poseen características que los diferencian entre sí, como su crecimiento a diferentes salinidades, ya que aislados pertenecientes a *T. dicentrarchi* no crecen a menos de 28 ppmil de NaCl, mientras que *T. finnmarkense* y *T. piscium* pueden crecer desde concentraciones de sal menores. Lo anterior es comparable a los resultados obtenidos por Olsen y cols. (2020), ya que cepas pertenecientes a *T. dicentrarchi* crecen con una salinidad mayor al 50% de agua de mar añadida, mientras que las cepas pertenecientes a *T. piscium* crecen con salinidades sobre el 20% de agua marina.

La capacidad hemolítica de los aislados estudiados, parece preliminarmente diferencial entre especies, ya que aquellos aislados determinados como *T. dicentrarchi* presentan hemólisis completa, aislados pertenecientes a *T. finnmarkense* no la presentan y *T. piscium* resulta variable. Sin embargo, al compararlos con Olsen y cols. (2020) y Lagadec y cols. (2021) no existe correlatividad, en primer lugar, las cepas *T. finnmarkense* presentan capacidad hemolítica variable, siendo el genotipo *ulcerans* incapaz de hemolizar y el genotipo *finnmarkense* variable. En segundo lugar, las cepas *T. piscium* de los estudios no presentan hemólisis y nuestro aislado L3 presentó β hemólisis, no obstante, ya que la identificación solo se realizó mediante el gen no resolutivo de 16S, nos lleva a hipotetizar que este aislado no se encuentra correctamente identificado. Ahora bien, es necesario mencionar que la cepa DSM28541=HFJ, en ambos estudios resulta discordante en cuanto a su capacidad hemolítica, posiblemente al ser llevada a cabo en medios diferentes influyó en su crecimiento y por ende en la reproducibilidad de los resultados, tal como en Avendaño-Herrera y cols. (2016), que al utilizar agar columbia suplementado con sangre no obtuvo resultados. Basado en lo anterior, resulta necesario estandarizar la prueba de hemólisis para este género con el fin de obtener resultados reproducibles.

Otra característica diferencial que se observó entre los aislados fue su capacidad de hidrolizar Tween 80, indicador de actividad lipolítica de ácidos grasos de cadena larga, siendo positiva para los aislados de *T. dicentrarchi* de este estudio y comparable con reportes de otros autores (Avendaño-Herrera y cols., 2016; Olsen y cols., 2020). Además, los aislados correspondientes a *T. finnmarkense* son negativos en la hidrolisis de Tween 80, resultados similares a los obtenidos por Avendaño-Herrera y cols. (2016), pero divergentes de lo reportado en Olsen y cols. (2020), apuntando a resultados variantes o débiles para aquella prueba.

En cuanto a la evaluación de enzimas lipasas-esterasas por medio de las galerías API-ZYM, se obtuvo que la presencia de esterasa para C14 difiere de lo reportado tanto para *T. dicentrarchi* como para *T. finnmarkense*. En nuestro estudio observamos reacciones positivas para aislados *T. dicentrarchi* y negativa para *T. finnmarkense*, resultados discordantes a los obtenidos por Olsen y cols. (2020), donde se reporta negatividad para la primera especie y respuesta débil en aislados pertenecientes a la segunda. Además, nuestros aislados de *T. piscium* presentaron variabilidad en su capacidad de utilización de C14 (PA-2881 positivo) y C8, difiriendo de la negatividad reportada en el estudio de Olsen y cols. (2020). Es posible atribuir las variaciones en los resultados de caracterización con los resultados de otros autores a la plasticidad genética de estos aislados, así como a diferencias en los métodos aplicados. De lo anterior podríamos inferir que la hidrólisis de Tween 80, la hemólisis y la prueba de esterasa C14 no son pruebas diferenciales entre las especies del género, pero si pueden ser usadas como recurso para diferenciar los aislados 23010 y LT2 durante el proceso de formulación vacunal.

El perfil genético obtenido mediante RAPD-PCR nos permite dilucidar patrones genéticos que puedan ser característicos de especie, mostrando claras similitudes entre los aislados y su dendograma se acerca bastante a los resultados obtenidos con el BLAST del 16S rRNA. Pese a lo anterior, este experimento se podría optimizar, ya que se puede observar que la amplificación de los aislados 13996, 14513 y 4270 solo presenta un amplicón y no se logra dilucidar claramente un patrón, como si se observó en el resto de aislados. Además, se recomendaría realizar estos estudios con un mayor tamaño muestral, tanto de cepas pertenecientes al género, como de cepas no pertenecientes (grupo externo), con el fin de realizar una comparación representativa de variabilidad genética.

La identificación y reconstrucción filogenética basada en 16S rRNA no es resolutive en la identificación de especies, por lo que la técnica de MLSA resulta ideal para analizar relaciones evolutivas y determinar la identidad de una cepa estudio (Gupta y Sharma, 2015). Si bien todos los genes conservados de los aislados de este estudio fueron secuenciados, solamente seis de los aislados pudieron ser correctamente concatenados. Las secuencias que no pudieron ser utilizadas correspondían los aislados AL1I, 4270, 3140, 14198, AL3-I, AL1-II, L3, 13996 y PA-2881, los que presentaban electroferogramas con picos ilegibles, indicando que el producto no fue correctamente purificado o que se encontraba en baja concentración, además de que los índices Phred (datos no mostrados) indicaban probabilidad menor al 90% de corresponder al nucleótido señalado.

