

**Desarrollo de un protocolo de PCR dúplex para la
detección de cepas de *Vibrio harveyi* virulentas para
peces**

**Development of a duplex PCR protocol for the detection
of *Vibrio harveyi* strains virulent for fish**

**Desenvolvimento dun protocolo de PCR dúplex para a
detección de cepas de *Vibrio harveyi* virulentas para
peixes**

Pablo Ibáñez Payá

Junio de 2023

Desarrollo de un protocolo de PCR dúplex para la detección de cepas de *Vibrio harveyi* virulentas para peces

Development of a duplex PCR protocol for the detection of *Vibrio harveyi* strains virulent for fish

Desenvolvemento dun protocolo de PCR dúplex para a detección de cepas de *Vibrio harveyi* virulentas para peixes

Estudiante: Pablo Ibáñez Payá

Institución: *Universitat de València*

Tutoras externas: Belén Fouz Rodríguez, Carmen Amaro González y Javier Barriga Cuartero

Tutora académica: María Concepción Herrero López

Facultad de Ciencias, Campus da Zapateira, Universidade da Coruña

30 de junio de 2023

Autorización y firma de la/s tutora/s

MARIA
CARMEN|
AMARO|
GONZALEZ
Firmado digitalmente por MARIA CARMEN| AMARO| GONZALEZ
Fecha: 2023.06.30 17:19:03 +02'00'

MARIA
BELEN|
FOUZ|
RODRIGUEZ
Firmado digitalmente por MARIA BELEN| FOUZ|RODRIGUEZ
Fecha: 2023.06.30 19:13:01 +02'00'

Agradecimientos

Entre estas hojas se recopila no solo un trabajo, sino una época que, con diferencia, ha sido la mejor hasta ahora. Ha habido momentos malos, y momentos buenos, e indiferentemente de como fuera la situación, siento que siempre he tenido apoyo por parte de la gente que me rodea. Es por eso por lo que quiero agradecer enormemente a mis tutoras, Carmen y Belén, por aguantarme y darme ese gran empujón que nos hace falta a todos y todas. A los y las integrantes del grupo PAFZP, por hacer que disfrute viniendo a la universidad. Especialmente a Xavi, que me ha llevado de la mano durante mis primeros pasos en el mundo de la ciencia y sin el cual no habría podido hacer este trabajo.

Gracias a mis padres y a mis hermanas, la hoguera donde uno puede descansar después de salir a librar sus propias batallas. Se lo debo todo a ellos.

Y como no podía faltar, aunque no pueda leer esto, gracias a mi perro, Tantor.

Pablo Ibáñez Payá

Resumen

Actualmente, el sector de la acuicultura juega un papel muy importante tanto en el suministro de alimentos como en la conservación de las especies marinas. El género *Vibrio*, un grupo de bacterias Gram negativas autóctonas de ambientes marinos, ejerce un impacto negativo sobre esta industria al causar importantes pérdidas económicas debidas a enfermedades conocidas como **vibriosis**. La lubina (*Dicentrarchus labrax* (Linnaeus, 1758)) es una de las especies más importantes en la acuicultura mediterránea y la vibriosis causada *V. harveyi* (Vh) una de sus principales amenazas. Además, el cambio climático está produciendo un incremento en el número de brotes de esta vibriosis, así como un aumento en la virulencia de las cepas de esta especie. En el laboratorio de la Dra. Amaro se han recopilado evidencias que asocian este aumento en la virulencia con la adquisición de dos genes que confieren capacidad septicémica por transferencia genética horizontal. El objetivo de este estudio ha sido desarrollar y validar un protocolo de PCR dúplex que permitiera la detección de este patógeno en cualquier tipo de muestra y, al mismo tiempo, discriminase si la muestra contiene la variante más virulenta. Para ello, se ha desarrollado una PCR dúplex dirigida a dos genes diana, el gen *toxR*, marcador de especie, y el gen *fpcrp*, uno de los dos genes que confieren capacidad septicémica. Determinamos que el límite de detección de la PCR, tanto a partir de cultivos de laboratorio como de tejido de lubina infectado, era alto (10^5 células/mL), por lo que se introdujo un paso previo de enriquecimiento en agua de peptona alcalina (APA-1). Se ensayaron distintos tiempos de incubación y se concluyó que una incubación de 8 h en APA-1 reducía el límite de detección entre 4 y 3 unidades logarítmicas dependiendo de si se trataba de un cultivo de laboratorio o de tejido infectado. El procedimiento completo fue validado con muestras de campo en las que fuimos capaces de detectar Vh en el moco superficial y branquias de animales sanos, en su mayoría negativo para el marcador septicémico. En conclusión, este procedimiento podría ser implementado en las piscifactorías para controlar la emergencia de los brotes de vibriosis, especialmente si las variantes detectadas presentan el marcador septicémico.

Abstract

Today, the aquaculture sector plays a very important role in both food supply and conservation of marine species. The genus *Vibrio*, a group of Gram-negative bacteria native to marine environments, has a negative impact on this industry as it is the cause of important economic losses due to diseases known as **vibriosis**. Sea bass (*Dicentrarchus labrax* (Linnaeus, 1758)) is one of the most important species in Mediterranean aquaculture and vibriosis caused by *V. harveyi* (Vh) is one of its main threats. In addition, climate change is causing an increase in the number of outbreaks of this vibriosis as well as an increase in the virulence of the strains of this species. In Dr. Amaro's laboratory, evidence has been gathered linking this increase in virulence to the acquisition of two genes that confer septicemic ability by horizontal gene transfer. The aim of this study was to develop and validate a duplex PCR that allows the detection of this pathogen from any type of sample and, at the same time, discriminates whether the sample contains the most virulent variant. To this end, a duplex PCR has been developed for two target genes: the *toxR* gene, a species marker, and the *fpcrp* gene, as septicemic marker. We determined that the limit of detection of this PCR from both laboratory cultures and infected sea bass tissue was high (10^5 cells/mL) so a pre-enrichment step in alkaline peptone water (APA-1) was introduced. Different incubation times were tested, and it was concluded that an 8h incubation in APA-1 reduced the detection limit by 4 to 3 log units depending on whether it was a laboratory culture or infected tissue. The whole procedure was validated with field samples in which we were able to detect Vh in surface mucus and gills of healthy animals mostly negative for the septicemic marker. In conclusion, this procedure could be implemented in fish farms to control the emergence of vibriosis outbreaks especially if the detected variants present the septicemic marker.

Índice

1. Introducción.....	9
1.1. <i>Vibrio</i> y vibriosis en acuicultura.....	9
1.2. Factores de virulencia.....	11
1.3. <i>Vibrio harveyi</i>	12
1.3.1. Ecología de <i>V. harveyi</i>	13
1.3.2. La vibriosis y sus signos clínicos en lubina.....	14
1.3.3. Factores de virulencia de <i>V. harveyi</i>	15
1.3.4. Métodos de identificación.....	17
1.3.5. Métodos de control para <i>V. harveyi</i>	18
1.4. Antecedentes y objetivo.....	19
2. Material y Métodos	19
2.1. Cepas bacterianas y condiciones de crecimiento.....	19
2.2. Obtención y preparación de las muestras.....	20
2.3. Extracción de ADN bacteriano.....	21
2.4. Diseño de un protocolo para la identificación y detección de <i>V. harveyi</i>	22
2.4.1. PCR dúplex.....	22
2.4.2. Enriquecimiento.....	23
2.5. Especificidad y sensibilidad del método.....	24
2.6. Validación del método.....	24
3. Resultados.....	25
3.1. Especificidad de la PCR dúplex.....	25
3.2. Sensibilidad del protocolo de PCR dúplex.....	26
3.3. Validación del protocolo con muestras de campo.....	27
4. Discusión	29

1. Introducción

1.1. *Vibrio* y vibriosis en acuicultura

El rápido crecimiento de la población global y la creciente reducción en el número de capturas por parte de las pesquerías hacen que, hoy en día, sea de gran relevancia el desarrollo de la industria de la acuicultura para poder cumplir con el suministro de alimentos y la conservación de las especies marinas (Amin *et al.*, 2021; Kim & Lee, 2017; Mougín *et al.*, 2021; Rossi *et al.*, 2021; Zhou *et al.*, 2022). De acuerdo con la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO), la acuicultura es uno de los sectores de más rápido crecimiento en el ámbito de la producción animal, llegando a proveer actualmente hasta un 50% del total de pescado para consumo humano (Kalatzis *et al.*, 2018; Sony *et al.*, 2021; Xu *et al.*, 2020).

De acuerdo con Kim y Lee (2017), la calidad microbiológica del agua puede determinar el éxito o el fracaso de una empresa de acuicultura, ya que los microorganismos son capaces de afectar a múltiples factores cruciales para el correcto desarrollo de la actividad acuícola, como son el ciclo de los nutrientes o el estado de salud de los animales, entre otros. De esta forma, los microorganismos patógenos pueden causar enfermedades en los animales causantes de pérdidas económicas significativas en el sector. Además, algunos de estos patógenos son también patógenos humanos por lo que la aparición de brotes en las instalaciones puede constituir un problema no solo de sanidad animal sino también de salud pública (Kim & Lee, 2017).

