



UNIVERSIDAD
NACIONAL
DE COLOMBIA

**DETERMINACIÓN DE LOS NIVELES DE
EXPRESIÓN DE LOS GENES DE IgT E IgM EN
DIFERENTES TEJIDOS DE TILAPIA ROJA
(*Oreochromis sp*) FRENTE A INFECCIÓN POR
Streptococcus agalactiae SEROTIPO Ib**

Leidy Johana Peña Osorio

Universidad Nacional de Colombia Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia,
Departamento Maestría en salud y producción animal Bogotá, Colombia

2024

DETERMINACIÓN DE LOS NIVELES DE EXPRESIÓN DE LOS GENES DE IgT E IgM EN DIFERENTES TEJIDOS DE TILAPIA ROJA (*Oreochromis sp*) FRENTE A INFECCIÓN POR *Streptococcus agalactiae* SEROTIPO Ib

Leidy Johana Peña Osorio

Tesis o trabajo de investigación presentada(o) como requisito parcial para optar al título
de:

Magister en salud y producción animal

Director:

M.V. MSc, PhD. Manuel Fernando Ariza Botero Codirector:

M.V. MSc, PhD. Víctor Manuel Tibatá Rodríguez

Línea de Investigación: Genética y mejoramiento animal

Universidad Nacional de Colombia Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia,
Departamento Maestría en salud y producción animal Bogotá, Colombia

2024

A DIOS, por darme la fuerza, la sabiduría y la guía para sacar adelante este proyecto.

A mis padres y a mis hermanos, por su constante apoyo. A mi pareja, gracias por compartir conmigo su conocimiento, orientarme, acompañarme y ayudarme durante todo este proceso.

Al equipo de VM LAB por abrirme las puertas del laboratorio, a mis profesores y colegas por contribuir a mi crecimiento profesional

Declaración de obra original

Yo declaro lo siguiente:

He leído el Acuerdo 035 de 2003 del Consejo Académico de la Universidad Nacional. «Reglamento sobre propiedad intelectual» y la Normatividad Nacional relacionada al respeto de los derechos de autor. Esta disertación representa mi trabajo original, excepto donde he reconocido las ideas, las palabras, o materiales de otros autores.

Cuando se han presentado ideas o palabras de otros autores en esta disertación, he realizado su respectivo reconocimiento aplicando correctamente los esquemas de citas y referencias bibliográficas en el estilo requerido.

He obtenido el permiso del autor o editor para incluir cualquier material con derechos de autor (por ejemplo, tablas, figuras, instrumentos de encuesta o grandes porciones de texto).

Por último, he sometido esta disertación a la herramienta de integridad académica, definida por la universidad.

Leidy Johana Peña Osorio

Fecha 29/01/2024

Agradecimientos

A la Universidad Nacional, muchas gracias por abrirme las puertas y permitirme cumplir ese sueño de ser parte de esta gran institución, así mismo al comité directivo de la FMVZ por el apoyo económico y académico. Al doctor Manuel Fernando Ariza Botero, y al laboratorio de genética muchas gracias por el apoyo incondicional, el acompañamiento, por brindarme conocimiento en esta área y la confianza para poder desarrollar este proyecto.

Al doctor Víctor Manuel Tibatá Rodríguez infinitas gracias y admiración por compartir desinteresadamente todos sus conocimientos, por acompañarme en cada fase de este proyecto, guiarme, enseñarme con paciencia, abrirme las puertas de VM LAB y permitirme crecer como persona y profesionalmente.

A la sede del remanso de la UDCA, al doctor Camilo Prieto Mojica, y a su grupo de estudio en peces principalmente Katty Geraldine Bernal, Esteban Pulido Zamora, Carlos Adrián Grajales, Hernán Darío Bermúdez gracias por su gran colaboración al adecuar el espacio de ictiología, y ayudarme a mantener las condiciones óptimas para los animales en estudio.

A Jair Arturo Comas por su orientación en cuanto a la ejecución de los procedimientos de infección y a Camilo Ernesto Rivera, muchas gracias por enseñarme e instruirme en la adecuada toma de muestras y detección histopatológica de lesiones en peces, gracias por la paciencia y apoyo en diagnóstico, el cual fue clave para el desarrollo de esta tesis.

Gracias a CORPOGEN por permitirme el acceso a sus instalaciones y equipos y finalmente le agradezco enormemente a VM LABORATORIES por todo el apoyo económico y académico el cual hizo posible desarrollar este proyecto, y a su equipo de trabajo Francis Francois Osorio por ser un gran amigo y compañero de laboratorio y a Olga Tibatá por su constante apoyo

X

Determinación de los niveles de expresión de los genes de la IgT e IgM en diferentes tejidos de tilapia roja (*Oreochromis sp*) frente a infección por *Streptococcus agalactiae* serotipo Ib

Resumen

DETERMINACIÓN DE LOS NIVELES DE EXPRESIÓN DE LOS GENES DE IgT E IgM EN DIFERENTES TEJIDOS DE TILAPIA ROJA (*Oreochromis sp*) FRENTE A INFECCIÓN POR *Streptococcus agalactiae* SEROTIPO Ib

La estreptococosis en tilapia (*Oreochromis sp.*) es una enfermedad causada por *Streptococcus agalactiae* y se caracteriza por tener un gran impacto económico. Como medidas preventivas se ha descrito la vacunación como la mejor opción, sin embargo, esta patología sigue afectando la piscicultura. Por tal razón, es importante entender los diferentes mecanismos de inmunidad humoral frente a este patógeno; tales como la IgM e IgT. A la fecha no hay reporte de expresión de la recientemente descubierta inmunoglobulina T en caso de estreptococosis, por lo tanto, esta investigación tuvo como objetivo determinar los niveles de expresión de las inmunoglobulinas T y M en diferentes tejidos de tilapia roja frente a infección por *Streptococcus agalactiae* serotipo Ib. Para el estudio se emplearon un total de 48 juveniles de tilapia, con un peso medio inicial de 90g, los cuales se mantuvieron en la sede del remanso de la UDCA, y se inocularon vía intragástrica, intraperitoneal e inmersión con una cepa obtenida de un brote natural, se tomaron muestras de bazo, branquias, hígado, intestino, piel y riñón craneal a las 24h, 3 y 10 días para hallar los niveles de expresión de las inmunoglobulinas por RT-qPCR y para verificar el desarrollo de la enfermedad se tomaron muestras para histopatología y se confirmaron por qPCR. Los niveles de expresión fueron calculados mediante el método $2^{-\Delta\Delta Ct}$, a partir de los resultados se concluyó que los niveles globales de IgM e IgT, al infectar a los peces con *Streptococcus agalactiae serotipo Ib*, ocurrieron principalmente, cuando los peces fueron inoculados por inmersión y por vía intraperitoneal y casi sin respuesta por la vía intragástrica. adicionalmente a nivel de órganos, la expresión de IgM e IgT, se dio principalmente en bazo y branquias, mientras que en los demás órganos evaluados hubo una menor expresión de las dos inmunoglobulinas, especialmente de IgM en los tres primeros días.

Palabras clave: *Streptococcus agalactiae*, tilapia, inmunoglobulinas

Abstract

DETERMINATION OF THE LEVELS OF EXPRESSION OF IgT AND IgM GENES IN DIFFERENT TISSUES OF RED TILAPIA (*Oreochromis sp*) IN THE VIEW OF INFECTION BY *Streptococcus agalactiae* SEROTYPE Ib

Streptococcosis in tilapia (*Oreochromis sp.*) is a disease caused by *Streptococcus agalactiae* and is characterized by a great economic impact. As preventive measures, vaccination has been described as the best option, however, this pathology continues to affect the fish farming. For this reason, it is important to understand the different mechanisms of humoral immunity against this pathogen, such as IgM and IgT. To date, there is no report of expression of the recently discovered immunoglobulin T in case of streptococcosis, therefore, this research aimed to determine the expression levels of immunoglobulin T and M in different tissues of red tilapia against infection by *Streptococcus agalactiae* serotype Ib. For the study, a total of 48 juvenile tilapia, with an average initial weight of 90g, were kept at the el remanso headquarters of the UDCA, and were inoculated via intragastric, intraperitoneal and immersion routes with a strain obtained from a natural outbreak. Samples of spleen, gills, liver, intestine, skin and cephalic kidney were taken at 24h, 3 and 10 days to find the levels of expression of immunoglobulins by RT-qPCR and to verify the development of the disease, samples were taken for histopathology and confirmed by qPCR. The expression levels were calculated by the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. From the results it was concluded that global levels of IgM and IgT, when infecting fish with *Streptococcus agalactiae* serotype Ib, occurred mainly when the fish were inoculated by immersion and intraperitoneally and with almost no response by the intragastric route. Additionally, at the organ level, the expression of IgM and IgT occurred mainly in the spleen and gills, while in the other organs evaluated there was a lower expression of the two immunoglobulins, especially IgM in the first three days.

Key words: *Streptococcus agalactiae*, tilapia, immunoglobulins.

Contenido

RESUMEN	6
ABSTRACT.....	7
LISTA DE TABLAS	14
LISTA DE SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS	15
INTRODUCCIÓN	17
CAPÍTULO 1. ESTREPTOCOCOSIS EN TILAPIA (<i>OREOCHROMIS SP.</i>) Y RESPUESTA INMUNE HUMORAL	19
1.1 ESTREPTOCOCOSIS	19
1.1.1 <i>Agente etiológico</i>	19
1.2 <i>Situación epidemiológica internacional y nacional de la estreptococosis en peces</i>	22
1.3 <i>Streptococcus agalactiae en peces</i>	26
1.4 <i>Inmunidad en peces</i>	31
1.4.1 <i>Generalidades del sistema inmune</i>	31
CAPÍTULO 2 EXPRESIÓN DE GENES DE INMUNOGLOBULINA T E INMUNOGLOBULINA M EN TILAPIA (<i>OREOCHROMIS SP</i>) POR PCR CUANTITATIVA EN TIEMPO REAL CON TRANSCRIPTASA REVERSA	36
<i>Introducción</i>	36
2.1 PCR CUANTITATIVA EN TIEMPO REAL CON TRANSCRIPTASA REVERSA (RT- QPCR)	37
2.1.1 <i>Factor de elongación 1 alpha</i>	38
2.2 MATERIALES Y MÉTODOS	39
2.2.1 <i>Cepa de Streptococcus agalactiae</i>	40
2.2.2 <i>Infección in vivo de tilapias con S. agalactiae serotipo Ib mediante inoculación intragástrica (IG), intraperitoneal (IP) e inmersión (INM)</i>	41
2.2.3 <i>Detección de S. agalactiae</i>	43
2.2.4 <i>Extracción de ARN y síntesis de ADN complementario</i>	44
2.2.5 <i>Expresión de genes de IgT e IgM</i>	44
2.2.6 <i>Evaluación histopatológica</i>	46
2.3 <i>Resultados</i>	48
2.4 <i>Discusión</i>	72
3 CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	79
3.3 <i>Conclusiones</i>	79
3.4 <i>Recomendaciones</i>	80
A. ANEXO: PRIMERS EMPLEADOS EN ESTE ESTUDIO	81
B. ANEXO: ALINEAMIENTO DE LAS SECUENCIAS	83
C. ANEXO: SALIDA R	88
BIBLIOGRAFÍA	89

Lista de figuras

	Pág.
Figura 2.2-1: Anatomía interna de un pez óseo	47
Figura 2.3-1: Colonias de <i>S. agalactiae</i> serotipo Ib cultivadas en agar selectivo para <i>Streptococcus</i> tipo B.....	48
Figura 2.3-2: Curva de la temperatura de fusión (Tm) de la PCR en tiempo real de la amplificación de un fragmento del gen <i>dlts</i> de <i>S. agalactiae</i> genotipo Ib a partir de ADN genómico extraído de cultivo	49
Figura 2.3-3: Curva de la temperatura de fusión (Tm) de la PCR en tiempo real del amplificado de un fragmento del gen <i>cps</i> de <i>S. agalactiae</i> genotipo Ib a partir de ADN genómico extraído de cultivo	49
Figura 2.3-4: Curvas de la temperatura de fusión (Tm) de la qPCR del gen <i>dlts</i> de <i>Streptococcus agalactiae</i> serotipo Ib, de los grupos experimentales y del control negativo.	50
Figura 2.3-5: Curvas de la temperatura de fusión (Tm) de la qPCR del gen <i>cps</i> de <i>Streptococcus agalactiae</i> serotipo Ib, de los grupos experimentales y del control negativo.	51
Figura 2.3-6: curvas de la temperatura de fusión (Tm) control negativo de la PCR del gen y <i>dlts</i> de <i>Streptococcus agalactiae</i> y grupo control	51
Figura 2.3-7: curvas de la temperatura de fusión (Tm) control negativo de la PCR del gen y <i>cps</i> del <i>Streptococcus agalactiae</i> y grupo control	52
Figura 2.3-8: Comportamiento de los niveles de expresión de la IgM a través del tiempo, por las 3 vías de inoculación	53
Figura 2.3-9: Comportamiento de los niveles de expresión de la IgT a través del tiempo por diferentes vías	54
Figura 2.3-10: Comparación de los niveles de expresión de IgM e IgT en peces inoculados con <i>Streptococcus agalactiae</i> serotipo Ib por vía intragástrica (IG), inmersión (INM) e intraperitoneal (IP) y su variación a través del tiempo	55
Figura 2.3-11: Niveles de expresión de la IgM en los diferentes órganos de los peces infectados con <i>Streptococcus agalactiae</i> serotipo Ib a través del tiempo	56
Figura 2.3-12: Niveles de expresión de la IgT en los diferentes órganos de los peces infectados con <i>Streptococcus agalactiae</i> serotipo Ib a través del tiempo	57
Figura 2.3-13: Comparación en los niveles de expresión de la IgM vs la IgT en los órganos evaluados durante 3 tiempos diferentes	58

Figura 2.3-14: Niveles de expresión de la IgM en diferentes órganos por las tres vías de inoculación: Intragástrica (IG), inmersión (INM) e intraperitoneal (IP) a través del tiempo.

60

Figura 2.3-15: Niveles de expresión de la IgT en diferentes órganos por las vías de inoculación Intragástrica (IG), inmersión (INM) e intraperitoneal (IP), a través del tiempo.

61

Figura 2.3-16: Riñón caudal .H & E a 20x

62

Figura 2.3-17: Epicardio .H & E a 20x

62

Figura 2.3-18: Hígado. H & E a 20x

63

Figura 2.3-19: Ojo. H & E a 40x

63

Figura 2.3-20: Encéfalo. H & E a 20x

64

Figura 2.3-21: Intestino. H & E a 10x

64

Figura 2.3-22: Intestino. H& E a 10x

65

Figura 2.3-23: Bazo. H & E a 40x

66

Figura 2.3-24: Branquias. H & E a 4x

67

Figura 2.3-25: Estómago. H & E a 10x

68

Figura 2.3-26: Bazo. H & E a 10x

69

Figura 2.3-27: Hígado. H & E a 10x

69

Lista de tablas

	Pág.
Tabla 1: Pruebas de identificación de <i>Streptococcus agalactiae</i> aislados de peces	12

Lista de Símbolos y abreviaturas

Símbolos con letras griegas

Símbolo	Término	Unidad SI	Definición
α	Alfa		
β	Beta		
γ	Gamma		
μg	Microgramo		
μM	Micromolar		
ml	Mililitro		
mm	Milímetro		
kDa	Kilo Dalton		
g	Gramo		

Superíndice

Superíndice	Término
$\Delta\Delta\text{Ct}$	Delta Delta cycle threshold

Abreviaturas

Abreviatura	Término
ACTH	Hormona adrenocorticotropa
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNc	Ácido desoxirribonucleico complementario
ARN	Ácido ribonucleico
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
ARNr	Ácido ribonucleico ribosomal
ARNt	Ácido ribonucleico transferencia
bp	Base pair o pares de bases
CGE	Células granulares eosinofílicas
CH	Dominio constante pesado
CL	Dominio constante ligero
Ct	Threshold cycle
EF	Factor de elongación
F	Forward
FRET	Transferencia de energía de resonancia fluorescente
GAPDH	Gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa
GAS	Grupo A del <i>Streptococcus</i>

GBS	Grupo B del <i>Streptococcus</i>
GCSD	Grupo C del <i>Streptococcus dysgalactiae</i>
GOI	Gene of interest
H&E	Hematoxilina y Eosina
ICA	Instituto Colombiano Agropecuario
Ig	Inmunoglobulina
IG	Intragástrico
IM	Intramuscular
INM	Inmersión
IP	Intraperitoneal
IPI	Inmunoperoxidasa indirecta
LD50	Dosis letal 50
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa
PI	Post Inoculación
PO	Vía oral
PRS	Porcentaje relativo de sobrevivencia
qPCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa en tiempo real
R	Reverse
RT	Retro transcripción
SALT	Tejido linfoide asociado a piel
SIA	Sistema inmune adquirido
SII	Sistema inmune innato
sp	Especie
SSF	Suero salino fisiológico
ST7	<i>Streptococcus agalactiae</i> serotipo Ia
TUBA	Tubulina alpha
UBCE	Enzima conjugadora de la ubiquitina
UFC	Unidades formadoras de colonias
VH	Dominio variable pesado
VL	Dominio variable ligero

Introducción

La tilapia (*Oreochromis sp*), es la especie piscícola más cultivada en Colombia representando el 58% de la producción nacional (Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural, 2020), debido a la cría intensiva y superintensiva de esta especie, y a la presión por aumentar la producción, los cultivos de tilapia se han visto afectados por problemas sanitarios y enfermedades emergentes (Bondad reantaso et al., 2005). Entre los patógenos más relevantes se encuentran las bacterias, tales como: *Aeromonas hydrophila*, *Pseudomonas sp.*, *Flavobacterium columnare* y *Streptococcus sp.* (Instituto Colombiano Agropecuario (ICA, s.f). De las anteriores, la estreptococosis ha sido considerada como una de las patologías más importantes en la acuicultura mundial debido a su amplia distribución geográfica, las cuantiosas pérdidas por mortalidad, costos de tratamiento, disminución en el crecimiento, dificultad en la comercialización y potenciales riesgos de zoonosis (Vásquez, 2019).

En Colombia en el año 2011, por aislamientos obtenidos de varias regiones del país, se demostró la presencia de *S. agalactiae* serotipo Ib en tilapias con un peso superior a los 20 g (Jimenez, 2010) mientras que en el 2023 las producciones piscícolas se vieron gravemente afectadas por la presencia del serotipo Ia, afectando todas las etapas productivas de la tilapia: cría, alevinaje, levante y engorde, por lo cual el Instituto Colombiano Agropecuario (ICA), declaró un estado de emergencia sanitaria debido a las mortalidades masivas y grandes pérdidas económicas. Frente a esta problemática, una de las herramientas más valiosas para la prevención de enfermedades y aseguramiento de un producto limpio sin efectos colaterales sobre el ambiente es la vacunación, actualmente se ofrecen en el mercado colombiano 2 vacunas comerciales para *S.agalactiae* Ib y una vacuna trivalente inactivada, formulada con base en *Streptococcus agalactiae* Ia, Ib y III, sin embargo, frente a los esfuerzos para controlar y prevenir esta enfermedad, los cultivos siguen siendo afectados en gran escala.

Una de las claves para una correcta inmunización se centra en el entendimiento del sistema inmune. Los peces tienen un sistema de defensa innato y uno adaptativo que se relacionan entre sí. El sistema inmune innato comprende barreras físicas, componentes humorales y celulares, defiende al organismo de las infecciones de una manera no específica, mientras que el sistema inmune adaptativo, involucra células altamente especializadas para el reconocimiento de antígenos por los linfocitos T y la producción y secreción de anticuerpos antígeno-específicos (inmunoglobulinas) de las células B de memoria y plasmáticas (Fernández et al., 2002; Ruiz et al., 2003).

En teleósteos como la tilapia, se consideraba que solo producían la inmunoglobulina M (IgM), siendo este el isotipo más predominante en el suero y la IgD, la cual hasta el momento no tiene una función clara. Sin embargo, para el año 2018, Velázquez et al., descubrieron en la tilapia, un nuevo isotipo de inmunoglobulina, la IgT (*Tau*), sin embargo, no son claros sus niveles, ni las diferencias funcionales entre esta inmunoglobulina con relación a la IgM, ni su respuesta frente al estímulo de los diferentes patógenos administrado por diferentes vías. Por lo tanto, la presente investigación se propuso determinar los niveles de expresión de la IgT y la IgM mediante diferentes rutas de infección como lo es la vía intragástrica, inmersión e intraperitoneal empleando el *Streptococcus agalactiae serotipo Ib*, teniendo en cuenta que estas son vías de ingreso de los patógenos y éste uno de los agentes etiológicos con mayor relevancia en los cultivos, permitiéndonos conocer el grado de estimulación del sistema inmune en los diferentes tejidos y tiempos evaluados.

Capítulo 1. Estreptococosis en tilapia (*Oreochromis sp.*) y respuesta inmune humoral

1.1 Estreptococosis

1.1.1 Agente etiológico

La estreptococosis es una enfermedad originada por cocos Gram positivos (+) del género *Streptococcus*, que generalmente causan infecciones piógenas en las superficies corporales o en órganos internos de muchas especies animales, incluidos los peces. Estas bacterias pueden formar cadenas de cocos de longitud variable, son inmóviles, anaerobias facultativas, catalasa y oxidasa negativos, son exigentes para su crecimiento, por lo que precisan de la adición de sangre o suero a los medios de cultivo. En un tiempo de incubación de 18 a 24 horas forman colonias pequeñas, puntiformes y de variada actividad hemolítica; lo cual ayuda en la diferenciación de las diferentes especies, junto con la clasificación de serogrupos con la metodología de Lancefield y pruebas bioquímicas (Quinn et al.,2016).

Taxonómicamente los *Streptococcus* se clasifican de la siguiente manera:

Reino: Bacteria

Phylum: Firmicutes

Clase: Bacilli

Orden: Lactobacillales

Familia: Streptococcaceae,

Género: *Streptococcus*

Especies: más de 150 especies reconocidas

(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi>)

Los *Streptococcus* pueden producir lisis en los glóbulos rojos en los agares de cultivo, generando 3 tipos de patrones: hemolisis Alfa (α), Beta (β) y Gamma (γ). La α -hemolisis consiste en una destrucción parcial de eritrocitos alrededor de la colonia, produciéndose una coloración verde a marrón en el medio de cultivo, esta hemolisis es producida por especies tales como el *S. mutans* (causante de caries), *S. viridans* (causante de endocarditis y abscesos dentales) y *S. pneumoniae*, el cual causa patologías en humanos tales como otitis media, neumonía, sepsis y meningitis (Preado, 2001). Otras especies generan Beta -hemolisis mediante la liberación de exotoxinas como la estreptolisina la cual genera una ruptura completa de los eritrocitos y se aprecia como una zona clara y brillante alrededor de las colonias; dentro de estas especies se encuentran el *S. agalactiae*, responsable de mastitis crónica o septicemia neonatal en vacas, ovejas, cabras, humanos y perros; el *S. pyogenes* que causa cuadros clínicos de faringitis, tonsilitis, linfadenitis, pioderma, osteomielitis o endocarditis en humanos y bovinos y el *S. equi* que causa la Gurma o papera equina, procesos supurativos y púrpura hemorrágica en equinos (Berridge et al., 2001). El grupo γ -hemolítico no tiene una actividad hemolítica aparente, como es el caso de algunos aislados de *S. dysgalactiae* o *S. uberis* en casos de mastitis agudas y clínicas en vacas (Quinn et al., 2016) y de algunas cepas de *S. agalactiae* que se caracterizan por ser débilmente hemolíticos y no hemolíticos como los que se han aislado de peces en Colombia (Delannoy et al., 2013).

Basados en la secuencia del gen 16S rARN, las especies estreptocócicas de importancia clínica se han organizado en seis grupos en función de sus características patógenas y clínicas; el grupo piogénico, el bovis, el anginosus, el salivarius, el mutans, y el mitis (Nobbs et al., 2009).

Otra forma adicional de clasificar a los *Streptococcus* hemolíticos, se basa en la antigenicidad de los polisacáridos que hacen parte de la pared celular de estas bacterias. Esta clasificación fue desarrollada por Rebeca Lancefield en 1933, mediante el uso de anticuerpos específicos, que permiten agruparlos en los siguientes tipos:

- Grupo A - *Streptococcus pyogenes*
- Grupo B - *Streptococcus agalactiae*
- Grupo C – *S. equisimilis*, *S. equi*, *S. zooepidemicus*, *S. dysgalactiae*
- Grupo D - *Enterococcus*, *Streptococcus bovis*, *Enterococcus faecalis*
- Grupo E - *Streptococcus milleri* y *Streptococcus mutans*
- Grupo F - *Streptococcus anginosus*
- Grupo G - *Streptococcus canis*, *Streptococcus dysgalactiae*
- Grupo H - *Streptococcus sanguis*
- Grupo L - *Streptococcus dysgalactiae*
- Grupo N - *Lactococcus lactis*
- Grupo R&S - *Streptococcus suis*

El grupo A (GAS), reúne cepas de *Streptococcus pyogenes*, que afectan al humano, causando faringitis, fiebre reumática, glomerulonefritis, escarlatina y shock tóxico. De otra parte, al grupo B de *Streptococcus* (GBS), también conocido como grupo piógeno, pertenece el *S. agalactiae*. El GBS es un patógeno oportunista, que suele ser comensal en las mucosas y generar enfermedades de gran importancia en bovinos, humanos y peces (Jimenez, 2010; Quinn et al., 2016), fue diferenciada por primera vez de otras especies de *Streptococcus* por Rebeca Lancefield en 1930, después de que fue aislada de leche y vacas con mastitis (Lancefield, 1933).

Lancefield describió la colonización del tracto vaginal de mujeres asintomáticas con GBS, sin embargo, la patogenicidad en humanos no se describió hasta 1938 cuando se publicaron tres informes de infecciones mortales posparto (Lancefield & Hare, 1935; Fry,

1938).

El mecanismo de invasión de GBS se identificó en humanos en 1960, cuando se generó un interés por la patogénesis de esta bacteria, al reportarse informes cada vez mayores de infecciones en adultos y meningitis neonatal (Mannik et al., 1962; Jones et al., 1968; Braunstein et al., 1969). En 1970, un gran número de publicaciones estuvieron enfocadas a la colonización, respuesta inmune, tratamiento con antibióticos y diagnóstico de infecciones por GBS en vacas y humanos. (Paredes et al., 1976; Schauf et al., 1976). En la década de los 80 las investigaciones se enfocaron en dilucidar factores de virulencia específicos, tales como el polisacárido capsular sialilado, toxinas y proteínas de superficie (Wilkinson et al., 1978; Gibson et al., 1999; Spellerberg et al., 1999). Desde entonces *S. agalactiae* ha sido un importante patógeno en humanos, responsable de causar meningitis en recién nacidos, demencia neurológica, bacteriuria en mujeres embarazadas, artritis séptica, osteomielitis, faringitis, neumonía, endocarditis e infecciones en tejido blando que se manifiestan como celulitis, absesos, y úlceras (Berridge et al., 2001; Duarte et al., 2004; Lindahl et al., 2005; Mian et al., 2009; Poppert et al., 2009). *S. agalactiae* usualmente es encapsulado y en razón a las diferencias de su polisacárido capsular, se le clasifica en diez serotipos (Ia, Ib, II, III, IV, V, VI, VII, VIII), en el caso de las tilapias, el serotipo más prevalente ha sido el Ib.

1.2 Situación epidemiológica internacional y nacional de la estreptococosis en peces

Hasta el momento, entre las especies de *Streptococcus* que han sido reportadas como patógenas para los peces se encuentran *S. agalactiae*, *S. iniae*, *S. dysgalactiae*, *S. milleri*, *S. ictaluri* y *S. parauberis*; los cuales inducen una enfermedad sistémica con un cuadro clínico bastante característico, que involucra lesiones purulentas y signos neurológicos (Prieta et al., 1993; Eldar et al., 1994; Toranzo et al., 1994; Domenech., 1996; Michel et al., 1997, Mata et al., 2004, Yang & Li, 2009, Vásquez, 2019)

En condiciones naturales las principales vías de transmisión del *Streptococcus* parecen ser de forma horizontal a través de contacto directo entre peces sanos y peces enfermos o muertos, así como el contacto indirecto a través del agua en los sistemas de cultivo (Robinson & Meyer, 1966; Nguyen et al., 2002; Agnew & Barnes, 2007; Kim et al., 2007; Bowater et al., 2012; Amal et al., 2013). La principal fuente de infección son las bacterias

liberadas al agua por los peces enfermos o muertos y la vía de ingreso es a través del tracto gastrointestinal (Iregui et al., 2013; 2016), lo cual se ha demostrado a través de ensayos por diferentes rutas experimentales, incluyendo inyecciones intraperitoneales, inmersión, cohabitación con peces infectados, así como inoculación oral, branquial y en orificios nasales (Perera et al., 1994; 1997; Evans et al., 2000; Shoemaker et al., 2000).