El árbol MLSA presenta dos clados, uno de ellos compuesto por las secuencias obtenidas de la base de datos (**figura 4**). Esta clara división nos impide obtener datos acertados sobre las relaciones filogenéticas, sin embargo, se pueden obtener algunos datos al desglosar y observar los árboles filogenéticos individuales de cada gen (**anexo 5**). De lo anterior, podemos rescatar y afirmar que todos los genes del aislado 2206 se encuentra mucho más cercanos a cepas *T. piscium* que a cepas catalogadas como *T. finnmarkense*, además de que 23010 se encuentra cercano a la cepa homóloga *T. finnmarkense* (TNO010) o las cepas definidas como *T. dicentrarchi*. Entonces, para poder realizar un árbol filogenético a partir de los genes constitutivos, se deberían volver a secuenciar los aislados procurando la adecuada purificación y correcta concentración de las secuencias objetivo, además de incluir las cepas control y alguna cepa fuera del género, de esta forma se tendrá un tamaño muestral mayor para un análisis más exhaustivo.

En todos los análisis tanto bioquímicos, genéticos e inmunológicos realizados, la cepa *T. maritimum* CECT4276 resulta ser la más divergente, siendo positiva para enzimas como tripsina, quimotripsina y galactosidasa, enzimas que son negativas para todos los aislados estudiados. Además, su polisacárido “O”, resulta ser específico como epítipo, ya que solo genera anticuerpos para su propia cepa y no reacciona con los demás sueros, sin embargo, es importante recalcar que solo se tuvo la cepa CECT 4276 como control para la especie, por lo que no tiene punto de comparación con otras bacterias homólogas. Existe literatura que reafirma la ausencia de reactividad cruzada de *T. maritimum* con otras especies del género (Fernández-Álvarez y cols., 2018a), infiriendo que las tres vacunas contra tenacibaculosis de tipo *T. maritimum* (Rafidah y cols., 2015; Lee y cols., 2019), probablemente no confieren protección contra tenacibaculosis producida por otras especies patógenas.

Los resultados de serotipificación mediante *dot-blot* nos indican que las cepas *T. dicentrarchi*, *T. piscium* y *T. finnmarkense* tienen reactividad cruzada, existiendo unión antígeno-anticuerpo con sueros hiperinmunes diluidos hasta 1:5000, sin embargo, no se logró determinar el título sérico específico. Se pretendía encontrar el título específico mediante ELISA, sin embargo, se debió eliminar una repetición con lo cual los análisis carecen de representatividad. No obstante, al analizar los datos (**anexo 6**) se observa una diferencia significativa de la cepa *T. maritimum* CECT4276 con cada suero, mientras que las demás cepas no presentan diferencias significativas entre sí, indicando nuevamente reactividad cruzada entre las especies *T. dicentrarchi*, *T. piscium* y *T. finnmarkense*. De lo anterior podríamos inferir que la formulación de una bacterina con un aislado perteneciente a alguna de las especies antes

mencionadas, podría estimular la formación de anticuerpos capaces de reconocer y otorgar protección ante tenacibaculosis producida por *T. dicentrarchi*, *T. piscium* y *T. finnmarkense*.

El formulado LT2 ocasionó respuesta inmune a corto y a largo plazo solamente en *S. salar*. El incremento de NF-kB observado a los seis días post vacunación, indica estimulación de linfocitos T y la producción de citoquinas proinflamatorias (Marciani, 2003) tales como TNF-alfa, IL1 e IL6 las que participan principalmente en: la activación de linfocitos, aumento de la producción de anticuerpos y la diferenciación de células B (Kordon y cols., 2022). Entonces, podríamos decir que LT2 desencadena una respuesta inmune específica, al estimular la proliferación y diferenciación de células B, concordando con los anticuerpos específicos detectados en peces vacunados post 600 UTA. Si bien los anticuerpos de peces vacunados con este formulado fueron significativamente mayores a peces vacunados con placebo, esta diferencia solo se observó contra la cepa *T. dicentrarchi*, infiriendo que esta vacuna solo conferiría protección contra tenacibaculosis producida por esa especie. Asimismo, podría resultar útil el replicar los experimentos contra las cepas *T. maritimum* y *T. piscium*, con el fin de determinar o descartar la eventual protección contra alguna de esas especies.

El formulado 23010 produjo respuesta inmune en ambas especies de peces estudiadas. Si bien en *S. salar* no se pudo corroborar la estimulación de marcadores moleculares, se determinó que en *O. mykiss* tanto NF-kB como CD4 se ven significativamente aumentados comparados con un grupo control (**Figura 6A**). Tal como se explicó en el párrafo anterior, un aumento de NF-kB implica la activación de la respuesta inmune adaptativa, estimulando a linfocitos T y B. El aumento de CD4 implica la participación de linfocitos T *helper* en la estimulación de células B y su consecuente producción de anticuerpos, además de estimular macrófagos para aumentar su potencial bactericida (Kordon y cols., 2022). Entonces, el estímulo de la inmunidad específica mediada por células detectado a los seis días, resulta concordante con la detección de anticuerpos en suero de peces 600 UTA post-vacunación.

La reacción antígeno-anticuerpo obtenida tanto en *S. salar* como en *O. mykiss*, contra las especies *T. finnmarkense* (**Figura 5B** y **Figura 6B**) y *T. dicentrarchi* (**Figura 5C** y **Figura 6C**), reafirma la similitud serológica de las especies e implica la posible protección del formulado 23010 contra tenacibaculosis producida por cualquiera de dichas especies. La eficacia del formulado se logra dilucidar en la **figura 7**, observando una mortalidad del 50% en el grupo control en los primeros siete días comparado con solo el 10% del grupo vacunado. El RPS, al ser mayor a 60% establece la eficacia de la vacuna, pudiendo colegir que la vacuna 23010 confiere protección a largo plazo contra tenacibaculosis.

