

CLONACIÓN MOLECULAR DE PROTEÍNAS DE MEMBRANA EXTERNA DE *AEROMONAS VERONII*

SU IMPLICACIÓN EN ADHESIÓN Y SU POTENCIAL COMO VACUNAS PARA PECES

R. C. VÁZQUEZ-JUÁREZ***, H. BARRERA-SALDAÑA*, F. ASCENCIO V.**



Las enfermedades infecciosas representan una importante fuente de morbilidad y mortalidad en la industria del cultivo de peces, trayendo consigo considerables pérdidas económicas.¹ Las *aeromonas* móviles (*A. veronii*, *A. hydrophila* y *A. caviae*) son los agentes etiológicos de la septicemia hemorrágica en diversas especies de peces, incluyendo salmónidos y peces de aguas templadas. Además, pueden causar gastroenteritis y enfermedades sistémicas más severas en niños y adultos con sistema inmune debilitado.^{1,2}

Como una alternativa al uso de antibióticos, la vacunación de peces se ha utilizado para controlar epidemias de enfermedades infecciosas en las granjas de producción. Sin embargo, no existe una vacuna eficiente contra infecciones causadas por *aeromonas* en peces cultivados, debido al desconocimiento de antígenos capaces de generar protección.³ Las vacunas de ADN son una novedosa tecnología para el control de enfermedades en animales domesticados. En estas vacunas, el antígeno es

sintetizado directamente en las células del hospedero, a partir de un plásmido (vector de ADN) que posee el gen que codifica para dicho antígeno.⁴

La habilidad de las bacterias patógenas para adherirse y colonizar los tejidos del hospedero susceptible es primordial para iniciar la infección y desarrollar la enfermedad. Por ende, estas moléculas de adhesión (adhesinas) son importantes factores de virulencia y candidatos apropiados para el desarrollo de vacunas.⁵

El objetivo de esta investigación fue identificar algunas adhesinas de *A. veronii* y desarrollar una vacuna de ADN a partir de los genes que codifican para estas proteínas; además, evaluar su eficiencia en la cabrilla arenera (*Paralabrax maculatofasciatus*) que es un recurso con potencial para la piscicultura del noroeste de México.

Metodología

Las proteínas de membrana externa (OMPs) de *A. veronii* totales fueron aisladas, de acuerdo al método de Jeanteur *et al.*,⁶ y se analizaron por electroforesis en geles de poliacrilamida desnaturalizantes. Las OMPs de interés fueron purificadas por

□ El presente artículo está basado en la investigación «Aplicación de la tecnología de las vacunas de ADN al cultivo de peces», galardonado con el Premio de Investigación UANL 2003 en la categoría de Ciencias Naturales, otorgado en sesión solemne del Consejo Universitario de la UANL, en septiembre de 2004.

*Departamento de Bioquímica. Facultad de Medicina, UANL. Monterrey, N.L.

**Departamento de Patología Marina, Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste S.C., La Paz, B.C.S.

electroelución de acuerdo a las indicaciones del fabricante (Bio-Rad) y se sometieron a secuenciación de su extremo N-terminal y de péptidos internos por el método de degradación de Edman.

Se prepararon anticuerpos policlonales anti-OMPs de *A. veronii* de acuerdo al método de Harlow y Lane.⁷

La interacción de las OMPs con glicoproteínas (colágenas, fibronectina, mucinas y lactoferrina) se llevó a cabo en placas de ELISA.⁸ Los ensayos de adhesión bacteriana se realizaron con células HeLa crecidas a confluencia total, siguiendo el protocolo de Torres y Kaper.⁹ Para la inhibición de la adhesión, las bacterias fueron pretratadas con el antisuero anti-OMP diluido en medio de cultivo, antes del ensayo de adhesión. Como control negativo se utilizaron bacterias pretratadas con antisuero de conejo no inmunizado. Para la inhibición competitiva, las células HeLa se pretrataron con 50 µg/pozo de cada una de las OMPs purificadas. La adhesión bacteriana se expresó como la cantidad de inóculo bacteriano recuperado de las células HeLa después del periodo de incubación.

Parte de los genes que codifican para las OMPs de interés se amplificaron por PCR, usando oligonucleótidos diseñados a partir de las secuencias de los péptidos internos y N-terminal de las proteínas. Estos amplicones se utilizaron para el tamizaje de librerías genómicas y subgenómicas de *A. veronii*.¹⁰ Finalmente, los genes completos se clonaron por medio de PCR inversa de acuerdo a Ochman *et al.*¹¹ Las secuencias nucleotídicas y de aminoácidos, deducidas de los genes clonados, se depositaron en el GenBank y se analizaron por medio de diversos programas computacionales.