Entre los diversos factores que pueden desencadenar la transmisión de la enfermedad se reporta: el desplazamiento, movilización de animales entre granjas, canibalismo de los peces por los ojos y vísceras de peces muertos, la alimentación en grupo en cercanía a éstos (Plumb et al., 1974); utilización de peces crudos en la alimentación de otros peces en cultivo (Toranzo et al., 1994; Domenech et al., 1996); concentrado contaminado con la bacteria (Brangg & Broere, 1986), reservorios como el agua, suelo o fango de los estanques, peces que sobreviven a los brotes de enfermedad, especies ícticas ajenas a la producción como por ejemplo los crustáceos, especies terrestres que son predatoras (Toranzo et al., 1993; Akhlaghi et al., 1996; Shoemaker & Klesius, 1997; Bromage et al., 1999; Bragg & Broere, 1986), parásitos que pueden actuar como vectores tal como las sanguijuelas (*Batracobdelloides tricarinata*), protozoarios y tremátodos en gran número ubicados en branquias y piel que pueden incrementar el riesgo de infección (Baya et al., 1996), adicionalmente la alteración de las condiciones del agua que favorecen situaciones de estrés como el aumento de la temperatura del agua, bajo oxígeno disuelto, altas concentraciones de amonio, nitritos, nitratos y elevada densidad de siembra lo que desencadena la diseminación de la enfermedad, morbilidad y aumento de la incidencia (Eldar et al., 1995; Perera et al., 1997, Shoemaker et al., 2000, Vendrell et al., 2006, Mian et al., 2009).

Teniendo en cuenta lo anterior, los reservorios de *Streptococcus* pueden indicar que estas bacterias son habitantes normales del ambiente, que han sido liberados y se conservan constantemente en el medio, mediante una transmisión horizontal, en donde animales enfermos o infectados subclínicamente, eliminan la bacteria vía intestinal o cuando mueren, permitiendo la infección de peces sanos para así iniciar un nuevo ciclo de vida bacteriano (Múzquiz et al., 1999). Sin embargo, en la tilapia roja, se ha demostrado que *S. agalactiae* y *S. iniae* pueden transmitirse verticalmente por reproductores asintomáticos infectados con estos patógenos y generar una alta proporción de familias en las que se produce este tipo de transmisión que son 60 % en *S. agalactiae*, y 100 % en *S. iniae*, lo

24 Determinación de los niveles de expresión de los genes de IgT e IgM en diferentes tejidos de tilapia (*Oreochromis sp*) frente a infección por *Streptococcus agalactiae* serotipo Ib

que sugiere que *Streptococcus* no pueden eliminarse fácilmente de las poblaciones acuícolas mediante una ruptura intergeneracional, que es un método común empleado en otras especies cultivadas favoreciendo a que el mantenimiento de esta enfermedad en una población ocurra gracias a la existencia de portadores aparentemente sanos (Toranzo et al., 1993; Eldar et al., 1995; Akhlaghi et al., 1996; Romalde et al., 1996; Pradeep et al., 2016).

Por otra parte, las limitaciones de fronteras geográficas o especificidad de huéspedes para la estreptococosis son muy pocas (Bromage et al., 1999) esto se evidencia en la notificación de que inicialmente se dieron en poblaciones de trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) criadas en prefectura de Shizuoka en Japón en abril de 1957 (Hoshina et al. 1958), posteriormente, dos epizootias, ambas involucrando infecciones de carpas doradas (*Notemigonus crysoleucas*) con *Streptococcus*, según Robinson & Meyer (1966), así mismo, los aislamientos de *Streptococcus sp.* de más del 50% de los peces enfermos durante una epizootia en las bahías estuarinas a lo largo de Florida, Alabama y la costa del Golfo de México en los Estados Unidos en 1972 (Plumb et al., 1974).

Hasta el momento, se ha reportado que *S. iniae*, *S. agalactiae* (*Streptococcus* del grupo B GBS) y *S. dysgalactiae* (*Streptococcus* del grupo C- GCSD) afectan a más de 50 especies de 29 familias de peces de agua salada, dulce y estuarina tales como como Barcoo grunter (*Scortum barcoo*), pompano dorado (*Trachinotus blochii*), ya-fish (*Schizothorax potanini*), mero gigante (*Epinephelus lanceolatus*), palometa plateada (*Pampus argenteus*), Seriola cola amarilla (*Seriola quinqueradiata*), Salmón amago (*Oncorhynchus rhodurus*), Salmón del pacífico (*Oncorhynchus kisutch*), Pez loro (*Sparisoma aurofrenatum*) y la tilapia (*Oreochromis sp*), entre otros, siendo esta última la especie más afectada (Kitao et al., 1981, Ohnishi & Jo., 1981, Eldar et al., 1994, Bowser et al., 1998, Shoemaker et al., 2001, Kvitt & Colorni., 2004, Li et al., 2015).

En cuanto a la distribución, ésta se da a nivel mundial en las regiones tropicales de los cinco continentes de la siguiente manera: *S. iniae* en Estados Unidos, Japón, Israel, Singapur, Bahrain, Australia, Taiwan, Chile, Barbados, Granadinas y China; *S. agalactiae*, en Estados Unidos, Israel, Japón, Kuwait, Tailandia, Brasil, Colombia, Honduras, Costa Rica, China y Australia, y *S. dysgalactiae* en Malasia, Indonesia, China, Taiwan, Japón y Brasil, constituyendo uno de los problemas sanitarios más importantes con considerables

pérdidas económicas debido a la mortalidad, morbilidad, disminución del rendimiento y del desempeño productivo (Bercovier et al., 1997; Perera et al., 1997; Shoemaker & Klesius, 1997; Bowser et al., 1998; Bromage et al., 1999; Pulido et al., 1999; Evans et al., 2002; Duremdez et al., 2004; Klesius et al., 2006; Russo et al., 2006; Mian et al., 2009; Bowater et al., 2012; Delannoy et al., 2013; Pridgeon & Zhang, 2014, Maekawa et al., 2020).

En Colombia, se ha detectado *S. agalactiae* en híbridos de tilapia roja (*Oreochromis sp.*), tilapia nilótica (*O. niloticus*) y trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) en los departamentos del Tolima, Huila, Valle del Cauca, Meta y Casanare. Esta bacteria se identificó por primera vez en el país en 1999 y la posterior secuenciación del ADN de distintos aislamientos obtenidos de varias regiones del país demostró un 98,8% de correspondencia genómica con *S. agalactiae* mediante la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) a partir de aislamientos obtenidos de brotes de enfermedad (Pulido et al., 1999; Iregui et al., 2004, Jiménez et al., 2007; Hernández et al., 2009). Hasta el año 2022, el único serotipo reportado en el país correspondía al Ib, sin embargo, el Instituto Colombiano Agropecuario (ICA) en la resolución N° 6535 del 2023, el 28 de abril de 2023 declaró un estado de emergencia sanitaria, como resultado de la atención sanitaria de 43 notificaciones de cuadros clínicos de mortalidad inusual y alteración de parámetros productivos en peces, siendo 29 notificaciones procedentes del departamento de Huila, 10 del Atlántico, 3 del Magdalena y 1 del Tolima, se diagnosticó como causa de la mortalidad inusual la presencia de *Streptococcus agalactiae* ST7 serotipo Ia en todas las etapas productivas de la tilapia: cría, alevinajes, levante y engorde, estimando una tasa de mortalidad del 12% en el Huila (4.554.598), 47% en Atlántico (1.621.665), 37% en Magdalena (10.301) y 10% en Tolima (50.000), sobre la totalidad de las poblaciones marco existentes y/o referenciadas en cada uno de estos departamentos.

Así mismo, la Federación Colombiana de Acuicultores FEDEACUA, reporto pérdidas por mortalidad de hasta el 30% en animales destinados a mercado de exportación y la producción nacional en la represa de Betania (Huila), y estimó pérdidas por mortalidad de hasta el 50% de los animales en todas las etapas productivas para el departamento del Atlántico (ICA, 2023).

1.3 *Streptococcus agalactiae* en peces

1.3.1 Formas de presentación y manifestaciones patológicas en peces

Existen dos formas de presentación de esta enfermedad en peces que tienen diferentes características patológicas, la forma sistémica, correspondiente a los casos agudos, con mortalidades altas y súbitas dentro de un período corto (10 días), con signos clínicos como septicemia, exoftalmía, opacidad de la córnea, melanososis, alteración del nado, hinchazón y hemorragia en los órganos internos (Ye et al. 2011; Chen et al. 2012). En los casos crónicos, la mortalidad es más baja y se caracteriza por la formación de granulomas (Bomker et al., 1979).

Los signos clínicos y las lesiones macroscópicas de *Streptococcus* incluidas las de *S. agalactiae* son inapetencia, desplazamiento de la columna, hemorragias en el ojo, opacidad de la córnea y hemorragias en la base de las aletas y en opérculos. Los signos más frecuentes son exoftalmía uni o bilateral, también conocida como “ojos saltones”, con severa endo y exopanoftalmitis hemorrágica microscópicamente con exudado celular, presencia masiva de macrófagos y bacterias comprometiendo en ocasiones el nervio óptico (Boomker et al., 1979; Rasheed et al., 1985; Baya et al., 1996; Chang & Plumb, 1996; Stoffregen et al., 1996; Perera et al., 1997; Pulido, 2000), abdomen distendido, letargia, dificultad en el desplazamiento, nado errático que es en espiral o en círculos justo debajo de la superficie de agua, con severa curvatura del cuerpo y rigidez dorsal (Plumb et al., 1974; Boomker et al., 1979; Rasheed et al., 1985; Kitao, 1993; Perera et al., 1994; Bercovier et al., 1997; Michel et al., 1997; Eldar & Ghittino, 1999; Pulido, 2004; Zamri Saad et al., 2022). En la necropsia los peces afectados pueden revelar en la cavidad abdominal o lumen intestinal la presencia de líquido sanguinolento o material gelatinoso amarillo-verdoso, hemorragias en las paredes abdominales, acúmulo de fluido sanguinolento, en ocasiones con apariencia purulenta y formación de membranas fibrinosas (Plumb et al., 1974; Rasheed et al., 1984; Eldar et al., 1995; Nieto et al., 1995; Bromage et al., 1999) bazo congestionado o con esplenomegalia, hígado pálido o congestionado con hepatomegalia, así como epicarditis o el corazón cubierto por material fibrinoso o granulomas, riñón inflamado o congestionado y lesiones hemorrágicas en la piel o el

oscurecimiento de esta (Bullock, 1981; Yanong & Floyd, 2002; Salvador et al., 2005). En algunos casos, los peces afectados no muestran signos clínicos evidentes antes de la muerte y la mortalidad se debe principalmente a la septicemia, infección del cerebro que puede cursar con meningoencefalitis en ocasiones de carácter hemorrágico, microscópicamente con presencia de bacterias en el espacio perivascular y en el interior de los capilares cerebrales (Boomker et al., 1979; Eldar et al., 1995; Nieto et al., 1995; Baya et al., 1996; Bercovier et al., 1997; Eldar & Ghittino, 1999; Pulido, 2000), de igual manera, se describen lesiones más severas con áreas de malacia y presencia de granulomas meníngeos y afectación del sistema nervioso especialmente el nervio óptico (Barham et al., 1979; Yanong & Floyd, 2002).

En Colombia, solo se había identificado *S. agalactiae* serotipo Ib, lo cual podría explicar que los cuadros clínicos que se observaban tuviesen procesos crónicos con bajas pero constantes mortalidades (Pulido et al., 1999; 2004) sin embargo, con la reciente emergencia sanitaria en que se declaró la presencia del serotipo Ia, se ha identificado que las manifestaciones clínicas de esta bacteria son más de tipo agudo y se ha caracterizado por mortalidad derivada de la presentación de la enfermedad, los principales signos clínicos que ha presentado son similares entre el Ia y Ib e incluyen letargia, nado errático, exoftalmia, lesiones en piel, cola, aletas, y muerte, por lo que no es posible identificar a simple vista, sin la ayuda de pruebas de laboratorio, qué serotipo está causando las mortalidades en los peces (ICA, 2023), adicionalmente toca tener en cuenta que la intensidad de las lesiones y signos clínicos también depende de factores relacionados a la dosis infectiva, cantidad y calidad de agua, temperatura, biomasa y manejo (Chang et al., 1996).

1.3.2 Características del cultivo de la bacteria

GBS puede crecer en medios simples, sin embargo, para su aislamiento generalmente se emplean medios de cultivo suplementados con sangre ovina desfibrinada al 5% o suero. Tras 18 - 24 h de incubación en agar sangre, las colonias suelen ser de unos 0.5 a 2 mm de diámetro, de color blanco opacos, bordes lisos, altamente viscosas por la presencia de la cápsula, pueden o no estar rodeadas por un halo de β -hemólisis debido a que algunos de los aislados de esta especie se caracterizan por ser débilmente hemolíticos, sin embargo, otros no hemolíticos han sido aislados de humanos, peces, bovinos, ranas y

ratones. (Plumb et al., 1974; Boomker et al., 1979; Bragg & Broere, 1986; Ceschia et al., 1992; Prieta et al., 1993; Perera et al., 1994; Yoshida et al., 1996; Yuasa et al., 1999, De la Rosa & De Cueto, 2004). El empleo de medios selectivos favorece la recuperación del GBS como el caldo Todd Hewitt suplementado con agentes selectivos como gentamicina (8 µg/ml), ácido nalidíxico (15 µg/ml), colistina (10 µg/ml) o cristal violeta (Lopardo et al., 2018). Adicionalmente, *S. agalactiae* produce un compuesto poliénico que presenta ornitina y ramnosa en sus extremos (granadaeno), que desarrolla colonias pigmentadas anaranjadas que se observan únicamente en los crecimientos anaeróbicos en un medio que contiene almidón (medio Granada). Las cepas no hemolíticas de GBS no producen el compuesto poliénico, pero se ha propuesto una variante con agregado de un disco de oxacilina para detectarlas (Lopardo et al., 2018).

En general no tienen motilidad, no forman esporas, son anaerobios facultativos, no producen catalasa, ácido sulfhídrico, indol, ornitina ni oxidasa, producen ácido láctico a partir de carbohidratos (Austin & Austin, 1985; Hardie, 1986), además del antígeno polisacárido común que caracteriza a *S. agalactiae* como perteneciente al grupo B de Lancefield, los antígenos polisacáridos específicos y antígenos proteicos, permiten su clasificación en serotipos, son positivos a la prueba del CAMP- test, fermentan sucrosa, pero no lactosa, salicina o trehalosa. (Berridge et al., 2001). La tabla 1 muestra las pruebas de identificación de *Streptococcus agalactiae* aislados de peces.

Tabla 1: Pruebas de identificación de *Streptococcus agalactiae* aislados de peces

Prueba	<i>S. agalactiae.</i>
Gram	Gram+
Forma	Cocos
Hemólisis	- ó + (β -hemolisis)
Catalasa	-
Oxidasa	-
Crecimiento en NaCl 6.5%	+
Bilis esculina	-
Tolerancia a 45°C	-
Arginina	-
Ureasa	-

PYR (l-pirrolidónilamidasa)	-
Hidrólisis del Hipurato de Na ⁺	-
Motilidad 37°C	-
Reacción Voges Proskauer	-
Asimilación de carbohidratos	
Sucrosa	+
Arabinosa	-
Lactosa,	-
Maltosa	-
Manitol	-
Rafinosa	-
Sorbitol	-
Trehalosa	-

Adaptado de (Hernández et al., 2005)

1.3.3 Diagnóstico

Ante un brote o una sospecha de estreptococosis en peces, los métodos de diagnóstico se basan principalmente en la presencia de signos clínicos, examen post mortem, el aislamiento bacteriano de órganos internos y técnicas de tinción rápida para identificar cadenas de cocos Gram positivos, adicionalmente se emplean métodos de histopatología, inmunohistoquímica como la inmunoperoxidasa indirecta (IPI), microbiología y reacción en cadena de la polimerasa (PCR); los cuales se aplican en casos de mortalidad o en programas de monitoreo sanitario que se realizan periódicamente con propósitos preventivos, reducción de la pérdida de producción o de la diseminación de la enfermedad al ambiente (Pulido et al., 2004).

Actualmente en Colombia, luego de confirmarse la presencia del *Streptococcus agalactiae* serotipo Ia, por el Instituto Colombiano de Agricultura (ICA), los métodos de diagnóstico de la enfermedad que se han empleado simultáneamente son la histopatología, el cultivo bacteriológico, PCR, y un proceso de análisis del genoma completo de las cepas aisladas, todo esto con el fin de aplicar las medidas sanitarias que resulten necesarias en cualquier parte del país, en función del riesgo existente, encaminadas a controlar y disminuir la mortalidad de peces, así como proteger la piscicultura nacional y garantizar la seguridad alimentaria del país (ICA, 2023).

1.3.4 Mecanismos de prevención y control

Las medidas implementadas para la prevención y control se basan en el fortalecimiento de las normas de bioseguridad, el monitoreo de la entrada y salida de vehículos, objetos y personal en los predios acuícolas, el mantenimiento de las densidades de siembra de peces de acuerdo con los permisos que se otorgan a cada uno de los predios, a las condiciones ambientales (temperatura, nubosidad, entre otras) y a la calidad de agua sobre todo en relación con el oxígeno disponible. En caso de presentarse mortalidades, estas deben eliminarse de manera inmediata realizando enterramiento, compostaje o proceso en plantas reductoras o de producción de harinas para alimentos para animales, acorde a las recomendaciones de la autoridad ambiental y fortalecimiento de los protocolos de limpieza y desinfección de equipos, instalación, vehículos, utensilios de elementos empleados en los lotes afectados (ICA, 2023).

Adicionalmente, la vacunación es una de las herramientas claves y de mayor eficacia en la prevención, control de enfermedades y reducción de la transmisión de agentes patógenos en cualquier programa de salud animal. Se debe tener en cuenta que la vacuna ideal debe inducir temprana protección, prevenir la formación de portadores, inducir inmunidad contra otros serotipos, producir una restitución más rápida de los peces enfermos y estimular la formación de anticuerpos protectores. En el caso de *S. agalactiae*, los primeros reportes sobre vacunaciones contra este patógeno en peces, datan para el año de 1995 (Eldar et al. 1995) con una vacuna inactivada con formalina la cual fue capaz de proteger a la tilapia contra el desafío de 100x con la dosis letal media (LD50) a partir de esta, los estudios y el uso de vacunas en peces han avanzado en las últimas décadas, disponiendo de la producción a nivel mundial de vacunas inactivadas de células completas ; vacunas vivas atenuadas; vacunas recombinantes y vacunas de ADN (Liu, 2016) con diversos métodos de administración, las cuales comprenden inmersión (INM), inyección intraperitoneal (IP), inyección intramuscular (IM) (principalmente para vacunas de ADN) y administración oral (P.O) (Bowden et al., 2003).

En Colombia se dispone comercialmente de 2 vacunas inactivadas o de primera generación, una de estas es AquaVac™ Strep Sa-Si que contiene células inactivadas de *Streptococcus agalactiae* TI 513, serotipo Ib con 2.13×10^8 células bacterianas con adyuvante oleoso de inyección IP, que bajo estudios de eficacia reporta un porcentaje

relativo de sobrevivencia (PRS) $\geq 92\%$, lo cual corresponde a los datos de mortalidad obtenidos en la evaluación de la eficacia que son analizados a partir de una fórmula matemática para calcular la sobrevivencia atribuible a la vacunación (Nordmo, 1997) y ALPHA JECT micro 1 TiLa una vacuna monovalente oleosa que contiene *Streptococcus agalactiae* Ib inactivado de inyección IP con un PRS 60: $\geq 60\%$, con periodos de inmunización completa que varían de 5 a 7 días posterior a la vacunación y que confieren una protección de 4 a 5 meses. Adicionalmente, para el control y prevención de *S. agalactiae* serotipo Ia, para el 2023 el ICA permitió la importación directa de 400 mil dosis de vacuna Tilovac S3 laboratorio Virbac® y la autorización al Laboratorio Vecol para el desarrollo de una autovacuna bivalente (*Streptococcus agalactiae* Ib-Ia) con las cepas aisladas en los brotes detectados en el país (ICA, 2023).

1.4 Inmunidad en peces

1.4.1 Generalidades del sistema inmune

El sistema inmune es aquel que se encarga de defender contra los patógenos, permitir la sobrevivencia del individuo y mantener sus funciones corporales en un medio que por naturaleza le es hostil. En peces, al igual que en los vertebrados superiores, puede ser dividido en dos tipos de mecanismos: sistema inmune innato (SII), natural o inespecífico y el sistema Inmune adquirido (SIA) o específico (Olabuenaga, 2000).

El SII es el que poseen todos los seres vivos desde el nacimiento, en peces está conformado en primer lugar por la piel como la primera línea de defensa contra los patógenos, así como las membranas mucosas que recubren las branquias y el tracto gastrointestinal, aparte de las escamas, espinas y la secreción de sustancias tóxicas que pueden liberarse en superficie del pez, el mucus que recubre la piel es un importante mecanismo defensivo, pues contiene una variedad de compuestos antibacteriales, antimicóticos, antivirales y probablemente antiparasitarios como lisozima, proteasas, factores del complemento, proteína C reactiva, lectinas, interferones, transferrina, prostaglandinas, tromboxanos, leucotrienos, péptidos antimicrobianos como hepcidinas y piscidinas y hormonas como la somatostatina, adrenocorticotropa (ACTH) (Noga &

Silphaduang, 2003; Shi & Camus, 2006; Fu et al., 2007; Toso et al., 2013; Rubio, 2013).

A nivel celular el sistema inmune se compone de células efectoras fagocíticas móviles, tales como los neutrófilos presentes en la sangre y macrófagos derivados de los monocitos, actuando en branquias, tejido conectivo de piel e intestino, órganos linfoides, riñón, bazo y epicardio; en donde colaboran con los linfocitos por medio de la presentación de antígenos y la secreción de citocinas. También se encuentran células eosinófilas granulares (CGE) consideradas análogas a las células cebadas (Mast cells) de los mamíferos y están presentes en peritoneo, intestino y branquias; células citotóxicas no específicas equivalentes a los natural killer (NK) localizadas en el riñón cefálico o pronefros, el bazo, sangre periférica, fluido peritoneal y el timo (Greenlee et al., 1991; Graves et al.; 1985; Fergusson, 1989; Olabuenaga, 2000; Utke et al., 2007 y Rubio, 2010)

El SIA tarda varios días en ser eficaz, sin embargo, cuando se desarrolla es altamente efectivo y las posibilidades de una infección se reducen considerablemente al ser este el último nivel de defensa con la producción de inmunoglobulinas que reconocen específicamente al antígeno (Olabuenaga, 2000; Tizard, 2009). Las inmunoglobulinas (Ig) son proteínas producidas por células plasmáticas y se encuentran en fluidos corporales como plasma, mucus y bilis (Penagos et al. 2009); molecularmente contienen dos cadenas livianas (L: Light) y dos pesadas (H: Heavy), las cuales se encuentran unidas por puentes disulfuro, formando una estructura cuaternaria en forma de Y, en donde las cadenas H contienen en su extremo amino-terminal (N-terminal) un dominio variable (VH) para el reconocimiento de los antígenos, en comparación con el extremo carboxilo terminal (C-terminal) el cual posee varios dominios constantes (CH) que median las funciones efectoras y las cadenas L solo tienen un dominio variable (VL) y uno constante (CL).

La finalidad de estas proteínas es unirse a la superficie de los patógenos, que para el caso de los virus lo bloquean evitando la infección celular, también se unen a las membranas de bacterias e inducen la lisis por la vía clásica del complemento y pueden actuar como opsoninas facilitando el reconocimiento por las células fagocíticas. Adicionalmente actúan como receptores de células B, participando en el reconocimiento de antígenos (Ruiz et al., 2003). Los peces teleósteos como la tilapia, son capaces de sintetizar tres tipos de inmunoglobulinas la IgM, la IgD y la IgT/Z (Velásquez et al., 2018). La IgM constituye la clase de Ig más abundante en el suero de los peces, su papel en la respuesta inmune

incluye múltiples funciones como la neutralización de antígenos específicos, activación del sistema de complemento, aglutinación, opsonización y mediación de la citotoxicidad celular (Bell, 2002; Ohlander et al., 2010).

La IgD hasta el momento no tiene una función bien definida (Parra et al., 2013). Por otra parte, la IgT/Z en tilapia fue identificada en estudios realizados por Velásquez et al., en 2018. Los resultados de esta investigación revelaron que este isotipo podría participar en la respuesta inmune contra patógenos bacterianos y sugiere que puede tener un rol predominante en la inmunidad a nivel de mucosas, controlando infecciones a nivel intestinal, epitelial y branquial; sin embargo, son necesarios más estudios que permitan determinar el tipo de respuesta que desarrolla frente al estímulo de diferentes patógenos y rutas de administración.

1.4.2 Inmunoglobulina M

La IgM, ha sido considerada como el anticuerpo más antiguo, al ser descubierto hace más de 50 años en el suero del tiburón Mielga (*Squalus acanthias*) (Marchalonis & Edelman, 1966). En mamíferos, es producida por las células plasmáticas en el bazo, los nódulos linfáticos y la médula ósea y representa la segunda clase en cuanto a concentración sérica tras la IgG. Cuando la IgM está en su forma transmembrana, es decir cuando se encuentra en la superficie de los linfocitos B y actúa como receptor de las células B (BCR), es un monómero de 180 kDa, sin embargo, la forma secretada de IgM consiste en un pentámero o en ocasiones un hexámero (cinco o seis subunidades monoméricas) unidas por puentes disulfuro en una disposición circular con un peso molecular total de 900 kDa y un pequeño polipéptido llamado cadena de unión (J) (15 kDa) que une dos de las unidades para completar el círculo (Tizard, 2009).

En los peces teleósteos, la IgM es el anticuerpo más prevalente y se encuentra en concentraciones séricas que van desde los 800 a los 9000 µg/mL (Ye et al., 2013). En estudios realizados en tilapias sanas, se encontró que esta inmunoglobulina se expresa en varios tejidos como el del riñón craneal, bazo, sangre periférica, intestino, piel y branquias. Frente a una infección bacteriana, el nivel de expresión de esta inmunoglobulina se sobre reguló significativamente en el riñón craneal, bazo, intestino y branquias, demostrando lo indispensable que es la IgM en la respuesta inmune (Gao et al., 2014, Yin et al., 2019).

En los peces, la IgM ya no se encuentra en forma pentamérica, si no que se puede encontrar en forma de monómero y tetrámero, en donde la cadena pesada de cada uno de estos tiene cuatro dominios constantes (CH1,CH2, CH3, CH4), sin embargo la forma transmembranal de la IgM, es de un dominio más corto que la forma secretoria debido a un splicing alternativo, por ende no tiene el dominio CH4, pero esto parece no afectar las funciones efectoras del isotipo, así mismo como no tienen cadena J, la polimerización se realiza vía intercadenas por enlaces disulfuro colocando monómeros, dímeros, trímeros y tetrámeros existentes (Castro & Flajnik, 2014; Castillo et al., 1993; Killie et al., 1991; Koumans-van Diepen et al.,1994; Miller et al.,1985; Ye et al., 2010, Su et al., 2019).

1.4.3 Inmunoglobulina T

La IgT/ IgZ, fue inicialmente identificada en dos peces teleósteos: la trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) y en el pez cebra (*Danio rerio*). (Danilova et al., 2005, Hansen et al., 2005), y recientemente en la tilapia (*Oreochromis niloticus*) (Velázquez et al.,2018). Aunque se creía que los peces óseos eran los únicos animales que la producían, se ha demostrado que no es exclusivo de este clado y que también está presente en peces holósteos (peces de esqueleto casi totalmente osificado) (Mirete-Bachiller et al., 2021).

Diferentes investigaciones soportan la idea de que la IgT es la inmunoglobulina más importante a nivel de las superficies mucosas del intestino, branquias y epitelios, llegando a tener un rol crucial en la respuesta inmune específica; adicionalmente se ha demostrado que posterior a una estimulación bacteriana por inmersión, la expresión de la IgT es sobre regulada en la piel (Zhang et al., 2011; Xu et al., 2013, 2016); también se determinó que las células B del tejido linfoide asociado a la piel (skin associated lymphoid tissue- SALT) son las responsables de la secreción polimérica de la IgT en el mucus de la piel para protegerla contra diferentes agentes infecciosos (Du et al., 2016; Velázquez et al., 2018) Molecularmente, se ha encontrado en forma de monómero en el suero, pero como un tetrámero en la mucosa, la cual es capaz de atravesar el epitelio mucoso usando un receptor polimérico de inmunoglobulinas (pIgR), y que al igual que la IgM, la IgT no tiene cadena J y la polimerización se realiza vía intercadenas por enlaces disulfuro (Zhang, et al., 2010; Castro &Flajnik, 2014), adicionalmente se ha descrito que el locus de la cadena pesada de la IgT codifica para una variedad de dominios constantes, pero que en la

mayoría de especies es caracterizada por tener cuatro CH, como se describió originalmente en la trucha arcoíris y pez cebra (Salinas et al., 2011) y que cada uno de estos está codificado por cuatro exones (parte del ARN que codifica para las proteínas), sin embargo, hay algunas especies que contienen solo dos o tres exones (Savan et al., 2005, Gambón-Deza et al., 2010).