En función de lo anterior, los resultados obtenidos con el formulado 23010, deberían ser complementados evaluando la reactividad de los sueros de peces contra *T. piscium* y *T. maritimum*, para evaluar el alcance teórico de protección de la vacuna en relación con otras especies causantes de la patología. Lo anterior ayudaría a esclarecer la necesidad de formular una vacuna poli-antigénica, para aumentar la potencia inmunogénica de la misma contra las diferentes especies causantes de tenacibaculosis.

Por ejemplo, una vacuna con el aislado 23010 y un aislado de *T. maritimum* podría potenciar el alcance de la vacuna a nivel global, ya que en otros países productores de salmónidos esta última especie resulta ser la que más estragos causa en la industria (Frisch y cols., 2018). Otra posibilidad sería un formulado con 23010 y LT2, que pudiese aumentar la efectividad y protección de la vacuna contra las especies que más brotes de tenacibaculosis causan en Chile (Avendaño-Herrera y cols., 2020). También, y de forma complementaria se podrían realizar desafíos con una cepa patogénica de *T. dicentrarchi* para evaluar la eficacia del formulado 23010 ante esta especie.

Finalmente, sería valioso evaluar marcadores moleculares de los peces desafiados, con el fin de determinar y comparar las rutas de señalización que marcan la diferencia en la supervivencia de los peces vacunados con respecto a los controles.

V.- CONCLUSIONES

En resumen, podemos concluir que se lograron satisfactoriamente los tres objetivos específicos. Todos los aislados fueron sometidos a una completa caracterización fenotípica a través de pruebas bioquímicas y microbiológicas, lo que permitió determinar su clasificación como especies pertenecientes al género *Tenacibaculum*.

Se ha determinado que ambos prototipos vacunales generan respuestas inmunitarias en *O. mykiss* y *S. salar*, activando vías moleculares de inmunidad, destacándose de forma consistente la vía de NF- κ B. Además, también se observó la presencia de una respuesta inmunitaria adaptativa que estimula la producción de anticuerpos específicos contra *Tenacibaculum* spp. Estos anticuerpos son detectables en el suero hasta 600 unidades térmicas acumuladas (UTA), lo que representa un período de hasta 50 días.

Por último, se confirmó la eficacia del prototipo *T. finnmarkense* 23010 al demostrar un Índice de Protección Relativa (RPS) del 77%, proporcionando protección efectiva contra la tenacibaculosis a través de un desafío con *T. finnmarkense* en truchas.

En consideración a lo señalado anteriormente, el objetivo general se ha cumplido con éxito al lograr evaluar prototipos vacunales que han demostrado aumentar la expresión de genes relacionados con la respuesta inmunitaria y la producción de anticuerpos contra *Tenacibaculum* spp.

Con los resultados obtenidos, se respalda la eficacia de la bacterina desarrollada con el aislado *T. finnmarkense* 23010 como una estrategia beneficiosa para la prevención de la tenacibaculosis, dando por aceptada la hipótesis de esta investigación y considerando la continuación de esta investigación para el desarrollo de una vacuna que pudiera contribuir a reducir la dependencia de antimicrobianos y las pérdidas por tenacibaculosis.

VI.- REFERENCIAS

- Adams A. (2019). Progress, challenges and opportunities in fish vaccine development. *Fish & shellfish immunology*, 90, 210–214. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2019.04.066>
- Avendaño-Herrera, R., Magariños, B., López-Romalde, S., Romalde, J. L., & Toranzo, A. E. (2004). Phenotypic characterization and description of two major O-serotypes in *Tenacibaculum maritimum* strains from marine fishes. *Diseases of aquatic organisms*, 58(1), 1–8. <https://doi.org/10.3354/dao058001>
- Apablaza, P., Frisch, K., Jakobsen Ø., Sverre, B., Småge B., Vallestad C., Duesund H., Mendoza J., Nylund A. (2017). Primary isolation and characterization of *Tenacibaculum maritimum* from Chilean atlantic salmon mortalities associated with a *Pseudochattonella* spp. algal bloom. *Journal of aquatic animal health*, 29(3), 143–149. <https://doi.org/10.1080/08997659.2017.1339643>
- Avendaño-Herrera, R., Irgang, R., Sandoval, C., Moreno-Lira, P., Houel, A., Duchaud, E., Poblete-Morales, M., Nicolas, P., & Ilardi, P. (2016). Isolation, Characterization and Virulence Potential of *Tenacibaculum dicentrarchi* in Salmonid Cultures in Chile. *Transboundary and emerging diseases*, 63(2), 121–126. <https://doi.org/10.1111/tbed.12464>
- Avendaño-Herrera, R., Saldarriaga-Cordoba, M., Irgang, R., & Tapia-Cammas, D. (2019). PCR protocol for *Tenacibaculum dicentrarchi*: Updated specificity for *Tenacibaculum finnmarkense* detection. *Bulletin of the European Association of Fish Pathologists*, 39(4), 162-171. <https://doi.org/10.3354/dao058001>
- Avendaño-Herrera, R., Collarte, C., Saldarriaga-Córdoba, M., & Irgang, R. (2020). New salmonid hosts for *Tenacibaculum* species: Expansion of tenacibaculosis in Chilean aquaculture. *Journal of fish diseases*, 43(9), 1077–1085. <https://doi.org/10.1111/jfd.13213>
- Bernardet, JF., Nakagawa, Y. (2006). An Introduction to the Family Flavobacteriaceae. In: Dworkin, M., Falkow, S., Rosenberg, E., Schleifer, KH., Stackebrandt, E. (eds) *The Prokaryotes*. Springer, New York, NY. https://doi.org/10.1007/0-387-30747-8_16
- Bjørngen, H., & Koppang, E. O. (2021). Anatomy of teleost fish immune structures and organs. *Immunogenetics*, 73(1), 53–63. <https://doi.org/10.1007/s00251-020-01196-0>
- Chettri, J. K., Deshmukh, S., Holten-Andersen, L., Jafaar, R. M., Dalsgaard, I., & Buchmann, K. (2013). Comparative evaluation of administration methods for a vaccine protecting rainbow

trout against *Yersinia ruckeri* O1 biotype 2 infections. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 154(1-2), 42–47. <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2013.04.001>