Para la construcción de las vacunas de ADN, los genes se clonaron en el plásmido pCDNA3.1 (Invitrogen), el cual posee el promotor inmediato temprano del citomegalovirus (CMV) y la señal de poliadenilación de la hormona de crecimiento bovina (BGH) para la terminación de la transcripción (figura 4). Para analizar la expresión de las OMPs se transfectaron células HeLa con los plásmidos construidos y con el vector pCDNA3.1 como control negativo usando Lipofectamina (Invitrogen). Además, las células fueron co-transfectadas con el plásmido reportero pCMV.SPORTβgal como control de la eficiencia de la transfección y para normalizar los valores de expresión de las OMPs. La expresión de las OMPs se determinó por medio de Slot blot. La densidad óptica de las bandas (DO) se registró por

medio del programa Scion Image (<http://www.scioncorp.com>). Los niveles de expresión de las OMPs se reportaron como unidades ópticas relativas (UOR), es decir, la DO dividida entre la actividad 2-galactosidasa.

Los peces se distribuyeron en grupos de diez organismos (tres réplicas para cada tratamiento) y se vacunaron intramuscularmente con los siguientes tratamientos: (I) pOMP38P; (II) pOMP48P; (III) pOMP38P y pOMP48P juntos; y dos controles negativos, (IV) pCDNA3.1 y (V) buffer PBS estéril. Cuatro y seis semanas después de la vacunación se determinaron los niveles de anticuerpos anti-OMPs en el suero de los peces vacunados y peces control por medio de ELISA.⁷

En otro experimento, los peces fueron vacunados como se mencionó anteriormente y cuatro semanas después de la vacunación se inocularon intraperitonealmente con una suspensión de *A. veronii* equivalente a la dosis letal media (1 x 10⁸ ufc/ml). A partir de ese momento se registró la mortalidad de los peces diariamente durante tres semanas. El porcentaje relativo de supervivencia (PRS) se calculó de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$PRS = 1 - \left(\frac{\% \text{ mortalidad en peces vacunados}}{\% \text{ mortalidad en peces control}} \right) \times 100$$

Al final se tomaron muestras de riñón, intestino, hígado y bazo de los peces que sobrevivieron a la infección para su análisis histopatológico. La eficacia de las vacunas se determinó al comparar el PRS y los daños histopatológicos de los peces sometidos a los tratamientos.

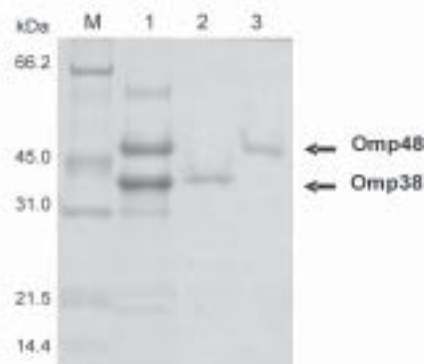


Fig. 1. Perfil electroforético de las proteínas de membrana externa (OMPs) de *A. veronii*. M, marcador de peso molecular en kilodaltons (kDa); carril 1, OMPs totales; carril 2, Omp38; carril 6, Omp48.

Resultados

Omp38 y Omp48: adhesinas de *A. veronii*

Se identificaron y purificaron dos proteínas en la membrana externa (OMPs) de *A. veronii* de 38 y 48 kDa (figura 1), denominadas Omp38 y Omp48.

Estas proteínas mostraron afinidad por componentes de mucosas (mucina y lactoferrina) y por proteínas de la matriz extracelular (colágena y fibronectina) (figura 2). Esta propiedad está comúnmente asociada a adhesinas bacterianas.

Los anticuerpos policlonales contra Omp38 y Omp48 inhibieron significativamente la adhesión de *A. veronii* a células epiteliales *in vitro* (figura 3), e inhibieron, de manera cruzada, la adhesión de otras especies de *Aeromonas* (*A. hydrophila* y *A. caviae*) y *Vibrio* (*V. vulnificus* y *V. parahaemolyticus*) hasta en un 40%. Además, un efecto de inhibición competitiva se observó al pre-incubar las células epiteliales con las proteínas Omp38 y Omp48 puras. La inhibición fue específica ya que las bacterias tratadas con suero de conejo no inmunizado, carente de anticuerpos policlonales anti-OMPs, no presentaron inhibición de la adhesión (figura 3).

