



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

Dpto. de Ciencia Animal

Estrategias novedosas de vacunación en acuicultura

Trabajo Fin de Máster

Máster Universitario en Acuicultura

AUTOR/A: Ruiz Megía, Raúl

Tutor/a: Tomás Vidal, Ana

CURSO ACADÉMICO: 2021/2022



Estrategias novedosas de vacunación en acuicultura

Trabajo Fin de Máster
septiembre de 2022

Autor:
RAÚL RUIZ MEGÍA

Director/tutor académico:
EVA SANJUAN CARO

Resumen

Hoy en día las enfermedades infecciosas suponen una de las principales causas que producen mayores pérdidas en acuicultura. Por lo tanto, establecer medidas de profilaxis es fundamental para garantizar un estado de salud óptimo de los peces lo que conllevaría a niveles buenos de producción. Hace décadas se empleaba como medida preventiva el uso de antibióticos, pero su abuso conlleva a la resistencia adquirida a los antibióticos por parte de las bacterias, por lo que no es un método eficiente a largo plazo. Una de las mejores alternativas es la vacunación ya que tiene una mayor capacidad de prevención de enfermedades y los patógenos no pueden adquirir resistencia frente a ellas. Las vacunas deben poseer una serie de propiedades y su uso depende de diversos factores. La vacunación es necesaria ya que ha demostrado su efectividad como medida profiláctica trayendo consigo un aumento de la producción de diversas especies lo que beneficia al crecimiento del sector. La mayoría de las vacunas autorizadas actualmente son inactivadas, atenuadas o subunitarias y han demostrado ser muy útiles. El objetivo de este artículo bibliográfico es dar a conocer algunas de las estrategias experimentales más novedosas en la acuicultura actual y compararlas entre sí. Para ello se ha realizado una búsqueda bibliográfica utilizando principalmente las bases de datos *Web of Science* y *ScienceDirect*, obteniendo 5367 y 5743 resultados respectivamente. Hoy en día existen varias vacunas experimentales en desarrollo con buenas expectativas a futuro, estas son las vacunas basadas en nanopartículas, mucosales, de ARN, antiidiotipo y el uso de la tecnología de vacunacología inversa. Pese a su prometedor futuro aún no han sido probadas en peces de interés en acuicultura por lo que es necesario que se fomente su investigación para disponer de más técnicas de prevención y control de enfermedades.

Palabras clave

Vacuna, inmunidad, acuicultura, patógeno, antígeno, anticuerpo, profilaxis, estrategia

Abstract

Nowadays, infectious diseases are one of the major causes of losses in aquaculture. Therefore, establishing prophylactic measures is fundamental to guarantee an optimal state of health of the fish, which would lead to good production levels. Decades ago, the use of antibiotics was used as a preventive measure, but their abuse leads to acquired resistance to antibiotics by bacteria, and therefore it is not an efficient method in the long term. Vaccination has a greater capacity for disease prevention and pathogens cannot acquire resistance to them, so it is an excellent preventive method. Vaccines must possess a few properties and their use depend on several factors. Vaccination is necessary as it has proven to be effective as a prophylactic measure, bringing with it an increase in the production of various species, which benefits the growth of the sector. The main vaccines are currently inactivated, attenuated or subunit vaccines and have proven to be very useful. The aim of this bibliographic article is to present some of the most innovative experimental strategies in current aquaculture and to compare them with each other. For this purpose, a bibliographic search was carried out using mainly the Web of Science and ScienceDirect databases, obtaining 5367 and 5743 results, respectively. There are currently several experimental vaccines under development with good expectations for the future, such as vaccines based on nanoparticles, mucosal, RNA, anti-idiotype and reverse vaccinology technology. These techniques have barely been tested in fish of interest in aquaculture, so it is necessary to promote their research in order to have more techniques for disease prevention and control.

Keywords

Vaccine, immunity, aquaculture, pathogen, antigen, antibody, prophylaxis, strategy

1. Introducción	4
1.1. Sistema inmunitario de los peces	4
1.1.1. Inmunidad inespecífica	4
1.1.2. Inmunidad específica	6
1.2. ¿Qué es una vacuna?	8
1.3. Tipos de vacunas	9
1.3.1. Inactivadas	9
1.3.2. Atenuada	10
1.3.3. Recombinante	10
1.3.4. Vacuna subunitaria	10
1.4.1 Momento de la vacunación	13
1.4.2 Temperatura del agua	13
1.4.3 Tamaño del pez	14
1.4.4 Administración	14
1.4.5 Dosis de refuerzo	15
1.5. Necesidad de vacunación en acuicultura	16
1.6. Historia de la vacunación	18
2. Objetivo	20
3. Metodología	20
4. Resultados	20
5. Técnicas novedosas	21
5.1. Vacuna basada en nanopartículas	21
5.2 Vacunas mucosales	21
5.3 Vacuna de ARN	22
5.4 Vacuna anti-idiotipo	23
5.5 Vacunas vegetales comestibles	24
5.6 Vacunación inversa	25
6. Comparación entre técnicas	26
7. Conclusión	28
8. Referencias bibliográficas	28

1. Introducción

1.1. Sistema inmunitario de los peces

El sistema inmunitario de los peces presenta dos tipos de defensa: defensas inespecíficas o innatas y defensas específicas o adaptativas. La respuesta innata es la primera en desencadenarse en la defensa inmunitaria y es un factor crucial en la resistencia a las enfermedades. La respuesta adaptativa de los peces suele tardar más en efectuarse, pero es esencial para una inmunidad duradera y es un factor clave para el éxito de la vacunación. El aumento del sector de la acuicultura en las últimas décadas ha fomentado un incremento en los estudios sobre el sistema inmunitario de los peces y su defensa contra las enfermedades, sobre todo de especies con interés comercial. Estas investigaciones han ayudado a definir las condiciones óptimas para el mantenimiento de peces inmunocompetentes en cultivo, para la cría de peces, así como para el desarrollo y la mejora de medidas profilácticas como la vacunación y el uso de probióticos e inmunoestimulantes en las especies de acuicultura (Secombes & Wang, 2012).

1.1.1. Inmunidad inespecífica

Receptores de Reconocimiento de Patrones (PRRs): La respuesta inmunitaria innata se inicia con la detección de agentes infecciosos por receptores de reconocimiento de patrones (PRRs) (Palm & Medzhitov, 2009). Los vertebrados han desarrollado una amplia gama de PRRs, tanto a nivel extracelular como intracelular, para detectar y responder a diferentes patrones moleculares asociados a patógenos (PAMP) o a los patrones moleculares asociados al peligro (DAMP), estos últimos son moléculas endógenas liberadas por las células dañadas o estresadas del huésped (Hansen et al., 2011).