El género *Vibrio* (filo Proteobacteria, clase Gammaproteobacteria, familia *Vibrionaceae*) comprende más de 100 especies de bacterias Gram negativas propias de ecosistemas marinos y salobres (de Souza Valente & Wan, 2021; Istiqomah *et al.*, 2020; Kumar *et al.*, 2021; Kalatzis *et al.*, 2018; Xu *et al.*, 2020). Tienen forma de bacilo y son móviles gracias a que tienen un flagelo polar. No producen esporas, pero sí formas viables no cultivables (VBNC) de resistencia a las condiciones adversas. Presentan un metabolismo anaerobio facultativo muy versátil. Así son capaces de respirar en condiciones aerobias y anaerobias (por ejemplo, respiran nitratos que reducen a nitritos) así como de fermentar múltiples azúcares como la glucosa, la D-fructosa, la maltosa y el glicerol. Además, tienen citocromo c en sus membranas (prueba oxidasa positiva) y son capaces de producir catalasa que inactiva el peróxido de hidrógeno (Kumar *et al.*, 2021; Mohamad *et al.*, 2019). El género es muy heterogéneo comprendiendo una gran diversidad de especies pertenecientes a

comunidades microbianas concretas que habitan una gran cantidad de ambientes acuáticos de diferentes salinidades. Son relativamente abundantes en el medio marino y, a menudo, suelen encontrarse adheridos a partículas, habiéndose podido aislar de la superficie mucosal de algas y animales acuáticos, del zooplancton, del sedimento e, incluso, de la columna de agua (Mohamad *et al.*, 2019). Obviamente también pueden encontrarse en las instalaciones de acuicultura que usan agua salobre o marina.

Algunos parámetros del agua como la temperatura, el pH, la salinidad o los nutrientes pueden afectar a la abundancia de los vibrios (de Souza Valente & Wan, 2021; Kalatzis *et al.*, 2018), siendo los parámetros que más influyen la temperatura y la salinidad (Xu *et al.*, 2020). En el caso de las especies del género que más afectan a la piscicultura mediterránea (*V. harveyi*, *V. parahaemolyticus*, *V. cholerae* y *V. alginolyticus* y *V. vulnificus*), su abundancia en el agua es mayor en los meses de verano (mayor temperatura, menos lluvia) y mucho menor en los meses de invierno (de Souza Valente & Wan, 2021; Xu *et al.*, 2020) (datos aplicables al hemisferio norte) por lo que su presencia en aguas costeras se está incrementando con el calentamiento global (de Souza Valente & Wan, 2021). Las condiciones óptimas para la presencia de estos patógenos en el agua son una salinidad media de entre 1 y 2% y una temperatura por encima de los 15°C (Amaro *et al.*, 2021).

Las enfermedades que causan tanto en los animales acuáticos como en el ser humano se conocen genéricamente como **vibriosis** (de Souza Valente & Wan, 2021; Kalatzis *et al.*, 2018; Mohamad *et al.*, 2019; Xu *et al.*, 2020; Zhou *et al.*, 2022). En este último caso la vía de transmisión del patógeno al ser humano puede ser por contacto con los animales enfermos o por la ingestión de marisco fresco o mal cocinado o sushi (Xu *et al.*, 2020). En ambos casos, la enfermedad puede desencadenar una septicemia hemorrágica con una probabilidad de muerte muy dependiente del estado de salud del paciente (Oliver, 2015).

La vibriosis es la enfermedad bacteriana de los peces que está más extendida, afectando a una gran cantidad de especies diferentes, tanto de agua dulce como salada, salvajes o de cría (Istiqomah *et al.*, 2020; Kumar *et al.*, 2021; Sakthivel *et al.*, 2022; Sony *et al.*, 2021; Zhou *et al.*, 2022). Además, es un problema que provoca grandes pérdidas económicas en el sector de la acuicultura a nivel mundial (Mohamad *et al.* 2019).

La primera vez que se publicó el caso de una infección por *Vibrio* fue en 1718, aunque no se reconoció como *Vibrio* hasta un siglo después. La primera infección animal confirmada

fue en 1817, cuando se aisló de anguilas enfermas (*Anguilla anguilla* (Linnaeus, 1758)) una bacteria a la que se denominó *Bacillus anguillarum*. Más tarde, en 1909, se aisló esta bacteria de nuevo en anguilas europeas y se la denominó *Vibrio anguillarum*. Las enfermedades producidas por la infección de *Vibrio spp.* empezaron a recibir atención cuando se convirtieron en una amenaza para el sector de la acuicultura, especialmente en América del Norte, Europa y Japón (Mohamad *et al.*, 2019).

A medida que ha pasado el tiempo, la taxonomía de las Vibrionáceas ha ido cambiando según evolucionaban los métodos de identificación de especies. Actualmente, los miembros de la familia Vibrionaceae se clasifican en 8 géneros: *Aliivibrio*, *Echinimonas*, *Enterovibrio*, *Grimontia*, *Photobacterium*, *Salinivibrio*, *Vibrio* y un género propuesto más recientemente denominado *Thaumasiovibrio* (Mohamad *et al.*, 2019).

La gran diversidad genética y biológica de la familia *Vibrionaceae* en los ecosistemas acuáticos provoca dificultades para entender las enfermedades provocadas por las especies de manera individual. Además, la falta de estudios de cómo las especies más inusuales del género *Vibro* infectan a los peces pueden dificultar el progreso además de poner en compromiso el desarrollo de futuros métodos de prevención (Mohamad *et al.*, 2019).

1.2. Factores de virulencia

La patogenicidad de los Vibrios se debe a una gran cantidad de genes y factores de virulencia que les permiten infectar y causar daños a diferentes especies hospedadoras (Sony *et al.*, 2021). Según Kalatzis *et al.* (2018), uno de los factores de virulencia comunes a las especies de vibrios patógenos es la producción de sistemas de captación de hierro dependientes de sideróforos con los que subvierten la inmunidad nutricional (secuestro de hierro) de sus hospedadores. También pueden secretar múltiples exoenzimas con actividad proteolítica, lipolítica, y degradadora de ácidos nucleicos, así como citotoxinas o hemolisinas. Pero no basta con la presencia de los genes de virulencia en el genoma para que la bacteria sea virulenta. Las bacterias presentan múltiples mecanismos de regulación de la expresión de los genes de virulencia tanto en función de variación en parámetros ambientales como en función del tamaño de la población. Este último fenómeno se conoce como *quorum sensing* y es dependiente de la elaboración de moléculas conocidas como autoinductores que se acumulan en el medio y que son “sentidas” por las propias bacterias

que los elaboran y sus vecinas lo que activa o reprime la transcripción génica en función del tamaño poblacional (Kalatzis *et al.*, 2018).

Como hemos comentado anteriormente son solo cuatro las especies de *Vibrio* que más causan estragos en la piscicultura mediterránea. De todas ellas, *V. vulnificus* es quizá la más relevante dado que es la única especie de *Vibrio* que es reconocida como agente zoonótico (zoonosis, enfermedad animal que se transmite al ser humano). El 50% de las vibriosis humanas registradas en EE. UU. han sido causadas por este patógeno tras el consumo de ostras crudas, por lo que la FDA lo considera como el patógeno transmitido por los alimentos de mayor tasa de mortalidad (Mohamad *et al.*, 2019). Actualmente, esta bacteria se clasifica en 5 grupos filogenéticos o linajes (Carmona-salido *et al.*, 2021; Roig *et al.*, 2018), dejando atrás la clasificación en tres biotipos basada en propiedades serológicas y bioquímicas.

Otra especie relevante es *V. anguillarum* que es el patógeno de peces de más amplio rango de hospedadores, infectando a más de 50 especies diferentes de peces. Además, es la especie mejor caracterizada del género y ha sido bastante estudiada (Mohamad *et al.*, 2019).

No obstante, existen más especies importantes dentro del género, aunque no todas son relevantes en la piscicultura mediterránea. De todas ellas, *V. harveyi*, *V. parahaemolyticus*, *V. cholerae* (no O1/O139) y *V. alginolyticus*, son las más relevantes (Mohamad, Noor, et al., 2019) siendo *V. parahaemolyticus*, *V. cholerae* (no O1/O139) y *V. alginolyticus* capaces de infectar al ser humano, en este caso directamente desde heridas o alimentos contaminados (Kumar *et al.*, 2021).

1.3. *Vibrio harveyi*

Actualmente en Europa, la especie de pez que más se cultiva es la lubina (*Dicentrarchus labrax*) (Mougin *et al.*, 2021). Esta especie puede sufrir de pasteurelosis (*Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*), fotobacteriosis (*P. damsela* subsp. *damsela*), tenacibaculosis (*Tenacibaculum* spp.), y vibriosis (*Vibrio* spp.), y todas ellas causar elevada mortalidad y pérdidas económicas cuantiosas. La vibriosis es la más importante de estas enfermedades, puesto que afecta a la lubina en todas las fases de la cadena de producción y del ciclo de vida, desde estadios larvarios hasta las tallas comerciales. Existen diferentes especies de *Vibrio* capaces de infectar lubinas: *V. alginolyticus*, *V. anguillarum*, *V. harveyi*, *V. ordalii*, *V. parahaemolyticus* y *V. vulnificus*. *V. anguillarum* ha sido el patógeno de mayor

importancia durante mucho tiempo, pero, actualmente, *V. harveyi* (Fig. 1) se ha identificado como la mayor amenaza para la lubina en la acuicultura, mediterránea pudiendo también afectar a lubina cultivada en aguas cálidas de Asia y América. (Mougin *et al.*, 2021; Zhang *et al.*, 2020). No existen medidas de control eficaces frente a esta enfermedad.

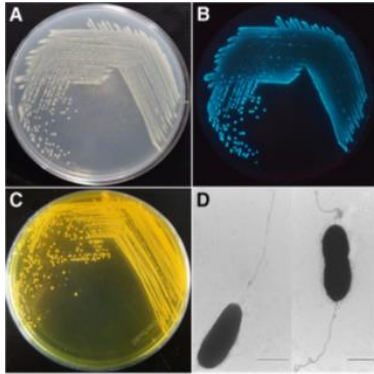


Figura 1. Crecimiento de *V. harveyi* sobre distintos medios y morfología de la bacteria. (A) Crecimiento de *V. harveyi* VIB 391 en agar marino. (B) Luminiscencia de *V. harveyi* VIB 391. (C) *V. harveyi* en TCBS agar. (D) Fotografía con microscopio electrónico de transmisión de células de *V. harveyi* VIB 645. Escala de 1 μ m. Figura extraída de Zhang *et al.* (2020).