Costa, G., Danz, H., Kataria, P., & Bromage, E. (2012). A holistic view of the dynamisms of teleost IgM: A case study of *Streptococcus iniae* vaccinated rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Developmental & Comparative Immunology*, 36(2), 298–305. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2011.04.011>

Edwards, U., Rogall, T., Blöcker, H., Emde, M., & Böttger, E. C. (1989). Isolation and direct complete nucleotide determination of entire genes. Characterization of a gene coding for 16S ribosomal RNA. *Nucleic acids research*, 17(19), 7843–7853. <https://doi.org/10.1093/nar/17.19.7843>

Fernández-Álvarez, C., Torres-Corral, Y., & Santos, Y. (2018a). Comparison of serological and molecular typing methods for epidemiological investigation of *Tenacibaculum* species pathogenic for fish. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 102(6), 2779–2789. <https://doi.org/10.1007/s00253-018-8825-8>

Fernández-Álvarez, C., & Santos, Y. (2018b). Identification and typing of fish pathogenic species of the genus *Tenacibaculum*. *Applied microbiology and biotechnology*, 102(23), 9973–9989. <https://doi.org/10.1007/s00253-018-9370-1>

Flores-Kossack, C., Montero, R., Köllner, B., & Maisey, K. (2020). Chilean aquaculture and the new challenges: Pathogens, immune response, vaccination and fish diversification. *Fish & shellfish immunology*, 98, 52–67. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2019.12.093>

Frisch, K., Småge, S. B., Vallestad, C., Duesund, H., Brevik, Ø. J., Klevan, A., Olsen, R. H., Sjaatil, S. T., Gauthier, D., Brudeseth, B., & Nylund, A. (2018). Experimental induction of mouthrot in Atlantic salmon smolts using *Tenacibaculum maritimum* from Western Canada. *Journal of fish diseases*, 41(8), 1247–1258. <https://doi.org/10.1111/jfd.12818>

Gupta, A., & Sharma, V. K. (2015). Using the taxon-specific genes for the taxonomic classification of bacterial genomes. *BMC genomics*, 16(1), 396. <https://doi.org/10.1186/s12864-015-1542-0>

Habib, C., Houel, A., Lunazzi, A., Bernardet, J. F., Olsen, A. B., Nilsen, H., Toranzo, A. E., Castro, N., Nicolas, P., & Duchaud, E. (2014). Multilocus sequence analysis of the marine bacterial genus *Tenacibaculum* suggests parallel evolution of fish pathogenicity and endemic

colonization of aquaculture systems. *Applied and environmental microbiology*, 80(17), 5503–5514. <https://doi.org/10.1128/AEM.01177-14>

Hektoen, H., Berge, J. A., Hormazabal, V., & Yndestad, M. (1995). Persistence of antibacterial agents in marine sediments. *Aquaculture*, 133(3-4), 175–184. [https://doi.org/10.1016/0044-8486\(94\)00310-K](https://doi.org/10.1016/0044-8486(94)00310-K)

Hipra Laboratories (N.D.). ICTHIOVAC® TM. Disponible en: https://static-web.hipra.com/migrate_files/product_files/ICTHIOVAC-TM-ETI-701222-01.4_0.pdf
(Consultado 15 de junio 2022)

Irgang, R., Mancilla, M., & Avendaño-Herrera, R. (2021). Florfenicol and oxytetracycline susceptibility patterns in Chilean isolates of *Tenacibaculum dicentrarchi*: An emerging pathogen for farmed salmonids. *Journal of fish diseases*, 44(8), 1043–1046. <https://doi.org/10.1111/jfd.13380>

Jørgensen, T. R., Raida, M. K., Kania, P. W., & Buchmann, K. (2009). Response of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) in skin and fin tissue during infection with a variant of *Gyrodactylus salaris* (Monogenea: Gyrodactylidae). *Folia parasitologica*, 56(4), 251–258. <https://doi.org/10.14411/fp.2009.029>

Karlsen, C., Ottem, K. F., Brevik, Ø. J., Davey, M., Sørum, H., & Winther-Larsen, H. C. (2017). The environmental and host-associated bacterial microbiota of Arctic seawater-farmed Atlantic salmon with ulcerative disorders. *Journal of Fish Diseases*, 40(11), 1645–1663. <https://doi.org/10.1111/jfd.12632>

Klakegg, Ø., Abayneh, T., Fauske, A. K., Fülberth, M., & Sørum, H. (2019). An outbreak of acute disease and mortality in Atlantic salmon (*Salmo salar*) post-smolts in Norway caused by *Tenacibaculum dicentrarchi*. *Journal of fish diseases*, 42(6), 789–807. <https://doi.org/10.1111/jfd.12982>

Kordon, A.O., Pinchuk, L., Karsi, A. (2022). Adaptive Immune System in Fish. *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 22(4), TRJFAS20235. <http://doi.org/10.4194/TRJFAS20235>