Los PRRs están codificados en la línea germinal y pueden clasificarse en al menos cinco grupos principales. En su mayor parte, expresados por las células de la primera línea defensiva del sistema inmunitario, incluyendo monocitos, macrófagos, células dendríticas y neutrófilos. Además, algunas células no inmunitarias expresan los PRR, como las células del sistema nervioso. La localización celular de los PRRs varía; se expresan en la superficie celular, en los endosomas o dentro del citosol de las células huésped. La existencia de múltiples tipos de PRRs en diferentes compartimentos celulares, algunos de los cuales detectan ligandos similares, es un ejemplo la compleja sinergia en las respuestas inmunitarias innatas de un organismo. Además de ser la primera línea de defensa, el sistema inmunitario

innato desempeña un papel esencial en la inducción y manipulación de la inmunidad adaptativa. (Secombes & Wang, 2012).

Péptidos antimicrobianos (AMPs): Los peces luchan continuamente contra los patógenos secretando una amplia gama de péptidos antimicrobianos (AMPs) como mecanismo de defensa innato. Los AMPs, también conocidos como péptidos de defensa del huésped, desempeñan un papel importante en el sistema inmunitario innato y protegen contra una amplia variedad de infecciones bacterianas, víricas, fúngicas y otros patógenos mediante acciones líticas o ionóforas disruptivas (Smith et al., 2010). En general, los AMPs se secretan en la saliva, las mucosas, el sistema circulatorio y otras zonas que son vulnerables a la entrada de patógenos (Noga et al., 2011). Además de sus efectos microbicidas directos, los AMPs desempeñan otras funciones en las respuestas inflamatorias, como el reclutamiento de neutrófilos y fibroblastos, la promoción de la degranulación de los mastocitos, la mejora de la fagocitosis y la disminución de la fibrinólisis (Plouffe et al., 2005).

Sistema del complemento: El sistema del complemento es un componente primordial en la defensa innata. En mamíferos está compuesto por unas 30 proteínas plasmáticas distintas y proteínas asociadas a la membrana responsables de varias funciones con efecto inmunitario. Entre ellas; la eliminación de patógenos invasores, la promoción de las respuestas inflamatorias, la eliminación de células apoptóticas, restos celulares, desechos celulares necróticos y la modulación de las respuestas inmunitarias adaptativas (Nakao et al., 2011). Ahora es evidente que casi todos los componentes del sistema del complemento de los mamíferos tienen homólogos en los teleósteos, por lo tanto, el sistema de los teleósteos es equivalente o comparable al de los mamíferos tanto desde el punto de vista estructural como funcional (Boshra et al., 2006).

El sistema del complemento de los teleósteos no sólo opera en la sangre, la linfa y los fluidos corporales, sino que también está presente en la mucosa en contacto con el medio ambiente, potencialmente preparado para los patógenos invasores. (Ricklin et al., 2010).

Componentes celulares: En la defensa inespecífica participan varios tipos celulares; monocitos, macrófagos, neutrófilos, eosinófilos, células citotóxicas inespecíficas, células dendríticas, mastocitos y células rodlet.

Los monocitos y los macrófagos son las células involucradas principalmente en la fagocitosis, en matar a los patógenos y producir citoquinas. El sistema fagocítico mononuclear está formado por células endoteliales y macrófagos que recubren los pequeños vasos sanguíneos y eliminan productos de desecho macromoleculares solubles de la circulación mediante endocitosis mediada por receptores y fagocitosis (Whyte, 2007). Los neutrófilos y

eosinófilos producen citoquinas para reclutar células de defensa en la zona infectada, fagocitan, producen especies reactivas del oxígeno y nitrógeno, son capaces de degranular y liberar trampas extracelulares de neutrófilos (NETs) en respuesta a los patógenos (Seternes et al., 2002). Se ha descrito que las células citotóxicas inespecíficas (NCCs) y las células similares a las *natural killer* (NK) participan en la citotoxicidad no específica mediada por células (CMC) en la fiebre induciendo la apoptosis de las bacterias patógenas. Las NCC destruyen una amplia variedad de células objetivo, incluyendo células tumorales, células infectadas por virus, protozoos y expresan componentes para la exocitosis de gránulos de las CMC similares a los linfocitos citotóxicos de mamíferos (Praveen et al., 2004). Las células dendríticas se activan por ligandos de PRRs y son capaces de fagocitar pequeñas partículas y procesar antígenos capaces de interactuar con los linfocitos T inmaduros (Bassity & Clark, 2012). Los mastocitos de los teleósteos se localizan en las proximidades de los vasos sanguíneos del intestino, las branquias y la piel, y pueden desempeñar un papel importante en la respuesta inflamatoria, ya que expresan una serie de proteínas funcionales, como las fosfatasas alcalinas y ácidas, la arilsulfatasa, la 5'-nucleotidasa, la lisozima y los AMP, que actúan contra un amplio espectro de patógenos (Dezfuli et al., 2010). Las células *rodlet* son únicas en los peces y se caracterizan morfológicamente por sus típicas inclusiones citoplasmáticas, los llamados *rodlets*, y un borde celular engrosado en forma de cápsula. Muestran una clara asociación con tejidos u órganos epiteliales (Siderits & Bielek, 2009). Se sugiere que la célula *rodlet* puede representar un tipo de granulocito eosinófilo que está presente en los tejidos cuando es inmaduro y que madura en respuesta a los estímulos apropiados, de forma similar a los precursores de mastocitos (Reite & Evensen, 2006). Existe una estrecha relación entre la presencia de helmintos u otros agentes nocivos y la presencia de células *rodlet*. En los epitelios afectados (por ejemplo, las branquias o el tracto intestinal) pueden observarse agregaciones masivas de dichas células, lo que apunta a un papel funcional de las células *rodlets* en la defensa del huésped teleósteo contra los parásitos.

1.1.2. Inmunidad específica

La respuesta inmunitaria adaptativa está coordinada por dos grandes grupos de linfocitos, las células B que median la respuesta humoral segregando anticuerpos y las células T que median la respuesta celular.