Inicialmente, se nombró como *Achromobacter harveyi* en honor de Edmund Newton Harvey y su trabajo en la bioluminiscencia de esta especie (Montánchez & Kaberdin, 2020). Actualmente conocida como *V. harveyi* (sinónimo de *V. carchariae* y *V. trachuri*), es el vibrio capaz de infectar a un mayor número de especies acuáticas distintas, entre las que se incluyen crustáceos, moluscos y peces (Amaro *et al.*, 2021; Mohamad *et al.*, 2019; Mougin *et al.*, 2021). Los signos clínicos dependerán del hospedador, siendo la gastroenteritis, la enteritis necrotizante, las úlceras en la piel y la septicemia hemorrágica los signos más habituales en peces (Amaro *et al.*, 2021).

V. harveyi tiene una gran variabilidad genética e incluye cepas virulentas y no virulentas. Estudios recientes sugieren que su capacidad para causar enfermedades en peces y otros organismos puede deberse a la adquisición de plásmidos de virulencia en las instalaciones de acuicultura donde se da una alta densidad de peces en los tanques (Amaro *et al.*, 2021).

1.3.1. Ecología de *V. harveyi*

V. harveyi puede encontrarse en el agua de mar o en la de los tanques de las piscifactorías tanto como organismo libre en la columna de agua como asociado a superficies bióticas o abióticas formando biofilms (Amaro *et al.*, 2021). También es común encontrarlo como miembro de la microbiota intestinal de algunos animales vertebrados e invertebrados acuáticos (Pang *et al.*, 2006). La bajada de temperaturas, salinidad o disponibilidad de nutrientes induce su entrada en el estado VBNC manteniendo la virulencia después de largos periodos de incubación bajo condiciones desfavorables (Amaro *et al.*, 2021).

Se le ha considerado un patógeno oportunista, el cual no siempre se puede recuperar como cultivo puro de animales, apareciendo en poblaciones mixtas junto con otras especies como *V. alginolyticus* o *V. parahaemolyticus* (Amaro *et al.*, 2021; Zhang *et al.*, 2020).

1.3.2. La vibriosis y sus signos clínicos en lubina

La infección de los peces con *V. harveyi* se produce por contacto con el agua o peces portadores/enfermos o por ingestión de alimento o agua contaminada de manera que la bacteria coloniza las mucosas internas y externas del pez, en especial las branquias, el intestino y el ano (Amaro *et al.*, 2021; Mougin *et al.*, 2021). Esta enfermedad puede cursar con signos clínicos externos (vibriosis leve) o también internos (vibriosis grave), estos últimos compatibles con una septicemia hemorrágica.

La lubina que padece vibriosis grave presenta falta de apetito, natación errática, exoftalmia, oscurecimiento del color de la piel, branquias de color pálido, hemorragias en las aletas, úlceras, lesiones cutáneas en la piel y el opérculo, petequias en la zona abdominal, distensión del abdomen y además una mayor secreción de moco cutáneo (Kalatzis *et al.*, 2018; Mougin *et al.*, 2021). A nivel interno (Fig. 2), las vísceras adquieren una apariencia hemorrágica o pálida (hígado principalmente), se detecta esplenomegalia y podemos observar enteritis (inflamación del intestino anterior) y necrosis del intestino posterior detectable por la acumulación de fluido ascítico (exudado amarillo) (Amaro *et al.*, 2021; Firmino *et al.*, 2019; Zhang *et al.*, 2020).

En los últimos años se han documentado 5 casos de infección en seres humanos por *V. harveyi* (Brehm *et al.*, 2020; Del Gigia-Aguirre *et al.*, 2017; Hundenborn *et al.*, 2013; Pavia, 1989; Wilkins *et al.*, 2008). Ninguna de estas infecciones se ha relacionado con un posible caso de zoonosis, sino que se produjeron por contacto de una herida con agua contaminada (Amaro *et al.*, 2021; Firmino *et al.*, 2019).

Tal y como se ha comentado con anterioridad, la abundancia en el agua de las especies que más afectan a la acuicultura mediterránea varía en la columna de agua según la estación del año, siendo mayor su abundancia desde junio a noviembre, cuando la temperatura del agua es máxima. Este fenómeno provoca que los brotes de vibriosis sean más comunes en estas fechas. Además, el calentamiento global está incrementando la abundancia de *V. harveyi* en las aguas costeras y los casos de vibriosis (Mougin *et al.*, 2021).

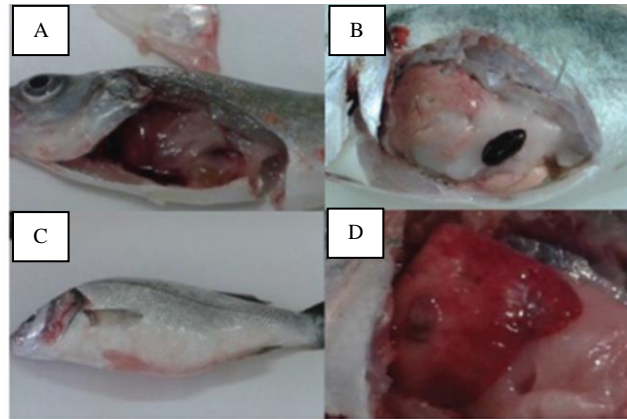


Figura 2. Signos clínicos de la vibriosis provocada en lubina por *V. harveyi* (Amaro *et al.*, 2021). (A) órganos internos hemorrágicos. (B) Inflamación de órganos internos. (C) Hinchazón abdominal y hemorragias externas. (D) Hígado hemorrágico.

1.3.3. Factores de virulencia de *V. harveyi*

Los principales factores de virulencia descritos en *V. harveyi* son: i) proteasas, fosfolipasas, y hemolisinas extracelulares; ii) proteínas de membrana externa, en especial, las involucradas en la captación de sideróforo férrico; iii) la respuesta al *quorum sensing*; iv) un sistema de secreción de tipo 3 y las toxinas efectoras que inyecta (estas últimas no están caracterizadas); v) el flagelo; y v) la capacidad de formación de biofilm (Austin & Zhang, 2006; Fe Franco & Hedreyda, 2006; Montánchez & Kaberdin, 2020; Pavlinec *et al.*, 2022). Esta última capacidad permitiría a *V. harveyi* crecer adherido a las paredes de los tanques lo que puede intensificar el riesgo de vibriosis dado que en los biofilms las bacterias son más resistentes a antibióticos y desinfectantes (Amin *et al.*, 2021; Mougin *et al.*, 2021).

Finalmente, algunas cepas de esta especie que son virulentas para peces son capaces de competir con otras bacterias en la colonización del pez al producir una bacteriocina denominada BLIS (bacteriocin-like substance) que actúa como un antibiótico selectivo (Fe Franco & Hedreyda, 2006).

De todas las toxinas, las más estudiadas son las hemolisinas codificadas por los genes *vhhA* y *vhhB* (Fe Franco & Hedreyda, 2006). Ambos están presentes en las cepas virulentas de *V. harveyi*, de forma que solo hay un gen o ninguno en las cepas menos virulentas. El producto resultante de la expresión de estos genes es una exotoxina responsable de lisar los eritrocitos (Austin & Zhang, 2006; Fe Franco & Hedreyda, 2006; Zhang *et al.*, 2020).

Hay que destacar que la interacción con bacteriófagos puede incrementar la virulencia en *V. harveyi*. Así, se ha descrito que la interacción con el myovirus VHML (*Vibrio harveyi* myovirus like) incrementa la secreción de VhhA en las cepas avirulentas, que se vuelven moderadamente virulentas (Zhang *et al.*, 2020).

V. harveyi parece tener una gran eficiencia en el intercambio y la transferencia de genes, lo que sugiere que podría incorporar genes o elementos genéticos móviles de otras bacterias (Montánchez & Kaberdin, 2020). De hecho, ya se ha descrito un plásmido conjugativo de unos 100 Kb en esta especie (pVh) (Austin & Zhang, 2006). Recientemente, el grupo de la Dra. Amaro encontró en este plásmido dos genes de virulencia que había descrito en *V. vulnificus*. Ambos genes están presentes en el plásmido pVv de *V. vulnificus*, el cual es distinto a pVh. Codifican una lipoproteína de membrana externa denominada Fpcrp (*fish phagocytosis and complement resistance protein*) y una proteína también de membrana externa denominada Ftbp, (*fish transferrin-binding protein*). Ambas confieren capacidad para crecer eficazmente en sangre de pez al dotar a la bacteria de resistencia a la inmunidad innata en sangre (Hernández-Cabanyero *et al.*, 2019). En consecuencia, se han dado fenómenos de transferencia genética horizontal entre ambas especies que probablemente hayan llevado a la emergencia de nuevas variantes de *V. harveyi* con mayor poder septicémico. Esta hipótesis ha sido demostrada con el hallazgo de cepas de *V. harveyi* que presentan estos genes y que son más virulentas que las que no los presentan (resultados no publicados).

Resulta interesante que algunas cepas de *V. harveyi* sean luminiscentes. Este fenómeno está mediado por el gen *luxR* y depende del *quorum sensing* de manera que a alta concentración del autoinductor (proporcional a un mayor tamaño poblacional) las bacterias emiten luz. Se desconoce si la bioluminiscencia tiene algún papel en la virulencia (Zhang *et al.*, 2020).

Finalmente, en *V. harveyi* se ha descrito un sistema de regulación de la transcripción de los genes de virulencia que es dependiente de un regulador denominado ToxR (Fe Franco & Hedreyda, 2006). Este sistema controla en *V. cholerae* la transcripción de la toxina colérica y está muy extendido en el género *Vibrio*. No ha sido estudiado en *V. harveyi*.