Lagadec, E., Småge, S. B., Trösse, C., & Nylund, A. (2021). Phylogenetic analyses of Norwegian *Tenacibaculum* strains confirm high bacterial diversity and suggest circulation of

ubiquitous virulent strains. *PloS one*, 16(10), e0259215.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0259215>

Lee, J., Wan, Q., Kugapreethan, R. & Kim, J. (2019). Pathogenicity attenuation technology of gliding bacteria, and live attenuated vaccine composition for preventing gliding bacterial disease. (Patente Corea No.KR101801221 B1). Korean Intellectual Property Office.
<https://tb.kibo.or.kr/ktms/supplyTe/download.do?rbsIdx=110&idx=1020180108534&tag=3>

Leung, T. L. & Bates, A. E. (2013). More rapid and severe disease outbreaks for aquaculture at the tropics: Implications for food security. *J. Appl. Ecol.* 50, 215–222.
<https://doi.org/10.1111/1365-2644.12017>

Livak, K. J., & Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods (San Diego, Calif.)*, 25(4), 402–408. <https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262>

Ma, J., Bruce, T. J., Jones, E. M., & Cain, K. D. (2019). A Review of Fish Vaccine Development Strategies: Conventional Methods and Modern Biotechnological Approaches. *Microorganisms*, 7(11), 569. <https://doi.org/10.3390/microorganisms7110569>

Marciani, D. J. (2003). Vaccine adjuvants: role and mechanisms of action in vaccine immunogenicity. *Drug Discovery Today*, 8(20), 934–943.
[https://doi.org/10.1016/s13596446\(03\)028642](https://doi.org/10.1016/s13596446(03)028642)

Olsen, A. B., Gulla, S., Steinum, T., Colquhoun, D. J., Nilsen, H. K., & Duchaud, E. (2017). Multilocus sequence analysis reveals extensive genetic variety within *Tenacibaculum* spp. associated with ulcers in sea-farmed fish in Norway. *Veterinary microbiology*, 205, 39–45.
<https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2017.04.028>

Olsen, A. B., Spilsberg, B., Nilsen, H. K., Lagesen, K., Gulla, S., Avendaño-Herrera, R., Irgang, R., Duchaud, E., & Colquhoun, D. J. (2020). *Tenacibaculum piscium* sp. nov., isolated from skin ulcers of sea-farmed fish, and description of *Tenacibaculum finnmarkense* sp. nov. with subdivision into genomovars *finnmarkense* and *ulcerans*. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 70(12), 6079–6090. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.004501>

Pavel, A. B., & Vasile, C. I. (2012). PyElph - a software tool for gel images analysis and phylogenetics. *BMC bioinformatics*, 13, 9. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-13-9>

Pettersen, J. M., Osmundsen, T., Aunsmo, A., Mardones, F. O., & Rich, K. M. (2015). Controlling emerging infectious diseases in salmon aquaculture. *Revue scientifique et technique (International Office of Epizootics)*, 34(3), 923–938. <https://doi.org/10.20506/rst.34.3.2406>

Rafidah, N., Seng, J. & Seng, E. (Mayo 2015). Isolation and characterization of *Tenacibaculum maritimum* for autogenous vaccine development. World Aquaculture Conference held in Jeju, Korea. Disponible en: <https://www.researchgate.net/publication/284100615> (Consultado el 1 de junio, 2022).

Raida, MK. & Buchmann, K. (2007) Temperature-dependent expression of immune-relevant genes in rainbow trout following *Yersinia ruckeri* vaccination. *Dis Aquat Org*, 77, 41-52. <https://doi.org/10.3354/dao01808>

SERNAPESCA, 2022a. Informe sanitario de la salmicultura en centros marinos del año 2021. Subdirección de Acuicultura, Departamento de Salud Animal, Valparaíso, mayo 2022, Chile. Disponible en: <http://www.sernapesca.cl/informes/resultados-gestion> (Consultado el 1 de junio, 2022).

SERNAPESCA, 2022b. Informe sobre uso de antimicrobianos en la salmicultura nacional año 2021. Subdirección de Acuicultura, Departamento de Salud Animal, Valparaíso, mayo 2022, Chile. Disponible en: http://www.sernapesca.cl/sites/default/files/informe_sobre_uso_de_antimicrobianos_en_la_salmonicultura_nacional_ano_2021.pdf (Consultado 1 de junio; 2022)

SERNAPESCA, 2023. Informe con información sanitaria de agua dulce y mar 1º semestre año 2022. (2023). Disponible en: <http://www.sernapesca.cl/informes/resultados-gestion> (Consultado el 15 de enero, 2023).

Småge, S. B., Brevik, Ø. J., Duesund, H., Ottem, K. F., Watanabe, K., & Nylund, A. (2016a). *Tenacibaculum finnmarkense* sp. nov., a fish pathogenic bacterium of the family Flavobacteriaceae isolated from Atlantic salmon. *Antonie van Leeuwenhoek*, 109(2), 273–285. <https://doi.org/10.1007/s10482-015-0630-0>

Småge, S. B., Frisch, K., Brevik, Ø. J., Watanabe, K., & Nylund, A. (2016b). First isolation, identification and characterization of *Tenacibaculum maritimum* in Norway, isolated from diseased farmed sea lice cleaner fish *Cyclopterus lumpus* L. *Aquaculture*, 464, 178–184. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2016.06.030>

Småge, S. B., Brevik, Ø. J., Frisch, K., Watanabe, K., Duesund, H., & Nylund, A. (2017). Concurrent jellyfish blooms and tenacibaculosis outbreaks in Northern Norwegian Atlantic salmon (*Salmo salar*) farms. *PloS one*, *12*(11), e0187476. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0187476>