Capítulo 2 Expresión de genes de inmunoglobulina T e inmunoglobulina M en tilapia (*Oreochromis sp*) por PCR cuantitativa en tiempo real con transcriptasa reversa

Introducción

La expresión génica es el proceso por el cual la información genética codificada en el ADN, es usada en la síntesis de un producto génico funcional, el cual normalmente es una proteína o polipéptido que se localiza en el lugar adecuado y realiza una función específica (Hernández et. al,1994); sin embargo, también se encuentran los genes no codificantes de proteínas en los cuales el producto génico es un ARN funcional: ARN mensajero (ARNm), ARN ribosomal (ARNr) o ARN transferencia (ARNt). Para regular las actividades de la célula, éstas activan o desactivan la expresión de sus genes en forma proporcional al número de copias de ARNm de un gen determinado. Por lo tanto, es posible obtener datos relativos a la producción de proteínas, determinando la expresión de los genes de una célula en particular (McPherson et al., 2008).

Actualmente existen varios métodos empleados para evaluar la expresión de genes, los cuales se basan en la capacidad para detectar ARNm específicos, tales como el Northern blot, técnicas de alta productividad como los microchips de ADN (DNA microarrays), estrategias basadas en la secuenciación masiva que proporcionan enormes cantidades de datos y son muy útiles para estudios de transcriptómica comparada, como los son las

etiquetas de secuencias expresadas o Expressed Sequence Tags, (EST) que sirven como identificadores cortos de genes, RNAseq para analizar el transcriptoma, la tecnología de Análisis en Serie de la Expresión Génica (SAGE), que permite conocer y cuantificar la expresión de los genes en la célula, mediante la medición de los ARNm que están presentes en esta en un momento determinado y la hibridación sustractiva por supresión (SSH) que permite aislar un segmento de ADN que falta en una muestra particular de ADN total (Diatchenko et al., 1996, Cortés et al., 2020), sin embargo, la técnica más adecuada para el estudio de genes concretos y expresión génica, es la reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real o cuantitativa (q), con transcriptasa reversa (RT) RT-qPCR (o RT-PCR a tiempo real), la cual ha sido ampliamente empleada para analizar los niveles de expresión de genes de interés bajo diferentes condiciones debido a su gran sensibilidad, especificidad y rapidez (Bustin, 2005; Bustin et al., 2009; Valasek & Repa, 2005; Lee et al., 2022).

2.1 PCR cuantitativa en tiempo real con transcriptasa reversa (RT- qPCR)

La PCR es la técnica de reacción en cadena de la polimerasa, que tiene como finalidad amplificar y cuantificar moléculas específicas de ADN en una muestra; para el caso de la cuantificación de la expresión de genes cuyo material es ARN, se debe realizar un paso previo que consiste en obtener copias ADN complementario (ADNc) a partir de moléculas de ARN (en especial de ARNm), con la ayuda de la enzima retrotranscriptasa, obtenida de Retrovirus y con el uso de iniciadores específicos del gen de interés o de iniciadores que se hibridan al azar (random primers) o de iniciadores oligodT.

Una vez que las moléculas de ARN de interés se hayan retrotranscrito a ADNc, este puede ser usado como molde para realizar la amplificación exponencial por medio de la PCR, que puede ser en forma convencional (PCR de punto final) o para obtener datos precisos sobre la cuantificación de la expresión genética de una secuencia diana en estudio, se emplea la PCR en tiempo real o cuantitativa (qPCR), que a diferencia de la PCR convencional, su sensibilidad, especificidad y eficiencia es mucho mayor. Para esta técnica se emplean iniciadores específicos, que generan amplicones desde 60 hasta 300 pares de bases (bp) (Bustin, 2002) y al uso de reporteros fluorescentes los cuales pueden ser inespecíficos y específicos. Los primeros como el SYBRGreen tienen afinidad por el ADN de doble

cadena, por lo que se intercala en el mismo y al ser oxidado mediante una longitud de onda de 480 nm genera fluorescencia, que es captada en la etapa de extensión de cada ciclo; de otro lado, los reporteros específicos como las sondas de hibridación, siguen el principio conocido como “transferencia de energía de resonancia fluorescente” (FRET), los cuales transfieren energía por hidrólisis o hibridación a un receptor, o “quencher”, siendo el Taqman el método más usado por hidrólisis, donde al activarse la enzima con función de ADN polimerasa y exonucleasa, rompen la unión entre el fluoróforo y el quencher produciendo fluorescencia, a partir de esto, el termociclador el cual va acoplado al espectrofluorómetro captura la señal de emisión de fluorescencia, la cual aumenta proporcionalmente con el aumento en la cantidad de cADN, y permite cuantificar simultáneamente (en tiempo real) el número de copias que se están generando en cada ciclo de amplificación (Heid et al., 1996; Tamay et al., 2013; De Alba & Rueda, 2013).

Existen dos variables la PCR cuantitativa en tiempo real, la primera es la RT-qPCR de cuantificación absoluta, en donde se calcula el número exacto de copias de genes mediante una curva de calibración, que se construye mediante la determinación del ciclo umbral en diluciones conocidas de ADN a partir de la preparación de soluciones estándares, y la segunda es la cuantificación relativa, la cual es ampliamente utilizada en estudios inmunológicos de especies acuícolas con el fin de examinar la expresión de genes involucrados en la inmunidad de los peces después de una infección viral o bacteriana (Matejusova et al., 2008; Chen et al., 2007; Yang et al., 2011) y se basa en la relación entre los niveles de expresión de un gen de interés (GOI ó "Gene of Interest") con respecto a los niveles de expresión de un gen de referencia (Ref) que se expresa constitutivamente, una vez obtenidos los datos, se aplica el método comparativo del Ct ("Threshold cycle" o ciclo umbral) ($2^{-\Delta\Delta C_T}$) para calcular la expresión relativa del gen de interés en las diferentes muestras (Bustin et al., 2005; Zhang et al., 2013).

2.1.1 Factor de elongación 1 alpha

En la selección y evaluación de genes de referencia empleados en la cuantificación relativa, se encuentran la Subunidad 18S de RNA ribosomal (18S RNAr), Beta actina (β -actina), Beta 2 microglobulina (β -2M), Factor de elongación 1 alpha (EF-1 α), Gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH), tubulina alpha (TUBA), y enzima conjugadora de la ubiquitina (UBCE) los cuales son ampliamente empleados en el estudio de la inmunidad de los peces (Wang et al., 2015; Zheng & Sun, 2011).

En las células eucariotas, el EF-1 α es una proteína citoplasmática presente en el ribosoma, que permite la traducción genética, actuando en el ciclo de elongación de la biosíntesis de proteínas mediando la entrada del ARNt en el sitio A (Aminoacil) libre del ribosoma (Weijland et.al., 1996). El EF-1 α es un producto de genes de referencia “housekeeping” que se expresan, el activo nivel de producción de esta proteína se debe a la alta transcripción de los genes de EF-1 α , los cuales pueden aumentar en el ARNm de células altamente proliferativas, embriones y en la oncogénesis (Negrutskii & El'skay, 1998).

La expresión de los diferentes genes de EF-1 α , pueden ser variar según la especie, tejido, estadio del desarrollo del organismo, presencia de agentes patógenos. A modo de ejemplo la expresión del en humanos ocurre en el cerebro, placenta, pulmones, hígado, riñones, páncreas, pero no se da en el corazón ni músculo esquelético (Knudsen et., al 1993), a diferencia de los peces, que en estudios inmunológicos demostraron que al estar o no infectados con lipopolisacáridos o ácidos lipoteicoicos bacterianos el EF-1 α logra

expresarse en los tejidos del cerebro, hígado, riñón, intestino, bazo, corazón y músculo (Yang et al., 2013), adicional a esto en peces también se ha confirmado que cuando estos están expuestos a estrógenos, disminuyen la expresión de este gen en el hígado, pero no en las gónadas (Filby, 2007).

Con el fin de determinar la estabilidad en la expresión de este gen en tilapias, diferentes estudios han confirmado que EF-1 α y la β -actina pueden minimizar la variación (Deloffre et al., 2012). Igualmente, cuando se emplea el Taqman como reportero fluorescente en una RT-qPCR, el gen más apropiado para uso rutinario en un ensayo de diagnóstico en peces es el EF-1 α (Bland et al., 2012), el cual es considerado uno de los genes más adecuados para este tipo de estudios en tilapias tras ser infectadas con *S.agalactiae* (Rahl et al., 2014).

2.2 Materiales y métodos

2.2.1 Cepa de *Streptococcus agalactiae*

Se empleó una cepa de *Streptococcus agalactiae* obtenida de un brote natural de enfermedad en tilapia roja (*Oreochromis spp*) procedente de una piscícola ubicada en el departamento del Huila (donada por el médico veterinario de la explotación). La bacteria fue caracterizada microbiológicamente como coco Gram positivo, no hemolítico, catalasa, oxidasa y ureasa negativo. Para comprobar y verificar que la cepa bacteriana, correspondía a *Streptococcus agalactiae* serotipo Ib, el cual al iniciar el experimento era la única cepa presente en el país. Se realizó la extracción del ADN genómico de la bacteria con el kit Biospin Omni Genomic DNA Extraction de Bioflux®, según instrucciones del fabricante. Una vez obtenidos los ADNs se tomaron 2 µl de cada muestra y se realizó la cuantificación mediante un espectrofotómetro de microvolumen NanoDrop 2000 (Thermo,USA). Se realizó una amplificación por PCR en tiempo real de los fragmentos de los genes *dlts* (d-alanyl-lipoteichoic acid biosynthesis) y *cps Ib* que codifican para la biosíntesis de la pared celular y la cápsula del *Streptococcus agalactiae* serotipo Ib (Furfaro et al; 2017). Para realizar la qPCR se empleó el sistema Eppendorf realplex 4 qPCR Real Time Cyler 96-Well 4 Color incl. Cal. El volumen total de la mezcla fue de 20 µl, con el kit 2x Q-PCR Master Mix SybrGreen Excel Taq Series de Smobio®, los pasos de la reacción fueron: 10 min iniciales de activación enzimática a 94°C, 20s de desnaturalización a 94°C, 20s de anillaje a 59°C y 20 s para extensión a 72 °C (40 ciclos).

Una vez verificada la identidad de la bacteria, se cultivó en agar BHI (Brain Heart Infusion) enriquecido con 5 % de sangre de oveja defibrinizada y en agar *Streptococcus* tipo B de Labgen®, se incubó a 28°C por 24 horas. Se recuperaron las colonias bacterianas aisladas, se cultivaron en 9mL de caldo BHI por 24 horas a 28°C, posteriormente se realizó un recuento de células viables utilizando el método de diluciones seriadas en base 10 hasta una concentración de 10⁷UFC/ml, sembrando cada una de las diluciones para el respectivo recuento de las colonias.

Previo a la experimentación en las tilapias, se realizó una reactivación y verificación de la patogenicidad de la cepa, recuperando las colonias bacterianas que crecieron en el agar *Streptococcus* empleado para el recuento de las células viables y se inocularon dos peces sanos por vía intraperitoneal. Adicionalmente para favorecer la infección, durante 7 días

se aumentaron los niveles de estrés de los peces disminuyendo los niveles de oxígeno disuelto y la temperatura. Los peces fueron sacrificados empleando aceite de clavo o Eugenol >85%, 50mg/Lt hasta inducir colapso medular; una vez los peces presentaron pérdida completa de respuesta ante estímulos, movimientos operculares, cardiacos y pérdida de reflejos, se realizó un corte cervical y se tomaron asépticamente las muestras de riñón (craneal y caudal), hígado, bazo, intestino, cerebro y ojo, los cuales se sembraron en agar selectivo para *Streptococcus* tipo B y se incubó por 24 horas a 28°C. Todos los procedimientos realizados en los animales fueron presentados y avalados ante el comité de Bioética de la Facultad de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional.

Una vez aisladas las colonias de los órganos internos de los dos peces y de nuevo verificado el *Streptococcus agalactiae* Ib por microbiología y por qPCR teniendo en cuenta las curvas de la temperatura de fusión (melting temperatura (Tm)), se sembraron e incubaron en caldo BHI a 27°C por 24 horas. Nuevamente se llevó a cabo el recuento de células viables utilizando el método de diluciones seriadas en base 10 hasta una concentración de 10⁷UFC/mL, posteriormente se calculó la dosis infectiva y se preparó el inóculo en solución salina fisiológica para infectar los peces por las diferentes vías.

2.2.2 Infección *in vivo* de tilapias con *S. agalactiae* serotipo Ib mediante inoculación intragástrica (IG), intraperitoneal (IP) e inmersión (INM).

Para evaluar la expresión de genes de la IgT e IgM frente a infección por *Streptococcus agalactiae* serotipo Ib, se emplearon un total de 48 juveniles de tilapia roja (*Oreochromis sp*) con un peso de 90±10 gramos, alimentados con concentrado comercial, ad libitum 3 veces al día. Estos peces fueron mantenidos inicialmente en el laboratorio de Ictiología de la Universidad Nacional y posteriormente trasladados a la unidad académica El Remanso de la Universidad de Ciencias Aplicadas y Ambientales U.D.C.A, en 4 tanques de 500 Litros, de los cuales 3 de ellos se encontraban en un sistema de recirculación RAS, y uno en un sistema independiente, cada uno dotado con control de temperatura promedio de 27°C, aireación permanente, flujo continuo de agua y filtro biológico.

Antes de iniciar el experimento y trasladar a los animales, se verificó que los lotes de donde procedían los peces estuviesen sanos y que no presentaban ninguna sintomatología y que

estaban libres de estreptococosis, esto se determinó mediante qPCR para *S. agalactiae* Ib, como se describió anteriormente. Una vez obtenidos los resultados y verificada la condición sanitaria, los animales fueron llevados a la sede del Remanso de la U.D.C.A en donde, se pesaron y se distribuyeron en grupos de doce peces por cada tanque, para tener los 4 grupos de experimentación; los peces entraron en un periodo de aclimatación durante 7 días y posteriormente se seleccionaron los grupos de inoculación por vía intragástrica, intraperitoneal, inmersión y control negativo.

Con el fin de obtener una medida del nivel basal de la expresión de inmunoglobulinas en condiciones normales, el grupo control de 12 peces sanos, no fue inoculado con la bacteria, sino que se mantuvieron en un tanque separado de los otros tres grupos experimentales hasta el día de la inoculación. 4 peces de este grupo fueron mantenidos en condiciones normales y fueron escogidos como control frente al grupo de inmersión (INM). Otros 4 peces fueron seleccionados para ser el grupo control de inoculación intragástrica (IG) y los 4 restantes fueron dejados como grupo control de inoculación intraperitoneal (IP).

Previo al día de inoculación los peces fueron dejados en ayuno y antes de la infección se anestesiaron con Eugenol 85% y disolvente orgánico, en una dosis 50mg/ Lt de agua y un periodo de inmersión de 2 minutos hasta que se evidenció la pérdida del eje de nado.

2.2.1.1 Inoculación por vía Intragástrica (IG):

12 peces fueron inoculados por esta vía con 300 µL de suspensión bacteriana 7×10^7 UFC en 0.1 mL de suero salino fisiológico (SSF), usando una jeringa de 1 mL conectada a un catéter #18, 1.16 cm, 1.3 x 30 mm. El tubo fue deslizado a lo largo de la boca del pez anestesiado a través del esófago hasta alcanzar el estómago siguiendo la metodología descrita por Iregui et al. (2015). Los 4 peces del control negativo (IG), fueron inoculados con 300 uL de solución salina fisiológica estéril (SSFE).

2.2.1.2 Inoculación por vía intraperitoneal (IP):

12 peces fueron inyectados en el punto medio de las aletas pélvicas con 100 µL (1 ×

10⁶UFC/pez) de bacteria viva suspendida en SSF con una concentración final de 1 × 10⁷ UFC/mL siguiendo la metodología descrita por Yin et al. (2019). Los 4 peces del control negativo (IP), fueron inoculados con 100 uL de solución salina fisiológica estéril (SSFE).

2.2.1.3 Inoculación por inmersión (INM):

Se incluyó la inducción de factores de riesgo de la estreptococosis como la manipulación y la alta densidad de siembra (biomasa/litro), asegurando el desarrollo de la enfermedad (Hernández et al., 2020). Posterior a la anestesia, el moco de la piel que se encuentra entre los ojos y la aleta dorsal de cada uno de los 12 peces, fue raspado con una hoja de bisturí; luego los peces fueron depositados en un acuario con un volumen de 20 litros, al cual previamente se le habían adicionado 10 mL de una suspensión de *S. agalactiae* de 8.5 x10⁷ UFC por 0.1 mL, siguiendo la metodología descrita por Iregui et al. (2015). A los 12 peces, se les mantuvo sumergidos en esta condición durante 15 min. Los 4 peces del control negativo (INM), fueron los que se mantuvieron en condiciones normales.

2.2.1.4 Toma de muestras de los grupos experimentales

4 animales de cada grupo (IP, IG, INM) y uno del grupo control, fueron sacrificados en cada día de muestreo: 24 horas, 3 y 10 días post-inoculación (p.i) teniendo en cuenta los tiempos evaluados por Velásquez et al., 2018 Xiaoxue Yin et al., 2019 en los estudios correspondientes a la expresión de la IgM e IgT. Antes del sacrificio, se empleó aceite de clavo (Eugenol 85%) disuelto en alcohol; este anestésico se adicionó a una dosis de 100mg/Lt de agua, en un acuario de 20 Lt. Los peces fueron sumergidos en esta solución hasta inducir colapso medular y poder realizar el corte cervical. De cada pez, se tomaron asépticamente muestras de piel, intestino, hígado, bazo, branquias, y riñón craneal y se depositaron en tubos de 1,5 mL que contenían 500µL del reactivo One Step RNA Reagent Thermofisher® (USA). Para la extracción de ARN se hizo un pool de cada órgano de los 4 peces. Alícuotas de estos órganos fueron depositadas en tubos de 1,5mL, que contenían 100µL de etanol al 70% para la extracción de ADN.

2.2.3 Detección de *S. agalactiae*

Para comprobar y verificar que cada uno de los grupos infectados experimentalmente

contenían *S. agalactiae*, se realizó la extracción del ADN genómico a partir del pool de tejidos con el kit Biospin Omni Genomic DNA Extraction de Bioflux®, según instrucciones del fabricante. Una vez obtenidos los ADNs se tomaron 2 µl de cada muestra y se realizó la cuantificación mediante un espectrofotómetro de microvolumen NanoDrop 2000 (Thermo,USA). Para realizar la qPCR se empleó la misma metodología descrita anteriormente para la cepa bacteriana y se compararon los Tm de los amplificadores obtenidos en cada grupo infectado, con el grupo control negativo y los controles positivo y negativo de la qPCR.

2.2.4 Extracción de ARN y síntesis de ADN complementario

Para la extracción del ARN de los tejidos se empleó el método de Isotiocianato de Guanidinio y fenol ácido. Los 100 mg de cada pool de tejido inmerso en el reactivo One Step RNA Reagent (Thermofisher®) se maceraron con pistilos desechables estériles y se dejaron por 5 minutos a temperatura ambiente para permitir la completa disociación de los complejos de nucleoproteína. Se adicionaron 0,2 mL de cloroformo, se mezcló en vortex por 15 segundos y se incubó a temperatura ambiente por 2 minutos. Se centrifugaron las muestras a 12000xg por 10 minutos. Se transfirió la fase acuosa a un nuevo vial y se le agregaron 0.5 mL de isopropanol frío, se mezcló e incubó a temperatura ambiente por 10 minutos. Se centrifugó a 12000 xg, por 10 minutos, se eliminó el isopropanol y se lavó el pellet con 500 µL de etanol 70%. Se centrifugó a 12000xg, por 5 minutos y se eliminó el etanol remanente. Se reconstituyó el pellet de ARN, con 200 µL de agua ultrapura estéril tratado con DEPC- Thermofisher. (USA), se agitó suavemente y se guardó el ARN a -70°C.

Se tomaron alícuotas de 10µL de cada muestra y se determinó la calidad y cantidad de ARN mediante la medición de absorbancia 260/280nm a través del espectrofotómetro NanoDrop 2000 (Thermo,USA). Alícuotas de 5µg de ARN extraído de cada muestra, se trataron con 1 µl de ADNasa y se emplearon para obtener el ADN complementario (ADNc) utilizando el Reverse Transcription Kit (Smobio, Taiwan) y random primers (Smobio), en un volumen final de 50µL, de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Se realizó un control negativo para la retrotranscripción (RT), con la adición de agua en vez de ARN.

2.2.5 Expresión de genes de IgT e IgM

Para la medición de la expresión de los genes de IgT e IgM, se realizó la qPCR y su cálculo se realizó empleando el método de cuantificación relativa con respecto a un gen de control interno (housekeeping gen), en este caso el gen del Factor de Elongación 1 α (EF-1 α), el cual se expresa constitutivamente; para la amplificación por qPCR de un fragmento de este gen, se emplearon los cebadores específicos EF-1 α -F y EF-1 α -R Macrogen, (Corea del sur) (Anexo 1), lo que permitió la amplificación de un producto de 138 pb. Para la amplificación de un fragmento de 163 pb del gen de la Inmunoglobulina T (IgT), se emplearon los iniciadores rIgT-F y rIgT-R y para la inmunoglobulina M (IgM) se usaron los iniciadores rIgM-F y rIgM-R que permiten amplificar un fragmento de 122 pb. La metodología empleada fue la reportada por Velásquez et al. (2018).

Cada muestra se amplificó por triplicado, empleando 3 μ L del ADNc obtenido en la reacción de transcripción reversa, en un volumen total de 17 μ L con Excel Taq 2x qPCR Master Mix SmoBio- Taiwan y el sistema Eppendorf realplex 4 qPCR Real Time Cyler 96-Well 4 Color incl. Cal. / Software, utilizando 1 μ L de concentración de 10 μ M de cada juego de cebadores. Se incluyeron los controles negativos de la RT y de la qPCR para cada gen en cada corrida. Los pasos de la reacción fueron: 15 min iniciales de activación enzimática a 95°C, seguidos de 40 ciclos de 15s de desnaturalización a 94°C, 30s de anillaje a 56°C para EF-1 α y de 53°C para IgT e IgM, y luego 30s para extensión a 72°C (Velásquez et al., 2018). Las curvas de la temperatura de fusión de los productos de la RT-qPCR se realizaron al final de cada PCR para confirmar la amplificación específica de cada gen.

Los niveles de expresión se calcularon mediante el método de Fold (unidad de cambio relativa) también llamado $2^{-\Delta\Delta Ct}$, en programa R y R studio.

El modelo 1. Estima esta unidad como:

$$\Delta Ct = Ct_{target} - Ct_{housekeeping}$$

$$\Delta\Delta Ct = (Ct_{target} - Ct_{housekeeping})_{muestra} - (Ct_{target} - Ct_{housekeeping})_{control} \quad 2^{-\Delta\Delta Ct} = 2^{\Delta\Delta Ct}$$

El modelo 2. Estima esta unidad como:

$$\Delta Ct = Ct_{target} - Ct_{housekeeping}$$

$$\Delta\Delta Ct = (Ct_{target} - Ct_{housekeeping})_{en\ el\ tiempo\ 0} - (Ct_{target} - Ct_{housekeeping})_{en\ el\ tiempo\ x} \quad 2^{-\Delta\Delta Ct} = 2^{\Delta\Delta Ct}$$

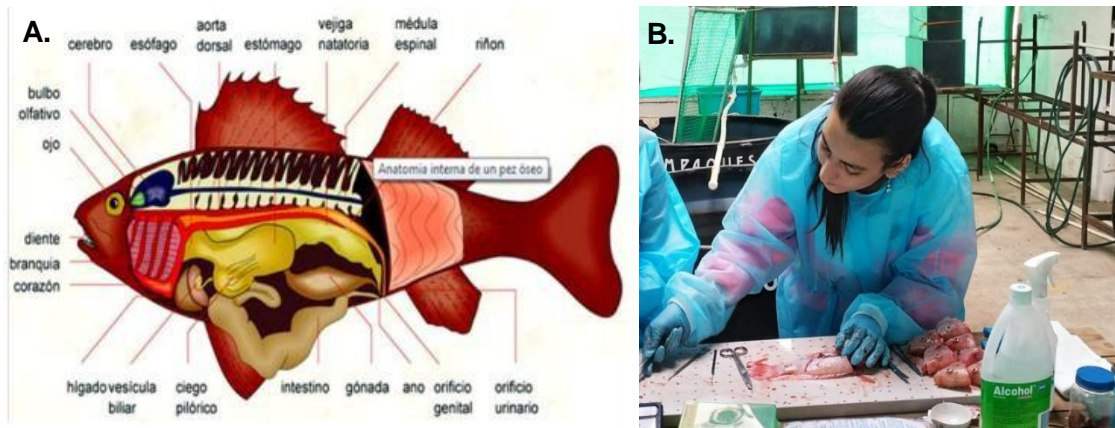
(Kenneth, *et. al.* 2001), (Thomas and Kenneth, 2008)

2.2.6 Evaluación histopatológica

Adicional a la comprobación por qPCR de la infección de *S. agalactiae* en las tilapias de los grupos inoculados, se llevó a cabo la visualización de las lesiones por medio de Histopatología; de igual forma fueron examinados los tejidos de ejemplares del grupo control para verificación de la ausencia de infección. De cada grupo experimental (IG, IP y de INM) y del grupo control, se tomaron muestras de 2 animales al día 1 y otros 2 peces al día 10 post infección. De estos animales se recolectaron muestras del encéfalo, ojo, corazón, estómago, intestino, hígado, bazo y riñón caudal (Figura 2.2-1 A y B); se fijaron en formalina tamponada al 10% y posteriormente fueron enviados al laboratorio de histotecnica de la Universidad Nacional de Colombia, para ser procesados por la técnica histológica de rutina, que consiste en el corte de los tejidos, inclusión en bloques de parafina y tinción con hematoxilina y eosina (H&E).

Una vez obtenidas las láminas, estas fueron examinadas de forma independiente e imparcial por un ictiohistopatólogo del Instituto Colombiano Agropecuario ICA.

Figura2.2-1: Anatomía interno de un pez óseo



Fuente A: Manual básico de sanidad. FAO. 2011. <https://www.fao.org/3/as830s/as830s.pdf>

2.2.7 Análisis estadístico

Las diferencias en los niveles de expresión fueron analizadas usando el programa R y R studio. El valor $P < 0,05$ fue considerado estadísticamente significativo. La variable de interés o tasa relativa de cambio se calculó con el protocolo propuesto por Kenneth, et. al. en 2001.

$$2^{\Delta\Delta Ct} = 2^{-(Ct \text{ target} - Ct \text{ housekeeping}) \text{ muestra} - (Ct \text{ target} - Ct \text{ housekeeping}) \text{ control}}$$

Donde ΔCt es la diferencia del Ct (los valores de umbrales de ciclo de la PCR) entre el gen de interés (target) el gen de referencia (housekeeping).

$$\Delta Ct = Ct \text{ target} - Ct \text{ reference}$$

$\Delta\Delta Ct$ Compara los valores ΔCt entre dos condiciones experimentales diferentes, muestra vs control

$$\Delta\Delta Ct = (Ct \text{ target} - Ct \text{ housekeeping}) \text{ muestra} - (Ct \text{ target} - Ct \text{ housekeeping}) \text{ control}$$

Finalmente, $2^{\Delta\Delta Ct}$ es la medida relativa de la expresión génica estandarizada, que compara los niveles de expresión de un gen específico entre dos condiciones experimentales. Para la variable de interés $2^{\Delta\Delta Ct}$, se llevaron a cabo análisis

48 Determinación de los niveles de expresión de los genes de IgT e IgM en diferentes tejidos de tilapia (*Oreochromis sp*) frente a infección por *Streptococcus agalactiae* serotipo Ib

estadísticos descriptivos tanto de medida de tendencia central (media) como de dispersión (error estándar de la media) y se realizaron análisis de varianza para la variable $2^{-\Delta\Delta Ct}$.