Estos resultados sugieren que ambas proteínas funcionan como factores de adhesión en *A. veronii*

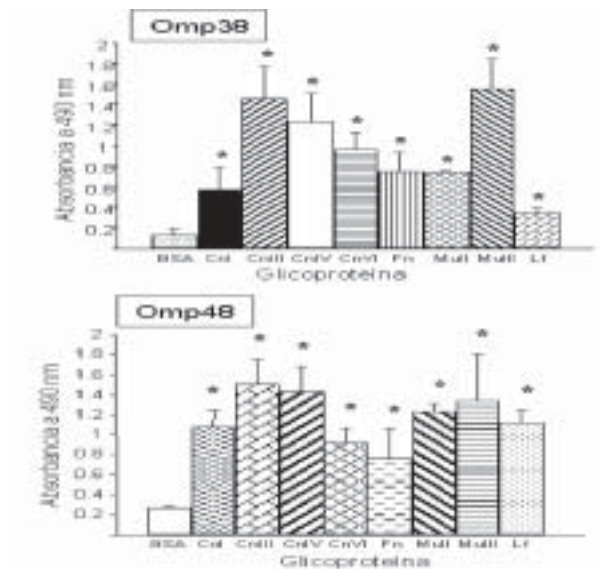


Fig. 2. Interacción de Omp38 y Omp48 con glicoproteínas inmobilizadas en placas de ELISA. BSA, albúmina sérica bovina como control negativo; Cnl, III, IV, VI, Colágenos tipo I, III, IV, y VI, respectivamente; Fn, Fibronectina; Mull, Mucina tipo II; MullI, Mucina tipo III; Lf, Lactoferrina. (*, $P < 0.05$).

y que otras especies de *Aeromonas* y *Vibrio* poseen proteínas en su superficie con determinantes antigénicos conservados.

Clonación de los genes *omp38* y *omp48*

Se determinó la secuencia N-terminal y de algunos péptidos internos de las proteínas Omp38 y Omp48. A partir de éstos se diseñaron oligonucleótidos con los cuales se amplificaron fragmentos de los genes *omp38* y *omp48*, por medio de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Para clonar los genes completos se construyeron y tamizaron librerías genómicas y sub-genómicas de *A. veronii*, usando los productos de PCR como sondas. Sin embargo, al no obtener clonas positivas, debido a la posible toxicidad de los genes hacia la cepa de *E. coli* hospedera, éstos se tuvieron que clonar por medio de PCR inversa. Las secuencias de aminoácidos deducidas a partir de las secuencias nucleotídicas indican que Omp38 (No. Acceso AF538867) y Omp48 (No. Acceso AF538866) tienen características típicas de proteínas de membrana externa tipo porinas, incluyendo ausencia de cisteína, alto contenido de glicina, bajo contenido de prolina, punto isoeléctrico ácido y un péptido líder altamente hidrofóbico en su extremo N-terminal, con el sitio de reconocimiento, [Ala-X-Ala], para la peptidasa señal I. La proteína Omp38 es similar a las porinas PhoE, OmpC y OmpF de bacterias entéricas y posee una estructura secundaria teórica constituida por ocho asas expuestas y 16 láminas β -antiparalelas transmembranales, con residuos conservados importantes para la estructura-función de las porinas. La proteína Omp48 es similar a la familia de porinas LamB y su modelo de conformación secundaria consiste de nueve asas expuestas y 18 láminas β -antiparalelas transmembranales.

Evaluación de las vacunas de ADN

Para la construcción de las vacunas de ADN, denominadas pOMP38P y pOMP48P, se subclonaron los genes *omp38* y *omp48* en el vector de expresión pcDNA3.1, bajo el control del promotor temprano de citomegalovirus (figura 4). En un ensayo preliminar se observó una expresión baja, pero significativa de Omp38 y Omp48 a partir de pOMP38P y pOMP48P en células eucariotas *in vitro* (figura 5). Se evaluó su efecto protector contra infecciones experimentales por *A. veronii* en cabrilla arenera (*P. maculatofuscatus*).