1.3.4. Métodos de identificación

Se recomienda realizar muestreos periódicos en las instalaciones acuícolas para controlar la presencia de *V. harveyi* tanto en el agua como en los peces (Amaro *et al.*, 2021). Desarrollar métodos de identificación para *V. harveyi* ha sido un proceso complicado debido a que los miembros del género tienen genotipos y fenotipos muy similares (Cano-Gomez *et al.*, 2009).

Respecto a la identificación de *V. harveyi*, tradicionalmente se han utilizado aproximaciones fenotípicas como perfiles metabólicos o de ácidos grasos, pruebas bioquímicas (API20E), serología, perfiles de susceptibilidad a antimicrobianos, etc. Y se han comprado los perfiles obtenidos con perfiles de referencia (Cano-Gómez *et al.*, 2009). No obstante, debido a la heterogeneidad fenotípica de *V. harveyi*, puede ser difícil distinguirlo de otros miembros del género *Vibrio* por lo que los resultados de la identificación fenotípica no siempre son concluyentes (Amaro *et al.*, 2021). La plasticidad de su genoma también puede causar variabilidad en el fenotipo y afectar a la reproducibilidad de los resultados (Cano-Gomez *et al.*, 2009). A pesar de ello, estas pruebas son fáciles de realizar, son rápidas y de bajo coste y, si bien pueden fallar en la identificación, pueden usarse en estudios comparativos o epizootiológicos (Cano-Gomez *et al.*, 2009).

Hoy en día se utilizan sobre todo métodos genéticos de identificación que incluyen técnicas basadas en análisis de genoma completo (*whole-genome analyses*) y huella genética (*molecular fingerprinting*), como son la hibridación de ADN (para comprobar las similitudes entre dos cepas), AFLP (*amplified fragment length polymorphism*), REP-PCR (*repetitive extragenic palindromic elements*) o RAPD (*random amplified polymorphic DNA*). Pero estos ensayos resultan largos, caros y requieren de habilidad y experiencia para la interpretación de los resultados (Cano-Gomez *et al.*, 2009).

Otro método genético de identificación que está muy extendido en bacterias se basa en la secuenciación del gen ARNr 16S y su comparación con cepas de referencia. Sin embargo, este método no sirve en el género *Vibrio* dado que especies diferentes pueden dar prácticamente la misma secuencia o secuencias con un 99% de similitud (Amaro *et al.*, 2021; Cano-Gomez *et al.*, 2009; Zhang *et al.*, 2020).

Quizá el método de identificación de *V. harveyi* más eficaz es la amplificación de genes específicos (o fragmentos) por PCR, siendo el más utilizado el gen *toxR* (Pang *et al.*, 2006;

Zhang *et al.*, 2020). Es un gen bien conservado entre los miembros del género *Vibrio* que presenta una región variable que es ideal para el diseño de cebadores específicos de especie (Cano-Gomez *et al.*, 2009). No obstante, esta identificación si bien sería precisa a nivel de especie no permitiría distinguir las cepas septicémicas de las no septicémicas (Cano-Gomez *et al.*, 2009).

Sin embargo, la amplificación de un único gen tiene un poder de resolución limitado. Por ello, se han desarrollado protocolos de PCR que amplifican diferentes genes al mismo tiempo. La PCR para múltiples genes (PCR multiplex) ha resultado ser específica y sensible (Zhang *et al.*, 2020).

Además, se han diseñado otros métodos como la ERIC-PCR (*enterobacterial repetitive intergenic consensus*) o la RPA (*recombinase polymerase amplification*), técnicas rápidas y precisas que permiten la monitorización de los brotes de *V. harveyi* (Zhang *et al.*, 2020). Estos métodos tienen ventajas: son precisos, con gran poder de discriminación, son reproducibles y existen bases de datos que permiten identificar cepas e intercambiar datos entre laboratorios (Cano-Gomez *et al.*, 2009). Además, en comparación con otros métodos moleculares, son más rápidos y baratos. El problema sigue siendo el mismo y es que no distinguen entre cepas septicémicas y no septicémicas.

La detección de genes de virulencia con el uso de estos métodos puede servir para confirmar la presencia de cepas patógenas con el fin de elaborar medidas de control preventivas. Amaro *et al.* (2021) recomienda realizar una PCR adicional, tras la identificación de *V. harveyi*, que se encargue de identificar alguno de los genes implicados en la mayor virulencia de los aislados.

1.3.5. Métodos de control para *V. harveyi*

Existen diferentes métodos para el control de la vibriosis causada por *V. harveyi*. Los antibióticos, como el Prefuran o la oxitetraciclina, se utilizaron al principio con éxito, pero la preocupación por la resistencia a antibióticos o la presencia de remanente en los tejidos de los animales contribuyó al desarrollo de otros métodos alternativos (Zhang *et al.*, 2020b). Entre estos métodos se encuentran la terapia con bacteriófagos, el control biológico con otras especies de bacterias, dietas con suplementos, inhibición del *quorum sensing* o la vacunación (Zhang *et al.*, 2020b).

1.4. Antecedentes y objetivo

Tras considerar la importancia epidemiológica de *V. harveyi* en la acuicultura, se concluye que es necesario un método de detección eficiente con el fin de identificar este patógeno y, en concreto, las cepas con potencial septicémico que son las más peligrosas en acuicultura. De esta manera, se pueden prever futuros brotes de vibriosis en las lubinas en cautividad y reducir la expansión y el impacto de la enfermedad, además de evitar grandes pérdidas económicas en el sector.

En consecuencia, el objetivo principal de este estudio fue desarrollar y validar una PCR dúplex que permitiera detectar de forma rápida y precisa la presencia de *V. harveyi* con diferentes potenciales virulentos en cualquier tipo de muestra (ambiental o clínica). Para ello seleccionamos dos genes, el gen *toxR* como marcador de especie y el gen *fpcrp* como marcador de poder septicémico, y determinamos la especificidad y sensibilidad del método con muestras de laboratorio. A continuación, combinamos la PCR con un enriquecimiento previo en un medio selectivo para *Vibrio* y determinamos la combinación óptima que permite la identificación de la especie y la discriminación de las variantes más peligrosas en salud animal. El protocolo completo fue validado tanto con muestras de laboratorio y de campo y podría ser implementado en las piscifactorías como método rutinario de control de las vibriosis causadas por *V. harveyi*.

2. Material y métodos

2.1. Cepas bacterianas y condiciones de crecimiento

Las cepas utilizadas en el estudio y los datos de su aislamiento se muestran en la tabla 1. De forma rutinaria las cepas se cultivaron en placas de TSA-1 (Trypticaseína soja agar, 1% de NaCl) o caldo LB-1 (Luria-Bertani, 1% de NaCl), en agitación (90–100 rpm), que se incubaron durante 18-24 h a 28°C. El medio selectivo y diferencial para vibrios TCBS (*Thiosulfate–citrate–bile salts–sucrose*) agar se utilizó para el aislamiento de *V. harveyi* a partir de muestras ambientales.

Tabla 1. Cepas utilizadas en el estudio, datos sobre su aislamiento y resultados de la PCR dirigida a genes marcadores.

Especie	Cepa	Hospedador	Geografía	Año de aislamiento	PCR*	
					Gen <i>fpcrp</i>	Gen <i>toxR</i>
<i>Vibrio harveyi</i>	C2	Lubina enferma	España	2020	+	+
<i>V. harveyi</i>	Lab1	Lubina enferma	España	2015	+	+
<i>V. harveyi</i>	C3	Lubina enferma	España	2020	-	+
<i>V. vulnificus</i>	CECT4999	Anguila enferma	España	1993	+	-
<i>V. cholerae</i>	8A	Tilapia enferma	España	2019	-	-
<i>V. parahaemolyticus</i>	TW-2	Langostino enfermo	Taiwán	NA	-	-
<i>V. alginolyticus</i>	LUB1	Lubina sana	España	2022	-	-

*. *fpcrp*, gen marcador de capacidad septicémica. Es un gen plasmídico que codifica una lipoproteína de membrana externa que confiere resistencia al sistema inmunitario en la sangre del pez. *toxR*, gen que codifica un regulador transcripcional utilizado en la identificación de *V. harveyi*.

2.2. Obtención y preparación de las muestras

Las muestras de tejido se obtuvieron a partir de ejemplares de *Dicentrarchus labrax* (lubina europea) de una instalación de jaulas del mar Mediterráneo (Bersolaz, Puerto de Sagunto, Valencia, 39°40'35"N 0°16'24"O) así como de lubinas mantenidas en las instalaciones de acuarios del Servicio Central de Soporte a la Investigación Experimental (SCIE) de la Universitat de València.

Tanto la extracción de sangre como la necropsia posterior se realizaron siguiendo los protocolos establecidos en dichas instalaciones, siempre bajo la supervisión de personal autorizado (tutores de trabajo). Se seleccionaron para el muestreo el moco superficial, las branquias, el riñón anterior, el cerebro y el bazo.

El moco de la superficie corporal se obtuvo raspando suavemente con la ayuda de un portaobjetos esterilizado con luz ultravioleta (UV) durante 2h. El moco se introdujo en tubos Eppendorf y se mantuvo en refrigeración (-80°C) hasta su análisis. Las branquias se retiraron con la ayuda de unas tijeras estériles y se utilizó el mismo procedimiento de almacenamiento que para el moco.