Con el propósito de identificar posibles diferencias entre los tratamientos se realizó la prueba de Tukey, a tejidos o tipo de inmunoglobulina (IgM e IgT) en diferentes periodos de tiempo, El modelo general fue el siguiente:

y $ij = \mu + \tau_j + \varepsilon_{ij}$, donde

y ij representa la observación i -ésima en el j -ésimo grupo, μ es la media general,

τ_j es el efecto del j -ésimo tratamiento, tejido o tipo de inmunoglobulina, y ε_{ij} es el error

2.2 Resultados

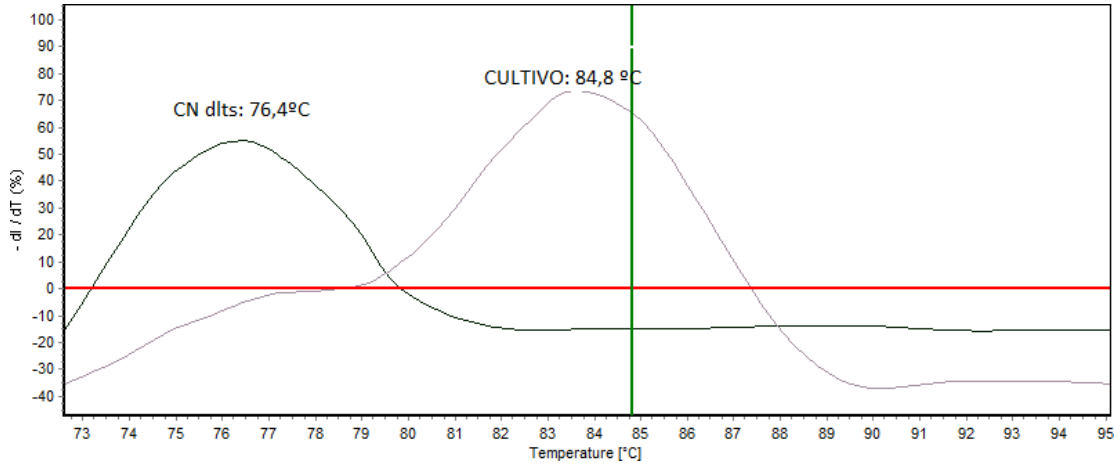
2.3.1 *Streptococcus agalactiae*

Se realizó el aislamiento a partir de los órganos de riñón (craneal y caudal), hígado, bazo, intestino, cerebro y ojo de peces inoculados por vía intraperitoneal intragástrica e inmersión, los cuales se sembraron en agar selectivo para *Streptococcus* tipo B (Figura 2.3-1) y se incubó por 24 horas a 28°C, posteriormente se confirmó microbiológicamente como coco Gram positivo, no hemolítico, catalasa, oxidasa y ureasa negativo, molecularmente se realizó la amplificación por PCR en tiempo real de los fragmentos de los genes *dltS* (d-alanyl-lipotheichoic acid biosynthesis) (Figura 2.3-2) y *cps Ib* (Gen capsular) (Figura 2.3-3), con sus correspondientes controles negativos, confirmando la presencia del *S. agalactiae* genotipo Ib (serotipo Ib).

Figura 2.3-1 Colonias de *S. agalactiae* serotipo Ib cultivadas en agar selectivo para *Streptococcus* tipo B

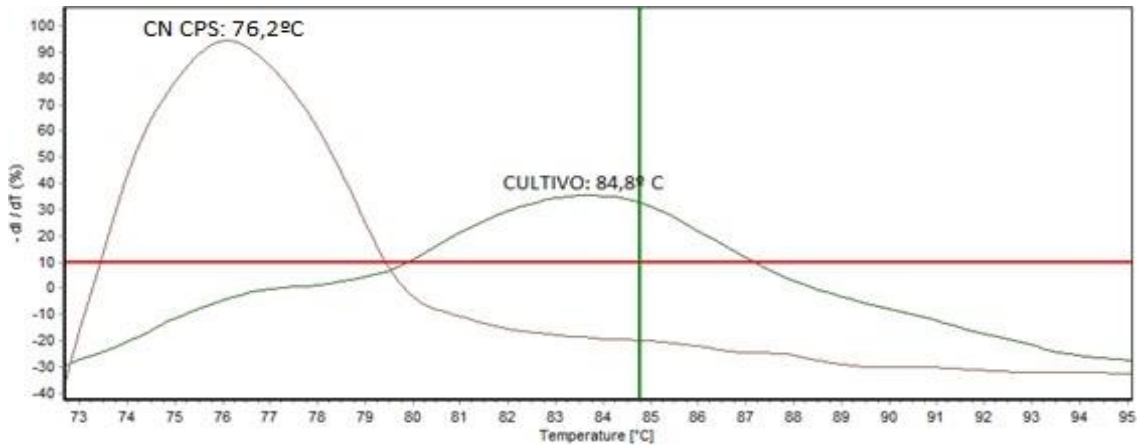


Figura 2.3-2: Curva de la temperatura de fusión (T_m) de la PCR en tiempo real de la amplificación de un fragmento del gen *dlts* de *S. agalactiae* genotipo Ib a partir de ADN genómico extraído de cultivo.



CN: control negativo T_m 76,4°C, T_m del amplificado del gen *dlts* T_m 84,8°C

Figura 2.3-2: Curva de la temperatura de fusión (T_m) de la PCR en tiempo real del amplificado de un fragmento del gen *cps* de *S. agalactiae* genotipo Ib a partir de ADN genómico extraído de cultivo.

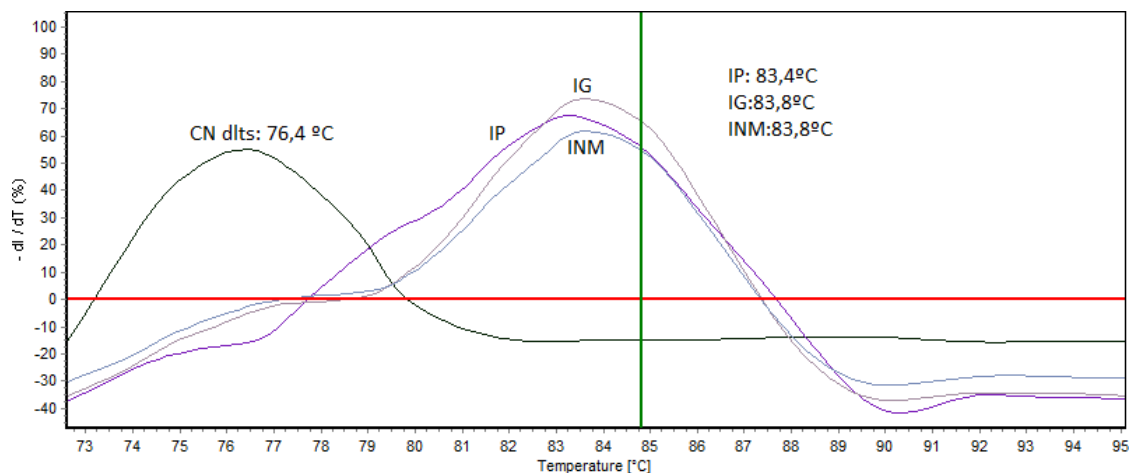


CN: control negativo T_m 76,4°C, T_m del amplificado del gen *cps* Ib T_m 84,8°C

2.3.2 Detección de *S. agalactiae* serotipo Ib por qPCR en peces inoculados por vía intragástrica (IG), intraperitoneal (IP) e inmersión (INM).

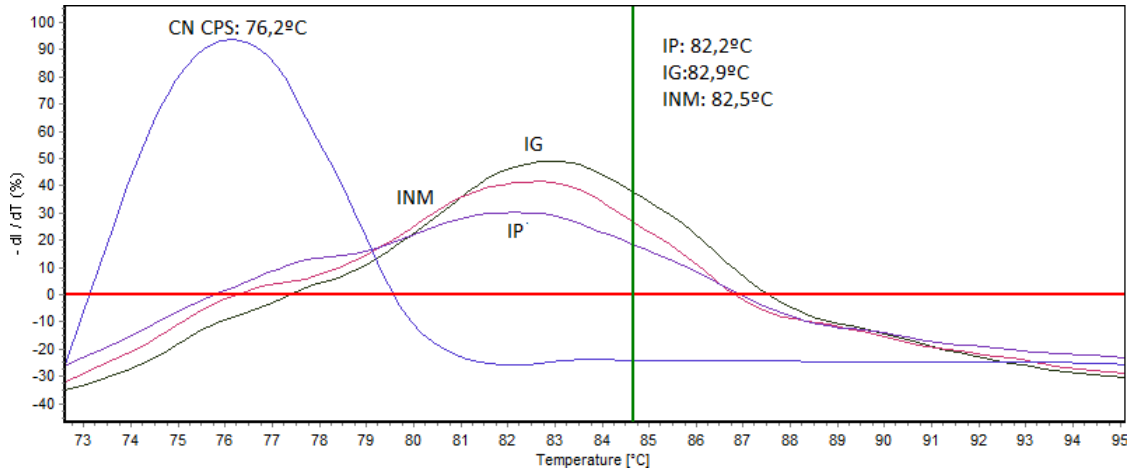
Mediante la qPCR se logró comprobar y verificar que los grupos inoculados por vía intragástrica, intraperitoneal e inmersión, estaban infectados con *Streptococcus agalactiae* serotipo Ib, empleando la detección de los genes *dlts* (Figura 2.3-4) y *cps* (Figura 2.3-5). Como se puede apreciar las temperaturas de fusión (T_m) de los grupos tratados fueron de 84,8°C en comparación con el control negativo de la PCR (76,2°C). En el grupo control (sin inocular) se confirmó la ausencia de *Streptococcus agalactiae* serotipo Ib, (Figura 2.3-6 y figura 2.3-7), en donde las T_m tuvieron valores similares al control negativo de PCR.

Figura 2.3-4: Curvas de la temperatura de fusión (T_m) de la qPCR del gen *dlts* de *Streptococcus agalactiae* serotipo Ib, de los grupos experimentales y del control negativo.



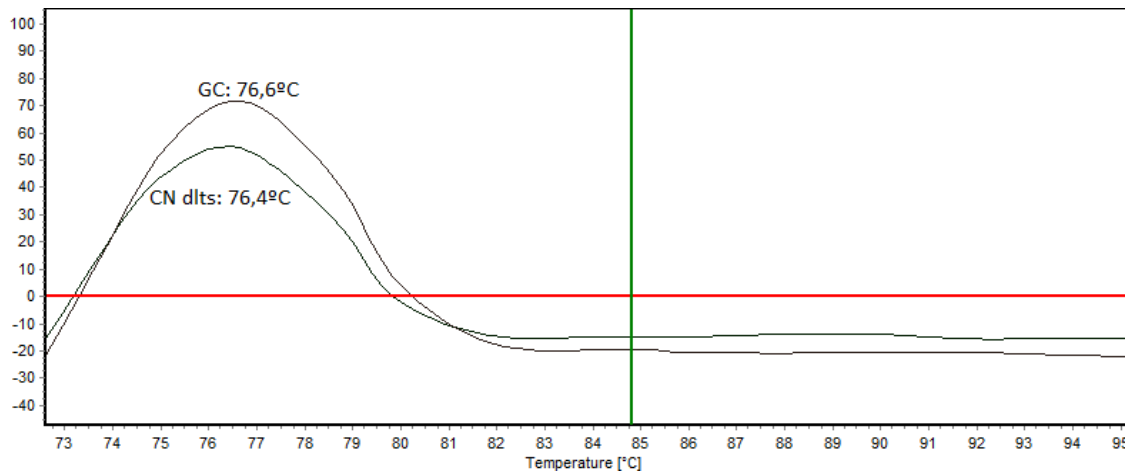
CN: control negativo T_m 76,4°C, T_m del amplificado del gen *dlts* T_m 83+- 0,4°C

Figura 2.3-5: Curvas de la temperatura de fusión (T_m) de la qPCR del gen *cps* de *Streptococcus agalactiae* serotipo Ib, de los grupos experimentales y del control negativo.



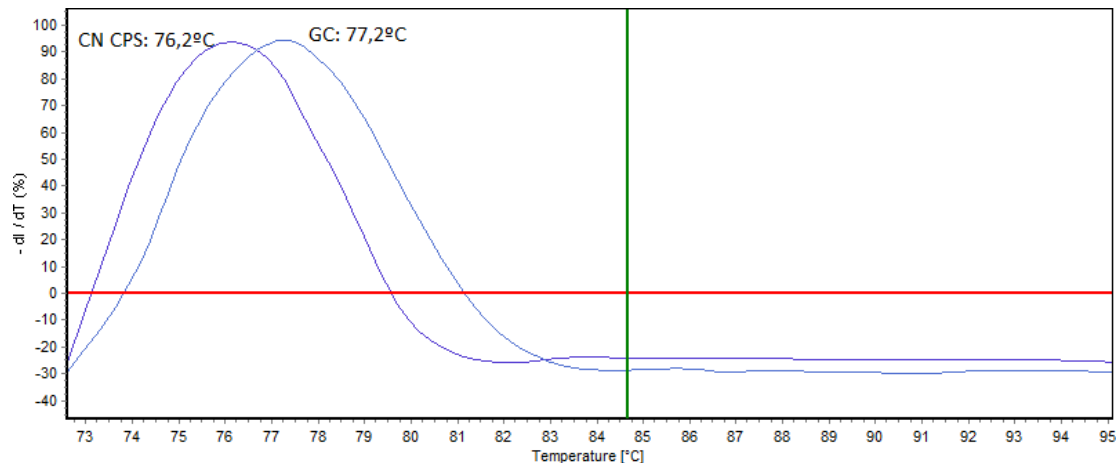
CN: control negativo T_m 76,4°C, T_m del amplificado del gen *cps* T_m 82 \pm 0,7°C

Figura 2.3-6: curvas de la temperatura de fusión (T_m) control negativo de la PCR del gen y *dlts* de *Streptococcus agalactiae* y grupo control.



CN: control negativo T_m 76,4°C, T_m del amplificado del gen *dlts* T_m 76,6°C

Figura 2.3-7: curvas de la temperatura de fusión (T_m) control negativo de la PCR del gen y *cps* del *Streptococcus agalactiae* y grupo control



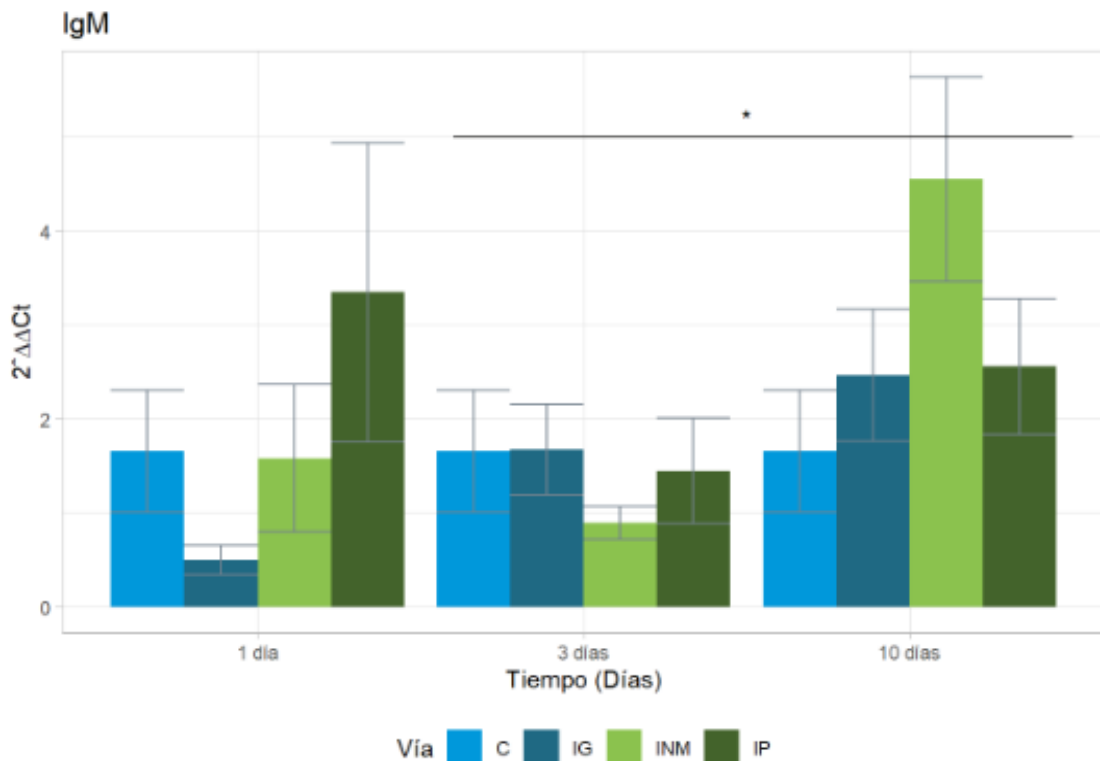
CN: control negativo T_m 76,2°C, T_m del amplificado del gen *cps* T_m 77,2°C

2.3.3 Dinámica de la expresión de la IgM e IgT ante el desafío a través del tiempo de experimentación

Aunque no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los niveles de expresión de la IgM para la vía o la interacción vía por tiempo, si se observó una diferencia estadística entre los tiempos 3 y 10 ($p < 0.05$). La expresión de la IgM en promedio de los órganos evaluados en los peces infectados respecto al grupo control, arrojó los siguientes resultados: Por vía intragástrica a las 24 horas, disminuyó su expresión 3 veces y luego al 3er día alcanzó los niveles basales y aumentó 0,5 veces más en el día 10, siendo su máxima expresión. En cuanto a la vía de inmersión, ésta presentó un nivel similar al control al 1 día, pero al día 3 disminuyó a casi a la mitad, pero tuvo su máxima expresión a los 10 días post infección, elevándose hasta casi tres veces, mientras que, por la vía intraperitoneal, su máxima expresión (dos veces) se dio a las 24 horas, disminuyendo un poco por debajo del nivel basal a los 3 días y posteriormente aumentó de nuevo a los 10 días (0,5 veces más del nivel control) (Figura 2.3-8).

Figura 2.3-8: Comportamiento de los niveles de expresión de la IgM a través del tiempo, por las 3 vías de inoculación.

##	Tiempo	Vía	Promedio	SEM	upp	low
## 1	1 día	C	1.6567175	0.6529811	2.3096987	1.0037364
## 2	10 días	C	1.6567175	0.6529811	2.3096987	1.0037364
## 3	3 días	C	1.6567175	0.6529811	2.3096987	1.0037364
## 4	1 día	IG	0.4995329	0.1559026	0.6554355	0.3436302
## 5	10 días	IG	2.4625278	0.7034260	3.1659537	1.7591018
## 6	3 días	IG	1.6756557	0.4814036	2.1570592	1.1942521
## 7	1 día	INM	1.5821409	0.7864638	2.3686047	0.7956771
## 8	10 días	INM	4.5539647	1.0905372	5.6445019	3.4634275
## 9	3 días	INM	0.8957538	0.1775238	1.0732776	0.7182301
## 10	1 día	IP	3.3479572	1.5972994	4.9452566	1.7506579
## 11	10 días	IP	2.5582581	0.7273025	3.2855605	1.8309556
## 12	3 días	IP	1.4471925	0.5649851	2.0121776	0.8822075



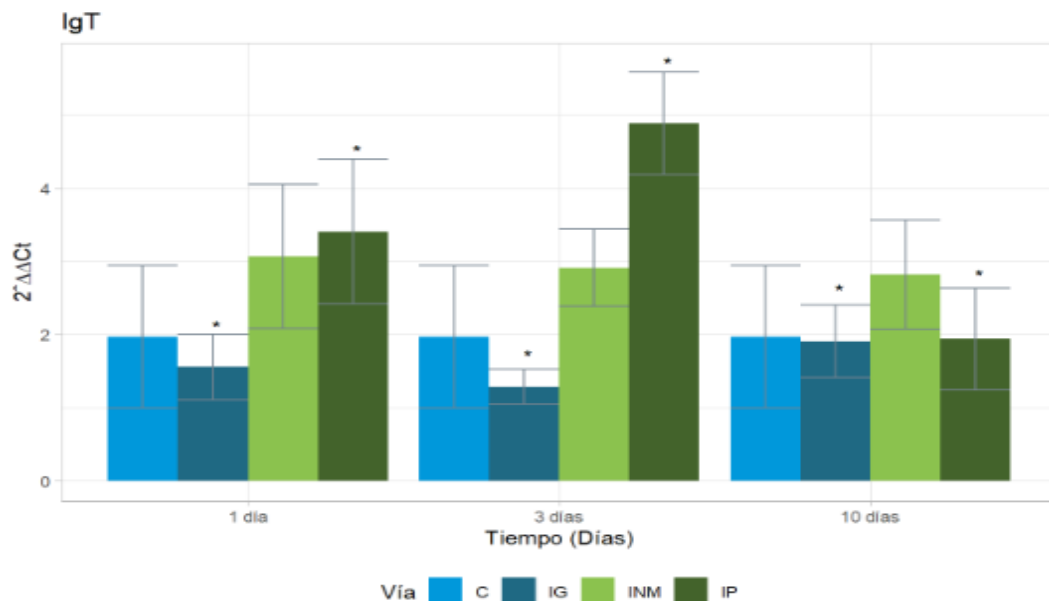
Grupos: C control, IG Intragástrico, INM: Inmersión, IP Intraperitoneal. Se encontraron diferencias significativas entre los tiempos 3 y 10 ($p < 0.05$), pero no para la vía o la interacción vía por tiempo. El * indica diferencias estadísticamente significativas $p = 0.0395$.

54 Determinación de los niveles de expresión de los genes de IgT e IgM en diferentes tejidos de tilapia (*Oreochromis sp*) frente a infección por *Streptococcus agalactiae* serotipo Ib

En cuanto a los niveles de expresión de IgT, estadísticamente se encontraron diferencias entre la vía intragástrica e intraperitoneal, pero no a través del tiempo. Se observó que: Por vía intragástrica al día 1 y 3 los niveles se encontraron por debajo del control, alcanzando el nivel basal al día 10; a diferencia de la vía de inmersión en la cual se mantuvieron sus niveles 0,5 veces por encima del control, con una leve tendencia a disminuir. En el caso de la vía intraperitoneal fue en donde ocurrió el mayor nivel de expresión, alcanzando casi el doble al día 1 y al día 3 el mayor pico con 2,5 veces más, para descender al nivel basal al día 10 (Figura 2.3-9).

Figura 2.3-9: Comportamiento de los niveles de expresión de la IgT a través del tiempo por diferentes vías.

##	Tiempo	Vía	Promedio	SEM	upp	low
## 1	1 día	C	1.964256	0.9771437	2.941400	0.9871121
## 2	10 días	C	1.964256	0.9771437	2.941400	0.9871121
## 3	3 días	C	1.964256	0.9771437	2.941400	0.9871121
## 4	1 día	IG	1.555346	0.4489252	2.004272	1.1064211
## 5	10 días	IG	1.904594	0.4999101	2.404504	1.4046841
## 6	3 días	IG	1.285690	0.2386489	1.524339	1.0470414
## 7	1 día	INM	3.066449	0.9830433	4.049493	2.0834060
## 8	10 días	INM	2.819338	0.7450009	3.564339	2.0743372
## 9	3 días	INM	2.909241	0.5254466	3.434688	2.3837945
## 10	1 día	IP	3.406233	0.9915220	4.397755	2.4147109
## 11	10 días	IP	1.935214	0.6944454	2.629659	1.2407682
## 12	3 días	IP	4.879516	0.6996414	5.579157	4.1798744



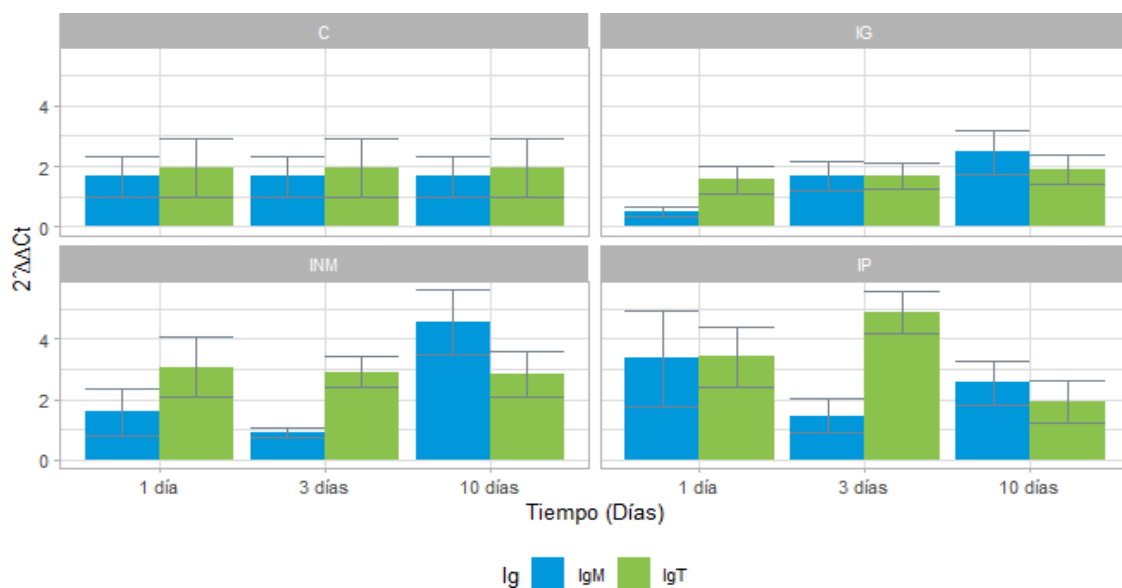
Grupos: C control, IG Intragástrico, INM: inmersión, IP intraperitoneal. Se encontraron diferencias significativas entre las muestras IP e IG ($p < 0.05$), pero no para el tiempo o la interacción vía por tiempo. El * indica diferencias estadísticamente significativas $p = 0.0321$.

De forma comparativa entre los niveles globales de IgM e IgT, estadísticamente dentro de cada vía no se encontraron diferencias significativas. Sin embargo, en los resultados se observó que en el grupo control, los niveles de IgT fueron ligeramente superiores a los de IgM, durante los 10 días del estudio (en relación al gen de control interno EF-1 α). Al infectar a los peces con *Streptococcus agalactiae* serotipo Ib por la vía intragástrica, la expresión de la IgM tuvo una disminución marcada al día 1 y alcanzó su nivel basal al día 3, mientras que IgT mantuvo en su nivel basal durante los días de experimentación.

En cuanto a la vía de inmersión, la IgM presentó un comportamiento heterogéneo, puesto que presentó un nivel basal al día 1 y luego descendió a la mitad al día 3 y se expresó al doble al día 10, mientras que la IgT mantuvo constante su expresión 0,5 veces más, durante los tres tiempos evaluados.

Por la vía intraperitoneal al día 3, tanto IgM como IgT, elevaron sus niveles 0,5 veces más que el control, pero al día 3 fue inversa la relación, puesto que IgM disminuyó a la mitad, mientras que IgT se expresó dos veces por encima de los niveles del control y para el día 10 disminuyó su expresión a nivel basal al tiempo que IgM tuvo un leve aumento (Figura 2.3-10).

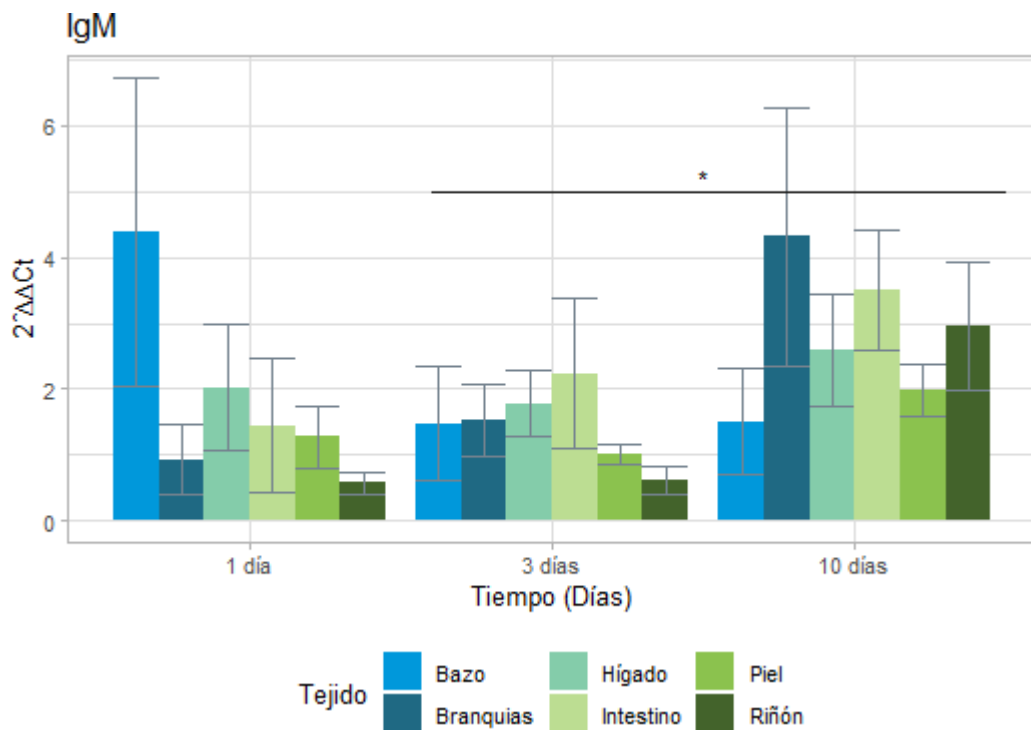
Figura 2.3-10: Comparación de los niveles de expresión de IgM e IgT en peces inoculados con *Streptococcus agalactiae* serotipo Ib por vía intragástrica (IG), inmersión (INM) e intraperitoneal (IP) y su variación a través del tiempo.