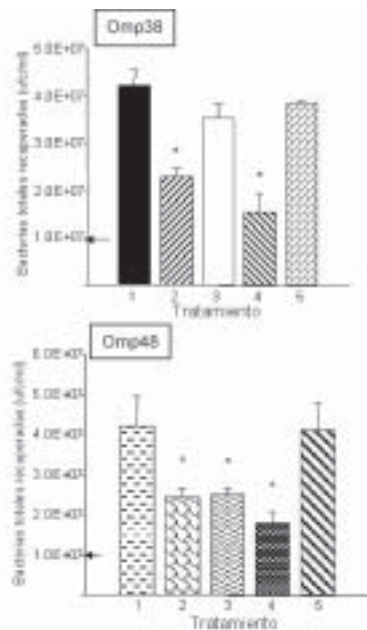


Fig. 3. Adhesión de *A. veronii* a células HeLa. (1) bacterias y células sin tratamiento; (2) bacterias incubadas con antisuero anti-Omp38 o anti-Omp48, diluido 1:10; (3) con antisuero anti-Omp38 o anti-Omp48, diluido 1:100; (4) células incubadas con Omp38 u Omp48, 50 µg/pozo; (5) bacterias incubadas con suero de conejo, diluido 1:10. Las flechas indican la cantidad de inóculo inicial. (*, P < 0.05).

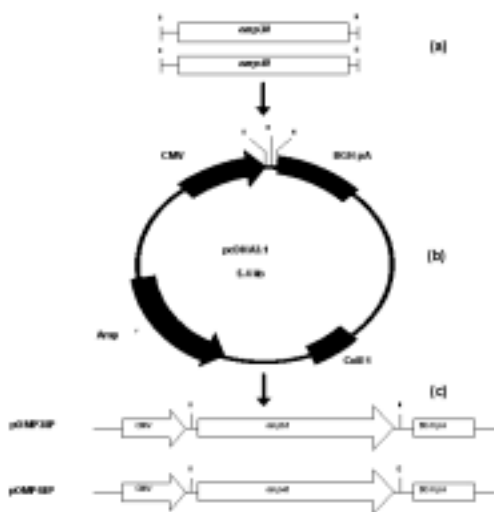


Fig. 4. Diagrama esquemático de la construcción de las vacunas de ADN. Los genes amplificados por PCR (a), fueron clonados en el vector pcDNA3.1 (b), para generar los vectores de expresión (vacunas de ADN) (c). Abreviaturas: CMV, promotor inmediato temprano del citomegalovirus; BGH pA, señal de poli-adenilación de la hormona de crecimiento bovina; Amp^r, gen de resistencia a ampicilina; ColEI, origen de replicación para *E. coli*; B, BAM; E, EcoRI.

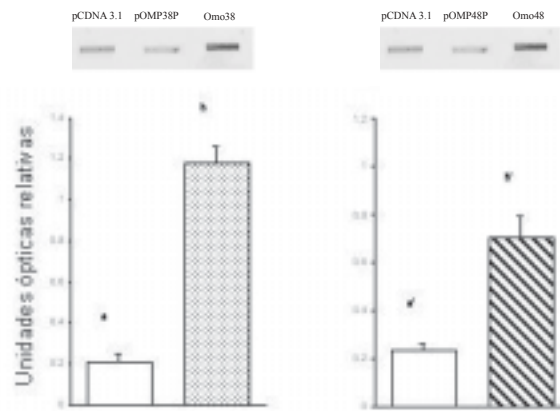


Fig. 5. Expresión de Omp38 y Omp48 en células HeLa. Los resultados se expresan como unidades ópticas relativas, que es la relación de la densidad de las bandas dividida por la actividad β-galactosidasa de cada tratamiento. Las proteínas Omp38 y Omp48 purificadas se usaron como controles positivos y las proteínas totales de células transfectadas con pcDNA3.1 se usaron como controles negativos. (P < 0.05)

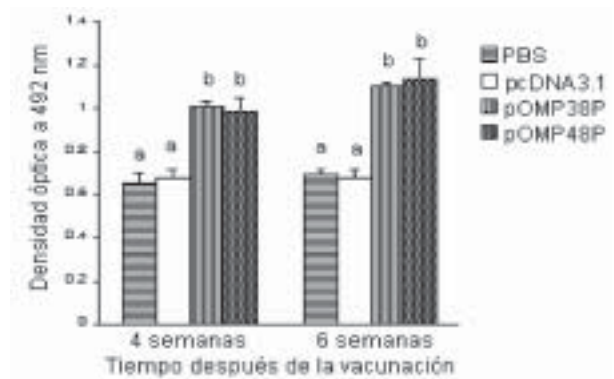


Fig. 6. Detección de anticuerpos anti-Omp38 y anti-Omp48 en suero de peces vacunados con los plásmidos pOMP38P y pOMP48P. La cantidad de anticuerpos específicos presentes en el suero se determinó por medio de ELISA, cuatro y seis semanas después de la vacunación. (P < 0.05).