Småge S., Frisch K., Vold V., Duesund H., Brevik Ø., Olsen R., Sjaatil S., Klevan A., Brudeseth B., Watanabe K., Nylund A. (2018). Induction of tenacibaculosis in Atlantic salmon smolts using *Tenacibaculum finnmarkense* and the evaluation of a whole cell inactivated vaccine. *Aquaculture*, *495*, 858–864. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2018.06.063>

Spilsberg, B., Nilsen, H. K., Tavoranpanich, S., Gulla, S., Jansen, M. D., Lagesen, K., Colquhoun, D. J., & Olsen, A. B. (2022). Tenacibaculosis in Norwegian Atlantic salmon (*Salmo salar*) cage-farmed in cold sea water is primarily associated with *Tenacibaculum finnmarkense* genomovar *finnmarkense*. *Journal of fish diseases*, *45*(4), 523–534. <https://doi.org/10.1111/jfd.13577>

SUBREI, 2021. *Informe anual comercio exterior*. Paredes N. Disponible en: <https://www.subrei.gob.cl/estudios-y-documentos> (Consultado 1 de Junio, 2021)

Suzuki, M., Nakagawa, Y., Harayama, S., & Yamamoto, S. (2001). Phylogenetic analysis and taxonomic study of marine Cytophaga-like bacteria: proposal for *Tenacibaculum* gen. nov. with *Tenacibaculum maritimum* comb. nov. and *Tenacibaculum ovolyticum* comb. nov., and description of *Tenacibaculum mesophilum* sp. nov. and *Tenacibaculum amylolyticum* sp. nov. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, *51*(5), 1639–1652. <https://doi.org/10.1099/00207713-51-5-1639>

Tamura, K., Stecher, G., & Kumar, S. (2021). MEGA11: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 11. *Molecular biology and evolution*, *38*(7), 3022–3027. <https://doi.org/10.1093/molbev/msab120>

Toranzo, A. E., Devesa, S., Romalde, J. L., Lamas, J., Riaza, A., Leiro, J., & Barja, J. L. (1995). Efficacy of intraperitoneal and immersion vaccination against *Enterococcus* sp. infection in turbot. *Aquaculture*, *134*(1-2), 17–27. [https://doi.org/10.1016/0044-8486\(95\)00038-4](https://doi.org/10.1016/0044-8486(95)00038-4)

Utke, K., Bergmann, S., Lorenzen, N., Köllner, B., Ototake, M., & Fischer, U. (2007). Cell-mediated cytotoxicity in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, infected with viral hemorrhagic septicemia virus. *Fish & shellfish immunology*, *22*(3), 182–196. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2006.04.008>

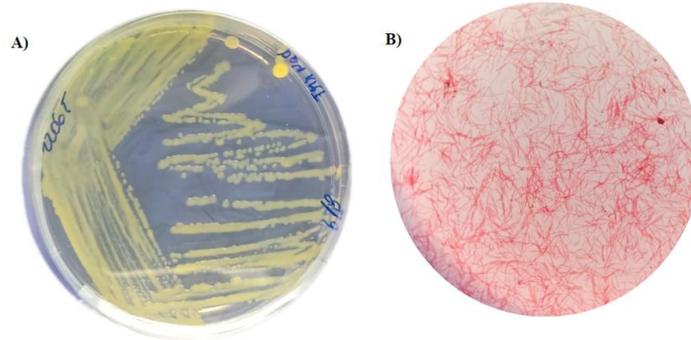
Valdés, I., Jaureguiberry, B., Romalde, J. L., Toranzo, A. E., Magariños, B., & Avendaño-Herrera, R. (2009). Genetic characterization of *Streptococcus phocae* strains isolated from Atlantic salmon, *Salmo salar* L., in Chile. *Journal of Fish Diseases*, *32*(4), 351–358. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2761.2008.01014.x>

Wynne, J. W., Thakur, K. K., Slinger, J., Samsing, F., Milligan, B., Powell, J. F. F., McKinnon, A., Nekouei, O., New, D., Richmond, Z., Gardner, I., & Siah, A. (2020). Microbiome Profiling Reveals a Microbial Dysbiosis During a Natural Outbreak of Tenacibaculosis (Yellow Mouth) in Atlantic Salmon. *Frontiers in microbiology*, *11*, 586387. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.586387>

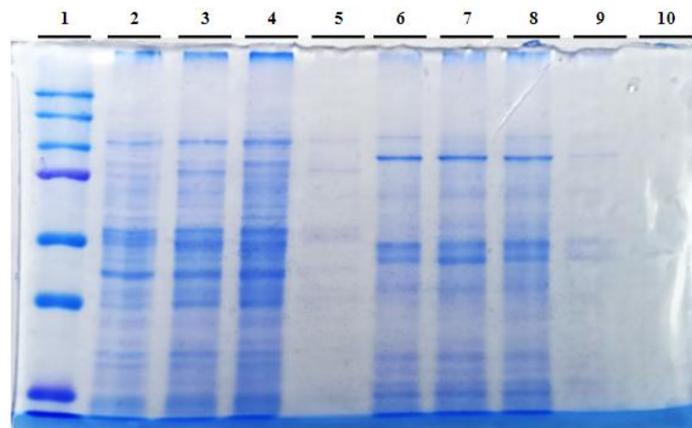
Yoon, S. H., Ha, S. M., Kwon, S., Lim, J., Kim, Y., Seo, H., & Chun, J. (2017). Introducing EzBioCloud: a taxonomically united database of 16S rRNA gene sequences and whole-genome assemblies. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, *67*(5), 1613–1617. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.001755>