2.3.4 Dinámica de la expresión de la IgM e IgT en los órganos evaluados, ante el desafío a través del tiempo

Los niveles de expresión de la IgM en la piel, intestino, hígado, bazo, branquias y riñón craneal de peces infectados con *Streptococcus agalactiae* serotipo Ib analizados al día 1, 3 y 10 post infección (Figura 2.3-11), estadísticamente presentaron diferencias significativas entre los tiempos 3 y 10 ($p < 0,05$), pero no para los órganos o la interacción órgano por tiempo. Así mismo, los resultados mostraron que la mayor expresión de IgM ocurrió en el bazo a las 24 horas y a los 10 días en las branquias (más de dos veces), pero con una expresión inversa, es decir expresión alta en el bazo al inicio, con disminución a nivel basal al día 3 y 10, mientras que en branquias fue elevándose progresivamente. Así mismo, a los 10 días se evidenció que en las branquias, intestino, riñón, hígado y piel los niveles de expresión fueron superiores a los días 1 y 3.

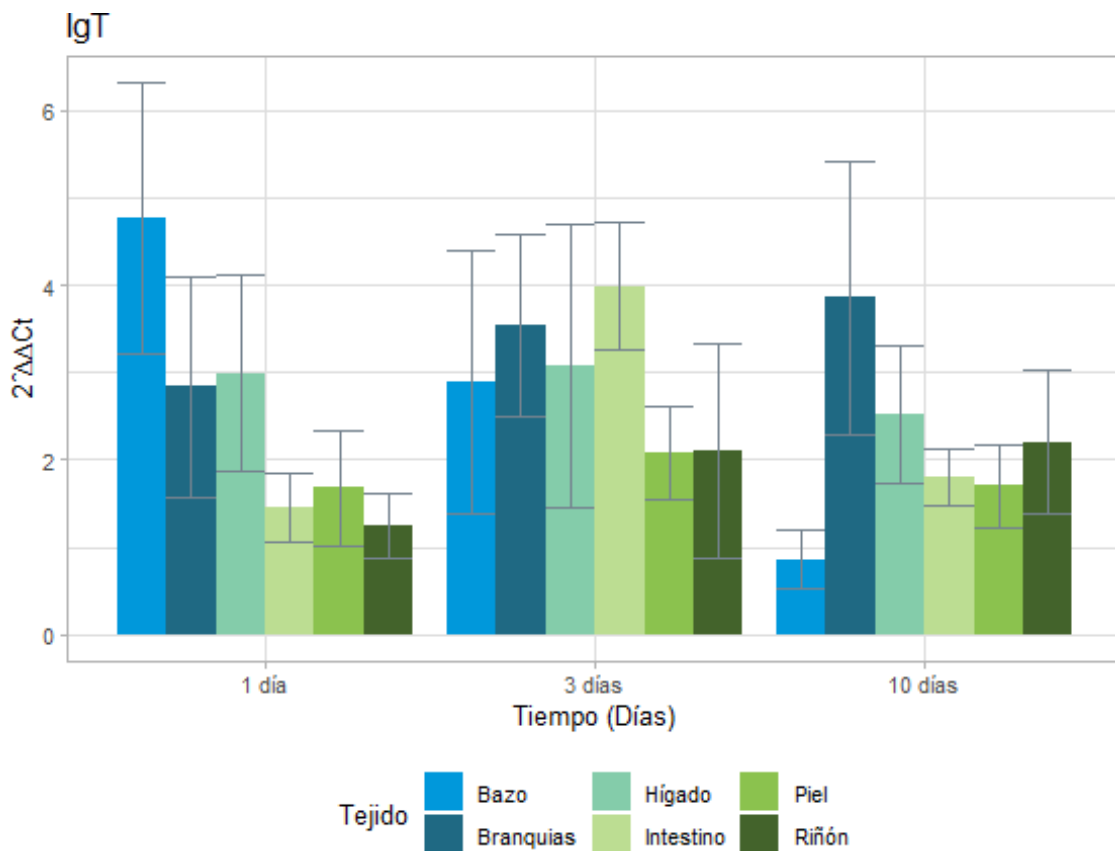
Figura 2.3-11: Niveles de expresión de la IgM en los diferentes órganos de los peces infectados con *Streptococcus agalactiae* serotipo Ib a través del tiempo.



El * indica diferencias estadísticamente significativas $p=0.0483$

En cuanto a la IgT, estadísticamente no hubo diferencias significativas en los niveles de expresión en los diferentes órganos a través del tiempo, sin embargo, los resultados de los niveles de expresión en la piel, intestino, hígado, bazo, branquias y riñón craneal de peces infectados con *Streptococcus agalactiae* serotipo Ib analizados al día 1, 3 y 10 post infección (Figura 2.3-12), fueron relativamente similares a los de la IgM debido a que, a las 24 horas, la mayor expresión ocurrió en el bazo (más de dos veces) y a los 10 días en las branquias y adicionalmente a los 3 días en el intestino (dos veces más que el control). Por otra parte, en el día 3 se evidenció que el hígado, el intestino y la piel, presentaron sus niveles más altos de expresión a diferencia del riñón, el cual fue en el día 10. En términos generales, en la mayoría de los órganos la mayor expresión fue en el día 3, a diferencia de IgM, que fue en el día 10.

Figura 2.3-12: Niveles de expresión de la IgT en los diferentes órganos de los peces infectados con *Streptococcus agalactiae* serotipo Ib a través del tiempo.



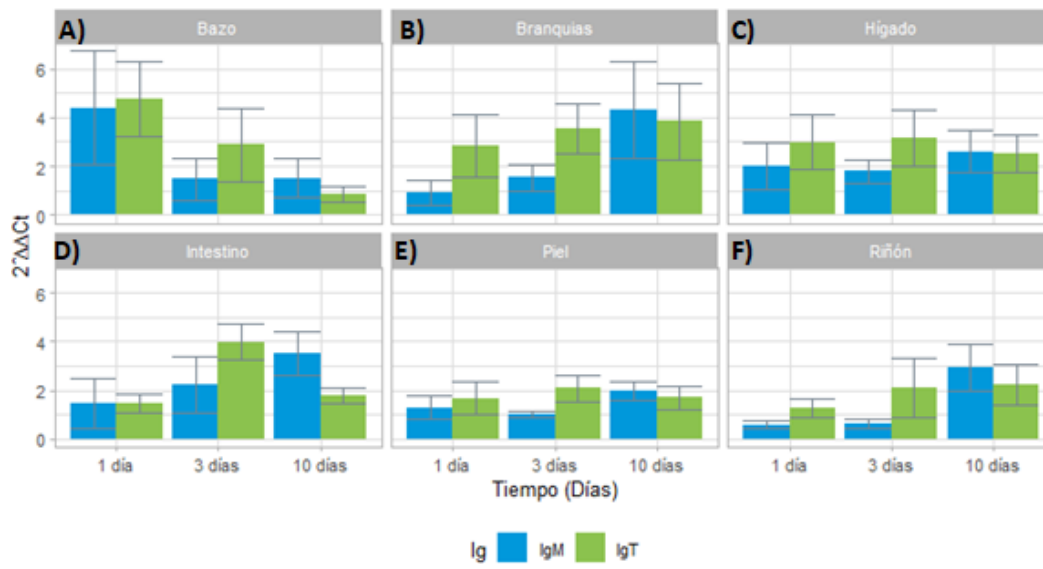
Al realizar la comparación de los niveles de expresión de la IgM e IgT, estadísticamente no hubo diferencias en cada órgano evaluado, pero en los resultados se observó que, en el bazo durante los primeros días, la IgT tuvo un mayor nivel en comparación con la IgM; sin embargo, estos niveles decrecieron, mientras que la IgM descendió al nivel basal a los 3 días a los 10 días (Figura 2.3-13 A).

En branquias, en la fase inicial de infección, (Día 1 al 3), la IgT fue la inmunoglobulina que mayor se expresó, sin embargo, a mayor tiempo de infección, la IgM presentó una mayor respuesta, superando los niveles de expresión de la IgT (Figura 2.3-13 B).

En hígado la IgT superó los niveles de la IgM durante el 1^{er} y 3^{er} día post infección (0,5 veces más) con la diferencia que en el día 10, la IgT en el hígado disminuyó levemente su nivel de expresión, hasta igualar el nivel creciente de IgM (Figura 2.3-13 C).

En el intestino la respuesta fue diferente en comparación con los otros tejidos, debido a que, al 1^{er} día, los niveles de la IgM e IgT fueron similares y al 3er día aumentó dos veces la IgT, pero a los 10 días disminuyó, mientras que la IgM aumentó progresivamente sus niveles hasta alcanzar su mayor expresión a los 10 días (Figura 2.3-13 D). La piel y el riñón fueron los órganos en donde hubo una menor expresión de las dos inmunoglobulinas, incluso por debajo del control, especialmente de IgM en los tres primeros días en riñón; sin embargo, hubo un aumento de 0 ,5 veces al día 10 (Figura 2.3-13 E y Figura 2.3-13 F).

Figura 2.3-13: Comparación en los niveles de expresión de la IgM vs la IgT en los órganos evaluados durante 3 tiempos diferentes.



2.3.5 Cambio de los niveles de expresión de IgM e IgT en los órganos por diferentes vías de inoculación a través del tiempo

Posterior a la infección de las tilapias por vía intragástrica (IG), intraperitoneal (IP) y por inmersión (INM), la expresión relativa de las inmunoglobulinas en los tejidos del bazo, branquias, hígado, intestino, piel y riñón, mostraron que la mayor expresión de IgM e IgT ocurrió principalmente, cuando los peces fueron inoculados por inmersión y por vía intraperitoneal (Figura 2.3-14).

IgM:

A nivel del bazo, el cual es un órgano linfoide primario, la expresión de la IgM fue 10 veces mayor (comparado con el control), a nivel intraperitoneal a las 24 horas, pero disminuyó progresivamente hasta los 10 días; mientras que por inmersión sus niveles disminuyeron a los 3 días, y luego aumentaron al día 10. Por vía intragástrica la expresión de IgM fue similar al control al día 1 y 3, pero disminuyó drásticamente al día 10 (Figura 2.3-14 A).

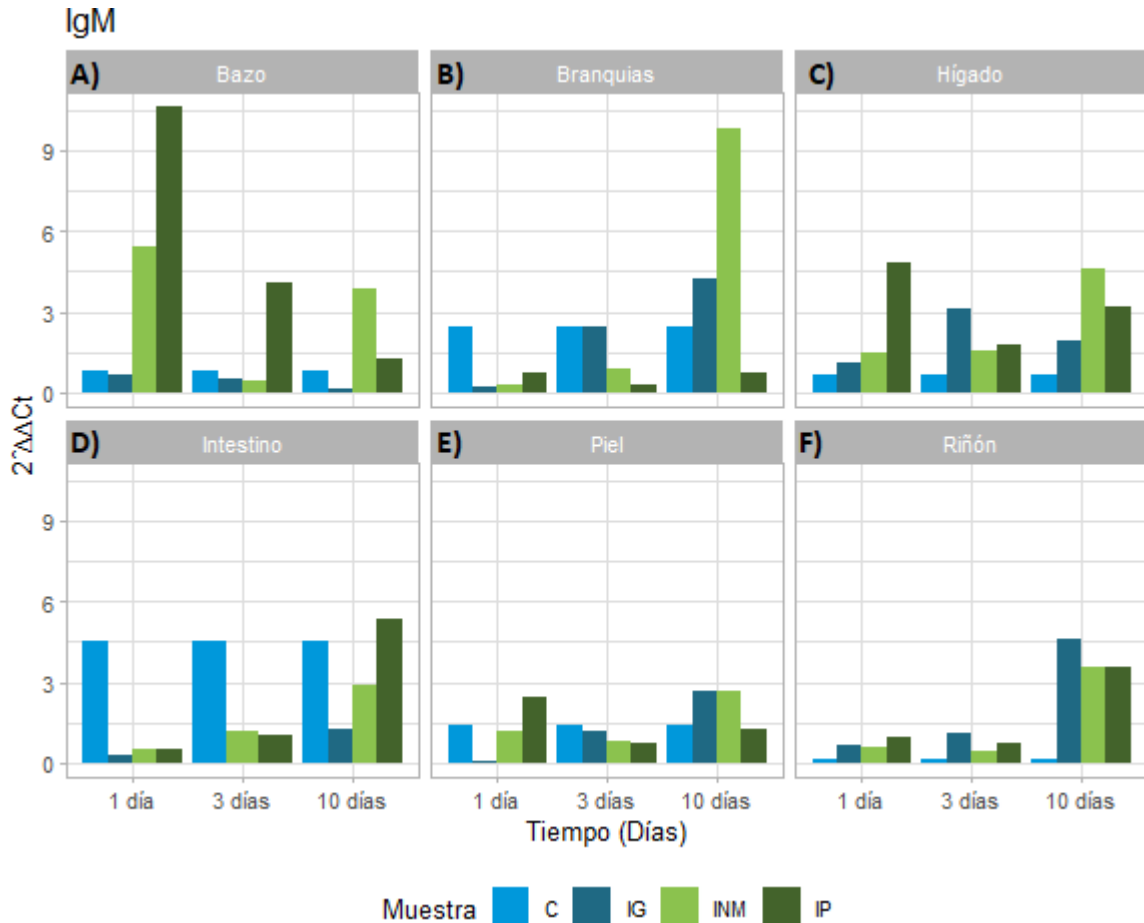
En las branquias por la vía de inmersión, la expresión de IgM fue mínima al día 1, con un leve ascenso al día 3, pero tuvo un elevado aumento de 9,5 veces al día 10. Las vías IP e IG, generaron niveles ascendentes hasta el día 10 (Figura 2.3-14 B).

En el hígado, la IgM aumentó por vía intraperitoneal a las 24 horas (4,2 veces) y luego descendió, pero volvió a elevarse al día 10, mientras que por inmersión el nivel fue ascendente hasta alcanzar su pico al día 10, con 4 veces. La vía IG generó menores niveles que las dos vías anteriores, con un pico de expresión al 3er día (Figura 2.3-14 C).

En intestino, la expresión únicamente aumentó por vía intraperitoneal a los 10 días post infección, pero tanto esta vía como la IG e INM, presentaron niveles muy por debajo del control (Figura 2.3-14 D).

Como se anotó anteriormente en la comparación en los niveles de expresión de la IgM vs la IgT en los órganos evaluados durante los 10 días, la piel y el riñón fueron los órganos en donde hubo una menor expresión de las dos inmunoglobulinas, especialmente de IgM en los tres primeros días; con aumento de 3 y 4 veces al día 10, por las 3 vías (Figura 2.3-14 E y Figura 2.3-14 F).

Figura 2.3-14: Niveles de expresión de la IgM en diferentes órganos por las tres vías de inoculación: Intragástrica (IG), inmersión (INM) e intraperitoneal (IP) a través del tiempo.



IgT:

En cuanto a la expresión de IgT en los diferentes órganos, particularmente en el bazo, los niveles de expresión fueron superiores (hasta 7 veces) cuando se inocularon los peces por inmersión y vía intraperitoneal al día 1 y hasta el día 3 en la vía IP; posterior a este tiempo los niveles disminuyeron drásticamente hasta llegar por debajo del nivel del grupo control. Por vía IG la expresión de IgT solo aumentó a las 24 horas (dos veces) y posteriormente descendió hasta el nivel mínimo a los 10 días (Figura 2.3-15 A).

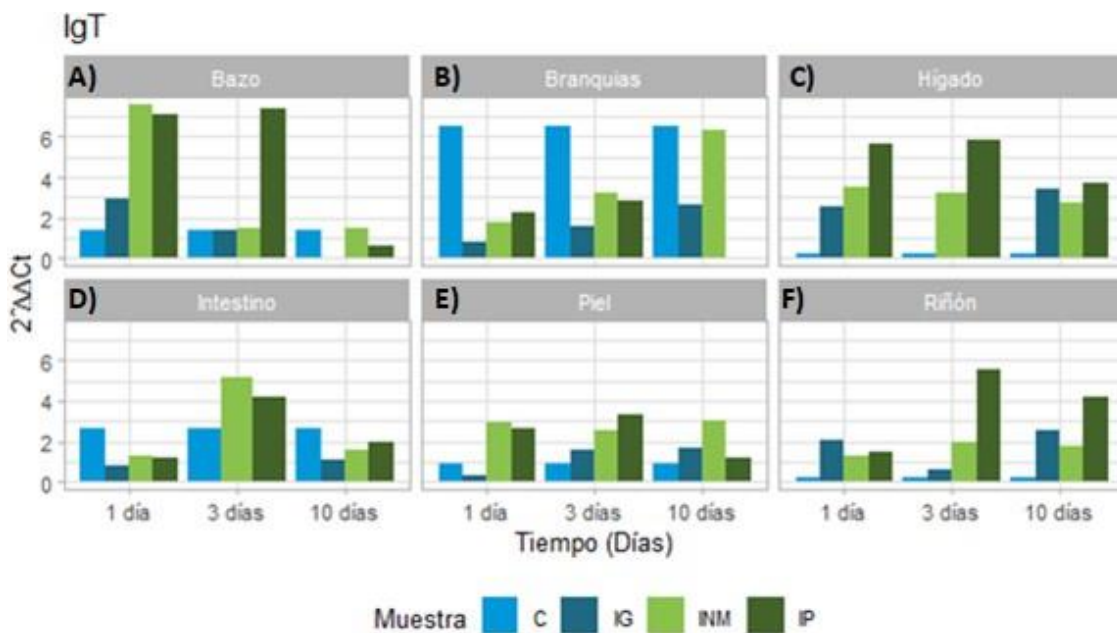
En las branquias, teniendo en cuenta la expresión del grupo control, los niveles de IgT

fueron menores, en los 3 primeros días, en las diferentes vías, excepto al día 10 por inmersión (Figura 2.3-15 B). Este hallazgo contrasta con los niveles del hígado, en donde los valores fueron superiores en comparación al control y la mayor expresión ocurrió principalmente por vía intraperitoneal, seguido de la vía de inmersión (Figura 2.3-15 C).

En el intestino la mayor expresión ocurrió principalmente por inmersión seguido de la vía intraperitoneal y estos niveles fueron superiores a los 3 días; esto también ocurrió en forma similar en piel (Figura 2.3-15 D y E).

En el riñón se observó una mayor expresión de IgT (casi 6 veces) en el grupo inoculado por vía intraperitoneal, a partir de los 3 días y luego disminuyó a 4 veces el valor basal; por la vía de inmersión los niveles fueron similares hasta los 10 días y por la vía intragástrica, se presentó un comportamiento diferente, al aumentar sus niveles únicamente a 1 día y 10 días (Figura 2.3-15 F).

Figura 2.4-15: Niveles de expresión de la IgT en diferentes órganos por las vías de inoculación Intragástrica (IG), inmersión (INM) e intraperitoneal (IP), a través del tiempo.



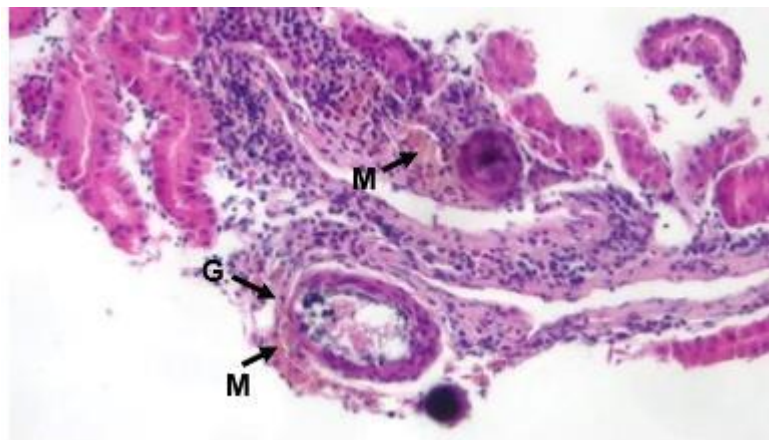
2.3.6 Evaluación histopatológica

Los hallazgos obtenidos por ictiohistopatología fueron los siguientes:

Grupo de inoculación intragástrica 24 horas post infección:

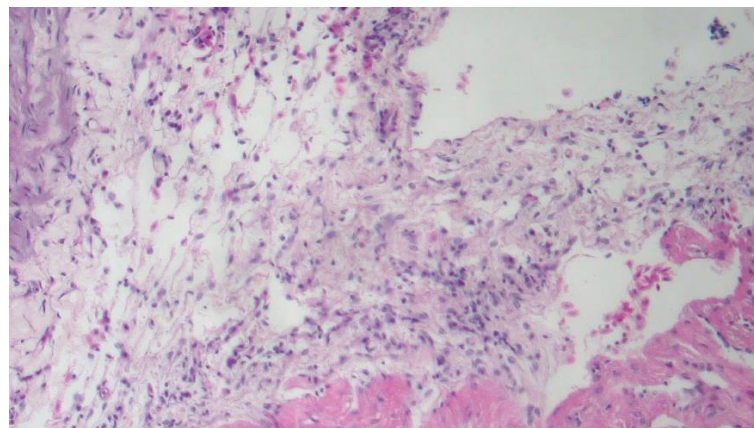
Riñón: intersticio, presencia multifocal leve de estructuras compatibles con granulomas (**G**), infiltrado linfocitario difuso leve, activación multifocal leve de centros melanomacrófagos (**M**). Nefritis granulomatosa multifocal leve (Fig.2.3-16).

Figura 2.3-16: Riñón caudal .H & E a 20x.



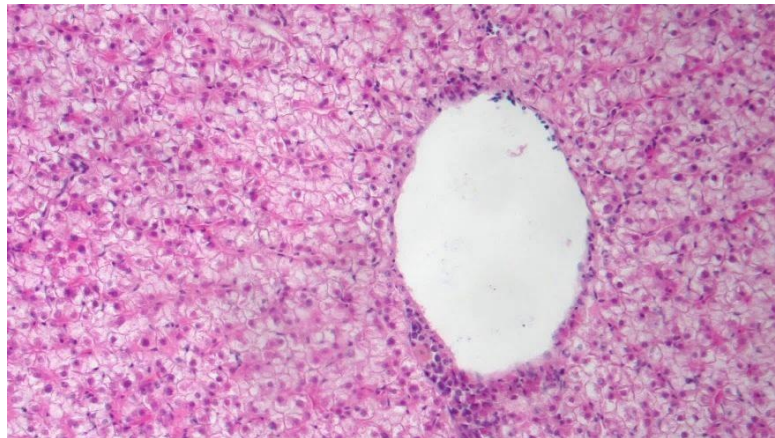
Corazón: epicardio, infiltrado linfoplasmocitario difuso leve a moderado (Fig.2.3-17).

Figura 2.3-17: Epicardio .H & E a 20x



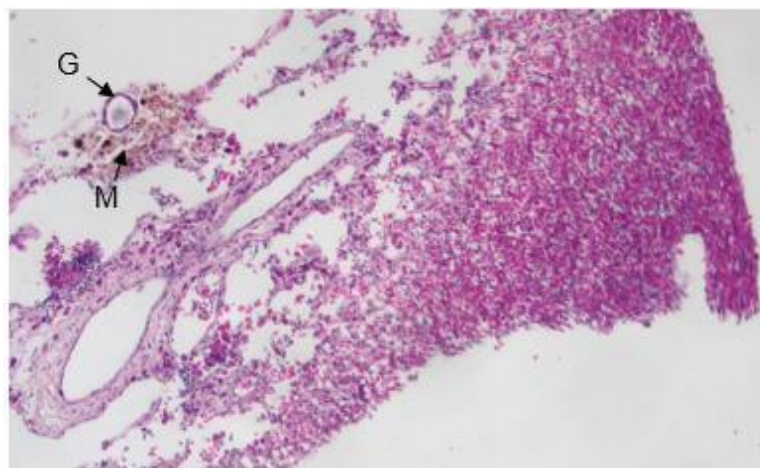
Hígado: Presentó infiltrado perivascular linfocitario y granular eosinofílico multifocal leve con degeneración hialina difusa leve de hepatocitos y activación multifocal leve de centros melanomacrófagos. Se observó hepatitis multifocal leve (Fig.2.3-18).

Figura 2.3-18: Hígado. H & E a 20x.



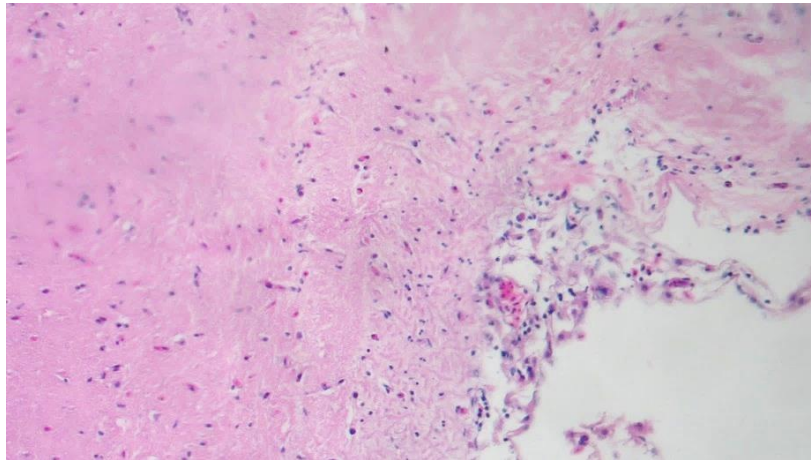
Ojo: Se observó la coroides con presencia focal leve de granuloma (**G**), infiltrado granular eosinofílico y linfocitario difuso leve a moderado, activación multifocal leve de centros melanomacrófagos (**M**) y presencia de émbolos bacterianos de morfología cocoide. Se presentó coroiditis granulomatosa focal leve (Fig.2.3-19).

Figura 2.3-19: Ojo. H & E a 40x



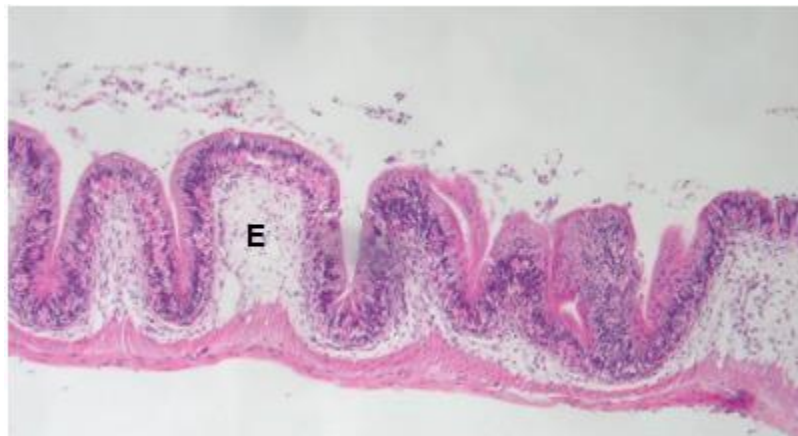
Encéfalo: En meninges, se observó leve infiltrado linfocitario multifocal, indicando meningitis multifocal leve (Fig.2.3-20).

Figura 2.3-20: Encéfalo. H & E a 20x.



Intestino: A nivel de la mucosa, se encontraron focos leves de muerte epitelial, en submucosa, infiltrado linfocitario difuso leve acompañado de edema (**E**) generalizado leve, indicando un proceso de enteritis difusa leve (Fig.2.3-21).

Figura 2.3-21: Intestino. H & E a 10x.



Branquias: Se halló infiltrado granular eosinofílico y linfocitario difuso leve a moderado, con hiperplasia epitelial lamelar multifocal leve y focos leves de telangiectasia.

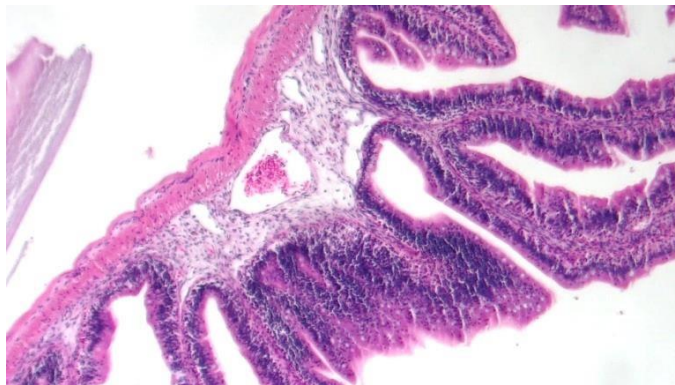
Grupo de inoculación intraperitoneal 24 horas post infección:

Ojo: En coroides, se observó infiltrado granular eosinofílico y linfocitario difuso leve a moderado con activación multifocal leve de centros melanomacrófagos. Coroiditis difusa leve a moderada.

Bazo: Se halló congestión difusa moderada y activación multifocal de centros melanomacrófagos.

Intestino: En la submucosa, se presentó infiltrado linfocitario y granular eosinofílico difuso leve acompañado de edema extenso leve, indicando enteritis difusa leve (Fig. 2.3-22).

Figura 2.3-22: Intestino. H& E a 10x



Hígado: Se observó degeneración hialina difusa leve de hepatocitos.

Riñón: En el intersticio, se presentó infiltrado linfocitario y granular eosinofílico difuso leve; en la luz de los túbulos, hubo presencia multifocal moderada de material basófilo compatible con mineral y focos leves de degeneración hialina del epitelio tubular, indicando nefrocalcinosis multifocal moderada.

Corazón: En el epicardio, se halló infiltrado linfoplasmocitario y granular eosinofílico extenso leve, con epicarditis extensa leve.