Los peces vacunados intramuscularmente con las vacunas de ADN presentaron escasos, pero significativos, niveles de anticuerpos anti-Omp38 y anti-Omp48 en suero, 4 y 6 semanas después de la vacunación, comparado con los peces vacunados con el plásmido pcDNA3.1 “vacío” o con solución de fosfatos (figura 6).

Los peces vacunados con pOMP38P, pOMP48P, o una mezcla de ambos, y retados con *A. veronii*, presentaron un nivel de protección considerable, registrando un porcentaje relativo de supervivencia

entre 50-60% (tabla I). De acuerdo al análisis histopatológico, los principales daños que sufrieron los peces, como consecuencia de la infección, fueron en bazo, hígado y riñón. Principalmente, en estos tejidos se presentó necrosis, elevación del número de melanomacrófagos e infiltración hemorrágica. Estos daños histológicos se observaron únicamente en 40% de los peces inmunizados, mientras que en los peces control no vacunados, la presencia de estos daños fue del 80%. Los resultados indican que la vacunación de cabrilla arenera con una sola dosis de vacunas de ADN que codifican para Omp38 u Omp48 confiere protección parcial contra infecciones experimentales con *A. veronii*, a pesar de no generar una respuesta humoral fuerte.

Tabla I. Mortalidad acumulada y porcentaje relativo de supervivencia de peces inmunizados con las vacunas de ADN y retados con *A. veronii*.

Vacunas:	Mortalidad acumulada (peces muertos/peces totales)	PRS*
Buffer PBS	41.4% (12/29)	—
pcDNA3.1	43.3% (13/30)	—
pOMP38P	20% (6/30)	53.8%
pOMP48P	17.2% (5/29)	60.2%
pOMP38P + pOMP48P	16.6% (5/30)	61.6%

*Porcentaje relativo de supervivencia, con relación a los peces control vacunados con el vector pcDNA3.1 solo.

Discusión y conclusiones

Adhesión bacteriana

Para iniciar una infección, las bacterias patógenas deben tener la capacidad de adherirse a un tejido del hospedero o a sus componentes asociados para colonizarlo. Existe una relación directa entre la capacidad de algunas bacterias de adherirse a glicoproteínas del hospedero y la patogenicidad de las mismas.^{5,12}

Dos proteínas de membrana externa (OMPs) de *A. veronii*, Omp38 y Omp48, interaccionaron con diversas glicoproteínas como fibronectina, colágenas, mucina y lactoferrina (figura 2). Algunas OMPs, de otras bacterias patógenas como *Vibrio cholerae* y *Pseudomonas aeruginosa*, también presentan esta propiedad.^{8,13}

Se evaluó si la adhesión de *A. veronii* a células epiteliales es mediada por Omp38 y Omp48, para lo cual se utilizaron células HeLa cultivadas *in vitro*, las cuales han servido tradicionalmente como modelo para estudiar patrones de adhesión de otras bacterias.¹⁴ Los anticuerpos policlonales dirigidos contra Omp38 y Omp48 inhibieron significativamente la adhesión de *A. veronii* a células HeLa. En contraste, el suero de conejo no inmunizado, carente de anticuerpos anti-Omp38 y anti-Omp48, no inhibió la adhesión bacteriana, lo cual demuestra que la inhibición fue debida al bloqueo de estas proteínas por parte de los anticuerpos específicos. Además, los anticuerpos policlonales inhibieron de manera cruzada la adhesión de otras especies relacionadas de *aeromonas* y *vibrios*. En el ensayo de inhibición competitiva se observó que las proteínas Omp38 y Omp48 compiten por los potenciales receptores en las células HeLa, derivando en una disminución de la adhesión de *A. veronii* (figura 3). La existencia de cepas adherentes de *aeromonas* spp. carentes de los factores de adhesión clásicos como el antígeno O de los LPS, fimbrias (pilis) o flagelos, podría ser explicada por la participación de las OMPs como potenciales adhesinas.