Yu, Y., Wang, Q., Huang, Z., Ding, L., & Xu, Z. (2020). Immunoglobulins, Mucosal Immunity and Vaccination in Teleost Fish. *Frontiers in immunology*, *11*, 567941. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.567941>

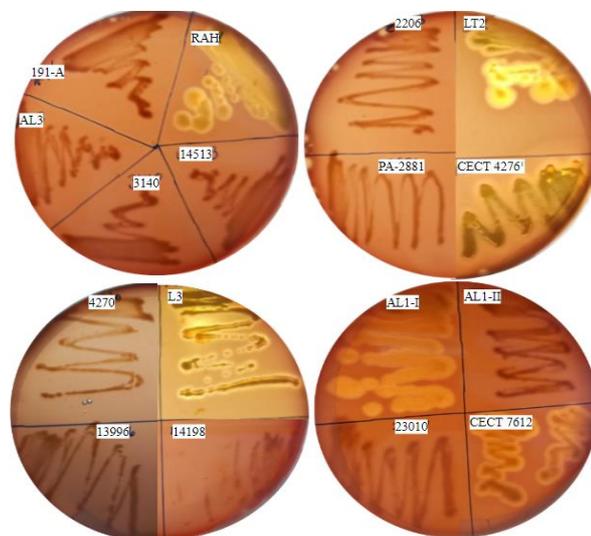
VII.- ANEXOS



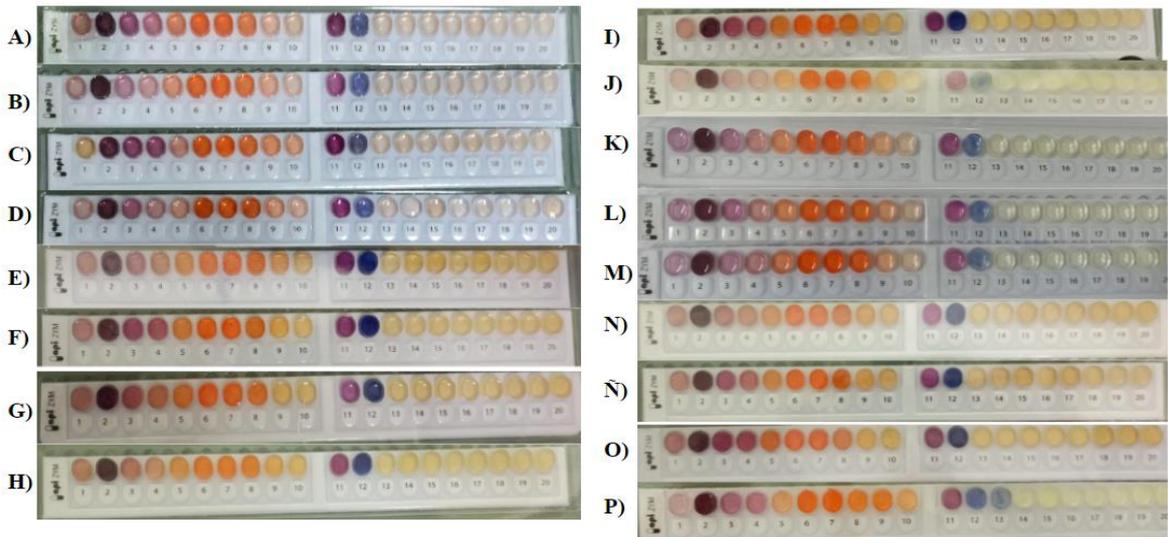
Anexo 1. Aislado 2206. A) Siembra por estría. B) Tinción Gram.