Branquias: Se observó leve infiltrado linfocitario y granular eosinofílico multifocal, focos leves de telangiectasia y branquitis multifocal leve.

Grupo de inoculación por inmersión 24 horas post infección:

Riñón: En el intersticio: Presencia multifocal leve de estructuras compatibles con granulomas, infiltrado linfocitario difuso leve a moderado; en la luz de los túbulos, deposición multifocal moderada de material basófilo compatible con mineral, activación multifocal leve de centros melanomacrófagos, sugiriendo nefritis granulomatosa multifocal leve/ nefrocalcinosis multifocal moderada.

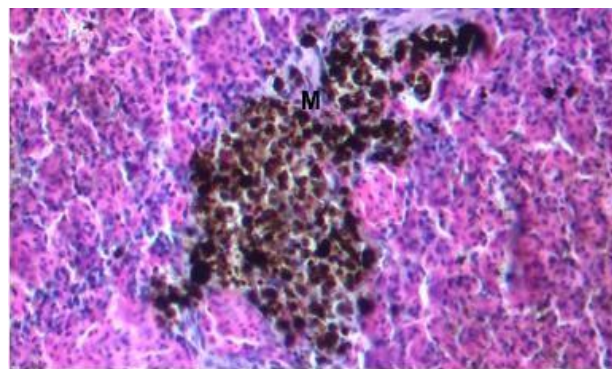
Ojo: En coroides, infiltrado granular eosinofílico y linfocitario difuso leve a moderado, activación multifocal leve de centros melanomacrófagos. Coroiditis difusa leve a moderada.

Intestino: En la mucosa, focos leves de muerte epitelial, en submucosa, infiltrado linfocitario y granular eosinofílico difuso leve acompañado de edema extenso leve. Enteritis difusa leve.

Corazón: A nivel de epicardio, infiltrado linfoplasmocitario y granular eosinofílico difuso leve a moderado. Epicarditis difusa leve a moderada.

Bazo: Se observó periesplenitis linfocitaria extensa leve a moderada, depleción linfoide difusa moderada y congestión difusa moderada del órgano, activación multifocal de centros melanomacrófagos (M) (Fig. 2.3-23).

Figura 2.3-23: Bazo. H & E a 40x



Encéfalo: En las meninges, hubo leve infiltrado linfoplasmocitario y granular eosinofílico difuso, focos de congestión leves. Meningitis difusa leve.

Branquias: Se observó leve infiltrado linfocitario difuso, focos leves de hiperplasia epitelial interlamelar.

Inoculación intragástrica 10 días post infección:

Estómago: En la mucosa, muerte epitelial difusa leve, dilatación de glándulas, en submucosa, infiltrado perivascular linfocitario y granular eosinofílico multifocal leve a moderado acompañado de edema generalizado leve a moderado, focos de congestión moderada, en túnica muscular, vacuolización difusa leve de miofibras. Gastritis multifocal leve a moderada.

Ojo: En la coroides, se presentó infiltrado granular eosinofílico y linfocitario difuso leve con escasas células rodlet y activación multifocal leve de centros melanomacrófagos. Coroiditis difusa leve

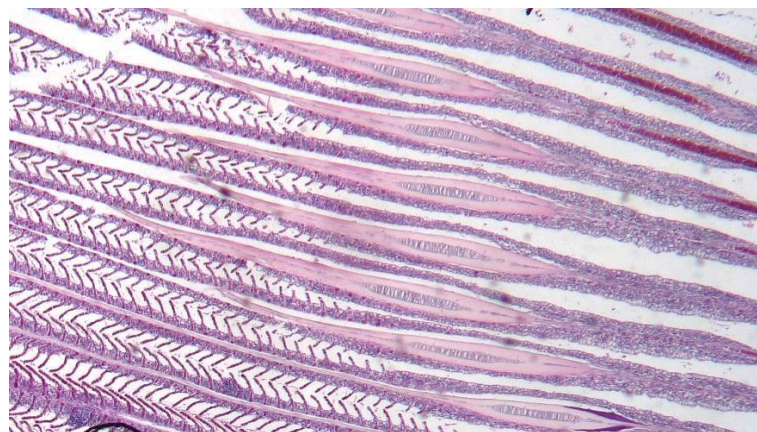
Corazón: En el epicardio, infiltrado linfocitario multifocal leve. Epicarditis multifocal leve

Hígado: Se observó leve infiltrado perivascular linfocitario multifocal. Hepatitis multifocal.

Bazo: Se halló leve depleción linfoide difusa leve y activación difusa leve a moderada de centros melanomacrófagos.

Branquias: Se halló infiltrado linfocitario y granular eosinofílico difuso leve a moderado, atrofia y/o pérdida de lamelas multifocal leve a moderada e hiperplasia difusa leve a moderada de células de moco (Fig.2.3-24)

Figura 2.3-24: Branquias. H & E a 4x



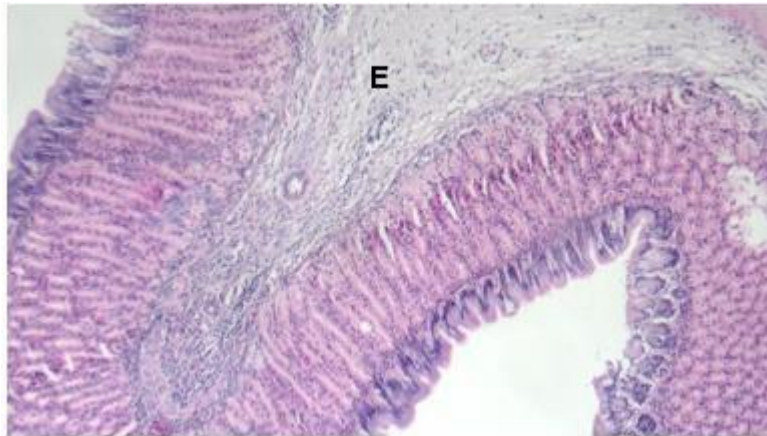
Intestino: En la submucosa, leve infiltrado linfocitario multifocal. Enteritis multifocal leve

Encéfalo: No hubo lesiones relevantes.

Inoculación intraperitoneal 10 días post infección:

Estómago: En la mucosa, muerte epitelial multifocal leve, dilatación, en submucosa, infiltrado perivascular linfoplasmocitario y granular eosinofílico difuso moderado acompañado de edema (**E**) generalizado leve a moderado, en túnica muscular, vacuolización difusa leve de miofibras. Gastritis difusa moderada (Fig. 2.3-25).

Figura 2.3-25: Estómago. H & E a 10x



Intestino: En submucosa, leve infiltrado linfocitario y granular eosinofílico difuso. Enteritis difuso leve.

Ojo: Se observó infiltrado linfoplasmocitario y granular eosinofílico difuso leve a moderado, activación multifocal a coalescente moderada de centros melanomacrófagos.

Bazo: Se observó activación multifocal leve de centros melanomacrófagos y congestión difusa moderada.

Corazón: En epicardio, infiltrado linfoplasmocitario difuso leve a moderado, miocardio, infiltrado linfocitario multifocal. Epicarditis difusa leve a moderada/ Miocarditis multifocal leve.

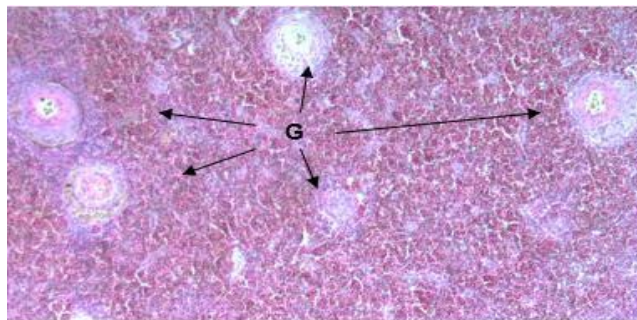
Branquias: Hubo infiltrado linfocitario difuso leve a moderado, hiperplasia epitelial lamelar multifocal leve a moderada, infestación multifocal leve. Branquitis difusa moderada

Hígado: Se presentó leve infiltrado linfocitario perivascular multifocal y activación multifocal leve de centros melanomacrófagos. Hepatitis multifocal leve.

Inoculación inmersión 10 días post infección:

Bazo: Se halló presencia multifocal moderada de granulomas (**G**), depleción linfoide difusa moderada y congestión difusa moderada. Esplenitis granulomatosa multifocal moderada (Fig.2.3-26).

Figura 2.3-26: Bazo. H & E a 10x.



Hígado: Se observó presencia multifocal leve a moderada de granulomas (**G**). Hepatitis granulomatosa multifocal leve a moderada. (Fig.2.3-27).

Figura 2.3-27: Hígado. H & E a 10x.



Riñón: En el intersticio, presencia multifocal leve de granulomas, focos leves de muerte epitelial tubular y activación multifocal leve de centros melanomacrófagos.

Estómago: En mucosa, muerte epitelial y glandular multifocal leve, en submucosa, infiltrado linfoplasmocitario difuso leve a moderado acompañado de edema generalizado leve a moderado. Gastritis difusa leve a moderada.

Intestino: En mucosa, muerte epitelial difusa leve, submucosa, infiltrado linfoplasmocitario difuso leve a moderado. Enteritis difusa leve.

Corazón: A nivel de epicardio, infiltrado linfoplasmocitario difuso leve. Epicarditis difusa leve

Branquias: Hubo infiltrado linfocitario difuso leve. Branquitis difusa leve.

Diagnóstico:

Grupo control:

De los tejidos muestreados para el grupo control, no se evidenciaron lesiones en ninguno de los órganos evaluados.

Grupos experimentales

A partir de los resultados obtenidos en histopatología para cada uno de los grupos inoculados por las diferentes vías (intraperitoneal, inmersión e intragástrica), se evidenció que los hallazgos fueron compatibles con un proceso infeccioso bacteriano multiorgánico, en donde se consideró a *Streptococcus agalactiae* como primer diferencial.

2.4 DISCUSIÓN

El *Streptococcus agalactiae* es una bacteria que causa importantes pérdidas en la piscicultura mundial incluyendo Colombia, más aún, desde 2023 el país está viviendo una emergencia sanitaria por cuenta de éste patógeno, especialmente por los serotipos Ib y Ia. Desde hace varios años se cuenta con dos vacunas consistentes en bacterinas hechas a partir del serotipo Ib (Zoetis, MSD) y recientemente otra hecha a partir de los serotipos Ia, Ib y III, las cuales se aplican vía intraperitoneal a peces entre 20 y 80 gramos (Virbac).

A pesar de los enormes esfuerzos en vacunación y en el diagnóstico temprano y posterior, esta bacteria continúa generando enormes pérdidas económicas en el sector; por tal razón es muy importante conocer aspectos básicos de sus mecanismos patogénicos, así como también de la respuesta inmune de las tilapias frente a la infección; por tanto en el presente trabajo se realizó una evaluación de la expresión de las inmunoglobulinas IgM e IgT, frente a la infección con *Streptococcus agalactiae* serotipo Ib. Una vez se comprobó mediante la qPCR e histopatología, que los peces en estudio desarrollaron la infección, se realizó la extracción de ARN total a partir de diferentes órganos, con el fin de realizar la retrotranscripción y amplificación por qPCR y de esta forma cuantificar la expresión relativa de los genes de IgM e IgT a los días 1, 3 y 10 post infección.

La inmunoglobulina M, es el isotipo de Ig, que se expresa mayormente en infecciones recientes o activas en el humano y en la mayoría de los animales incluyendo peces teleosteos como la tilapia; en donde constituye la clase de inmunoglobulina más abundante en el suero y juega el rol más importante en la respuesta inmune adaptativa a nivel sistémico (Cuesta et al., 2004) y respuesta inmune a nivel de mucosas. Para el presente caso, el promedio general de expresión de la IgM en tilapia, según la vía de inoculación del *S. agalactiae*, mostró que el mayor nivel de respuesta primaria fue alcanzado por la vía intraperitoneal, seguida de la vía de inmersión y por último por la vía intragástrica al día 1 p.i. Esto puede obedecer a que por vía IP, el *S. agalactiae* infecta de forma más rápida y generalizada, estimulando órganos linfoides, como el bazo y por ende generando un incremento de esta Ig, lo cual fue evidenciado en los altos niveles que expresó este órgano

al día 1 y que luego disminuyeron progresivamente, resultados similares fueron obtenidos por Xiaoxue et al, (2019), con la diferencia de que en su estudio al caracterizar la respuesta de la IgM ante una infección con *S. agalactiae* por vía intraperitoneal, el riñón craneal fue el órgano con los niveles de expresión más altos e incluso superiores a los del bazo, lo cual es explicado por Geven & Klaren, (2007) al indicar que el riñón craneal es el centro germinal análogo en los teleosteos que se encuentra lleno de células B que expresan la IgM, y que el bazo ante un estímulo antigénico genera una rápida respuesta, debido a que es uno de los principales órganos linfoides en la tilapia, y que adicionalmente los estudios realizados por Zamri- Saad et al., (2010) & Soto et al., (2013) indican que el bazo puede ser uno de los órganos blanco que afecta el *Streptococcus agalactiae*, lo cual se pudo confirmar en este estudio mediante los hallazgos obtenidos por histopatología al evidenciar a las 24 horas en las 3 vías de inoculación una rápida activación de los centros melanomacrófagos acompañado de un proceso inflamatorio.

La siguiente vía que generó un alto nivel de IgM, fue por inmersión (INM), que aunque tuvo niveles cercanos a los basales durante los primeros 3 días, su máxima expresión fue los 10 días p.i, elevándose hasta casi tres veces; este pico fue debido a la alta expresión en branquias, lo cual se explicaría con las investigaciones realizadas por Nakanishi et al., (1997) & Swain et al., (2006) en las cuales indican que los componentes mucosos que recubren la parte externa de los peces y los componentes sistémicos del sistema inmunitario están relacionados, de forma que los peces desarrollan niveles detectables de anticuerpos después de ser sumergidos en soluciones de antígenos solubles o en suspensiones de antígenos particulados; y estos anticuerpos pueden ser detectados en el moco de las branquias y la piel. Aunque en experimentos de inmersión realizados por Rasheed & Plumb, (1984), los peces retados con *S. agalactiae* no presentaron signos clínicos y las evidencias del estudio realizado por Comas e Iregui, (2005) indican que *S. agalactiae* ingresa a los peces a través del estómago y el intestino, Bowden et al., (2003) menciona que especies de *Streptococcus* penetran fácilmente por la piel y/o las branquias, lo cual explicaría los resultados de este estudio, en donde no se descarta la idea de que quizás por la adherencia, colonización y multiplicación de la bacteria en éste órgano a través de los días, se generaría una respuesta inmune elevada, lo cual respalda los hallazgos histopatológicos en donde se encontraron infiltrados linfocitarios e hiperplasia en las branquias, con pérdida de las lamelas.

Por último, el menor nivel de IgM en promedio de todos los órganos fue por la vía intragástrica a las 24 horas, que fue más baja que el control en el primer día p.i. y luego al 3er día alcanzó el nivel normal, con un ligero aumento al día 10; esta aparente inmunodepresión al día 1, puede haberse debido al estrés de la manipulación combinada con la carga bacteriana dentro del estómago. Adicionalmente los bajos niveles de expresión por esta vía, podrían estar relacionados con los resultados obtenidos en la caracterización morfológica de la adherencia e invasión de *Streptococcus agalactiae* a la mucosa intestinal de la tilapia, realizado por Vásquez (2019), en donde indica que las lesiones y respuesta inflamatoria en el intestino de tilapia frente a la invasión por *S. agalactiae* es escasa y en ocasiones nula; respaldado por la inexistente respuesta inmune innata por parte de las células caliciformes, que son las primeras en reaccionar a la presencia de diferentes agentes extraños y la respuesta adquirida, en donde indicó que el número de linfocitos intraepiteliales no mostró cambio llamativo y aunque este último resultado difiere de los hallazgos histopatológicos obtenidos en esta investigación, en donde a nivel intestinal se encontraron focos leves de muerte epitelial, en submucosa, infiltrado linfocitario difuso leve acompañado de edema generalizado leve a moderado, se demostró que si existe una respuesta inmunológica, y los bajos niveles de expresión puedan atribuirse al ataque del *Streptococcus* al tejido linfoide asociado a las mucosas, que conlleve a una inmunodepresión inicial con una posterior recuperación, considerando la hipótesis de Vásquez, la cual estipula que *S. agalactiae* está tan bien adaptado molecularmente a su hospedero que pasa casi desapercibido gracias a la presencia de ácido N-acetil neuramínico (Neu5Ac) sobre su superficie y el cual es idéntico al ácido siálico que se encuentra sobre las células del hospedero, lo que le permite al patógeno engañar al sistema inmune o que puede haber una inmunotolerancia a patógenos que ingresan por ruta oral, como lo reportado por Chistiakov et al, (2015).

En cuanto a la IgT, la expresión general de esta inmunoglobulina en los órganos examinados se halló que al igual que con la IgM, la vía intraperitoneal fue en donde se registró el mayor nivel de expresión, alcanzando casi el doble al día 1 y al día 3 el mayor pico, descendiendo al nivel basal al día 10. Es de anotar que, en este estudio la IgM por vía IP, tuvo también su mayor nivel al día 1 (al mismo nivel de IgT); lo anterior sugiere que la respuesta primaria ante la infección reciente es producida tanto por IgM como por IgT, lo cual es congruente con lo descrito por Velásquez et al., 2018 en donde menciona que los niveles de expresión más altos de IgM e IgT evaluados a las 24 horas post infección

fueron detectados en órganos linfoides primarios y secundarios como riñón craneal y bazo.

En cuanto a la IgT, la cual existe en la mayoría de teleósteos y parece ser exclusiva de este grupo de vertebrados (Mashoof et al., 2014), los mayores niveles de expresión en los órganos de la tilapia al ser inoculados con *S. agalactiae* por vía intraperitoneal (IP), ocurrieron al 3 día inicialmente en el bazo, seguido del hígado, riñón e intestino en relación a los controles, los órganos con menor expresión fueron piel y branquias. Al comparar estos resultados con los obtenidos por Hu et al., 2019, en el pez cebra al estimular con lipopolisacáridos (LPS) los niveles de expresión de la IgT/Z aumentaron a las 12 h p.i en riñón craneal, bazo, branquias, piel e intestino, así mismo, Zhang et al., (2017), en la trucha arcoíris al administrar LPS por vía IP, describieron que el incremento de la IgT en el bazo e intestino fueron detectados 3 días después de la infección, lo cual permite evidenciar los cambios entre las diferentes especies activándose con mayor rapidez en el pez cebra, a nivel de órganos en las 3 especies nos permite indicar que aunque esta inmunoglobulina está asociada a la inmunidad de mucosas, la respuesta inmune humoral inducida por un patógeno cuando es administrado por vía intraperitoneal, activa principalmente los órganos linfoides primarios y secundarios como lo es el bazo y el riñón craneal, adicionalmente aunque no se ha reportado niveles de expresión de la IgT en el hígado del pez cebra, ni en la trucha arcoíris, con los resultados obtenidos en la tilapia es de resaltar que este órgano juega un papel fundamental en la presentación antigénica y en el inicio de la respuesta inmunitaria adaptativa, al contar con una gran concentración de melanomacrófagos que captan los antígenos e inmunocomplejos presentes en la sangre y que además, estos tienen la capacidad de retener los antígenos durante largos periodos de tiempo (Fergusson, 1989), lo cual se evidenció histopatológicamente en este estudio en el día 10 p.i al observar en este órgano leves infiltrados linfocitarios perivasculares multifocal y activación multifocal leve de centros melanomacrófagos.

Por la vía de inmersión (INM) los niveles de expresión de la IgT en el 1^{er} día post infección evidenciaron que el bazo es el que presenta un mayor aumento en sus niveles de expresión, seguido de hígado, piel y riñón en relación con sus respectivos controles, hacia el día 3 p.i, en el bazo disminuye a su nivel basal, en el hígado y la piel, aunque descienden levemente, sus niveles tratan de mantenerse constantes, mientras que en el riñón aumenta 0,5 veces por encima de los valores obtenidos en el día 1 p.i, en el intestino se observa un aumento 2 veces por encima del nivel basal, evidenciando un aumento en la inmunidad a nivel de mucosas, los resultados del día 10 p,i varían ya que las branquias aumentaron

sus niveles de expresión y aunque no superaron los niveles basales, estos resultados comparados con los obtenidos en el 1^{er} y 3^{er} día post infección demuestran que a nivel de branquias su aumento es progresivo, a diferencia del bazo, hígado e intestino los cuales disminuyen con el tiempo y la piel y el riñón, los cuales tratan de mantener sus niveles constantes hasta el día 10; teniendo en cuenta los resultados de Velásquez et al., (2018), al descubrir la IgT en tilapia, en su estudio ellos indicaron que la sobrerregulación de la expresión de IgT fue encontrada en la piel de la tilapia, y sugirieron que la IgT podría jugar un rol predominante en la inmunidad de mucosas en esta especie para controlar la infección en este sitio, resultados similares fueron obtenidos por Du et al., (2016) al trabajar con el lenguado japonés (*Paralichthys olivaceus*) infectando los peces con *Edwardsiella tarda* por vía intraperitoneal e inmersión, con la diferencia de que los niveles de IgT fueron sobrerregulados en todos los tejidos muestreados y no exclusivamente en la piel, estos resultados comparados con los nuestros afirman que tanto la infección por la vía intraperitoneal e inmersión pueden simultáneamente inducir respuestas inmunes a nivel sistémico y a nivel de mucosas teniendo en cuenta que la expresión va a variar según el órgano y el tiempo de post infección.

Al igual que los datos obtenidos para IgM, la vía intragástrica generó niveles por debajo de la vía IP e INM, con una leve recuperación hacia el día 10, reforzando la idea de que por esta vía se genera una menor respuesta inmune ante el *S. agalactiae*. Para el día 1 p.i se evidencio que el bazo, hígado y riñón aumentaron los niveles de expresión de la IgT, no al nivel de las otras rutas de infección, indicando una respuesta activa lo cual concuerda con los hallazgos histopatológicos y los resultados de Iregui et al., (2016), al infectar tilapias con *S. agalactiae* por vía oral indicando que en el hígado, riñón y bazo el *Streptococcus* podía recuperarse a partir de las 24 h hasta las 72 h de incubación. A los 3 días p.i, se evidenció que el hígado, intestino y piel, alcanzaron su mayor nivel de expresión, mientras que en el riñón fue en el día 10. Es de anotar que en éstos mismos órganos la mayor expresión de IgM fue en el día 10, lo cual puede indicar que la IgT tiene mayor actividad en esta etapa, lo cual se puede relacionar con el mecanismo de adaptación molecular del *Streptococcus* atribuido a presencia del ácido Neu5Ac mencionado por Vásquez (2019), o la inmunotolerancia descrita por Chistiakov et al, (2015) aunado al tiempo que *S. agalactiae* tarda en atravesar la capa de moco de la mucosa intestinal y el estómago para adherirse, colonizar e invadir el epitelio intestinal, resistiendo el pH del estómago, para posteriormente distribuirse sistémicamente, lo cual puede retardar el reconocimiento de la

bacteria en los diferentes tejidos y por ende retardar la respuesta inmune por esta vía.

En cuanto al órgano que más produjo IgT, se determinó que fue el bazo el mayor responsable por los niveles de expresión (superiores hasta 7 veces), especialmente en infección por inmersión y por vía intraperitoneal; posterior a este tiempo los niveles disminuyen hasta llegar por debajo del nivel basal, mientras que en las branquias los niveles de IgT fueron menores, en los 3 primeros días en las diferentes vías, pero que ascendieron al día 10. En hígado los valores fueron superiores en comparación al control y la mayor expresión ocurrió principalmente por vía intraperitoneal, seguido de la vía de inmersión. Estos datos sugieren que la respuesta de IgT es iniciada principalmente en bazo y branquias, seguido del hígado, intestino, piel y hacia el día 10 por el riñón craneal, en donde se registró una mayor expresión de IgT (casi 6 veces) en el grupo inoculado por vía intraperitoneal, a partir de los 3 días y por vía de inmersión los niveles fueron similares hasta los 10 días.

Teniendo en cuenta que el mejor método para prevenir emergencias sanitarias en acuicultura es la vacunación, y que sus vías de administración incluyen la vía intraperitoneal (IP), inmersión (INM), y oral, los estudios realizados por Noraini et al. (2013), Caipang et al. (2014) para desarrollar vacunas en tilapia contra el *S. agalactiae* indicaron que las vacunas pueden ser parcialmente degradadas por fluidos digestivos cuando se administran por vía oral o que las vacunas pueden no ser suficientemente absorbidas por el cuerpo del pez cuando se implementan métodos de inmersión, así mismo la eficiencia en la protección no es tan buena como cuando es inyectada, el empleo de estas vías de vacunación concuerdan con los resultados obtenidos en este estudio al medir los niveles de IgM e IgT debido a que las vías con mayor nivel de expresión de inmunoglobulinas fueron la vía IP y de INM estimulando los órganos linfoides primarios y secundarios como el bazo y riñón craneal lo cual explicaría porque estas vías son las que presenta una mayor eficacia, sin embargo, cabe resaltar que una vacuna se ve influenciada por múltiples parámetros tales como la duración y número de inmunizaciones, así como el tamaño del pez y la dosis del desafío; tal como lo menciona Evans et al. (2004) al demostrar que el tamaño del pez si parece jugar un rol importante en la eficacia de la vacunación al obtener en tilapias con un peso superior al de 30 g un porcentaje relativo de supervivencia (PRS) del 80% a diferencia de tilapias con un peso de 5g las cuales obtuvieron un PRS de solo 25% bajo las mismas condiciones, así mismo el número de inmunizaciones como lo indica Pretto-Giordano et al. (2010), al comparar los PRS al

78 Determinación de los niveles de expresión de los genes de IgT e IgM en diferentes tejidos de tilapia (*Oreochromis sp*) frente a infección por *Streptococcus agalactiae* serotipo Ib

vacunar los peces vía IP , obteniendo que cuando se aplican únicas dosis el PRS es de 83,6% mientras que en vacunaciones con 1 o 2 refuerzos los niveles de PRS aumentan significativamente al 96,4%, teniendo en cuenta que vacunas de ADN y recombinantes usualmente necesitan un refuerzo para obtener un nivel de protección satisfactoria, mientras que las vivas atenuadas o las inactivadas, solo necesitan una única dosis.

3 Conclusiones y recomendaciones

3.3 Conclusiones

Al realizar la comparación de la expresión de IgM e IgT, por la vía intraperitoneal la IgM como IgT, elevaron sus niveles 0,5 veces más que el control, pero al día 3 fue inversa la relación, puesto que IgM disminuyó a la mitad, mientras que IgT se expresó dos veces por encima de los niveles del control y para el día 10 la IgM aumento levemente sus niveles de expresión, mientras que la IgT disminuyo su expresión a nivel basal, evidenciando que ante una infección, la respuesta primaria es debida tanto a la IgM como a la IgT, así mismo, que la inmunoglobulina T puede inducir simultáneamente una respuesta sistémica y mucosal.

La comparación en los niveles de expresión de la IgM vs la IgT en los órganos evaluados durante los 10 días, la piel y el riñón fueron los órganos en donde hubo una menor expresión de las dos inmunoglobulinas, especialmente de IgM en los tres primeros días; con aumento de 3 y 4 veces al día 10, por las 3 vías.

Los niveles globales de IgM e IgT, se evidenció que en el grupo control, los niveles de IgT fueron ligeramente superiores a los de IgM, durante los 10 días del estudio (En relación con el gen de control interno EF-1 α).

Al infectar a los peces con *Streptococcus agalactiae* serotipo Ib por vía intragástrica (IG), intraperitoneal (IP) y por inmersión (INM), la expresión relativa de las inmunoglobulinas en los tejidos del bazo, branquias, hígado, intestino, piel y riñón, mostraron que la mayor expresión de IgM e IgT ocurrió principalmente, cuando los peces fueron inoculados por inmersión y por vía intraperitoneal.

3.4 Recomendaciones

Realizar este tipo de estudios, complementándolos con más días de muestreo, teniendo en cuenta los tiempos evaluados por Xiaoxue Yin et al., 2019 en donde se pueda evidenciar el comportamiento de ambas inmunoglobulinas en un tiempo superior a los 10 días para así evidenciar el tiempo en donde se alcanza el pico de producción. Así mismo, realizar mediciones de las inmunoglobulinas en suero y timo, tanto con qPCR, como con técnicas serológicas ya que debido al presupuesto con el que contaba este proyecto no fue posible incorporar esta técnica.

Para cada uno de los tiempos acompañar el estudio con histopatología para correlacionar hallazgos e incluir un estudio de tiempo de formación de granulomas post inoculación.

Incorporar la evaluación de la IgD, y comparar el comportamiento de las 3 inmunoglobulinas frente al estímulo del patógeno y la vacunación, teniendo en cuenta las diferentes rutas de administración.