Respuesta humoral: En la respuesta humoral, los linfocitos B se activan para secretar anticuerpos, que son formas solubles del receptor de antígeno Ig de superficie. Los anticuerpos circulan por el torrente sanguíneo y atravesando los vasos sanguíneos alcanzan

los demás fluidos corporales, donde se unen específicamente al antígeno que estimuló su producción. La unión de los anticuerpos al antígeno inactiva los virus y las toxinas microbianas (como la toxina del tétanos o la toxina de la difteria) al bloquear su capacidad de unirse a los receptores de las células del huésped (Secombes & Wang, 2012). La unión de anticuerpos también marca a los patógenos invasores para su destrucción, principalmente por parte de las células con receptores en la superficie celular para las moléculas de Ig, como las células fagocíticas del sistema inmunitario innato (Schroeder & Cavacini, 2010).

En casi todas las especies estudiadas pertenecientes a los principales órdenes de peces teleósteos se han identificado tres isotipos, IgM, IgD e IgT (también llamada IgZ en el pez cebra). La principal excepción es que la IgT no se ha encontrado hasta ahora en el pez gato de canal (*I. punctatus*) (Edholm et al., 2011). La clase de anticuerpos IgM ha sido considerada durante mucho tiempo la más antigua y es la Ig más prevalente en el plasma de los peces (Flajnik & Kasahara, 2010). La IgM contribuye a la inmunidad innata y adaptativa de los peces con funciones efectoras que incluyen la activación del complemento (Cooper, 1985). La IgM también interviene en la aglutinación para la fagocitosis y la eliminación de patógenos, así como en la citotoxicidad celular (Ye et al., 2013). Aunque la función de la IgD ha sido bien estudiada en los mamíferos, hay muy pocos estudios sobre la función de la IgD en los peces (Xia et al., 2022). Se especula que la IgD puede desempeñar un papel esencial en la resistencia de *Megalobrama amblycephala* contra la infección por *Aeromonas hydrophila* (Xia et al., 2015) y en el mantenimiento de la homeostasis en la mucosa (Yu et al., 2020). La IgT de los peces es una inmunoglobulina epitelial de la mucosa que se expresa preferentemente en el intestino, unida a la membrana de las bacterias residentes e inducida específicamente por patógenos localizados en la mucosa (Zhang et al., 2010).

Respuesta celular: Los linfocitos T llevan en su superficie receptores (TCR) que interactúan con los antígenos portados por las células presentadoras de antígeno (CPA). Existen 2 tipos de linfocitos T: Linfocitos CD4+ o linfocitos *helper* (Th) cuya función es la de regular el sistema inmunitario mediante la liberación de citoquinas y los linfocitos CD8+ o linfocitos T citotóxicos cuya función es la de destruir directamente otras células infectadas por patógenos intracelulares como los virus y parásitos liberando granzimas, perforinas y proteínas antibacterianas, antivíricas y antiparasitarias.

Cuando se produce una reacción de reconocimiento entre los receptores de los linfocitos Th y el antígeno portado por células presentadoras de antígeno se liberan citoquinas que estimulan la proliferación celular del clon capaz de reconocer el antígeno y la diferenciación celular de linfocitos B y T en células efectoras de vida media corta y células de memoria de vida larga encargadas de actuar de forma inmediata si se produce un segundo

encuentro con el antígeno (Secombes & Wang, 2012). Este segundo encuentro producirá una respuesta más fuerte y rápida que la primera.

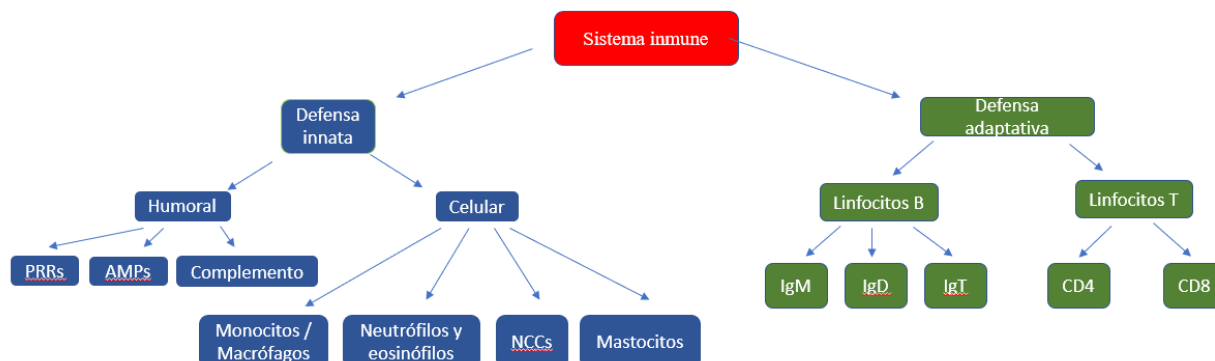


Figura 1. Composición del sistema inmune de los peces

1.2. ¿Qué es una vacuna?

Las vacunas son preparados biológicos que contienen antígenos, parte del patógeno o el patógeno completo, destinados a establecer o mejorar la inmunidad del huésped frente a una enfermedad o grupo de enfermedades concretas. Funcionan exponiendo el sistema inmunitario de un animal sano a un antígeno y permitiendo entonces que el sistema inmunitario del huésped desarrolle una respuesta y una "memoria" para acelerar esta respuesta en posteriores infecciones por el patógeno objetivo. Una vacuna para peces ideal debería tener las siguientes propiedades (Bedekar & Kole, 2022).

Propiedades fundamentales:

1. **Inmunogenicidad:** El patógeno o antígeno presente en una vacuna debe tener el potencial de inducir respuestas inmunitarias humorales y/o celulares en el huésped.
2. **Memoria inmunológica:** Una vacuna será considerada como ideal si induce una memoria inmunológica protectora duradera, es decir, una vez administrada, la vacuna debe activar los linfocitos B de memoria del huésped y le ayuda a reconocer y combatir el antígeno de inmediato en una futura exposición y proporciona protección a los peces, al menos durante un ciclo de producción.
3. **Seguridad:** En general, se considera que una vacuna es segura si simula la infección natural en la producción de inmunidad, pero es incapaz de producir enfermedad clínica y efectos secundarios en el huésped. Además de esto, la vacuna para peces también debe ser segura para el consumidor final, es decir, el ser humano u otros animales, que en última instancia consumirían los peces inmunizados.