Todos los órganos internos se extrajeron en condiciones de asepsia realizando incisiones

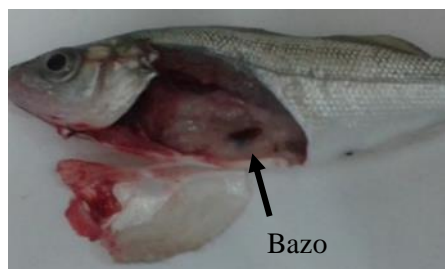


Figura 3. Necropsia de lubina. Se observa el bazo en la parte inferior derecha de la apertura.

con bisturí y separando los tejidos con pinzas, ambos instrumentos esterilizados previamente. En el caso del riñón anterior y el bazo, se realizó una incisión ventral desde el ano hasta el inicio de la cabeza y dos incisiones perpendiculares (Fig. 3). En el caso del cerebro se realizaron dos incisiones paralelas y una perpendicular en la parte superior del cráneo. Una vez extraídos, los órganos se introdujeron en tubos Eppendorf estériles y se conservaron congelados a -80°C hasta su posterior utilización.

2.3. Extracción de ADN bacteriano

El ADN bacteriano se extrajo a partir de medio de cultivo y de tejido. En el primer caso, se utilizó el método de ebullición (Pérez Roig *et al.*, 2022) y en el segundo se empleó el kit de purificación de ADN genómico de Thermo Fisher Scientific. (España).

Para la obtención de ADN a partir de cultivos, las bacterias se recogieron por centrifugación a 12.000 rpm durante 4 min a 4°C (Gyrozen 1730R, Controltecnica, España) y se resuspendieron en 100 µL de PBS 1% (tampón fosfato salino, pH 7). Las muestras se hirvieron a 100°C durante 5 min, se enfriaron en hielo 5 min y se eliminaron los restos celulares por centrifugación a 12.000 rpm durante 4 min a 4°C. El sobrenadante conteniendo el ADN bacteriano se pasó a nuevos tubos Eppendorf estériles y se almacenó a -20°C.

Para la obtención de ADN bacteriano a partir de tejido de pez, primero se trituró y homogeneizó el tejido en tampón tris-EDTA en un volumen final de 200 µL. A continuación, se añadieron 400 µL de solución de lisis y se homogenizó por inversión del tubo. Posteriormente se incubó a 65°C durante 15 min, se añadió 600 µL de cloroformo y

se procedió a su emulsión, de nuevo por inversión del tubo. Las muestras se centrifugaron 2 min a 10.000 rpm y la fase acuosa (con el ADN) se transfirió a un nuevo Eppendorf. Se añadieron 800 μ L de la solución de precipitación, se mezcló por inversión y se centrifugó 2 min a 10.000 rpm. Se eliminó el sobrenadante y se homogenizó el sedimento en 100 μ L de solución salina, utilizando un agitador. Después, se añadieron 300 μ L de etanol absoluto frío gota a gota y se dejó precipitar durante 30 min a -20 °C. Seguidamente, la muestra se centrifugó durante 10 min a 10.000 rpm y se lavó el sedimento (sin resuspender) en 300 μ L de etanol frío al 70%, con posterior centrifugación de 10 min a 10.000 rpm. Finalmente, se resuspendió el sedimento en 50 μ L de agua molecular.

La calidad y la concentración del DNA extraído tanto a partir de cultivo como de tejido se determinó con un NanoDrop ND1000 (Thermo Fisher Scientific, España). La concentración del ADN extraído se calcula en función de la absorbancia obtenida a 260nm. La pureza se puede estimó a partir de la relación entre absorbancia a 260 y 280 nm y 260 y 230 nm.

2.4. Diseño de un protocolo para la identificación y detección de *V. harveyi*

2.4.1. PCR dúplex

Se diseñó una PCR dúplex para la identificación de *V. harveyi* que permitiese discriminar las cepas más virulentas. Para la identificación de la especie se seleccionó como gen diana *toxR*. Este gen está presente en todas las especies del género *Vibrio* y presenta una zona de variabilidad que permite la identificación a nivel de especie. Se utilizaron dos pares de cebadores dirigidos a amplificar el fragmento específico del gen *toxR* para *V. harveyi* previamente descritos (Pang *et al.*, 2006). Para la discriminación de las cepas más virulentas se incluyó un segundo gen marcador, el gen *fpcrp*. Este gen fue descrito en *V. vulnificus* y codifica una lipoproteína de membrana externa que confiere resistencia a la fagocitosis y al complemento de la sangre de los peces y, por tanto, capacidad septicémica (Hernández-Cabanyero *et al.*, 2019). El gen *fpcrp* está presente en un elemento genético móvil y ha sido transferido a cepas de *V. harveyi* altamente virulentas (resultados no publicados). Los cebadores y el tamaño de los amplicones para ambos genes se muestran en la tabla 2, ambos fueron suministrados por Integrated DNA Technologies (IDT, Bélgica). La mezcla de reacción se preparó en un volumen final de 25 μ L, siguiendo las

condiciones recomendadas por el *Master Mix* comercial (*Speedy Supreme NZY*Taq 2x green, NZYTech): 12 μ L de *Master Mix*, 2,5 μ L de cebadores, 9,5 μ L de agua molecular (HyPure Molecular Biology Grade Water, Cytiva) y 1 μ L de ADN. La temperatura de hibridación para los cebadores fue de 55°C durante 5 segundos, con un total de 30 ciclos. El proceso se realizó con el termociclador (*MiniAmp Thermal Cycler*, Thermo Fisher Scientific).

Tabla 2. Cebadores y tamaño de los amplicones.

Cebador	Secuencia (5' – 3')	Tamaño (pb)	Referencia
<i>toxR</i> – F	GAAGCAGCACTCACCGAT	382	(Pang <i>et al.</i> , 2006)
<i>toxR</i> – R	GGTGAAGACTCATCAGCA		
<i>fpcrp</i> – F	AGGTAAGAAGGGAGGAGTTT	497	(Barriga-Cuartero <i>et al.</i> , 2023)
<i>fpcrp</i> - R	TCAAGGTTTTTCCGCTAACT		

A continuación, el ADN se separó mediante electroforesis en gel de agarosa 1'8% a 100V, 30 min y las bandas se visualizaron por tinción con *RedSafe Nucleic Acid Staining Solution* (Intron Biotechnology) 5 μ L/100 mL. Se cargaron 5 μ L del ADN amplificado además de 5 μ L del patrón de pesos moleculares *Thermo Scientific Gene Ruler 1 kb*. Los amplicones se visualizaron y fotografiaron con un escáner Microtek MFS-300L de luz UV.

2.4.2. Enriquecimiento

Para reducir el límite de detección por PCR se procedió a un enriquecimiento previo de la muestra en APA-1 (agua de peptona alcalina 1% de NaCl, pH 8,6) (Pérez Roig *et al.*, 2022). El enriquecimiento se realizó incubando una dilución 1/10 de la muestra en APA-1 a 28°C y en agitación durante 24 h. Para seleccionar el tiempo de incubación idóneo, se tomaron muestras a distintos tiempos post-inoculación (0, 4, 6, 8, 10 y 24 h) y se realizó la extracción de ADN siguiendo el protocolo de ebullición (apartado 2.3).

2.5. Especificidad y sensibilidad del método.

Para valorar la especificidad del método se cultivaron las cepas de *V. harveyi* y de los otros vibrios que se indican en la tabla 2 en LB-1 y se realizó la extracción de ADN a partir de cultivos puros y mixtos (con mezcla de varias especies en proporción 1:1). Para valorar la sensibilidad, se realizaron diluciones de cultivos de la cepa C2 de *V. harveyi* en PBS-1 (DO_{625} entre 0'2 y 0'3, lo que equivale a 10^8 UFC (unidades formadoras de colonias/mL). El número de UFC /mL se estimó mediante recuentos por goteo en TSA-1 (Hoben & Somasegaran, 1982). Se extrajo el ADN de los diferentes cultivos por el método de ebullición.

2.6. Validación del método

El protocolo de PCR dúplex se validó con muestras de tejido inoculado en el laboratorio y muestras de campo. En el primer caso, muestras de 0'1g de tejido se homogeneizaron en 100 μ L de diluciones decimales seriadas de una suspensión de la cepa C2 de *V. harveyi* (desde 10^8 a 10^0 UFC/mL).

La validación del protocolo en el campo se realizó empleando lubinas sanas procedentes de las instalaciones de acuicultura que aparecen en el apartado 2.2. Los tejidos/órganos de interés (moco superficial, branquias, sangre y bazo) se homogeneizaron según se describe en el apartado 2.4.3. En paralelo se realizó un enriquecimiento en APA-1 y se extrajo el ADN que se sometió al protocolo de PCR dúplex para detectar *V. harveyi*. Cada muestra enriquecida se sembró en agar TCBS y las colonias amarillas (fermentadoras de sacarosa) se aislaron y purificaron en TSA-1. A continuación se identificaron usando tiras API-20E (Biomérieux) y, en paralelo, la PCR diseñada. Un esquema del protocolo de validación se muestra en la Figura 4.