A. Anexo: PRIMERS EMPLEADOS EN ESTE ESTUDIO

Tabla A. 1: Primers y secuencias empleadas en este estudio

Nombre del primer	Secuencia 5' a 3'	bp	Sentido	Secuencia que amplifica y referencia
CpsIb-F	TATACTTGCCCACCCAAC	18	Forward	Secuencia de cápsula <i>Streptococcus agalactiae</i> serotipo Ib para estudios de qPCR (Furfaro et.al.,2017)
CpsIb-R	ACTTATTGGTTTGTGATATTCC	22	Reverse	Secuencia de cápsula <i>Streptococcus agalactiae</i> serotipo Ib para estudios de qPCR (Furfaro et.al.,2017)
dltS-F	CCTTATGGCGTTCCACGATT	20	Forward	Secuencia d-alanyl-lipotheichoic acid biosynthesis de <i>Streptococcus agalactiae</i> serotipo Ib para estudios de qPCR (Furfaro et.al.,2017).

dltS-R	ATCATGCAGATTCTCTCAGTTTTGG	25	Reverse	Secuencia d-alanyl-lipotheichoic acid biosynthesis <i>Streptococcus agalactiae</i> serotipo Ib para estudios de qPCR (Furfaro et.al.,2017).
EF-1 α -F	CTACAGCCAGGCTCGTTTCG	20	Forward	Secuencia de factor de elongación1 α para estudios de qPCR (Velázquez et. al, 2018)
EF-1 α -R	CTTGTCACTGGTCTCCAGCA	20	Reverse	Secuencia de factor de elongación1 α para estudios de qPCR (Velázquez et. al, 2018)
rtIgT-F	TGACCAGAAATGGCGAAGTATG	22	Forward	Secuencia de Inmunoglobulina T para estudios de qPCR (Velázquez et. al, 2018)
rtIgT-R	GTTACAGTCACATTCTCTGGAATTACC	27	Reverse	Secuencia de Inmunoglobulina T para estudios de qPCR (Velázquez et. al, 2018)
rtIgM-F	GGATGACGAGGAAGCAGACT	20	Forward	Secuencia de Inmunoglobulina M para estudios de qPCR (Velázquez et. al, 2018)

rtIgM-R	CATCATCCCTTTGCCACTGG	20	Reverse	Secuencia de Inmunoglobulina M para estudios de qPCR (Velázquez et. al, 2018)
---------	----------------------	----	---------	---

B. ANEXO: ALINEAMIENTO DE LAS SECUENCIAS

Streptococcus agalactiae:

Cápsula del serotipo Ib (cpsIb):

LOCUS LT671984 15807 bp DNA linear BCT 16-DEC-2016

DEFINITION *Streptococcus agalactiae* capsular locus (cps) operon (serotype Ib) strain NCTC8187.

ACCESSION LT671984 VERSION LT671984.1

SOURCE *Streptococcus agalactiae* ORGANISM *Streptococcus*

agalactiae REFERENCE 1

AUTHORS Kapatai,G., Patel,D., Efstratiou,A. and Chalker,V.J.

TITLE Comparison of molecular serotyping approaches of *Streptococcus agalactiae* from genomic sequences

JOURNAL Unpublished

REFERENCE 2 (bases 1 to 15807)

AUTHORS Underwood,A. TITLE Direct Submission

JOURNAL Submitted (02-DEC-2016) PHE, 61 Colindale Avenue, London NW9 5EQ, UNITED KINGDOM

ORIGIN

```

8641 agggagaata tttttttaga atggatgctg atgatatttc atatccaagt agatttgata
8701 agcaaattcg ttttatggag gaaaattcat tggatttctc agcaactcta atagaattga
8761 tagacaaaa aggaaattta gtatataaac aacgagaaag taataaaaata tacttaacta
8821 atgatatacg gaagatgtta ttgaatagat ctatacttgc ccacccaacg tgggtcgtaa
8881 aaaagaaaagt tttcgataag ttaatgggat atagagattt agtacctggt gaagattatg
8941 attttgcaat aagaggagct ctggctgatt tcaaaatcgg cttactcaat aaagtacttt
9001 tacagtatag attaaacgag aatggaatat cacaaaccaa taagtttaag caatatattt
9061 actcagctat tttacaagat ttttataaag aaaaatctta tattgatatc acaaaaatta
9121 ctaattactt tcaagagtat gtgataaaga aacgctatac tcagcaagag ctctccta
9181 attttgagct aaaatctacc ctagtatta ctattagaaa actatatatt tgtttatatt

```

9241 tataactttaa gtctcccttg gttaggaggt tattaataaa tgatattaat
 attttagtac 9301 tgaattggt tggaggagag aaacaaagt actaatagaa
 aaatttatgt atgtcact 9361 cttatcatt tattgatttg tttatataaa
 gaagagatat attcaaattt agaaattatt 9421 ctctcttctt ctattctga
 tgttgataat ttagagaaaa aattaaatc aaaaacaata

Fuente: [https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/LT671984.1?report=genbank&log\\$=nucl_align&blast_rank=47&RID=U3GX66DF016](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/LT671984.1?report=genbank&log$=nucl_align&blast_rank=47&RID=U3GX66DF016)

d-alanyl-lipoteichoic acid biosynthesis (dlts):

LOCUS CP053027 2105299 bp DNA circular BCT 22-MAY-2020
 DEFINITION *Streptococcus agalactiae* strain 01173 chromosome,
 complete genome.
 ACCESSION CP053027 VERSION CP053027.1
 DBLINK BioProject: [PRJNA627590](#)
 BioSample:
[SAMN14677105](#) SOURCE
 Streptococcus
s agalactiae ORGANISM
[Streptococcus agalactiae](#)
 REFERENCE 1 (bases 1
 to 2105299)
 AUTHORS Santi, M., Egan, S.A., Leigh, J.A., Verner-
 Jefferys, D.W. and Blanchard, A.M.
 TITLE Complete Genome Sequence of *Streptococcus*
agalactiae strain 01173 isolated from Kuwaiti wild fish
 JOURNAL Unpublished
 REFERENCE 2 (bases 1 to 2105299)
 AUTHORS Santi, M., Egan, S.A., Leigh, J.A., Verner-
 Jefferys, D.W. and Blanchard, A.M.
 TITLE Direct Submission
 JOURNAL Submitted (23-APR-2020) Veterinary Medicine and
 Science, University of Nottingham, College Road, Sutton
 Bonington, Loughbrough, England LE12 5RD, United Kingdom

1779001ccgaagtata ataacgttct accaataaaa gataaatatg gtttcatcat
 tcttctttaa 1779061attaatcatg gtattggtcc aaaatccatc aattggtaac
 tggacttcaa gacgtaattg 1779121gtctttttct tgatattgctc taattctcc
 cttatggcgt tccacgattg ctttagcaat 1779181agataagcct aga ccaaaac
 tgagagaatc tgcattgatca tctttagcct gataaaaacg 1779241ctcaaagaga
 ttatccataa cctctttgga atagatagca cttggatttg atattgtcag
 1779301aatagctttt cttcgagcct gtttaagact aaactggatt gctgattttg
 acaaagaatg 1779361cctaataagca ttatccaaaa gaattattaa aatttgctta
 atttgactct cttctccaac 1779421aatccagaca tcatcttcaa ttgtatcatt
 taaacatttt tcttcttcat atgccaaact 1779481ttcatatggt agaagtactt
 cttgacataa gacagataag tttaactttt tgaattttac 1779541cttggagcgt
 ttttcatcaa gtctagacaa attaagcaaa tcttcaatta aaaactccat
 1779601tcgcttagtc tccgaacaa catgatccag ataacgattt cctggaattt
 gctgttccag 1779661aacctgaacg ttggctcgta tagctgcaat aggggtcttc
 agctcatgac tcgcatctga 1779721aacgaactgt ttttcgagag tcatttctgt

```
ctctacaggc cctacgataa atcgagaaag 1779781ataaagactt acagctgcta
ataaacaaaa tccaaaaata gtaaaaacaa gaatgagaaa 1779841acgccttgca
taagggactt cataactagc caaatccata atagctatgg tgtaagtttt
```

Fuente:[https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/CP053027.1?report=genbank&log\\$=nucl align&blast_rank=14&RID=U6200XUG013](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/CP053027.1?report=genbank&log$=nucl%20align&blast_rank=14&RID=U6200XUG013)

HOUSEKEEPING GENE:

Factor de elongación 1 alpha (EF-1 α):

LOCUS KJ12368 687 bp mRNA linear VRT 11-JUN-2014

DEFINITION *Oreochromis niloticus* elongation factor 1a (EF-1a) mRNA, partial cds.

ACCESSION KJ123689 VERSION KJ123689.1

SOURCE *Oreochromis niloticus* (Nile tilapia) ORGANISM

[Oreochromis niloticus](#)

REFERENCE 1 (bases 1 to 687)

AUTHORS He,A.Y., Liu,C.Z., Chen,L.Q., Ning,L.J., Zhang,M.L., Li,E.C. and Du,Z.Y.

TITLE Identification, characterization and nutritional regulation of two isoforms of acyl-coenzyme A oxidase 1 gene in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*)

JOURNAL Gene 545 (1), 30-35 (2014)

PUBMED [24802117](#)

REFERENCE 2 (bases 1 to 687) AUTHORS He,A., Du,Z. and Chen,L.

TITLE Direct Submission

JOURNAL Submitted (07-JAN-2014) School of Life Science, East China Normal University, 500 Dong Chuang Rd, Shanghai, Shanghai 200241, China

ORIGIN

```
1 tttgaggagg aagccgctga gatgggaaag ggctccttca agtacgcctg
ggtgctggac
61 aaactgaagg ctgagcgtga gcgtggtatc accatcgata tcgctctgtg gaagtctgag
121 accagcaagt actacgtgac catcattgat gccctggac acagagactt catcaagaac
181 atgactactg gtacctcca ggctgactgc gctgtgctga tcgttgctgc tgggtgtgga
241 gagttcgagg ctggtatctc caagaacggc cagaccctg agcacgctct gctggccttt
301 accctgggtg tgaagcagct catcgttgga gtcaacaaga tggactccac cgagcccccc
361 tacagccagg ctcgtttcga ggaaatcacc aaggaagtga gcgcctacat caagaagatc
421 ggctacaacc ctgccgccgt tgccttcgtc cccatctccg gatggcacgg agacaacatg 481
ctggagacca gtgacaagat gagctggttc aagggatgga agattgagcg caaggagggc
541 aatgcctctg gaaccaccct gctggaggct ctggatgcca tcttgccacc ttcccccccc 601
actgacaagc cctccgtct gccctgcag gacgtctaca agattggcgg tatcgggaact 661
gtaccctcgc gtcgtgttaa aactggt
```

Fuente:[https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/KJ123689.1?report=genbank&log\\$=nucl align&blast_rank=2&RID=TBGMPN4P013](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/KJ123689.1?report=genbank&log$=nucl%20align&blast_rank=2&RID=TBGMPN4P013)

INMUNOGLOBULINAS:**Inmunoglobulina T (IgT):**

LOCUS KP685367 1344 bp mRNA linear VRT 29-JUN-2015
 DEFINITION *Oreochromis niloticus* immunoglobulin tau heavy chain secretory form mRNA, complete cds.

ACCESSION KP685367 VERSION KP685367.1
 SOURCE *Oreochromis niloticus* (Nile tilapia) REFERENCE 1
 (bases 1 to 1344)
 AUTHORS Velázquez. and Estrada, M.P.
 TITLE Molecular cloning of the novel tilapia (*Oreochromis niloticus*) immunoglobulin T heavy chains JOURNAL Unpublished
 REFERENCE 2 (bases 1 to 1344)
 AUTHORS Velazquez, J. and Estrada, M.P. TITLE Direct Submission
 JOURNAL Submitted (16-JAN-2015) Animal Biotechnology Department, Center for Genetic Engineering and Biotechnology, Ave. 31 e158 y 190, Cubanacan, Havana 10600, Cuba

ORIGIN

```

1 atgatggact gtaggacag actgctgctt ttaactgttt gctgggcagg tggatgatag
61 cagactctga ctgagtctga accagtgggt aaaagacctg gagaatccca cacactgacc
121 tgtacagcct ctggctttac attcagtgcac tactggatgg cctggggtcag acaggcacct
181 ggaaaagcat tagagtgggt tgcgaacatc agatatgaca gtgcttacat ctattattct
241 cagtcagtcc aaggccgggt caccatctcc agagacaaca gcaaacagca gctgtatctg
301 cggatgaaca gtctgaacac tgaagattct gctgtttatt attgtttaaa caagatggac
361 tgtaggacag tgctgctgct tttgactgtc ttctgtgcag aggggtttga gcagaatcca
421 actgttaata caacagttat tccctcttct gacggcacca atatcacctc atgcgttggtg
481 aaagaatttg taccaaagaa acatgacctc aaatggctga aaaacggaaa agacatcacc
541 agcgaatatag atctgccggt taaagttttg acttcagttt ctgaatcaag aaaggatgga 601
aagaaggtgt aactgcaga aagttttctc gcagtaaatt ccagtgatgt gaatgcagac 661
actgaattca cttgtgtggt aacgggagag caaaatgcat ctttgaataa acctgacaga 721
gacaaccag tagcagatgt ttccataact gcagatctga caaacaggcc aacaatggca 781
gtctacatcc tcccacagca gcaaaccgac ccatataagc ctgatgaaat cactctgggtg 841
tgtctgggtc ccagtactgt ggatgagaca tataaaatcg aatggtcaga aatgtctgaa 901
aagacacaag gaccttatgc tacagccacc gacgtccctg cacagcagag caaaaatgac 961
cagaaatggc gaagtatgag tctttacacc accagtaagg caaactggga caaaaaacat 1021
ccaacaaaa tgttcacctg ccgtgtcaga gtcggacata aaaatatttc aaaagcagtg 1081
tctaattgcc atggtaattc cagagaatgt gactgtaact actaagcttt aaatgtgata 1141
ttttgtgctt gtgtcattct ttgtctgtga cagttttcta tatgaaaaga tgtgcacttg 1201
tgatgtcagt cactgtgaga caaaatgttt gttttgttgt catcatggtt ttgttcagcc
1261 tgtctgagtc acagtgtcca attgctttta tgtgtgctgt ctgtttgaaa
taaacggttc 1321 atggaaaaaa aaaaaaaaaa aaaa

```

Fuente: [https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/KP685367.1?report=genbank&log\\$=nuclalign&blast_rank=1&RID=GVMJTJ8WR013](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/KP685367.1?report=genbank&log$=nuclalign&blast_rank=1&RID=GVMJTJ8WR013)

Inmunoglobulina M (IgM):

LOCUS KC677037 1921 bp mRNA linear VRT 19-FEB-2019
 DEFINITION *Oreochromis niloticus* IgM heavy chain secreted form mRNA, complete cds.

ACCESSION KC677037 VERSION KC677037.1
 SOURCE *Oreochromis niloticus* (Nile tilapia) REFERENCE 1
 (bases 1 to 1921)
 AUTHORS Srisapoome, P., Phuyindee, C. and Unajak, S.

TITLE Molecular Characterization and Diversity Analysis of Variable Regions of Complementary DNA of Immunoglobulin M Heavy Chain Genein Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*)

JOURNAL Unpublished

REFERENCE 2 (bases 1 to 1921)

AUTHORS Srisapoome,P., Phuyindee,C. and Unajak,S. TITLE Direct Submission

JOURNAL

Submitted (22-FEB-2013) Fisheries, Kasetsart University, Wong Wan Rd, Lat Yao Chatuchak, Bangkok, Bangkok 10900 Th

ORIGIN

```

1 atggggacac caatgtggac cgggcagaga caaatggctc ctacaatgaa ccatccagcg
61 ttgacggctg ttattcttgt cctgtcagtt tactgggttg gtactggggg tcaaacattg
121 acagagtctg aatcagtggt taaacagcct ggacaattcc acagactgac ctgtacatac
181 tcagggttca gtggtgatat ctatgctaac tggatcagac aggctgcagg aaaaggactg
241 gaatggatcg cttatatcag tcatagtagt agcaagtact actctcagtc agtcagaggc
301 cggttcacca tctccagaga caacagcaga aagcaggtgt atctgcagat gaacagcttg
361 acgactgagg attcagctgt ttattattgt gttcgatata gtgattactt tgactactgg
421 ggaaaagggg caactgtgac tgtcacaaca gccacttcaa ctgcaccacac tgtgtttcct
481 ctggtaccat gtggttctga gactggagat atggctactc ttggctgcct tgccaccgga
541 tttaaccctc ctgcggtgac tttctcgtgg accaaaggcg gcgctgcctt gacagacttc 601
atccagtacc ctgcagtaca gaaaggcaat gtttatactg gagtcagtca agtccgagtg 661
aggagacagg actggaatgc acaacagaat ttacaatgtg ctgtgactca cgctgctggg 721
aatgcacaga ctattgtcac accaccacca ccaccaccac cgccatttaa gcagaatccg 781
actcttaaag cgttttcctc ctcttctgat gaggatgata cctatactgc ctctgcttt 841
gccaaagagt ttgcaccaa gacacataac ttaaaatggc agaaaaacgg agtagacgtc 901
gccagcacia tagatctgac cgaatcgaaa aatgcggctg gaaaaacact gtacaatgca 961
gcaagttttc tcacagtaaa ttccagtgac ctgaatgatc agactagatt tacatgtgtg 1021
tttactggag gagaagatgg atctttgaat aaaactgtca tttaaaaaa gaaccaatg 1081
cctggttgtg ttacatctaa tgtgaaagta gtaatcagtg gccccacaac tgaggacatg 1141
cttgtccgta aaaaaggaa tataacatgt gcagtcacag taaaaaaga tgaaccccaa 1201
ataacctggg aggatgagaa actaggggac atagcaagta acccagtcac taaagtcgaa 1261
gacaatggga atacatacgt gtctaagctt gacatcacct atgacgaatg gaccaggggg 1321
gtaacacgct tctgtgttgt tcaccacgaa gatttgattg agcctttgag ggaaccgtat 1381
aaaagggatt ttggaggaaa ccctcagcgt ccgtcagtggt ttatgctccc tcctttagaa 1441
caaactaaca aagcagaggt gaccctgact tgttttgtga aagacttctt ccctaaggag 1501
gtttttgtgt cttggcttgt ggatgacgag gaagcagact caatttatgc ttttaatacc 1561
acagaaccca ttgaaaacaa tggattttat tctgcttatg gccagttatt tgtcagcctt 1621
caccagtggc aaagggatga tgctgtctat agctgtgtag tgtaccacga atctgtgggt 1681
aacacaacta gagctattgt caggtccatt gggtagacaga catttgacaa aaaccgcatt 1741
gacctcaaca tgaacatcaa ccaagactcc aagtgtctgc tccagtagat gtttctcatg 1801
tctctgtctg ctgtttgttc tttaatgtct gttgcttgtg atatgacatt gtgtttgtgt 1861
gttttaatgc agattcaaaa taaaaaaaaa aaaacaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 1921 a

```

Fuente: [https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/KC677037.1?report=genbank&log\\$=nucleotide&blast_rank=5&RID=GVN8RJP01R](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/KC677037.1?report=genbank&log$=nucleotide&blast_rank=5&RID=GVN8RJP01R)

C. Anexo: Salida R

```

setwd("C:/Users/Esperanto/Desktop") library(readxl)
library brary(ggplot2) library(dplyr) ##
## Attaching package: 'dplyr'
## The following objects are masked from 'package:stats': ##
## filter, lag
## The following objects are masked from 'package:base': ##
## intersect, setdiff, setequal, union #####
lgM <- read_excel("2`delta delta Ct.xlsx", sheet = "lgMc")
lgT <- read_excel("2`delta delta Ct.xlsx", sheet = "lgTc")

##### Modelo 1 #####
a<-aggregate(`2`ΔΔCt`~ Muestra, data=lgM, mean) std.error <- function (x) sd (x) / sqrt (
length (x))
b<-aggregate(`2`ΔΔCt`~ Muestra, data=lgM, std.error) c<- data.frame(a,b[,-1])
colnames(c)<- c("Muestra", "Promedio", "SEM") c$upp<-a$`2`ΔΔCt`+b$`2`ΔΔCt`
c$low<-a$`2`ΔΔCt`-b$`2`ΔΔCt`
at<-aggregate(`2`ΔΔCt`~ Muestra, data=lgT, mean) std.error <- function (x) sd (x) / sqrt (
length (x))
bt<-aggregate(`2`ΔΔCt`~ Muestra, data=lgT, std.error) ct<- data.frame(at,bt[,-1])
colnames(ct)<- c("Muestra", "Promedio", "SEM") ct$upp<-at$`2`ΔΔCt`+bt$`2`ΔΔCt`
ct$low<-at$`2`ΔΔCt`-bt$`2`ΔΔCt`
c$Muestra<-factor(c$Muestra, levels = c("C", "IP", "INM", "IG")) ggplot(c, aes(x =Muestra ,
y =Promedio)) +geom_col() +
geom_errorbar(aes(ymin = low,ymax = upp), position = "dodge", color = "#75838F", width
= 0.15)+ ylab("2`ΔΔCt")+ labs(title = "lgM")+ theme_light().
ct$Muestra<-factor(ct$Muestra, levels = c("C", "IP", "INM", "IG")) ggplot(ct, aes(x =Muestra
, y =Promedio)) +
geom_col() + geom_errorbar(aes(ymin = low,ymax = upp), position = "dodge", color =
"#75838F", width = 0.15)+ ylab("2`ΔΔCt")+ labs(title = "lgT")+ theme_light

```

Bibliografía

- Agnew, W.; Barnes, A.C. (2007). *Streptococcus iniae*: An aquatic pathogen of global veterinary significance and a challenging candidate for reliable vaccination. *Vet. Microbiol* 122, 1–15.
- Akhlaghi, M., Munday, B. L., & Whittington, R. J. (1996). Comparison of passive and active immunization of fish against streptococcosis (enterococcosis). *Journal of Fish Diseases*, 19(3), 251-258.
- Amal MN, Zamri-Saad M, Siti-Zahrah A, Zulkafli AR. (2013) Transmission of *Streptococcus agalactiae* from a hatchery into a newly established red hybrid tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.) × *Oreochromis mossambicus* (Peters), farm. *J Fish Dis*. Aug;36(8):735-9. doi: 10.1111/jfd.12056. Epub 2013 Jan 24. PMID: 23347250.
- Austin, B., & Austin, D. (1985). Bacterial pathogens of fish. A review. *J. Appl. Bacteriol.*, 58: 483- 506.
- Baya, A.M., Navarro, R.B., and Kotopoulis, E. (1996). Streptococcal infections of hybrid striped bass and tilapia. AES Technical Session 1: Open Papers.
- Bell, J., (2002). Cellular cytotoxicity: complex killing. *Nat. Rev. Immunol.* 2 (5), 301.
- Bercovier H, Ghittino C and Eldar A. (1997). Immunization with bacterial antigens: infections with *Streptococcus* and related organisms. *Fish Vaccinology*. 90:153-160
- Berridge, B. R., Bercovier, H., & Frelier, P. F. (2001). *Streptococcus agalactiae* and *Streptococcus difficile* 16S–23S intergenic rDNA: genetic homogeneity and species-specific PCR. *Veterinary Microbiology*, 78(2), 165-173
- Bland, F., McIntosh, R., Bain, N., Snow, M., (2012). Development and validation of a range of endogenous controls to support the implementation of practical Taqman realtime PCR-based surveillance for fish diseases within aquaculture. *J. Fish Dis*. 35, 447–454
- Bondad-Reantaso M.G., Subasinghe R.P., Arthur J.R., Ogawa K., Chinabut S., Adlard R., Tan Z., Shariff M. (2005). Disease and health management in Asian aquaculture. *Vet Parasitol*. 132:249–272
- Boomker, J.; Imes, G.D.Jr.; Cameron, C. M.; Naude, T.W., and Schoonbee, H.J. (1979). Trout mortalities as a result of *Streptococcus* infection. *Onderstepoort J. Vet. Res*, 46: 71-77.
- Bowater, R., Forbes- Faulkner, J., Anderson, I., Condon, K., Robinson, B., Kong, F., McPherson, G. (2012). Natural outbreak of *Streptococcus agalactiae* (GBS) infection in wild giant Queensland grouper, *Epinephelus lanceolatus* (Bloch), and other wild fish in northern Queensland, Australia. *Journal of fish diseases*, 35(3), 173-186.
- Bowden, T., Bricknell, I., Ellis, A.E. (2003) Fish Vaccination, an overview. Industry report IntraFish.5-20
- Bowser, P., Wooster, G., Getchell, R., & Timmons, M. (1998). *Streptococcus iniae* infection of

- tilapia *Oreochromis niloticus* in a recirculation production facility. *Journal of the World Aquaculture Society*, 29(3), 335-339.
- Bragg, R., and Broere, J. (1986). Streptococcosis in rainbow trout in South Africa. *Bulletin of the European Association of Fish Pathologists (Denmark)*.
- Braunstein H, Tucker EB, Gibson BC. (1969). Identification and significance of *Streptococcus agalactiae* (Lancefield group B). *Am J Clin Pathol* 51:207–213 10.1093/ajcp/51.2.207
- Bromage, E., Thomas, A., & Owens, L. (1999). *Streptococcus iniae*, a bacterial infection in barramundi *Lates calcarifer*. *Diseases of Aquatic Organisms*, 36(3), 177-181.
- Bullock, G. L. (1981). Streptococcal infections of fishes. United States Department of the Interior, Fish and Wildlife Service, Fish Disease Leaflet 63:1-7.
- Bustin, S.A. (2002). Quantification of mRNA using real-time reverse transcription PCR (RT-PCR): trends and problems. *J. Mol. Endocrinol.* 29.
- Bustin, S.A., Benes, V., Nolan, T., Pfaffl, M.W., 2005. Quantitative real-time RT-PCR—a perspective. *J. Mol. Endocrinol.* 34, 597–601.
- Bustin, S. A., Benes, V., Garson, J. A., Hellemans, J., Huggett, J., Kubista, M., & Wittwer, C. T. (2009). The MIQE Guidelines: Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments.
- Caipang CMA, Lucanas JB, Lay-yag CM (2014) Updates on the vaccination against bacterial diseases in tilapia, *Oreochromis spp.* and Asian seabass, *Lates calcarifer*. *AAFL Bioflux* 7: 184–193
- Castillo, A., C. Sánchez, J. Domínguez, S.L. Kaatari & A.J. Villena. (1993). Ontogeny of IgM and IgM-bearing cells in rainbow trout. *Dev. Comp. Immunol.* 17: 419-424.
- Castro, C.D., & Flajnik, M.F. (2014). Putting J Chain Back on the Map: How Might Its Expression Define Plasma Cell Development?. *The Journal of Immunology*, 193, 3248 - 3255.
- Ceschia, G.; Giorgetti, G.; Giavenni, R., & Sarti, M. (1992). A new problem for italian trout farms: *Streptococcosis* in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Bull. Eur. Assoc. Fish Pathol.*, 2: 71-72.
- Chang, P., & Plumb, J. (1996). Histopathology of experimental *Streptococcus sp.* infection in tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.), and channel catfish, *Ictalurus punctatus* (Ratinesque). *Journal of fish diseases*, 19(3), 235-241.
- Chen, S.L., Li, W., Meng, L., Sha, Z.X., Wang, Z.J., Ren, G.C.(2007). Molecular cloning and expression analysis of a hepcidin antimicrobial peptide gene from turbot (*Scophthalmus maximus*). *Fish Shellfish Immunol.* 22, 172–181
- Chen, M., Li, L. P., Wang, R., Liang, W. W., Huang, Y., Li, J. & Gan, X. (2012). PCR detection and PFGE genotype analyses of streptococcal clinical isolates from tilapia in China. *Veterinary microbiology*, 159(3-4), 526-530
- Chistiakov, D. A., Bobryshev, Y. V., Kozarov, E., Sobenin, I. A., & Orekhov, A. N. (2015). Intestinal mucosal tolerance and impact of gut microbiota to mucosal tolerance. *Frontiers in microbiology*, 5, 781.
- De Alba Aguayo, David R., & Rueda, Angelica. (2013). Problema bioquímico: Determinación del ciclo umbral y la eficiencia para la PCR cuantitativa en tiempo real. *REB. Revista de educación bioquímica*, 32(1), 36-39.
- De La Rosa M, D. C. M. (2004). *Streptococcus agalactiae*. *Control Calidad SEIMC*.