Propiedades recomendadas:

4. Amplio espectro de protección: Como el patógeno individual de los peces se compone de una amplia variedad de cepas, una vacuna ideal para peces también debe dar una protección eficaz contra el amplio espectro del patógeno.
5. Protección multiespecie: A diferencia de otros patógenos animales, que pueden infectar a una o dos especies terrestres, los patógenos de los peces tienen una amplia gama de especies hospedadoras susceptibles, por lo que, para ser ideal, la vacuna para peces debe ser igualmente eficaz en varias especies.
6. Facilidad de uso: La facilidad de uso es un criterio crítico para una vacuna ideal para peces. La vacuna debe ser preparada con el objetivo de que el protocolo de inmunización no sea estresante, sea eficiente en el tiempo y sea masivo.
7. Rentabilidad: La vacuna para peces también debe tener en cuenta la parte económica de la vacuna. Debe ser poco costosa para que los piscicultores puedan permitirse la vacunación de sus peces y obtener un beneficio tras la venta de sus productos.

1.3. Tipos de vacunas

A lo largo del tiempo se han diseñado varios tipos de vacunas con diferentes componentes antigénicos partiendo desde el patógeno inactivado hasta biomoléculas como péptidos e incluso ADN.

1.3.1. Inactivadas

Son vacunas que utilizan microorganismos patógenos inactivados para generar la respuesta del sistema inmune. Estas bacterias patógenas pueden inactivarse utilizando formalina, que mata al microorganismo patógeno sin dañar la capacidad de producir una respuesta del sistema inmunitario (Dadar et al., 2016). Toranzo et al. (2009) informaron que las vacunas bacterianas utilizadas en acuicultura son vacunas inactivadas adquiridas a partir del cultivo del microorganismo específico inactivado con formalina.

1.3.2. Atenuada

Son vacunas vivas que han sido debilitadas genética o químicamente y pueden inducir respuestas inmunitarias de menor duración en el huésped (Adams et al., 2008). Están compuestas por microorganismos como bacterias y virus que ya no poseen la capacidad de infectar (Muktar et al., 2016) pero que activaran las respuesta inmunitaria frente al patógeno en caso de infección con la modalidad virulenta.

1.3.3. Recombinante

En estas vacunas, las regiones inmunogénicas del patógeno se expresan en un huésped heterólogo que será utilizado como vacuna (Adams et al., 2008) ya que no tiene la capacidad de producir una infección, pero sí de activar el sistema inmune. Irie et al. (2005) indicaron mediante la vacunación de los peces con el antígeno y posterior infección con el patógeno vivo se puede tener información sobre el nivel de supervivencia en los peces vacunados, lo que ayuda a examinar la eficacia de la vacuna. Hoy en día, algunos investigadores están utilizando la tecnología del ADN recombinante para mejorar las vacunas (Sun et al., 2009).

1.3.4. Vacuna subunitaria

Una vacuna subunitaria contiene al antígeno purificado en vez del microorganismo completo (Vartak & Sucheck, 2016). A continuación, se describen los tipos de vacunas subunitarias.

Péptidos sintéticos: Las vacunas peptídicas sintéticas pueden servir como una vacuna de subunidad siendo los péptidos reconocidos por el MHC I de los linfocitos CD8+ (Bijker et al., 2007). Algunos investigadores han llevado a cabo algunos estudios para demostrar si estos péptidos pueden utilizarse para estimular la producción de anticuerpos contra patógenos como nodavirus, rabdovirus, birnavirus, IHNV, virus de la necrosis pancreática infecciosa (IPNV) y VHS (Fridholm et al., 2007). Estos artículos sugieren que la vacunación de peces mediante el uso de péptidos es posible, aunque todavía faltan los conocimientos fundamentales de los mecanismos inmunitarios de los peces contra diversos antígenos (Dadar et al. 2016).

ADN: Las vacunas de ADN consisten en un plásmido con un gen específico que codifica una proteína antigénica seleccionada, que cuando se expresa en el huésped se espera que provoque una fuerte respuesta inmunitaria (Ma et al., 2019). La producción del plásmido se realiza en células bacterianas, y el gen de interés está flanqueado por elementos promotores y de terminación que facilitan la expresión en las células eucariotas (Kurath, 2008). Las vacunas de ADN son capaces de activar fuertemente la inmunidad celular y humoral y su desarrollo puede ser rápido y relativamente sencillo si se conoce la secuencia del gen que expresa el antígeno. Las vacunas de ADN suelen ser más eficaces en la protección contra las infecciones víricas, y han sido especialmente eficientes contra los rhabdovirus de los peces, ya que suelen utilizar los mismos mecanismos celulares que utiliza un virus una vez que entra en una célula huésped (Hølvold et al., 2014). La primera vacuna de ADN descrita en la literatura científica para su uso en acuicultura fue frente la necrosis hematópoyética infecciosa (NHI) y se probó en la trucha arco iris (Anderson et al., 1996; Kurath, 2008). En la última década, se han desarrollado otras vacunas experimentales de ADN contra diversos patógenos y para una amplia gama de especies de peces (Anderson et al., 1996). Sin embargo, sólo un número limitado de ellas se ha comercializado.

Vectores similares a virus: Las partículas similares a virus (VLP) son componentes de una vacuna subunitaria avanzada que se forman a partir del autoensamblaje de las proteínas de la cápside viral en partículas que imitan la estructura del virus (Rosenthal et al., 2014). Sin embargo, a diferencia de las partículas virales reales, las VLP carecen de material genómico, lo que excluye cualquier posibilidad de mutaciones de reversión o de infección patógena (Noad & Roy, 2003). Las VLPs son incapaces de replicarse en el receptor, pero pueden potenciar las respuestas inmunitarias innatas y adaptativas a través del reconocimiento de subunidades repetitivas y produciendo una alta respuesta celular y humoral (Keller et al., 2010). Las VLP, tanto las no envueltas como las envueltas, se han producido en bacterias, levaduras, plantas transgénicas, insectos, mamíferos y plataformas libres de células. Además, los antígenos de estas vacunas pueden producirse como fusiones genéticas o conjugados químicos con proteínas estructurales virales, dando lugar a VLPs quiméricas (Grgacic & Anderson, 2006).

Debido a las ventajas comparadas con otros tipos de vacunas, el interés en la tecnología VLP ha aumentado en los últimos años. Algunas vacunas VLP altamente purificadas han sido autorizadas y comercializadas en humanos, como Engerix (virus de la hepatitis B (VHB)) de GlaxoSmithKline (GSK), Cervarix (virus del papiloma humano (VPH)), Recombivax HB (VHB) y Gardasil (VPH) de Merck (Kushnir et al., 2012). Recientemente, se han desarrollado varios candidatos a vacunas VLP para enfermedades de los peces (Dhar et al., 2010; Cho et al., 2017; Chien et al., 2018; Guo et al., 2018; Ma et al., 2019). Sobre la base

de estos y otros estudios, se ha demostrado que las VLP provocan una fuerte inmunogenicidad y constituyen una alternativa segura a las vacunas inactivadas o atenuadas.