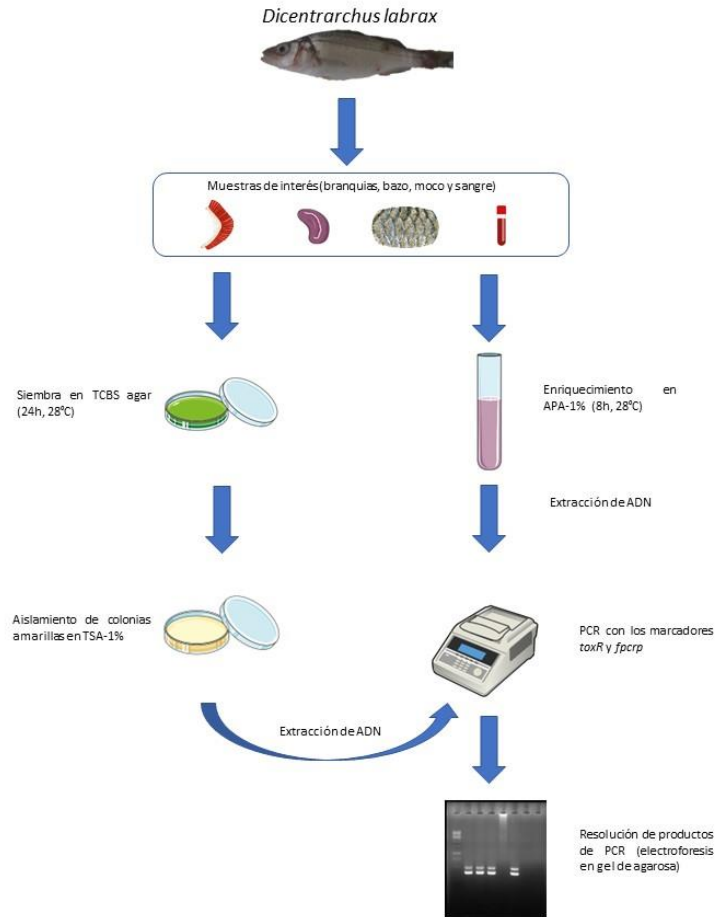


Figura 4. Procedimiento para la detección de *V. harveyi* en muestras de campo. TCBS: agar tiosulfato citrato bilis sacarosa. TSA-1: tripticaseína soja agar con 1% de NaCl. APA-1: agua de peptona alcalina con 1% de NaCl. PCR: reacción en cadena de la polimerasa. Gen *toxR*: marcador específico para *V. harveyi*. Gen *fpcrp*: gen indicador de virulencia que confiere resistencia a la fagocitosis y al sistema del complemento en peces.

3. Resultados

3.1. Especificidad de la PCR dúplex

En primer lugar, se ensayó la especificidad de la PCR dúplex utilizando ADN de diferentes cepas de *V. harveyi* y de otras especies de *Vibrio* que pueden coexistir en el mismo hábitat (Tabla 2). Se obtuvieron los amplicones correspondientes a los 2 genes seleccionados (*toxR* y *fpcrp*) en las muestras de ADN de *V. harveyi* para las cepas Lab1 y C2 y solo el del gen *toxR* en la cepa C3 (Fig. 5A). Asimismo, no se visualizaron bandas en las muestras de las otras especies de *Vibrio*, salvo en el caso de la cepa de *V. vulnificus* que sí amplificó el gen *fpcrp* (Tabla 2). Con una combinación/mezcla de ADN de otras especies se visualizan

las bandas correspondientes a los genes de interés en *V. harveyi* (Fig. 5B). No se observó ninguna banda inespecífica (Fig. 5A y 5B).

3.2. Sensibilidad del protocolo de PCR dúplex

Cuando se analizan las muestras de ADN obtenidas a partir de suspensiones bacterianas se obtuvieron resultados positivos en aquellas que tenían una cantidad de bacterias mayor o igual a 10^5 UFC/mL (Fig. 5C). Con las muestras de bazo inoculadas con *V. harveyi* se obtuvieron los mismos resultados (Fig. 5D).

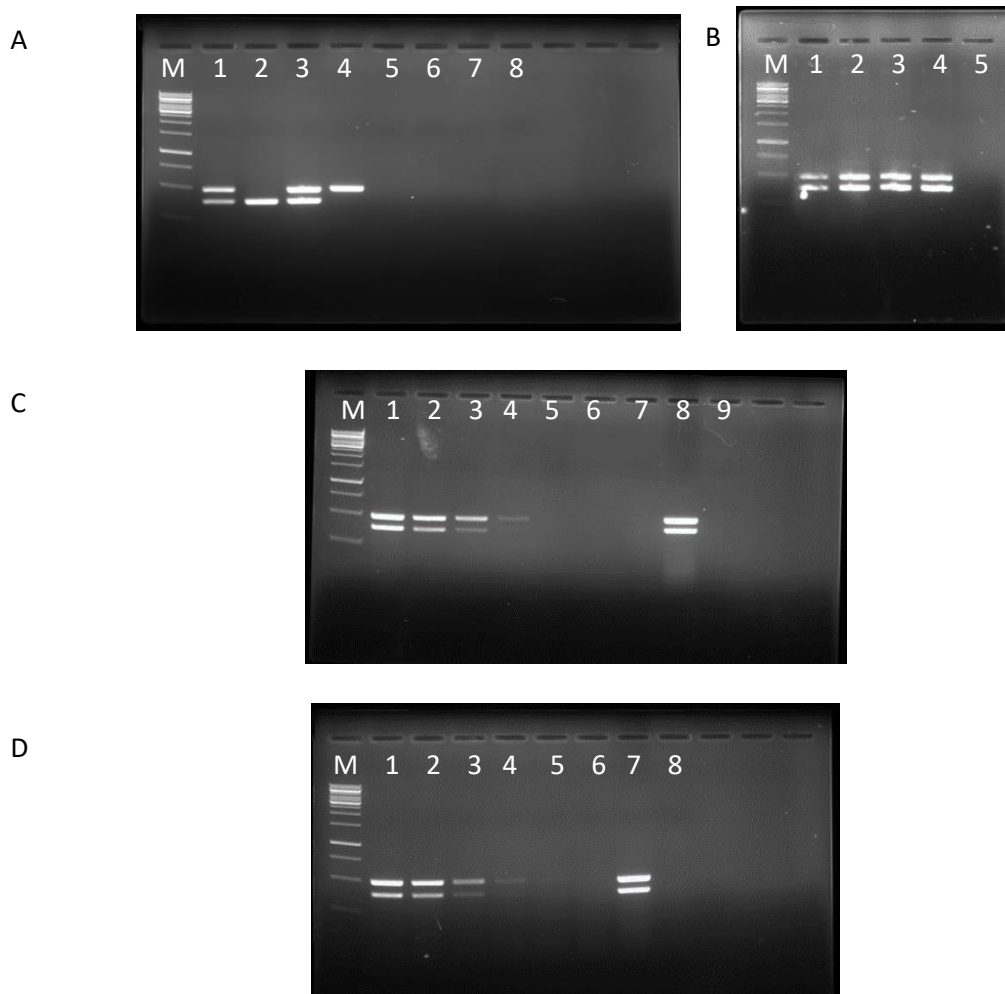


Figura 5. Especificidad del protocolo de PCR. (A) Especificidad de los cebadores dirigidos a *toxR* y *fpcrp*. ADN de diferentes especies de *Vibrio*. Marcador de peso molecular 1kb (Thermo Fisher) (M), *Vibrio harveyi* Lab1 (1), *V. harveyi* C3 (2), *V. harveyi* C2 (3), *V. vulnificus* R99 (4), *V. cholerae* (5), *V. alginolyticus* (6), *V. parahaemolyticus* (7), control negativo sin ADN (8). (B) Especificidad para los cebadores dirigidos a *toxR* y *fpcrp*. Mezcla de ADN de diferentes especies de *Vibrio*: *V. cholerae*, *V. harveyi*, *V. vulnificus*, *V. parahaemolyticus*, *V. alginolyticus* (1, 2 y 3), control positivo con ADN de *V. harveyi* (C2) (4), control negativo sin ADN (5), Marcador de peso molecular 1kb (Thermo Fisher) (M). (C) Detección de *V. harveyi* (C2) mediante PCR dúplex. Marcador de peso molecular 1kb (Thermo Fisher) (M), 10^8 UFC/mL (1), 10^7 UFC/mL (2), 10^6 UFC/mL (3), 10^5 UFC/mL (4), 10^4 UFC/mL (5), 10^3 UFC/mL (6), 10^2 UFC/mL (7), control positivo con ADN de *V. harveyi* (8), control negativo sin ADN (9). (D) Detección de *V. harveyi* (C2) por PCR dúplex desde tejido contaminado artificialmente. Marcador de peso molecular 1kb (Thermo Fisher) (M), 10^8 UFC/mL (1), 10^7 UFC/mL (2), 10^6 UFC/mL (3), 10^5 UFC/mL (4), 10^4 UFC/mL (5), 10^3 UFC/mL (6), control positivo con ADN de *V. harveyi* (7), control negativo sin ADN (8).

Para reducir el límite de detección del protocolo se procedió a realizar un enriquecimiento de las muestras. Los resultados demostraron que incubar la muestra previamente en APA-1 durante 8 h reducía el límite de detección 10^3 veces en el caso de las muestras de tejido inoculado (10^2 UFC/mL) (Fig 6) y 10^4 veces en el caso de los cultivos puros (10 UFC/mL) (Fig. 7).

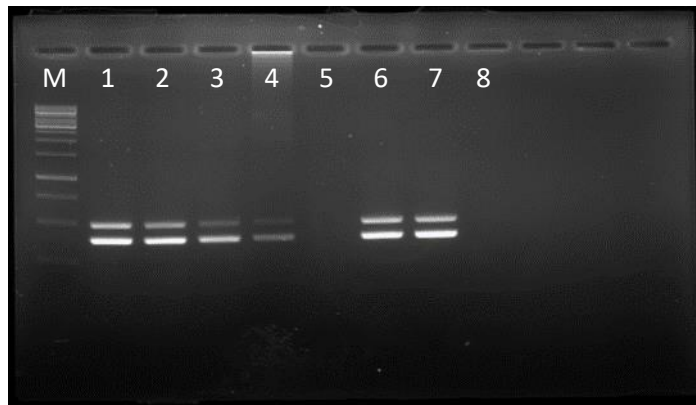


Figura 6. Efecto del enriquecimiento en el límite de detección de la PCR dúplex a partir de tejido inoculado. Se utilizó tejido esplénico de lubina infectado con *V. harveyi* que se incubó en APA-1 8 h. Marcador de peso molecular 1kb (Thermo Fisher) (M), Inóculo: 10^5 UFC/mL (1), 10^4 UFC/mL (2), 10^3 UFC/mL (3), 10^2 UFC/mL (4), 10^1 UFC/mL (5), control positivo extraído por ebullición (6), control positivo extraído con kit (7), control negativo sin ADN (8).