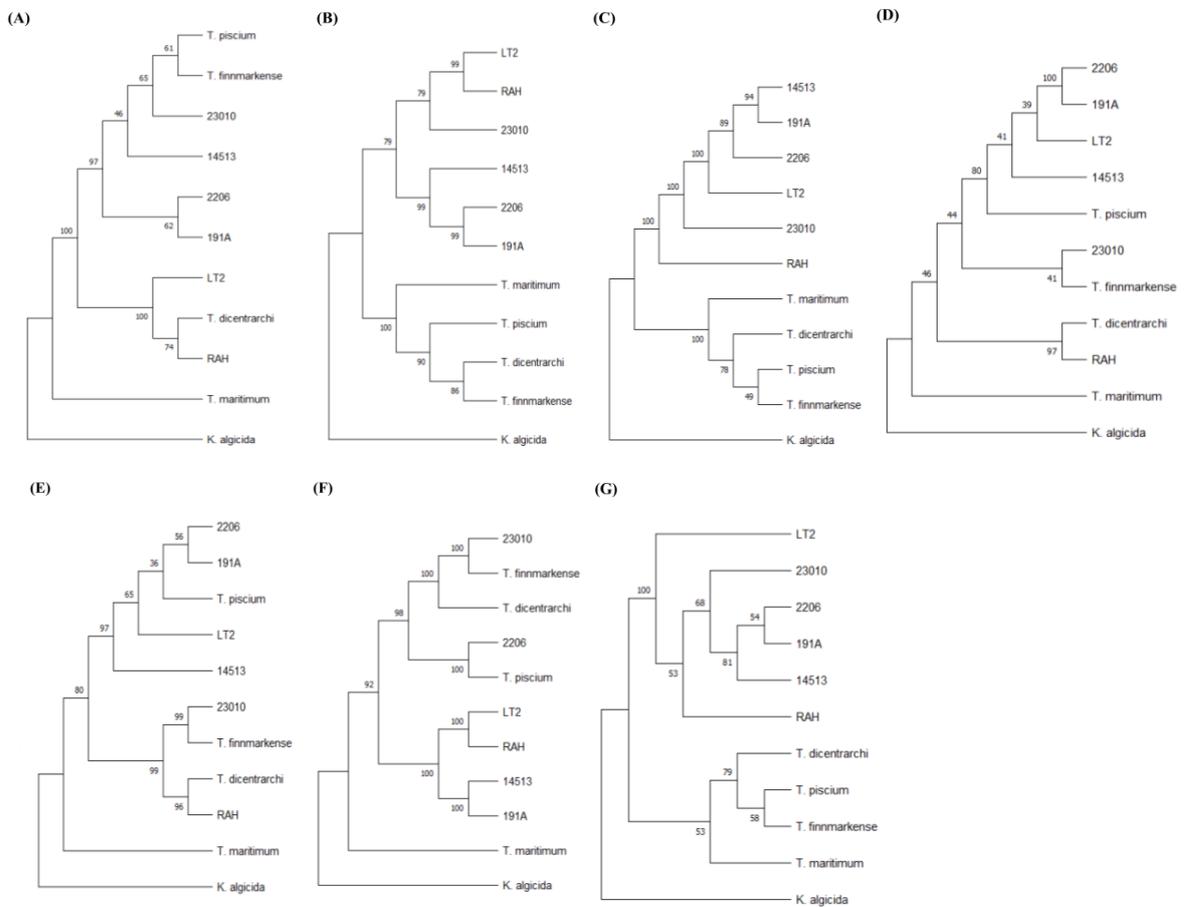
Anexo 2. Perfil electroforético aislados 23010 y 2206. El primer carril corresponde a pesos moleculares. Carriles del 2-5 corresponden a la cepa 23010, cultivada en caldo marino, FMM/agua de mar, FMM/50% agua de mar y Muller-Hinton respectivamente. Los carriles 6-9 corresponden a la cepa 2206, cultivada en caldo marino, FMM/agua de mar, FMM/50% agua de mar y Muller-Hinton respectivamente. El carril 10 corresponde al control negativo.



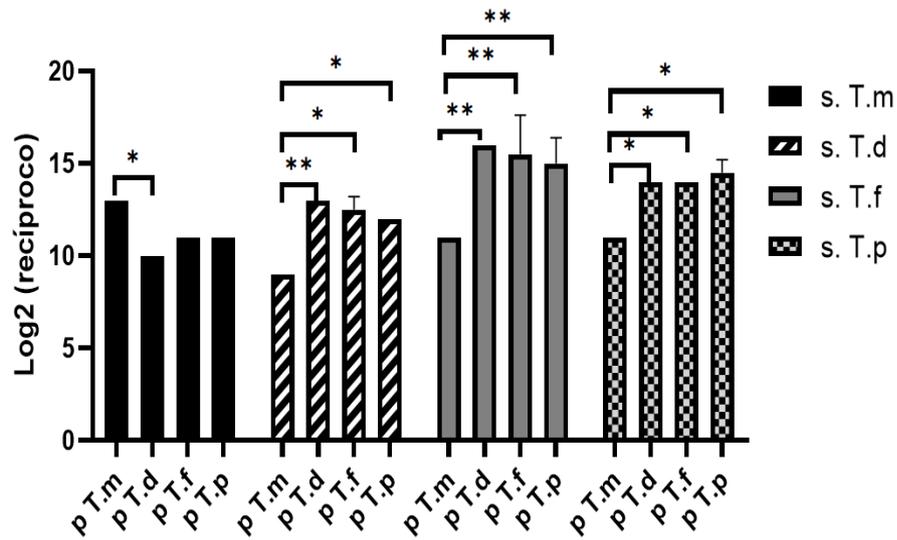
Anexo 3. Siembra de cepas y aislados en AM suplementado con NaCl 2% y sangre de cordero desfibrinada al 5%. RAH, LT2, CECT 4276, L3, AL1-I Y CECT 7612 presentan hemólisis β , observando un halo transparente a su alrededor. El resto de aislados no presentan hemólisis (γ). Las placas fueron incubadas por 1 semana.



Anexo 4. Resultados galerías API-ZYM. A) 23010. B) 2206. C) LT2. D) 4270. E) PA-2881. F) CECT 7612T. G) AL3I. H) AL1I. I) L3. J) 191-A. K) 3140. L) 13996. M) 14513. N) 14198. Ñ) RAH. O) AL1II. P) CECT 4276T.



Anexo 5. Árboles filogenéticos de genes constitutivos. A) 16S rRNA. B) *atpD*. C) *fusA*. D) *ileS*. E) *rlmN*. F) *rpoB*. G) *tuF*.



Anexo 6. Inmuno-ensayo de suero de conejo hiperinmune. Gráfico de expresión de títulos séricos, expresado como el log en base 2 del recíproco de la última dilución positiva luego de un ensayo ELISA. Utilizando suero de conejo hiperinmune contra *T. maritimum* (s. T.m), *T. dicentrarchi* (s. T.d), *T. finnmarkense* (s. T. f) y *T. piscium* (s. T.p). Las microplacas se fijaron con célula completa de cepas *T. maritimum* (p. T.m), *T. dicentrarchi* (p. T.d), *T. finnmarkense* (p. T. f) y *T. piscium* (p. T.p). Las titulaciones de los sueros fueron realizadas en razón 1:2 desde una dilución inicial de 1/150 a 1/153600. Se determinó como positivo aquellos pocillos que presentasen 3 veces la absorbancia control. El número de replicados es de 2. Se realizó un ANOVA de dos vías junto con una prueba de Tukey. *: P<0.05, **: P<0.01