Vacunas de toxoides: Cuando el sistema inmunitario recibe un toxoide, se producen anticuerpos que se fijan y bloquean la toxina, lo que se denomina anatoxina (Bedekar & Kole, 2022). La vacuna de toxoides se desarrolla generalmente a partir de la exotoxinas segregadas por bacterias, inactivándola o reduciendo la toxicidad de esta mediante un tratamiento químico o térmico, pero manteniendo su inmunogenicidad.

1.4 Factores para tener en cuenta para las estrategias de vacunación

El término "estrategia de vacunación" incluye la decisión de contra qué enfermedades vacunar, así como la elección del procedimiento de vacunación (Lillehaug, 1997). Este último abarca la elección del tipo de vacuna y el método y momento de la vacunación en relación con el ciclo de producción, la temperatura del agua y el tamaño de los peces, así como el uso de la revacunación. Estos parámetros están estrechamente relacionados, y uno de ellos no puede resolverse sin tener en cuenta los demás (Lillehaug, 2014a). Una estrategia de vacunación óptima tiene por objetivo proteger a los peces contra las infecciones que causan problemas en la explotación o en la región en cuestión. El nivel de inmunidad alcanzado debe ser adecuado para superar la presión infecciosa, y debe ser máximo cuando el riesgo de brote de la enfermedad sea mayor. La protección debe durar todo el periodo de riesgo. Además, la estrategia de vacunación debe tener en cuenta los costes relacionados con la vacunación y el riesgo de efectos secundarios. En general, la estrategia de vacunación debe tener como objetivo lograr una solución favorable, tanto desde el punto de vista económico para la industria piscícola, como desde el punto de vista del bienestar animal.

El éxito de la vacunación depende tanto del desarrollo de vacunas como de su correcta utilización. Además de decidir contra qué enfermedades vacunar, hay que tener en cuenta la elección del método de vacunación, el momento de la vacunación y el uso de la revacunación. Para obtener una protección óptima, la vacunación debe realizarse con antelación a la exposición al agente patógeno real, con el fin de dar a la inmunidad el tiempo suficiente para desarrollarse. Por otra parte, la vacunación no debe realizarse demasiado pronto, ya que el grado de inmunidad disminuye con el tiempo (Lillehaug, 2014a).

1.4.1 Momento de la vacunación

Para lograr una respuesta inmunitaria protectora, el pez debe ser inmunocompetente en el momento de la vacunación. Después de la vacunación, la curva de desarrollo de la inmunidad sigue un patrón típico, pasando algún tiempo antes de que la inmunidad alcance el nivel necesario para la protección, y antes de que se alcance la máxima protección. A continuación, el nivel de inmunidad comienza a descender después de algún tiempo, y finalmente cae por debajo del límite de protección. El tiempo necesario para que se desarrolle la inmunidad, el nivel máximo de protección y la duración de la inmunidad dependerán de varios factores, como la temperatura del agua, así como del procedimiento de vacunación utilizado y las características del producto vacunal (es decir, inactivado o atenuado, uso de adyuvante, etc.)(Lillehaug, 2014b).

La estrategia de vacunación elegida también debe ser compatible con el ciclo de producción de la especie piscícola, realizándose idealmente con la debida antelación a la posible exposición al microorganismo patógeno. Los sistemas de producción acuícola intensiva suelen dividirse en dos fases distintas. La primera, que incluye la eclosión, la alimentación inicial y el primer período de crecimiento, tiene lugar en condiciones controladas en sistemas de tanques con un uso limitado del agua, lo que permite controlar la introducción de patógenos con sistemas de desinfección. La vacunación debe llevarse a cabo durante este periodo, antes de la siguiente fase, el crecimiento en estanques o jaulas echas con redes. Para las especies anádromas, como los salmónidos, la vacunación contra los agentes patógenos en el medio marino debe realizarse durante la fase de agua dulce (Press & Lillehaug, 1995).

1.4.2 Temperatura del agua

Es bien sabido que el entorno, incluida la temperatura del agua, influye en el funcionamiento del sistema inmunitario y en la respuesta inmunitaria de los peces (Bowden, 2008). Anteriormente, se recomendaba vacunar a los peces, incluidos los salmónidos, a temperaturas relativamente altas, para evitar que la respuesta inmunitaria se viera afectada por las bajas temperaturas ambientales (Bly & Clem, 1992). En varios estudios de vacunación de salmónidos a distintas temperaturas se ha comprobado que a mayor temperatura del agua mayor es el nivel de protección producido por la vacuna (Sevatdal & Dalen, 1997; Lorenzen et al., 2011), aunque en el estudio de Lillehaug (1991) los resultados demostraron que la vacunación del salmón del Atlántico contra la vibriosis de aguas frías puede llevarse a cabo a temperaturas del agua bajas; incluso hubo tendencias hacia niveles más altos de protección

en grupos de peces vacunados a las temperaturas más bajas, 2-6 °C, tanto para los peces vacunados por inmersión como por inyección.

En conjunto, se puede concluir que el nivel final de protección no parece verse notablemente afectado por la temperatura ambiente cuando se vacuna a los peces, al menos cuando está dentro de la variación "normal" para la especie en cuestión. Los efectos de la temperatura pueden variar según las especies de peces (aguas cálidas frente a aguas frías) y en relación con los distintos tipos de antígenos.

1.4.3 Tamaño del pez

Sólo se han publicado datos sobre la edad o el tamaño de los peces cuando el sistema inmunitario se ha desarrollado por completo en el caso de unas pocas especies de peces. Se ha demostrado que las especies de importancia comercial, como la carpa y la trucha arco iris, son capaces de desarrollar una respuesta inmune completa a los 2-3 meses de edad aproximadamente (Zapata et al., 2006), y los salmónidos no deben ser vacunados antes de que estén inmunológicamente maduros con un peso de aproximadamente 5 gramos (Hart et al., 1988). Para la manipulación manual, se recomienda que los salmónidos tengan 20 gramos antes de ser vacunados por inyección, y esta sugerencia probablemente también sea aplicable a otras especies de peces. El sistema inmunitario del bacalao también parece estar plenamente desarrollado alrededor de los dos meses de edad (Schrøder et al., 1998), mientras que el fletán necesita cerca de un mes más para estar inmunológicamente maduro (Øvergård et al., 2011). Por otro lado, una especie subtropical de agua dulce como el bagre de canal parece tener una respuesta completa cuando se le vacuna con una vacuna viva de *Edwardsiella ictaluri* sólo siete días después de la eclosión (Shoemaker et al., 1999), lo que ilustra la gran variabilidad en este tema entre las especies de peces, y posiblemente entre diferentes antígenos.