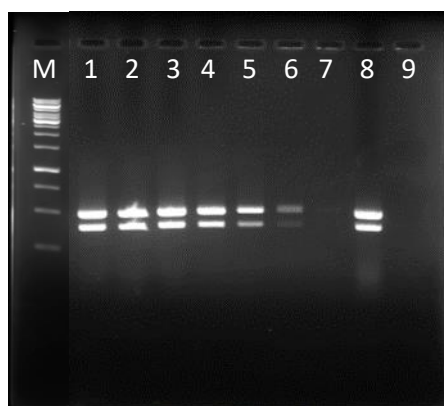


Figura 7. Efecto del enriquecimiento en el límite de detección de la PCR dúplex a partir de cultivo puro. Se incubó en APA-1 8 h. Marcador de peso molecular 1kb (Thermo Fisher) (M), Concentración del cultivo: 10^6 UFC/mL (1), 10^5 UFC/mL (2), 10^4 UFC/mL (3), 10^3 UFC/mL (4), 10^2 UFC/mL (5), 10 UFC/mL (6), 10^0 UFC/mL (7), control positivo con ADN de *V. harveyi* (C2) (8) y control negativo sin ADN (9).

3.3. Validación del protocolo con muestras de campo

Se realizó la valoración del protocolo con muestras de campo empleando lubinas de acuicultura. Se realizaron dos muestreos y las muestras se sometieron al protocolo optimizado de PCR dúplex tras previo enriquecimiento en APA-1. En el primer muestreo se detectó el amplicón correspondiente al gen *toxR* en las branquias y el moco superficial (Fig. 8). En sangre no se detectó presencia de *V. harveyi* (Fig. 8). Asimismo, en paralelo, se analizaron microbiológicamente las muestras enriquecidas mediante siembra en TCBS agar y posterior purificación en TSA-1 e identificación

por tira API-20E. Las colonias aisladas sobre agar TCBS se identificaron como *V. alginolyticus* (perfil 4046125 con probabilidad de identificación del 98,14% y perfil 4246525 con probabilidad de identificación del 98,3%).

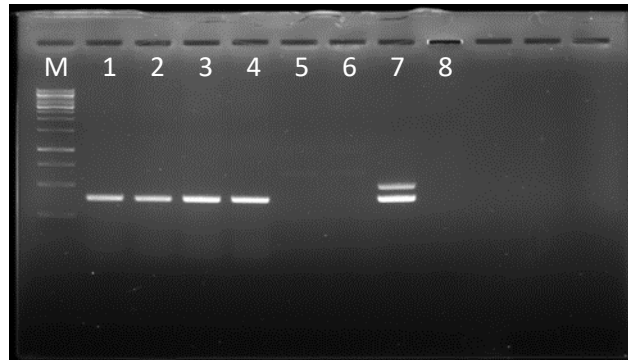


Figura 8. Validación del protocolo con muestras de campo (I). Detección de *V. harveyi* en muestras de lubina mediante PCR dúplex. Marcador de peso molecular 1kb (Thermo Fisher) (M), ADN extraído de: moco (1, 2), branquia (3, 4), sangre (5,6), control positivo con ADN de *V. harveyi* (C2) (7), control negativo sin ADN (8).

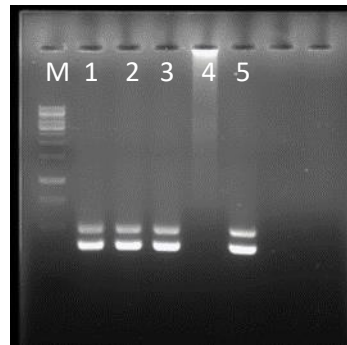


Figura 9. Validación del protocolo con muestras de campo (II). Detección de *V. harveyi* en muestras de lubina mediante PCR dúplex. Marcador de peso molecular 1kb (Thermo Fisher) (M), ADN extraído de: branquia (1, 2 y 3), bazo (4), control positivo con ADN de *V. harveyi* (5).

En el segundo muestreo, el protocolo se aplicó a muestras de branquias de lubinas sanas extraídas de ejemplares criados en jaulas. Se detectó la presencia de *V. harveyi* con el gen *fpgrp* (Fig. 9). Como control negativo se utilizó el bazo (Fig. 9). Las muestras enriquecidas fueron analizadas microbiológicamente empleando TSA-1 y TCBS agar. De nuevo, se aislaron colonias identificadas presuntamente como *V. alginolyticus* (perfil 4046125 con probabilidad de identificación del 98,14% y perfil 4246525 con probabilidad de identificación del 98,3%).

4. Discusión

El sector de la acuicultura ha adquirido gran importancia y protagonismo en los últimos años en el suministro de alimentos y la conservación de las especies marinas (Amin *et al.*, 2021; Kim & Lee, 2017; Mougin *et al.*, 2021; Rossi *et al.*, 2021; Zhou *et al.*, 2022). El género *Vibrio* comprende especies autóctonas de ambientes de aguas salobres (Mohamad *et al.*, 2019) algunas de las cuales pueden ocasionar importantes pérdidas económicas al sector (De Souza Valente & Wan, 2021; Kalatzis *et al.*, 2018; Mohamad *et al.*, 2019; Xu *et al.*, 2020; Zhou *et al.*, 2022). La lubina europea es una de las especies económicamente más relevantes en la acuicultura mediterránea y *V. harveyi* es actualmente el patógeno que representa su mayor amenaza (Mougin *et al.*, 2021; Zhang *et al.*, 2020). En consecuencia, desarrollar métodos de detección de este patógeno que sean rápidos y fiables es esencial para poder prevenir los brotes de vibriosis y garantizar el buen estado sanitario de los peces. Actualmente no hay ninguna vacuna comercial contra la vibriosis causada por *V. harveyi* aunque si la hay frente a la vibriosis clásica causada por *V. anguillarum* (Mohamad *et al.*, 2019).

El objetivo del presente trabajo fue desarrollar y validar un protocolo de detección de *V. harveyi* en lubina que pudiera implementarse en otras especies y muestras ambientales. Para ello, se diseñó una PCR dúplex basada en el gen *toxR* como marcador de especie (Pang *et al.*, 2006) y en el gen *fpcrp* marcador de capacidad septicémica al conferir resistencia al sistema del complemento y a la fagocitosis de los peces (Amaro *et al.*, 2021). La PCR dúplex resultó ser específica al 100%, sin generar resultados positivos con otras especies del género que co-habitan con *V. harveyi* en los ecosistemas acuáticos. Por otro lado, la tira API20E resultó no ser un método efectivo en la identificación de especie.

El límite de detección obtenido utilizando cultivos puros o mixtos fue de 10^5 UFC/mL. Otros autores encontraron un límite de detección inferior al utilizar la PCR simple con el gen *toxR* frente a *V. harveyi* (Pang *et al.*, 2006). Aunque el método de extracción del ADN podría haber influido en el resultado, resultados posteriores obtenidos en el laboratorio y no incluidos en la presente memoria demuestran que los límites de detección con ambas metodologías están en el mismo rango. Probablemente la razón estribe en que esta PCR detecta dos genes lo que involucra ajustes a un mismo proceso de PCR de genes distintos lo que podría redundar en un mayor límite de detección.

Para poder aplicar el protocolo de detección precoz era necesario, por tanto, reducir el límite de detección. Para ello, se realizó un enriquecimiento previo en APA-1 de acuerdo con el trabajo de Pérez-Roig *et al.* (2022). De esta manera, tras 8 h de enriquecimiento el límite de detección bajo de 10^5 UFC/mL a 10^1 y 10^2 UFC/mL, dependiendo del tipo de muestra (cultivo puro vs tejido infectado) lo que significa que se redujo el límite de detección entre 4 y 3 unidades logarítmicas.

Con esta modificación sí que se observaron diferencias en los resultados obtenidos a partir de cultivo puro de *V. harveyi* y de tejido infectado, lo que significa que la presencia de tejido afecta ligeramente al límite de detección de la técnica.

El protocolo de PCR dúplex con enriquecimiento previo de las muestras se validó utilizando muestras de campo, en concreto lubinas sanas de acuicultura, donde se consiguió detectar *V. harveyi*. Además, se pudo recuperar en cultivo puro a partir de las placas de agar TCBS. Las cepas encontradas se aislaron todas de superficie y no de órgano interno y, con una sola excepción, fueron negativas para el gen *fpcrp*. Este resultado sugiere que la mayoría de las cepas ambientales no poseen capacidad septicémica.

En conclusión, hemos diseñado un protocolo que combina un enriquecimiento con una PCR dúplex que presenta la ventaja con respecto a PCR anteriores de que permite detectar no solo la presencia de *V. harveyi*, sino conocer si la cepa presente tiene un mayor poder septicémico. Esta ventaja convierte al protocolo desarrollado en una herramienta esencial y muy útil para la prevención de posibles brotes de vibriosis en instalaciones de acuicultura, pudiéndose implementar de forma rutinaria para el control de esta patología.

Bibliografía

- Amaro, C., Fouz, B., Sanjuán, E., & Romalde, J. L. (2021). Vibriosis. En *Climate Change and Infectious Fish Diseases* (pp. 182-210).
- Amin, Z., Waly, N. A., & Arshad, S. E. (2021). Biofilm Inhibition and Antimicrobial Properties of Silver-Ion-Exchanged Zeolite A against *Vibrio* spp. Marine Pathogens. *Applied Sciences*, *11*, 5496. <https://doi.org/10.3390/app11125496>
- Austin, B., & Zhang, X. H. (2006). *Vibrio harveyi*: A significant pathogen of marine vertebrates and invertebrates. *Letters in Applied Microbiology*, *43*(2), 119-124. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2006.01989.x>
- Barriga-Cuartero, J., Hernández-Cabanyero, C., Ibáñez-Payá, P., Pérez Roig, A., Fouz, B., & Amaro, C. (2023, julio 13). A two-step duplex PCR for rapid detection of *Vibrio harveyi* strains hazardous to fish. FEMS Congress of European Microbiologist, Hamburg, Germany.