Colectivamente, estos resultados muestran que Omp38 y Omp48 pueden funcionar como factores de adhesión de *A. veronii* y que otras especies relacionadas, tanto de *aeromonas* como de *vibrio*, poseen componentes en su superficie con epítopes conservados. Este hecho es de particular relevancia, tomando en cuenta que la diversidad antigénica de estos patógenos dificulta en gran medida el desarrollo de vacunas.⁵

Clonación molecular

Los oligonucleótidos degenerados que se diseñaron a partir de los péptidos secuenciados de Omp38 y Omp48, funcionaron para la amplificación específica, por medio de PCR, de fragmentos de los respectivos genes *omp38* y *omp48*. Los genes *omp38* y *omp48* completos se clonaron por medio de PCR inversa. Esta técnica sirve para determinar las secuencias flanqueantes (río arriba y río abajo) de una región de secuencia conocida.¹¹

La secuencia de aminoácidos de Omp38, deducida a partir de la secuencia nucleotídica de *omp38*, sugiere que ésta es una OMP tipo porina no específica, tal como las porinas PhoE, OmpC y OmpF de *E. coli* y otras enterobacterias.¹⁵ De acuerdo al ali-

neamiento múltiple de secuencias y a su patrón de hidrofobicidad, Omp38 presenta un modelo teórico de estructura secundaria constituido por ocho asas externas y 16 láminas β antiparalelas transmembranales.

El análisis de la secuencia de aminoácidos indica que Omp48 es una proteína de la familia de porinas LamB. Estas proteínas están presentes en otras bacterias patógenas como *Salmonella typhimurium*, *Klebsiella pneumoniae*, *A. salmonicida*, *V. cholerae*, *V. parahaemolyticus*, *Actinobacillus* y *Yersinia*, y sirven de poro de entrada de la maltosa (maltopinas) al interior de las bacterias.¹⁵ Al igual que LamB, Omp48 presenta una conformación secundaria constituida por nueve asas expuestas y 18 láminas β -antiparalelas transmembranales.

Las bacterias Gram-negativas interactúan con superficies y moléculas presentes en el ambiente externo, a través de las regiones hidrofílicas expuestas (asas) de sus OMPs. Por lo tanto, además de su papel fisiológico, las porinas bacterianas participan en otras facetas, asociadas a la adaptación, supervivencia y prevalencia de las bacterias en un determinado ambiente.¹⁶ Las asas de Omp38 y Omp48, al estar expuestas en la superficie de *A. veronii*, podrían estar contribuyendo a las propiedades adhesivas de estas proteínas, y por ende, de la bacteria, al interactuar con receptores específicos de las células epiteliales o de manera inespecífica, por medio de interacciones electroestáticas.

Vacunación genética

Se ha demostrado previamente que las OMPs son altamente antigénicas y que la vacunación de peces con estas proteínas es un método efectivo para prevenir infecciones por *A. salmonicida* y *A. hydrophila*.^{17,18} Sin embargo, su efectividad en forma de vacunas de ADN no ha sido demostrada. En este estudio se construyeron vacunas de ADN, con base en los genes *omp38* y *omp48* de *A. veronii* en el vector de expresión pcDNA3.1 (figura 4).

Teóricamente, cualquier gen que codifique para una proteína antigénica de un patógeno puede ser usado para la elaboración de vacunas de ADN, siempre y cuando el uso de codones del gen en cuestión permita su expresión en las células del hospedero. Se ha demostrado que existe una correlación directa entre el uso de codones de genes que codifican para antígenos de virus, bacterias y parásitos y su

nivel de expresión en hospederos heterólogos.¹⁹⁻²² Los vectores construidos, pOMP38P y pOMP48P, poseen todas las secuencias requeridas para la expresión de genes, por lo que la modesta expresión de las proteínas Omp38 y Omp48 en células HeLa podría atribuirse a la diferencia en el uso de codones (figura 5).

La baja respuesta humoral observada en los peces inmunizados intramuscularmente con las vacunas de ADN (figura 6), podría estar asociada a bajos niveles de expresión del antígeno en las células del hospedero.¹⁹⁻²² Por otra parte, la secreción de la proteína antigénica de las células musculares (miocitos) puede influenciar la magnitud de la producción de anticuerpos. El vector pcDNA3.1 no posee una secuencia señal de secreción para expresar a los antígenos como proteínas extracelulares, por lo tanto, Omp38 y Omp48 no son secretadas. En casos como éste, los linfocitos B (LcB) son activados cuando el antígeno es liberado de los miocitos, después de que éstos son lisados por acción de los linfocitos T (LcT) citotóxicos específicos contra el antígeno, daño celular o muerte natural.²³ Para estudios posteriores sobre el desarrollo de vacunas de ADN con base en antígenos bacterianos se recomienda la incorporación de dicha secuencia.