1.4.4 Administración

Hoy en día las vacunas se pueden administrar a los peces por tres vías diferentes:

Vacunación por inyección: La vacunación por inyección es el método de administración que generalmente da lugar a la mejor protección y es la única opción para las vacunas con adyuvantes (Harikrishnan et al., 2011). Las ventajas de la inyección de una vacuna son la obtención de una alta protección y la necesidad de una dosis relativamente mínima, ya que el

cálculo correcto de la dosis es fácil y económico para los peces más grandes, además se puede administrar una vacuna multivalente. Las desventajas de esta vía son las siguientes: formación de adherencias, estrés en los peces que provoca una reducción de la ingesta de alimento, daños durante la inyección que pueden causar múltiples muertes en los peces y no se puede administrar en poblaciones muy jóvenes debido a que el desarrollo de la inmunidad puede no ser suficiente (Lillehaug, 2014a).

Vacunación por inmersión/baño: La vacunación por inmersión consiste en sumergir a los peces en agua que contiene antígenos vacunales. Al aplicar la inmersión, las vacunas se aplican en la superficie de los peces y la absorción de los antígenos ocurre por las branquias, la piel y la línea lateral (Assefa & Abunna, 2018). La vacunación por inmersión es rápida, ya que los peces se sumergen en agua que contiene una dosis relativamente alta de antígenos vacunales durante varios minutos, o, si se vacunan por baño, los peces reciben una preparación de antígeno vacunal más diluida durante un período más largo. Los peces pueden recibir una vacuna de refuerzo por inmersión o por baño para aumentar la protección. La vacunación por inmersión es especialmente conveniente para los animales pequeños y los alevines, cuya manipulación para la inyección es poco práctica; la otra ventaja es que provoca un estrés mínimo y además una solución de vacuna puede reutilizarse. Sus desventajas son que requiere mucha mano de obra y cantidad de vacuna, que la compra de tanques es costosa y se necesita equipo especializado (Dadar et al., 2016).

Vacunación por ingestión: La vacunación oral es fácil de aplicar y evita el estrés de los peces. La vacuna se incorpora al pienso durante la producción, o puede estar recubierta de pellets o encapsulada (Lillehaug, 2014a). La vacunación oral se recomienda para las vacunaciones secundarias o de refuerzo (Dadar et al., 2016). Las desventajas de la vacunación oral incluyen que puede no dar una protección uniforme y requiere una gran dosis además de poder tener un coste adicional de encapsulación (Vallejos-Vidal et al., 2017).

1.4.5 Dosis de refuerzo

El uso de dosis de refuerzo aumentará el nivel de protección después de la vacunación (Tatner & Horne, 1985), y puede emplearse cuando la vacunación con una sola dosis no proporciona la protección adecuada como resultado, o cuando la primera vacunación tiene que llevarse a cabo en peces pequeños que no son totalmente inmunocompetentes. En estos casos, la revacunación se llevará a cabo normalmente unas semanas después de la inmunización primaria.

La vacunación por inmersión suele ser el método de elección tanto para la primera vacunación como para la segunda en peces pequeños, por ejemplo, como describen Angelidis et al. (2006) en los juveniles de lubina. También se puede utilizar un refuerzo para restablecer la protección en aquellos momentos en que la susceptibilidad de los peces a la enfermedad vuelve a aumentar. En estos casos, la vacunación debe realizarse normalmente en peces relativamente grandes. Al ser prácticamente difícil de manejar la vacunación por inyección, y necesitar grandes cantidades de vacuna para la inmersión, la inmunización oral resulta en una opción viable.

1.5. Necesidad de vacunación en acuicultura

Según el último informe sobre el estado mundial de la pesca y la acuicultura (FAO, 2022), la producción total de la acuicultura en 2020 se situó en 87,5 millones de toneladas de animales acuáticos destinados en su mayoría a la alimentación humana, 35,1 millones de toneladas de algas para uso alimentario y no alimentario y 700 toneladas de conchas y perlas para uso ornamental, alcanzando un total de 122,6 millones de toneladas de peso vivo. Esto representó un aumento de 6,7 millones de toneladas respecto a 2018. El valor total estimado en la explotación fue de 281.500.000.000 \$ en 2020, un aumento de 6,57% respecto a 2018 y de 2,38 % respecto a 2019.

Este crecimiento se ve ralentizado por varios factores, siendo uno de los más importantes la mortalidad debido a enfermedades (Tavares-Dias & Martins, 2017) estimándose unas pérdidas globales entre 1050 y 9580 millones de dólares cada año (Shinn et al., 2015). Como consecuencia, en el pasado se utilizaron grandes cantidades de antibióticos lo que aumentó la preocupación por la resistencia a los antibióticos (Adams, 2019) y planteó la utilización de otras medidas de bioseguridad. La vacunación, en comparación con otras medidas, tiene un mayor potencial en la prevención de enfermedades y mortalidad surtiendo efecto con mayor rapidez que las demás estrategias. Otra característica única de la vacunación es su potencial para proporcionar protección incluso si fracciones menores de una población permanecen sin vacunar.

Hoy en día hay 36 vacunas licenciadas (tabla 1) pero también hay enfermedades víricas y bacterianas para las cuáles no se dispone de vacunas licenciadas (tabla 2) y que causan grandes pérdidas en todo el mundo (Midtlyng, 2022) por lo que es necesario que se incentive la producción de vacunas comerciales para abarcar un mayor espectro de enfermedades.