- Brehm, T. T., Berneking, L., Rohde, H., Chistner, M., Schlickewei, C., Sena Martins, M., & Schmiedel, S. (2020). Wound infection with *Vibrio harveyi* following a traumatic leg amputation after a motorboat propeller injury in Mallorca, Spain: A case report and review of literature. *BMC Infectious Diseases*, 20(1), 104. <https://doi.org/10.1186/s12879-020-4789-2>
- Cano-Gomez, A., Bourne, D. G., Hall, M. R., Owens, L., & Høj, L. (2009). Molecular identification, typing and tracking of *Vibrio harveyi* in aquaculture systems: Current methods and future prospects. *Aquaculture*, 287(1-2), 1-10. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2008.10.058>
- Carmona-salido, H., Fouz, B., Sanjuán, E., Carda, M., Delannoy, C. M. J., García-González, N., González-Candelas, F., & Amaro, C. (2021). The widespread presence of a family of fish virulence plasmids in *Vibrio vulnificus* stresses its relevance as a zoonotic pathogen linked to fish farms. *Emerging microbes & infections*, 10. <https://doi.org/10.1080/22221751.2021.1999177>
- de Souza Valente, C., & Wan, A. H. L. (2021). *Vibrio* and major commercially important vibriosis diseases in decapod crustaceans. *Journal of Invertebrate Pathology*, 181, 107527. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2020.107527>
- Del Gigia-Aguirre, L., Sánchez-Yebra-Romera, W., García-Muñoz, S., & Rodríguez-Maresca, M. (2017). First description of wound infection with *Vibrio harveyi* in Spain. *New Microbes and New Infections*, 19, 15-16. <https://doi.org/10.1016/j.nmni.2017.05.004>
- Fe Franco, P., & Hedreyda, C. T. (2006). Amplification and sequence analysis of the full length *toxR* gene in *Vibrio harveyi*. *Journal of General and Applied Microbiology*, 287(52), 281-287.
- Firmino, J., Furones, M. D., Andree, K. B., Sarasquete, C., Ortiz-delgado, J. B., Asencio-alcudia, G., & Gisbert, E. (2019). Contrasting outcomes of *Vibrio harveyi* pathogenicity in gilthead seabream, *Sparus aurata* and European seabass, *Dicentrarchus labrax*. *Aquaculture*, 511, 734210. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2019.734210>

- Hernández-Cabanyero, C., Lee, C-T., Tolosa-Enguis, V., Sanjuán, E., Pajuelo, D., Reyes-López, F., Tort, L., & Amaro, C. (2019). Adaptation to host in *Vibrio vulnificus*, a zoonotic pathogen that causes septicemia in fish and humans. *Environmental Microbiology*, *21*(8), 3118-3139. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.14714>
- Hoben, H. J., & Somasegaran, P. (1982). Comparison of the Pour, Spread, and Drop Plate Methods for Enumeration of *Rhizobium* spp. In Inoculants Made from Presterilized Peat. *Applied and Environmental Microbiology*, *44*(5), 1246-1247. <https://doi.org/10.1128/aem.44.5.1246-1247.1982>
- Hundenborn, J., Thurig, S., Kommerell, M., Haag, H., & Nolte, O. (2013). Severe Wound Infection with *Photobacterium damsela* ssp. *damsela* and *Vibrio harveyi*, following a Laceration Injury in Marine Environment: A Case Report and Review of the Literature. *Case Reports in Medicine*, *2013*, 1-7. <https://doi.org/10.1155/2013/610632>
- Istiqomah, I., Sukardi, Murwantoko, & Isnansetyo, A. (2020). *Vibriosis Management in Indonesian Marine Fish Farming*. 01001. <https://doi.org/10.1051/e3sconf/202014701001>
- Kalatzis, P. G., Castillo, D., Katharios, P., & Middelboe, M. (2018). Bacteriophage Interactions with Marine Pathogenic Vibrios: Implications for Phage Therapy. *Antibiotics*, *15*(7), 1-23. <https://doi.org/10.3390/antibiotics7010015>
- Kim, J. Y., & Lee, J-L. (2017). Correlation of Total Bacterial and *Vibrio* spp. Populations between Fish and Water in the Aquaculture System. *Frontiers in Marine Science*, *4*, 1-10. <https://doi.org/10.3389/fmars.2017.00147>
- Kumar, S. B., Shinde, A. H., Behere, M. J., Italia, D., & Haldar, S. (2021). Simple, rapid and on spot dye - based sensor for the detection of *Vibrio* load in shrimp culture farms. *Archives of Microbiology*, *203*(6), 3525-3532. <https://doi.org/10.1007/s00203-021-02333-3>
- Mohamad, N., Noor Azmai Amal, M., Yasin, I. S. M., Zamri Saad, M., Nasruddin, N. S., Al-saari, N., Mino, S., & Sawabe, T. (2019). Vibriosis in cultured marine fishes: A review. *Aquaculture*, *512*, 734289. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2019.734289>

- Montánchez, I., & Kaberdin, V. R. (2020a). *Vibrio harveyi*: A brief survey of general characteristics and recent epidemiological traits associated with climate change. *Marine Environmental Research*, 154. <https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2019.104850>
- Mougin, J., Roquigny, R., Flahaut, C., Bonnin-Jusserand, M., Grard, T., & Le Bris, C. (2021). Abundance and spatial patterns over time of Vibrionaceae and *Vibrio harveyi* in water and biofilm from a seabass aquaculture facility. *Aquaculture*, 542, 736862. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2021.736862>
- Oliver, J. D. (2015). The Biology of *Vibrio vulnificus*. *Microbiology Spectrum*, 3(3), 3.3.01. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.VE-0001-2014>
- Pang, L., Zhang, X. H., Zhong, Y., Chen, J., Li, Y., & Austin, B. (2006). Identification of *Vibrio harveyi* using PCR amplification of the *toxR* gene. *Letters in Applied Microbiology*, 43(3), 249-255. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2006.01962.x>
- Pavia, A. T. (1989). *Vibrio carchariae* Infection after a Shark Bite. *Annals of Internal Medicine*, 111(1), 85. <https://doi.org/10.7326/0003-4819-111-1-85>
- Pavlinec, Ž., Zupičić, I. G., Oraić, D., Lojkić, I., Fouz, B., & Zrnčić, S. (2022). Biochemical and molecular characterization of three serologically different *Vibrio harveyi* strains isolated from farmed *Dicentrarchus labrax* from the Adriatic Sea. *Scientific Reports*, 12:7309, 1-10. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-10720-z>
- Pérez Roig, A., Carmona-Salido, H., Sanjuán, E., Fouz, B., & Amaro, C. (2022). A multiplex PCR for the detection of *Vibrio vulnificus* hazardous to human and/or animal health from seafood. *International Journal of Food Microbiology*, 377, 109778. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2022.109778>
- Roig, F. J., González-Candelas, F., Sanjuán, E., Fouz, B., Feil, E. J., Llorens, C., Baker-Austin, C., Oliver, J. D., Danin-Poleg, Y., Gibas, C. J., Kashi, Y., Gulig, P. A., Morrison, S. S., & Amaro, C. (2018). Phylogeny of *Vibrio vulnificus* from the analysis of the core-genome: Implications for intra-species taxonomy. *Frontiers in Microbiology*, 8, 1-13. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.02613>

- Rossi, B., Ang, M., Giovagnoni, G., Cuesta, A., Piva, A., & Grilli, E. (2021). Antimicrobial Power of Organic Acids and Nature-Identical Compounds against Two *Vibrio* spp.: An In Vitro Study. *Microorganisms*, 9, 966. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9050966>
- Sakthivel, M., Jayanthi, J., & Raguathan, M. G. (2022). Antagonistic Potential Marine Bacteria Against Luminiscent Vibriosis Pathogen *Vibrio Harveyi* Obtained from Shrimp Farm, Marakkanam, Tamil Nadu, India. *International Journal of Life Science and Pharma Research*, 12(4), 14-22. <https://doi.org/10.22376/ijpbs/lpr.2022.12.4.L14->
- Sony, M., Sumithra, T. G., Anusree, V. N., Amala, P. V, Reshma, K. J., Alex, S., & Sanil, K. (2021). *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio harveyi* from natural disease outbreaks of marine / estuarine fishes. *Aquaculture*, 539, 736608. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2021.736608>
- Wilkins, S., Millar, M., Hemsworth, S., Johnson, G., Warwick, S., & Pizer, B. (2008). *Vibrio harveyi* sepsis in a child with cancer. *Pediatric Blood & Cancer*, 50(4), 891-892. <https://doi.org/10.1002/pbc.21356>
- Xu, W., Gong, L., Yang, S., Gao, Y., Ma, X., Xu, L., Chen, H., & Luo, Z. (2020). Spatiotemporal Dynamics of *Vibrio* Communities and Abundance in Dongshan Bay, South of China. *Frontiers in Microbiology*, 11, 575287. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.575287>
- Zhang, X. H., He, X., & Austin, B. (2020). *Vibrio harveyi*: A serious pathogen of fish and invertebrates in mariculture. *Marine Life Science and Technology*, 2(3), 231-245. <https://doi.org/10.1007/s42995-020-00037-z>
- Zhou, Q., Zhu, X., Li, Y., Yang, P., Wang, S., Ning, K., & Chen, S. (2022). Intestinal microbiome - mediated resistance against vibriosis for *Cynoglossus semilaevis*. *Microbiome*, 10:153. <https://doi.org/10.1186/s40168-022-01346-4>