La vacunación generó una protección moderada contra infecciones experimentales por *A. veronii* (tabla I), además de un porcentaje menor de peces con alteraciones histopatológicas. Similares niveles de protección han sido observados en salmón (*Salmo salar*) y trucha arcoiris (*Oncorhynchus mykiss*), inmunizados con OMPs.¹⁷⁻²⁴

Aunque no se ha logrado establecer una correlación respuesta humoral-protección, se ha propuesto que los anticuerpos generados por vacunación participan en la prevención de la adhesión e invasión bacteriana del epitelio de agallas, piel y aletas de peces durante las primeras etapas de la infección.²⁵ La baja respuesta humoral generada con pOMP38P o pOMP48P, sugiere que la protección parcial registrada en los peces vacunados involucra más bien a la inmunidad mediada por células. Hay muy pocos estudios sobre la inmunidad celular de peces en respuesta a la vacunación, ya que no existen marcadores para la identificación de subpoblaciones de LcT.²⁶ La activación de macrófagos en peces es importante en la defensa contra patógenos bacterianos como *A. salmonicida* y *R. Salmoninarum*.²⁷ Las proteínas Omp38 y Omp48 (expresadas a partir de pOMP38P y pOMP48P) po-

drían ser presentadas a través del MHCII, al ser tomadas por las células presentadoras de antígeno, resultando en la activación de los LcT cooperadores y en la activación de macrófagos.

Con esta investigación se amplía el conocimiento sobre los mecanismos de adhesión de *A. veronii* y se establece, por vez primera, el potencial de los genes que codifican para OMPs de bacterias Gram-negativas como componentes antigénicos de vacunas de ADN para el control de infecciones bacterianas de peces cultivados.

Resumen

It has been estimated that 10-15% of cultured aquatic organisms are lost because of infectious diseases. The motile Aeromonads, bacterial pathogens of fish, are an example. Two proteins implicated in *Aeromonas veronii* adhesion to epithelial cells were identified. Fish immunized with DNA vaccines, which decode for these adhesions, registered higher survival levels and less histopathological signs following *A. veronii* infection. This research expands the knowledge concerning bacterial adhesion mechanisms, and established the potential of DNA vaccines for the control of bacterial infections in cultured fish.

Palabras clave: Vacunas de ADN, *Aeromonas*, Adhesión bacteriana, Porinas, Acuicultura.

Abstract

It has been estimated that 10-15% of cultured aquatic organisms are lost because of infectious diseases. The motile Aeromonads, bacterial pathogens of fish, are an example. Two proteins implicated in *Aeromonas veronii* adhesion to epithelial cells were identified. Fish immunized with DNA vaccines coding for this adhesins registered higher survival levels and less histopathological signs following *A. veronii* infection. This research expands the knowledge concerning bacterial adhesion mechanisms, and establishes the potential of DNA vaccines for the control of bacterial infections in cultured fish.

Keywords: DNA vaccines, *Aeromonas*, Bacterial adhesion, Porins, Aquaculture.

Referencias

1. Austin, B. y Austin, D.A. (1999). *Bacterial fish pathogens: disease in farmed and wild fish*. New York: Springer Verlag.
2. Janda, J.M. and Abbott, S.L. (1998). Evolving concepts regarding the genus *Aeromonas*: an expanding panorama of species, disease presentations, and unanswered questions. *Clinical Infectious Diseases* 27: 332-344.
3. Newman, S. G. (1993). Bacterial vaccine for fish. *Annual Review of Fish Diseases* 3: 145-185.
4. Rajendra-Krishnan, B. (2000). Current status of DNA vaccines in veterinary medicine. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 43:3-11.
5. Ofek, I. y Doyle, R.J. (1994). Bacterial adhesion to cells and tissues. Chapman & Hall, New York. pp. 578.
6. Jeanteur, D., Gletsu, N., Pattus, F. y Buckley, J.T. (1992). Purification of *Aeromonas hydrophila* major outer-membrane proteins: N-terminal sequence analysis and channel-forming properties. *Molecular Microbiology* 6: 3355-3363.
7. Harlow, E. y Lane, D. (1988). «Antibodies. A laboratory manual.» Cold Spring Harbor Laboratory, New York.
8. Sperandio, V., Giron, J.A., Silveira, W.D. y Kaper, J.B. (1995). The OmpU outer membrane protein, a potential adherence factor of *Vibrio cholerae*. *Infection and Immunity* 63: 4433-4438.
9. Torres, A.G. y Kaper, J.B. (2003). Multiple elements controlling adherence of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 to HeLa cells. *Infection and Immunity* 71: 4985-4995.
10. Sambrook, J., Fritsch, E.F. y Maniatis, T. (1989). «Molecular Cloning: A Laboratory Manual.» Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
11. Ochman, H., Gerber, A.S. y Hartl, D.L. (1988). Genetic applications of an inverse polymerase chain reaction. *Genetics* 120: 621-623.
12. Westerlund, B. y Korhonen, T.K. (1993). Bacterial proteins binding to the mammalian extracellular matrix. *Molecular Microbiology* 9: 687-694.
13. Scharfman, A., Kroczyński, H., Carnoy, C., Van Brussel, E., Lamblin, G., Ramphal, R. y Roussel, P. (1996). Adhesion of *Pseudomonas aeruginosa* to respiratory mucins and expression of mucin-