- http://www.seimc.org/control/revi_Bacte/agalac.htm
- Delannoy, C.M., Crumlish, M., Fontaine., M.C., Pollock, J., Foster, G., Dagleish, M. P., Zadoks, R.N. (2013). Human *Streptococcus agalactiae* strains in aquatic mammals and fish. *BMC microbiology* 13(1), 1
- Deloffre, L. A., Andrade, A., Filipe, A. I., & Canario, A. V. (2012). Reference genes to quantify gene expression during oogenesis in a teleost fish. *Gene*, 506(1), 69-75.
- Domeénech, A., Derenaáandez- Garayzábal, J., Pascual, C., Garcia, J., Cutuli, M., Moreno, M., Dominguez, L. (1996). Streptococcosis in cultured turbot, *Scophthalmus maximus* (L.), associated with *Streptococcus parauberis*. *Journal of fish diseases*, 19(1), 33-38
- Du, Y., Tang, X., Zhan, W., Xing, J., & Sheng, X. (2016). Immunoglobulin tau heavy chain (IgT) in flounder, *Paralichthys olivaceus*: Molecular cloning, characterization, and expression analyses. *International journal of molecular sciences*, 17(9), 1571.
- Duarte R.S., Miranda O., Bellei B.c., Brito V. And Teixeira L.M. (2004). Phenotypic and molecular characteristics of *Streptococcus agalactiae* isolates recovered from milk of dairy cows in Brazil. *J. Clin. Microbiol.* 42: 4214-4222.
- Duremdez, R., Al- Marzouk, A., Qasem, J., Al- Harbi, A., & Gharabally, H. (2004). Isolation of *Streptococcus agalactiae* from cultured silver pomfret, *Pampus argenteus* (Euphrasen), in Kuwait. *Journal of fish diseases*, 27(5), 307-310.
- Eldar, A., Bejerano, Y. and Bercovier, H. (1994). *Streptococcus shiloi* and *Streptococcus difficile*: two new streptococcal species causing a meningoencephalitis in fish. *Current Microbiology* 28:139-143.
- Eldar, A., Bejerano, Y., Livoff, A., Horovitz, A., & Bercovier, H. (1995). Experimental streptococcal meningo-encephalitis in cultured fish. *Veterinary Microbiology*, 43(1), 33-40.
- Eldar, A., and Guittino, C. (1999). *Lactococcus garviae* and *Streptococcus iniae* infections in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*: similar, but different diseases. *Dis. Aquat. Org.*, 36: 227-231.
- Evans, J.J., Shoemaker, C.A., & Klesius, P.H. (2000), Experimental *Streptococcus iniae* infection of hybrid striped bass (*Morone chrysops* x *Morone saxatilis*) and tilapia (*Oreochromis niloticus*) by nares inoculation. *Aquaculture*, 189, 197-210.
- Evans, J.J., Klesius, P.H., Gilbert, P.M., Shoemaker, C.A., Sarawi, M.A., Landsberg, J., Duremdez, R., Marzouk, A. Al. and Zenki, S. Al. (2002). Characterization of β -haemolytic group B *Streptococcus agalactiae* in cultured seabream, *Sparus auratus* L., and wild mullet, *Liza klunzingeri* (Day), in Kuwait. *Journal fish diseases* 25:505-513
- Ferguson, H. W. (1989). *Systemic Pathology of Fish. En A text and atlas of comparative tissue responses in diseases of Teleosts.* Iowa State University Press. Pags.: 64- 103
- Filby, A. L., & Tyler, C. R. (2007). Appropriate 'housekeeping' genes for use in expression profiling the effects of environmental estrogens in fish. *BMC molecular biology*, 8(1), 1-13.
- Fry, R.M. (1938). Fatal Infections by Haemolytic *Streptococcus* Group B. *Lancet* 1:199-201
10.1016/S0140-6736(00)93202-1
- Fu, Y., Li, S., Wu, Y. y Chang, Y. (2007). Identification and expression analysis of hepcidinlike cDNAs from pigeon (*Columba livia*). *Mol Cell Biochem.* 305: 191-197
- Furfaro, L. L., Chang, B. J., & Payne, M. S. (2017). A novel one-step real-time multiplex PCR assay to detect *Streptococcus agalactiae* presence and serotypes Ia, Ib, and III. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 89(1), 7-12.

- Gambón, F.; Sánchez, C.; Magadan, S. (2010). Presence of an unique IgT on the IGH locus in three-spined stickleback fish (*Gasterosteus aculeatus*) and the very recent generation of a repertoire of VH genes. *Dev. Comp. Immunol.* 34, 114–122.
- Gao, Y., Yi, Y., Wu, H., Wang, Q., Qu, J., Zhang, Y. (2014). Molecular cloning and characterization of secretory and membrane-bound IgM of turbot. *Fish Shellfish Immunol.* 40, 354–361.
- Geven, E., Klaren, P. (2017). The teleost head kidney: Integrating thyroid and immune signalling. *Developmental & Comparative Immunology*, Volume 66, Pages 73-83, ISSN 0145-305X .<https://doi.org/10.1016/j.dci.2016.06.025>.
- Gibson, R.L., Nizet, V., Rubens, C.E. (1999). Group B streptococcal beta-hemolysin promotes injury of lung microvascular endothelial cells. *Pediatric Research* 45:626–634
- Graves, S.S., D. Evans & D.L. Dawe. (1985). Antiprotozoan activity of nonspecific cytotoxic cells from the channel catfish. *J. Immunol.* 13:478-85.
- Greenlee, A.R., R.A. Brown & S.S. Ristow. 1991. Nonspecific cytotoxic cells of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) kill YAC-1 targets by both necrotic and apoptotic mechanisms. *Dev. Comp. Immunol.* 15:153-164.
- Hardie, J. (1986). Genus *Streptococcus* Rosenbach. In: Sneath, P.; Mair, N.; Sharpe, M., and Holt, J. (eds). *Bergey's manual of systematic bacteriology*. Vol. 2. Williams and Wilkins Co., Baltimore, p 1043-1047
- Heid, C. A., Stevens, J., Livak, K. J., and Williams, P. M. (1996). *Genome Res.* 6, 986–994.
- Hernández EA. 2005. Caracterización epidemiológica, microbiológica e inmunohistoquímica de la Streptococosis en tilapias (*Oreochromis sp.*) en un brote natural de la enfermedad. Tesis de grado Médico Veterinario. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá.
- Hernández, E., Figueroa, J., & Iregui, C. (2009). Streptococcosis on a red tilapia, *Oreochromis sp.*, farm: a case study. *Journal of fish diseases*, 32(3), 247-252.
- Hernández, A., Martín Vasallo, P., Torres Ramírez, A., & Salido, E. (1994) RNA analysis: The study of genic expression. *NEFROLOGIA* 14: 145-162.
- Hoshina T., Sano T. and Morimoto T. 1958. A *Streptococcus* pathogenic to fish. *Journal Tokyo University Fish* 44: 57-68
- ICA. Protección sanitaria de los peces acuícolas. Instituto Colombiano de Agricultura. Recuperado 2 de octubre del 2022 de <https://www.ica.gov.co>
- ICA. (2023). Resolución 6535 de 2023. “Por la cual se declara el Estado de Emergencia Sanitaria en el territorio nacional por la presencia de *Streptococcus Agalactiae* ST7 serotipo Ia”. <https://www.ica.gov.co/getattachment/7e70025e-4aac-4a21-8ab0-2be6dcaa48b6/2023R00006535.aspx>
- Iregui, C., Barato, P., Rey, A., Vasquez, G., and Verjan, N. (2013). Epidemiology of *Streptococcus agalactiae* and Streptococcosis in Tilapia Fish.
- Iregui, C., Comas, J., Vásquez, G., & Verján, N. (2016). Experimental early pathogenesis of *Streptococcus agalactiae* infection in red tilapia *Oreochromis spp.* *Journal of fish diseases*, 39(2), 205-215.
- Jiménez, A., Rey, A., Penagos, L., Ariza, M., Figueroa, J., and Iregui, C. (2007). Estado actual de la estreptococosis en tilapias cultivadas en Colombia. *Revista Medicina Veterinaria Zootecnia* 54, 120-123.

- Jiménez, A.P. (2010). Detección de *Streptococcus agalactiae* por PCR en Tejidos de Tilapias rojas (*Oreochromis spp.*) menores de 20g. Universidad Nacional de Colombia.
- Jones, H., Everley and Howells, C.H.L. (1968) Neonatal meningitis due to *Streptococcus agalactiae*. Postgraduate Medical Journal, 44, 549
- Killie, J.E., S. Espelid & T. Jorgessen. (1991). The humoral response in atlantic salmon (*Salmo salar* L.) against the hapten carrier NIP-KLH; the effect of determinant (NIP) density and the isotype profile of anti-NIP antibodies. Fish Shellfish Immunol. 1:33-46.
- Kim MS, Choi SH, Lee EH, Nam YK, Kim SK, Kim KH. (2007). α -enolase, a plasmin(ogen) binding protein and cell wall associating protein from a fish pathogenic *Streptococcus iniae* strain. Aquaculture. 265: 55-60.
- Kitao, T. 1993. Streptococcal infections. In: Inglis, V.; Roberts, R., and Bromage, N. (eds) Bacterial diseases of fish. Blackwell, Oxford, p 196-210.
- Klesius, P., Evans, J., Shoemaker, C., Yeh, H., Goodwin, A., Adams, A., & Thompson, K. (2006). Rapid detection and identification of *Streptococcus iniae* using a monoclonal antibody-based indirect fluorescent antibody technique. Aquaculture 258(1), 180-186
- Knudsen CR, Clark BFC, Degn B, Wiborg O. One-step purification of E. coli elongation factor. Tu Biochem Int. 1992;28:352–362.
- Koumans-van Diepen, J.C.E., M.H.M. van de Lisdonk, A.J.L. Taverne-Thiele, B.M. Verburg-van Kemenade & J.H.W.M. Rombout. (1994). Characterization of immunoglobulin-binding leucocytes in carp (*Cyprinus carpio* L.) Dev. Comp. Immunol. 18:45-56.
- Kvitt, H., and Colorni, A. (2004). Strain variation and geographic endemism in *Streptococcus iniae*. Diseases of Aquatic Organisms 61:67-73
- Lancefield, R.C. (1933). A Serological Differentiation of Human and Other Groups of Hemolytic Streptococci. J Exp Med 57:571–595 10.1084/jem.57.4.571.
- Lancefield RC, Hare R. (1935). The Serological Differentiation of Pathogenic and Non-Pathogenic Strains of Hemolytic Streptococci from Parturient Women. J Exp Med 61:335–349 10.1084/jem.61.3.335
- Lee, J., Kim, Y. H., Kim, K., Kim, D., Lee, S. H., & Kim, S. (2022). Selection of stable reference genes for quantitative real-time PCR in the Varroa mite, *Varroa destructor*. Archives of Insect Biochemistry and Physiology, 110(3), e21905.
- Lindahl, G., Stålhammar-Carlemalm, M., & Areschoug, T. (2005). Surface proteins of *Streptococcus agalactiae* and related proteins in other bacterial pathogens. Clinical microbiology reviews, 18(1), 102-127.
- Lopardo Horacio A, Predari Silvia C, Vay Carlos. (2018). Manual de Microbiología de la Asociación Argentina de Microbiología. Asociación Argentina de Microbiología. 300pp
- Maekawa, S.; Wang, Y.-T.; Yoshida, T.; Wang, P.C.; Chen, S.-C. (2020) Group C *Streptococcus dysgalactiae* infection in fish. J. Fish Dis. 43, 963–970.
- Mannik M, Baringer JR, Stokes J III. (1962). Infections due to group B beta-hemolytic streptococci. Report of three cases and review of the literature. N Engl J Med 266:910–913 10.1056/NEJM196205032661803
- Marchalonis, J., & Edelman, G. M. (1966). Polypeptide chains of immunoglobulins from the smooth dogfish (*Mustelus canis*). Science, 154(3756), 1567-1568.
- Mata A.I., Gibello A., Casamayor A., Blanco M., Domínguez L. and Garayzábal F. (2004).

- Multiplex PCR assay for detection of bacterial pathogens associated with warm-water streptococcosis in fish. *App. Environ. Microbiol.* 70: 3183-3187.
- Matejusova, I., McKay, P., McBeath, A. J., Collet, B., & Snow, M. (2008). Development of a sensitive and controlled real-time RT-PCR assay for viral haemorrhagic septicaemia virus (VHSV) in marine salmonid aquaculture. *Diseases of Aquatic Organisms*, 80(2), 137-144.
- McPherson, M. J., Hames, B. D., & Taylor, G. R. (2008). *PCR a Practical approach*. First Edition edn. Oxford University Press Oxford. <https://www.redalyc.org/pdf/636/63617114013.pdf>
- Mian, G., Godoy, D., Leal, C., Yuhara, T., Costa, G., and Figueiredo, H. (2009). Aspects of the natural history and virulence of *S. agalactiae* infection in Nile tilapia. *Veterinary Microbiology*, 136(1), 180-183.
- Michel, C.; Nougayrède, P.; Eldar, A.; Sochon, E., and Kinkelin, de P. (1997). *Vagococcus salmoninarum*, a bacterium of pathological significance in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* farming. *Dis. Aquat. Org.*, 30: 199-208.
- Miller, N.W., R.C. Sizemore & L.W.Clem. (1985). Phylogeny of lymphocyte heterogeneity: the cellular requirements for in vitro antibody responses of channel catfish leukocytes. *J. Immunol.* 134:2884-2888.
- Mirete-Bachiller, S., Olivieri, D. N., & Gambón-Deza, F. (2021). Immunoglobulin t genes in actinopterygii. *Fish & Shellfish Immunology*, 108, 86–93.
- Muzquiz, J.L., Royo, F.M., Ortega, C., De Blas, I., Ruiz, I., and Alonso, J.L. (1999). Pathogenicity of streptococcosis in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): dependence on age of diseased fish. *Bulletin-European Association Of Fish Pathologists*, 19, 114-119.
- Nakanishi T, Ototake M. (1997). Antigen uptake and immune responses after immersion vaccination. *Dev Biol Stand*; 90:59–68
- Negrutskii BS, El'skaya AV (1998) Eukaryotic translation elongationfactor 1 alpha: structure, expression, functions, and possible role in aminoacyl-tRNA channeling. *Prog Nucl Acid Res Mol Biol* 60:47–78
- Nguyen HT, Kanai K y Yoshikoshi K. (2002). Ecological investigation of *Streptococcus iniae* in cultured Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*) using selective isolation procedures. *Aquaculture*. 205: 7-17.
- Nieto, J., Devesa, S., Quiroga, I., and Toranzo, A. (1995). Pathology of *Enterococcus* sp. infection in farmed turbot, *Scophthalmus maximus* L. *Journal of fish diseases*, 18(1), 21-30.
- Nobbs, A.H., Lamont, R.J., and Jenkinson, H.F. (2009). *Streptococcus* adherence and colonization. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 73(3), 407-450
- Noga E.J., Silphaduang, U.(2001) Peptide antibiotics in mast cells of fish. *Nature*; 414:268-269.
- Noraini O, Sabri MY, Siti-Zahrah A (2013) Efficacy of spray administration of formalin-killed *Streptococcus agalactiae* in hybrid red tilapia. *J Aquat Anim Health* 25: 142–148
- Nordmo, R., Ramstad, A. (1997). Comparison of different challenge methods to evaluate the efficacy of furunculosis vaccines in Atlantic salmon, *Salmo salar* L. *J. Fish Dis.*; 20: 119–126.
- Ohlander, C., Perlmann, H., Perlmann, P., (2010). Regulation of IgG-IgM interplay by antibody specificity in human K-cell-mediated cytotoxicity. *Scand. J. Immunol.* 15 (4), 409–417

- Ohnishi, K & Jo, Y. (1981). Studies on streptococcal infection in pond-cultured fishes-I. Characteristics of a beta-hemolytic streptococcus isolated from cultured ayu and amago in 1977-1978. *Fish Pathology*, 16: 63-67.
- Olabuenaga, S.E. (2000). Sistema inmune en peces. *Gayana (Concepción)*, 64(2), 205-215. <https://dx.doi.org/10.4067/S0717-65382000000200010>
- Paredes, A., Wong, P., and Yow, M.D. (1976). Failure of penicillin to eradicate the carrier state of group B streptococcus in infants. *Journal of Pediatrics* 89, 191.
- Parra, D., Takizawa, F., Sunyer, J.O., 2013. Evolution of B cell immunity. *Annu. Rev. Anim.Biosci.* 1 (1), 65–97
- Penagos, G., Barato, P., & Iregui, C. (2009). Sistema inmune y vacunación de peces. *Acta Biológica Colombiana*, 14(1), 3-24.
- Perera, R.P., Johnson, S.K., Collins, M.D., and Lewis, D.H. (1994). *Streptococcus iniae* associated with mortality of Tilapia nilotica x T. aurea hybrids. *Journal of Aquatic Animal Health*, 6(4), 335-340.
- Perera, R.P., Johnson, S.K., and Lewis, D.H. (1997). Epizootiological aspects of *Streptococcus iniae* affecting tilapia in Texas. *Aquaculture*, 152 (1), 25-33.
- Plumb, J., Schachte, J., Gaines, J., Peltier, W., & Carroll, B. (1974). *Streptococcus sp.* from marine fishes along the Alabama and northwest Florida coast of the Gulf of Mexico. *Transactions of the American Fisheries Society*, 103(2), 358-361
- Poppert S., Nickel D., Berger A., Yildiz T., Kaestner N., Mauerer S. and Spellerberg B. (2009). Rapid identification of beta-hemolytic streptococci by fluorescence in situ hybridization (FISH). *Internat. J. of Medical Micro.* 299: 421–426.
- Pradeep, P. J., Suebsing, R., Sirthammajak, S., Kampeera, J., Jitrakorn, S., Saksmerprome, V., ... & Wityachumanarnkul, B. (2016). Evidence of vertical transmission and tissue tropism of Streptococcosis from naturally infected red tilapia (*Oreochromis spp.*). *Aquaculture Reports*, 3, 58-66.
- Preado J., Valeria. (2001). Conceptos microbiológicos de *Streptococcus pneumoniae*: Basic microbiological aspects. *Revista chilena de infectología*, 18(Supl. 1), 6-9. <https://dx.doi.org/10.4067/S0716-10182001000000002>
- Pretto-Giordano LG, Muller EE, Klesius P, da Silva VG (2010) Efficacy of an experimentally inactivated *Streptococcus agalactiae* vaccine in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) reared in Brazil. *Aquacult Res* 41: 1539–1544
- Pridgeon, J. W., & Zhang, D. (2014). Complete genome sequence of a virulent *Streptococcus agalactiae* strain, 138P, isolated from diseased Nile Tilapia. *Genome announcements*, 2(2), e00295-00214.
- Prieta, J., Doménech, A., Fernández-Garayzábal, J., Collins, M., Rodríguez, U., Jones, D., Domínguez, L. (1993). Lactococcosis de la trucha arco iris. *Medicina Veterinaria* 10, 367-373.
- Pulido, A., Figueroa, J., and Castro, C.A. (1999). Reporte de streptococcosis en tilapias cultivadas en Colombia.
- Pulido, A. (2000). Evaluación clínica y fisiopatológica de un caso de streptococcosis en la explotación de tilapia roja en la Represa de Hidroprado, Tolima. Tesis, Universidad Nacional de Colombia, Facultad. Medicina Veterinaria Zootecnia, Ibagué.
- Pulido, E., Iregui, C., Figueroa, J., and Klesius, P. (2004). Estreptococcosis en tilapias (*Oreochromis spp.*) cultivadas en Colombia. *Revista AquaTIC*, 20, 97-106

- Quinn, P.J., Markey, B.K., Leonard, F.C., Fitzpatrick, E.S., Fanning, S. (2016). Elementos de microbiología veterinaria. 2da edición. Ed. Willey- Blackwell. ISBN:9788420011868
- R Core Team. (2021). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <https://www.R-project.org/>.
- Rahl, P. B., & Young, R. A. (2014). MYC and transcription elongation. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*, 4(1), a020990.
- Rasheed, V. M. 1983 *Streptococcus sp.* infection in bullminnows (*Fundulus grandis*). PhD. dissertation. Department of Fisheries and Allied Aquacultures, Auburn University, Auburn, Alabama. 71 pp
- Robinson, J.A. & Meyer, F.P. (1966). Streptococcal fish pathogen. *Journal of bacteriology*. 92: 512
- Romalde J, Malgariños B, Nuñez S, Barja J and Toranzo A. (1996). Host range susceptibility of *Enterococcus sp.* strains isolated from diseased turbot: possible routes of infection. *Appl. Environ. Microbiol.*, 62: 607-611.
- Rubio-Godoy, M., 2010. Teleost fish immunology. Review. *Revista Mexicana de Ciencias Pecuarias* 1, 47-57.
- Ruiz, I., Fernández, A.B., De Blas, I (2003). El sistema inmune de los teleósteos (III): Respuesta inmune específica. *Revista AquaTIC*. 18:33-38.
- Russo, R., Mitchell, H., & Yanong, R. P. E. (2006). Characterization of *Streptococcus iniae* isolated from ornamental cyprinid fishes. *Aquaculture* 256, 105-10.
- Salinas, I.; Zhang, Y.A.; Sunyer, J.O. (2011). Mucosal immunoglobulins and B cells of teleost fish. *Dev. Comp. Immunol.* 35, 1346–1365.
- Salvador R, Muller EE, Freitas JC, Leonhardt JH, Pretto-Giordano LG, Dias JA. (2005). Isolation and characterization of *Streptococcus* spp. group B in Nile tilapias (*Oreochromis niloticus*) reared in hapas nets and earth nurseries in the northern region of Parana State, Brazil. *Ciencia Rural* 35(6):1374–1378.
- Savan, R.; Aman, A.; Sato, K.; Yamaguchi, R.; Sakai, M. (2005). Discovery of a new class of immunoglobulin heavy chain from fugu. *Eur. J. Immunol.* 35, 3320–3331
- Schauf, V., Deveikis, A., Riff, L., Serota, A. (1976). Antibiotic-killing kinetics of group B streptococci. *Journal of Pediatrics* 89(2):194–198.
- Shi, J. y Camus, A. C. (2006). Hecidins in amphibians and fishes: Antimicrobial peptides or iron-regulatory hormones?. *Developmental and Comparative Immunology*. 30: 746-755.
- Shoemaker, C., and Klesius, P. (1997). Streptococcal disease problems and control a review. Fitzsimmons, K.
- Shoemaker, C.A., Evans, J.J., Klesius, P.H., 2000. Density and dose: factors affecting mortality of *Streptococcus iniae* infected tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Aquaculture* 188: 229–235.
- Spellerberg, B., Rozdzinski, E., Martin, S., Weber-Heynemann, J., Schnitzler, N., Lütticken, R., and Podbielski, A. (1999). Lmb, a protein with similarities to the Lral adhesin family, mediates attachment of *Streptococcus agalactiae* to human laminin. *Infection and immunity*, 67(2), 871-878.

- Stoffregen, D.A.; Backman, S.C.; Perham, R.E.; Bowser, P.R., and Babish, J.G. (1996). Initial disease report of *Streptococcus iniae* infection in hybrid striped (sunshine) bass and successful therapeutic intervention with the fluoroquinolone antibacterial enrofloxacin. J. World Aqua. Soc., 4: 420-434.
- Su, Y., Wang, B., Zhang, Y., Ruan, Z., Bai, H., Wan, J. & Geng, H. (2019). Mass spectrometric determination of disulfide bonds and free cysteine in grass carp IgM isoforms. Fish & shellfish immunology, 95, 287-296.
- Swain P, Dash S, Bal J, Routray P, Sahoo PK, Sahoo SK, et al. (2006). Passive transfer of maternal antibodies and their existence in eggs, larvae and fry of Indian major carp, *Labeo rohita* (Ham.). Fish Shellfish Immunol; 20:519–527.
- Tamay de Dios, L., Ibarra, C., & Velasquillo, C. (2013). Fundamentos de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y de la PCR en tiempo real. Investigación en discapacidad, 2(2), 70-78.
- Teruo Miyazaki, Saburoh S. Kubota, Noboru Kaige & Toshio Miyashita. Histopathological Study of Streptococcal Disease in Tilapia. Fish Pathology 19(3), 167-172, 1984.12
- Tizard, I. 2001. The phylogeny of the immune system. In: Veterinary Immunology an introduction. W.B. Saunders Company (Ed.). Harcourt Brace Jovanovich, Inc. USA.
- Toranzo, A., Devesa, S., Heinen, P., Rianza, A., Nunez, S., & Barja, J. (1994). Streptococcosis in cultured turbot caused by an Enterococcus-like bacterium. Bulletin of the European Association of Fish Pathologists, 14(1), 19-23
- Toso, P. W., Diestro, A. D., de la Guarda, R. G., Vallejos, E. C., Herrera, A. M., de Amat Herbozo, C., Álvarez, J. M. (2013). Actividad del Complemento y de la Lisozima Sérica en juveniles de *Oncorhynchus mykiss* inmunizados con fracciones de membrana externa de una cepa nativa de *Flavobacterium psychrophilum*. REDVET. Revista Electrónica de Veterinaria, 14(1), 1-10.
- Utke, K., Bergmann, S., Lorenzen, N., Kollner, B., Ototake, M., y Fischer, U. (2007). Cell-mediated cytotoxicity in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, infected with viral haemorrhagic septicaemia virus. Fish and Shellfish Immunology. 22: 182-196
- Valasek, M. A., & Repa, J. J. (2005). The power of real-time PCR. Advances in physiology education, 29(3), 151-159.
- Vásquez, G. M. (2019). Caracterización morfológica de la adherencia e invasión de *Streptococcus agalactiae* a la mucosa intestinal de la tilapia *Oreochromis sp.*, modelo in vitro. Universidad Nacional de Colombia.
- Velázquez, J., Acosta, J., Lugo, J. M., Reyes, E., Herrera, F., González, O., Estrada, M. P. (2018). Discovery of immunoglobulin T in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*): A potential molecular marker to understand mucosal immunity in this species. Developmental and Comparative Immunology, 88(March), 124–136. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2018.07.013>
- Vendrell, D., Balcázar, J. L., Ruiz-Zarzuola, I., De Blas, I., Gironés, O., & Múzquiz, J. L. (2006). *Lactococcus garvieae* in fish: a review. Comparative immunology, microbiology and infectious diseases, 29(4), 177-198
- Wang, E., Wang, K., Chen, D., Wang, J., He, Y., Long, B., ... & Lai, W. (2015). Evaluation and selection of appropriate reference genes for real-time quantitative PCR analysis of gene expression in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) during vaccination and infection.

- International journal of molecular sciences, 16(5), 9998-10015.
- Weijland, A., Harmark, K., Cool, R. H., Anborgh, P. H. & Parmeggiani, A. (1992). Elongation factor Tu: a molecular switch in protein biosynthesis. *Mol Microbiol* 6, 683–688
- Wilkinson, H.W. (1978). Group B streptococcal infection in humans. *Annual Review of Microbiology*.1978;32:41–57
- Xu, Z.; Parra, D.; Gomez, D.; Salinas, I.; Zhang, Y.A.; Von Gersdorff Jorgensen, L.; Heinecke, R.D.; Buchmann, K.; LaPatra, S.; Sunyer, J.O. (2013).Teleost skin, an ancient mucosal surface that elicits gut-like immune responses. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 110, 13097–13102
- Yang W. & Li A. (2009). Isolation and characterization of *Streptococcus dysgalactiae* from diseased *Acipenser schrenckii*. *Aquaculture* 294: 14–17.
- Yang, C. G., Wang, X. L., Tian, J., Liu, W., Wu, F., Jiang, M., & Wen, H. (2013). Evaluation of reference genes for quantitative real-time RT-PCR analysis of gene expression in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Gene*, 527(1), 183-192.
- Yanong RP, Francis-Floyd R. (2002). Gainesville, FL: IFAS, University of Florida Streptococcal infections of fish. Florida Cooperative Extension Service; pp. 1–5.
- Ye, JM; Bromage, ES; and Kaattari, SL, The Strength of B Cell Interaction with Antigen Determines the Degree of IgM Polymerization (2010). *Journal Of Immunology*, 184(2), 844-850.
- Yin, X., Mu, L., Fu, S., Wu, L., Han, K., Wu, H., ... & Ye, J. (2019). Expression and characterization of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) secretory and membrane-bound IgM in response to bacterial infection. *Aquaculture*, 508, 214-222
- Yoshida, T.; Yamada, Y.; Sakai, M.; Inglis, V.; Xie, X.J.; Chen, S.-C., and Kruger, R. (1996). Association of the cell capsule with anti-opsonophagocytosis in β -hemolytic *Streptococcus* spp. isolated from rainbow trout. *J. Aquat. Anim. Health*, 8: 223-228.
- Yuasa, K.; Kitancharoen, N.; Kataoka, Y., and Al-Murbaty, F. (1999). *Streptococcus iniae*, the causative agent of mass mortality in rabbitfish *Siganus canaliculatus* in Bahrain. *J. Aquat. Anim. Health*, 87-93
- Zamri-Saad M, Amal MNA, Siti-Zahrah A. (2022) Pathological changes in red tilapias (*Oreochromis spp.*) naturally infected by *Streptococcus agalactiae*. *J Comp Pathol* 2010; 143:227–229. Available at: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20334871/>.
- Zhang, Y.-A., Salinas, I., Li, J., Parra, D., Bjork, S., Xu, Z., LaPatra, S. E., Bartholomew, J., & Sunyer, J. O. (2010). Igt, a primitive immunoglobulin class specialized in mucosal immunity. *Nature immunology*, 11, 827–835.
- Zheng, W. J., & Sun, L. (2011). Evaluation of housekeeping genes as references for quantitative real time RT-PCR analysis of gene expression in Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*). *Fish & shellfish immunology*, 30(2), 638-645.
- Zhang, R., Zhang, L. L., Ye, X., Tian, Y. Y., Sun, C. F., Lu, M. X., & Bai, J. J. (2013). Transcriptome profiling and digital gene expression analysis of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) infected by *Streptococcus agalactiae*. *Molecular biology reports*, 40, 5657-56