Tabla 1. Vacunas comerciales frente a las enfermedades bacterianas y víricas más importantes. Obtenido de Shetaf et al. (2018)

Vacuna	Especies	Enfermedad prevenida
Vacuna viva de <i>Arthrobacter davidanieli</i>	Salmónidos	Enfermedad de la columna
Antisuero frente <i>Vibrio anguillarum</i>	Salmónidos	Vibriosis
Bacterina de <i>Aeromonas salmonicida</i>	Salmónidos	Forunculosis
Bacterina de <i>Yersinia ruckeri</i>	Salmónidos	Yersiniosis
Vacuna atenuada de <i>Edwardsiella ictaluri</i>	Pez gato	Edwardsielosis
Vacuna atenuada de <i>Flavobacterium columnare</i>	Bagre del canal, salmónidos, peces de agua dulce	Enfermedad de la columna
Bacterina de <i>Listonella anguillarum</i>	Salmónidos, lubina, seriola	Vibriosis
Bacterina de <i>Vibrio salmonicida</i>	Salmónidos	Vibriosis de aguas frías
Bacterina de <i>V. anguillarum - salmonicida</i>	Salmónidos	Vibriosis
Bacterina de <i>E. ictaluri</i>	Bagre del canal, fletán japonés	Septicemia entérica
Bacterina de <i>Aeromonas hydrophyla</i>	Carpas	Hidropesía
Bacterina de <i>Streptococcus agalactiae</i>	Tilapia	Streptococosis
Bacterina de <i>Streptococcus iniae</i>	Tilapia	Streptococosis
Bacterina de <i>Y.ruckeri</i> O1	Salmónidos	Enfermedad Entérica de la Boca Roja
Bacterina de <i>Photobacterium damsela</i> subsp. <i>piscicida</i>	Salmónidos, lubina, seriola	Fotobacteriosis
Vacuna recombinante (proteína capa S) de <i>A. hydrophyla</i>	Salmónidos	Aeromonosis
Vacuna de ADN para la eritrodermatitis	Carpa	Eritrodermatitis
Bacterina de <i>Piscirickettsia salmonis</i>	Salmónidos	Piscirickettsiosis
Bacterina de <i>Aerococcus viridans</i> (var.) <i>homari</i>	Langosta	Gafkaemia
Vacuna atenuada de <i>Flavobacterium psychrophilum</i>	Salmónidos y peces de agua dulce	Flavobacteriosis
Bacterina de <i>Lactococcus garviae</i>	Trucha arcoíris y seriola	Lactococosis
Virus inactivado de la Necrosis Hematopoyética Infeciosa	Salmónidos	Necrosis Hematopoyética Infeciosa

Virus inactivado de la Necrosis Pancreática Infecciosa	Salmónidos	Necrosis Pancreática Infecciosa
Virus inactivado de la Anemia Infecciosa del Salmón	Salmónidos	Anemia Infecciosa del Salmón
Iridovirus inactivado de la dorada roja	Dorada roja	Enfermedad iridoviral
Vacuna de ADN frente a la viremia primaveral de la carpa	Carpa común	Viremia primaveral de la carpa
Herpesvirus Koi inactivado	Carpa Koi	Enfermedad del herpesvirus Koi
Betanodavirus inactivado	Mero	Enfermedad del betanodavirus
Vacuna recombinante frente a la enfermedad hemorrágica de la carpa herbívora	Carpa herbívora	Enfermedad hemorrágica de la carpa herbívora
Vacuna de ADN frente al nodavirus	Lubina	Necrosis Nerviosa Viral

Tabla 2. Enfermedades bacterianas y víricas más importantes frente a las que no existen vacunas comerciales. Obtenido de Shetaf et al. (2018)

Tipo de enfermedad	Agentes causales	Especies afectadas	Enfermedad
Viral	Virus de la septicemia hemorrágica	Trucha, rodaballo, fletán japonés	Septicemia Hemorrágica Viral
	Betanodavirus	Meros, lubina y rodaballo	Enfermedad del Betanodavirus
	Virus del bagre del canal	Bagre de canal	Enfermedad del Virus del bagre de canal
Bacteriana	<i>Flavobacterium branchiophilum</i>	Salmónidos y peces de agua dulce	Enfermedad Bacteriana Branquial
	<i>Mycobacterium marinum</i>	Peces	Micobacteriosis
	<i>Flavobacterium psychrophilum</i>	Salmónidos y peces de agua dulce	Síndrome de los alevines
	<i>Edwardsiella tarda</i>	Bagre del canal	Septicemia por Edwardsiella
	<i>Streptococcus focae</i>	Lubina asiática y salmónidos	Streptococosis

1.6. Historia de la vacunación

El primer artículo sobre la prevención de enfermedades infecciosas en peces mediante la vacunación es el de Snieszko et al. (1938), que publica un artículo sobre la inmunidad protectora en carpas inmunizadas frente a *Aeromonas punctata*. Sin embargo, su artículo

estaba escrito en polaco, lo que redujo la disponibilidad de la información. Las primeras publicaciones en inglés fueron publicadas por Duff, quien demostró la protección frente a *Aeromonas salmonicida* en truchas inmunizadas por inoculación parenteral y por administración oral (Duff, 1939, 1942)

Posteriormente se produce un aumento del desinterés por los trabajos de profilaxis debido probablemente a la disponibilidad de compuestos antimicrobianos. Durante 30 años tras la finalización de la Segunda Guerra Mundial se vivió la era de la quimioterapia debido a que se utilizaron de forma rutinaria un gran número de antibióticos, sulfamidas e incluso agentes antimicrobianos derivados del mercurio (Evelyn, 1997). Un estudio de Snieszko & Friddle (1949) concluyó que la quimioterapia con sulfamerazina era preferible a la administración oral de una vacuna para el control de la furunculosis.

No fue hasta mediados-finales de la década de 1970 cuando se volvió a prestar atención a la posibilidad de la vacunación como medio de prevención y control de las enfermedades infecciosas de los peces (Gudding & Van Muiswinkel, 2013) y se incentivó el desarrollo de vacunas comerciales. Las razones de este cambio fueron variadas: el elevado coste de la utilización de fármacos, la naturaleza a corto plazo de la protección obtenida con los antibióticos, la creciente aparición de patógenos de peces resistentes a los antibióticos y, en cierta medida, la preocupación por el impacto medioambiental del uso de antibióticos (Evelyn, 1997).

Las primeras vacunas para peces consistían en bacterias inactivadas con formalina, con o sin adyuvantes (Tafalla et al., 2014). Se administraban por inmersión o por inyección y, a su vez, inducían cierto nivel de inmunidad humoral. En la década de 1990, se desarrollaron y comercializaron algunas vacunas vivas modificadas para su uso en la acuicultura (Shoemaker et al., 2009). La primera vacuna comercializada fue una bacterina de *Yersinia ruckeri* producida por Wildlife Vaccine Inc (Tebbit et al., 1980). Tras el éxito de este producto, se desarrollaron vacunas administradas por inmersión inactivadas para la vibriosis de la trucha y el salmón. Después se empezaron a desarrollar vacunas para las especies de mayor valor comercial y, hasta ahora, hay hasta 36 vacunas autorizadas en todo el mundo para su uso en diversas especies de peces y una para langosta (Shefat, 2018).