- binding proteins are increased by limiting iron during growth. *Infection and Immunity* 64: 5417-5420.
14. Albert, M.J., Grant, T. y Robins-Browne, R. (2000). Studying bacterial adhesion to cultured cells. In An, Y.H. y Friedman, R.J. (eds.) *Handbook of Bacterial Adhesion. Principles, Methods and Applications*. Totowa, New Jersey: Human Press. pp. 541-552.
 15. Jeanteur, D., Lakey, J.H. y Pattus, F. (1991). The bacterial porin superfamily: sequence alignment and structure prediction. *Molecular Microbiology* 5: 2153-2164.
 16. Achouak, W., Heulin, T. y Pages, J.M. (2001). Multiple facets of bacterial porins. *FEMS Microbiology Letters* 199: 1-7.
 17. Lutwyche, P., Exner, M.M., Hancock, R.E. y Trust, T.J. (1995). A conserved *Aeromonas salmonicida* porin provides protective immunity to rainbow trout. *Infection and Immunity* 63: 3137-3142.
 18. Rahman, M.H. y Kawai, K. (2000). Outer membrane proteins of *Aeromonas hydrophila* induce protective immunity in goldfish. *Fish & Shellfish Immunology* 10: 379-382.
 19. Andre, S., Seed, B., Eberle, J., Schraut, W., Bultmann, A. y Haas, J. (1998). Increased immune response elicited by DNA vaccination with a synthetic gp120 sequence with optimized codon usage. *Journal of Virology* 72: 1497-1503.
 20. Uchijima, M., Yoshida, A., Nagata, T. y Koide, Y. (1998). Optimization of codon usage of plasmid DNA vaccine is required for the effective MHC class I-restricted T cell responses against an intracellular bacterium. *Journal of Immunology* 161: 5594-5599.
 21. Nagata, T., Uchijima, M., Yoshida, A., Kawashima, M. y Koide, Y. (1999). Codon optimization effect on translational efficiency of DNA vaccine in mammalian cells: analysis of plasmid DNA encoding a CTL epitope derived from microorganisms. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 261: 445-451.
 22. Stratford, R., Douce, G., Zhang-Barber, L., Fairweather, N., Eskola, J. y Dougan, G. (2000). Influence of codon usage on the immunogenicity of a DNA vaccine against tetanus. *Vaccine* 19: 810-815.
 23. Donnelly, J.J., Liu, M.A. y Ulmer, J.B. (2000). Antigen presentation and DNA vaccines. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 162: S190-S193.
 24. Bricknell, I.R., King, J.A., Browden, T.J. y Ellis, A.E. (1999). Duration of protective antibodies, and the correlation with protection in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) following vaccination with an *Aeromonas salmonicida* vaccine containing iron-regulated outer membrane proteins and secretory polysaccharide. *Fish & Shellfish Immunology* 9: 139-151.
 25. Yin, Z., Lam, T.J. y Sin, Y.M. (1996). The role of specific antiserum of catfish, *Clarias gariepinus*, as a defence against *Aeromonas hydrophila*. *Fish & Shellfish Immunology* 6: 57-69.
 26. Manning, M.J. y Nakanishi, T. (1996). The specific immune system: cellular defenses. In Iwama, G. y Nakanishi, T. (eds.) *The Fish Immune System: Organism, Pathogen and Environment*. Academic Press Inc, New York. pp. 160-206.
 27. Ellis, A.E. (1997). Furunculosis: protective antigens and mechanisms. In Bernoth, E. M., Ellis, A.E., Midtlyng, P.J., Olivier, G. and Smith, P. (eds.) *Furunculosis: multidisciplinary fish disease research*. Academic Press, London. pp. 366-381.