La mayoría de las vacunas han sido aprobadas para su uso por el Departamento de Agricultura de los Estados Unidos (USDA) y la Agencia Europea del Medicamento (EMA) para una variedad de especies acuícolas, y la mayoría de estas vacunas utilizan métodos de producción convencionales que comienzan con el cultivo de los patógenos objetivo (Adams, 2019).

2. Objetivo

El objetivo de este artículo bibliográfico es revisar los fundamentos de la vacunación en acuicultura y los métodos básicos de la vacunación actual y una vez sabidos dar a conocer algunas de las estrategias experimentales más novedosas en la acuicultura actual y compararlas entre sí.

3. Metodología

La búsqueda bibliográfica se realizó utilizando principalmente las siguientes fuentes: Web of Science y ScienceDirect. Las palabras clave empleadas fueron: *vaccine*, *aquaculture*, *advances*, *fish*, *immune system*. La información ha sido adquirida principalmente de revisiones bibliográficas y en menor medida de capítulos de libros y de artículos de cualquier año. Primero se ha leído el abstract y en el caso que la información fuese interesante se procedió con el documento entero. Para la redacción fue empleado el software "Microsoft Word" suministrado por el paquete "Microsoft 365" el cual incluye como complemento el gestor bibliográfico Mendeley el cual ha sido utilizado para citar y redactar la bibliografía.

4. Resultados

El resultado de esta búsqueda sobre las técnicas novedosas para la vacunación de peces está detallado a continuación. En la *Web of Science* utilizando las palabras claves *Vaccine* y *Aquaculture*, utilizando el operador AND nos encontramos con 5367 resultados (tabla 3) publicados hasta la actualidad y en ScienceDirect se obtuvieron 5743 resultados.

Tabla 3. Tipo de publicación y cantidad obtenida en nuestra búsqueda

	Artículos	Revisiones	Reuniones	Set de datos	Libros	Otros
Web of Science	3298	360	234	156	120	1199
ScienceDirect	3689	541	160	3	122	1228

5. Técnicas novedosas

5.1. Vacuna basada en nanopartículas

Las nanopartículas están atrayendo actualmente mucha atención entre los investigadores en el ámbito del desarrollo de vacunas para la acuicultura, aunque el despliegue de los nanomateriales se encuentra en una fase incipiente (Dadar et al. 2016). Los antígenos pueden ir encapsulados dentro de las nanovacunas o unidos en su superficie (figura 2). Estas vacunas contienen varios materiales dispersos de tamaño nanométrico que incluyen el alginato, el quitosano y el poli(ácido láctico-co-glucónico) (PLGA) con varias características físicas específicas que se incorporan con antígenos e inmunostimulantes para mejorar su administración y también para aumentar la intensidad de la respuesta inmunitaria (Ji et al., 2015). En un estudio reciente se proponía el uso de diversos materiales orgánicos como PLGA, nanopoliplexos, quitosano y partículas similares a virus (VLP) para desarrollar vacunas para controlar las enfermedades patógenas de los peces. Se ha demostrado que estas vacunas suministradas vía oral pueden utilizarse en peces (Angulo et al., 2021). Otro estudio reciente se demostraba que las nanopartículas de selenio pueden ser una herramienta novedosa para controlar diversas enfermedades bacterianas y virales de los peces (Nasr-Eldahan et al., 2021).

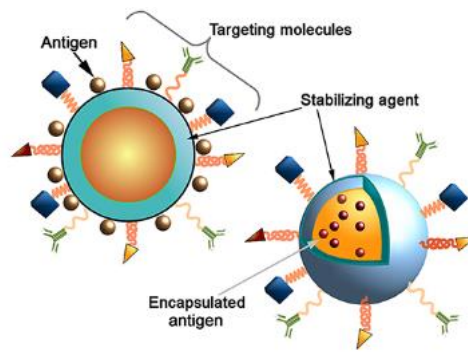


Figura 2. Transporte de antígenos por nanopartículas

5.2 Vacunas mucosales

Las vacunas para las mucosas están ganando ahora una amplia atención en la acuicultura debido al mayor período de inmunidad de los peces vacunados (Dadar et al., 2016). El desarrollo de vacunas para las mucosas contra las infecciones en la acuicultura es actualmente uno de los principales focos de investigación ya que tienen el potencial de

provocar respuestas protectoras en las superficies mucosales produciendo el bloqueo de los patógenos en el sitio inicial de infección (Muñoz-Atienza et al., 2021). Una revisión bibliográfica sobre la respuesta mucosal y a nivel sistémico de los linfocitos B y T al inmunizar con vacunas para mucosas contra patógenos en peces teleósteos a través de diferentes vías de administración que incluían la vacunación oral, por inmersión y nasal (Muñoz-Atienza et al., 2021) concluía que aún se requiere seguir investigando en muchos aspectos y que es esencial desarrollar nuevas herramientas inmunológicas que nos ayuden a evaluar la respuesta a estas formulaciones vacunales. (Munang'andu et al., 2012) informaron que uno de los problemas en el diseño de vacunas de mucosas protectoras para los peces es la determinación de la dosis de antígeno necesaria para conferir inmunidad, dado que se presupone que las vacunas inyectables son más protectoras por naturaleza, las condiciones y las dosis requeridas para desarrollar vacunas mucosas eficaces deben ser diseñadas con el debido cuidado (Dadar et al. 2016).

5.3 Vacuna de ARN

En la actualidad, existen dos grandes tipos de vacunas basadas en el ARN que se distinguen por la capacidad de traducción del ARN: el ARNm convencional y el ARNm autoamplificador (Cho et al., 2017). El uso de ARN en una vacuna tiene una serie de ventajas: su uso es seguro porque el ARN no es infeccioso y se degrada por los procesos celulares normales, y no hay riesgo potencial de infección o inserción con posterior mutagénesis. Además, el ARN, de por sí, es un potente estimulador de la inmunidad (Pardi et al., 2018).

El ARNm desnudo se degrada rápidamente por las RNasas extracelulares y no se internaliza eficazmente. Por ello, se ha desarrollado una gran variedad de transportadores in vitro e in vivo que facilitan la captación celular del ARNm y lo protegen de la degradación. Una vez que el ARNm transita hacia el citosol, la maquinaria de traducción celular produce una proteína que sufre modificaciones postraduccionales, dando lugar a una proteína correctamente plegada y completamente funcional.

A diferencia de la inmunización con proteínas, varios formatos de vacunas de ARNm inducen fuertes respuestas de células T CD8+, probablemente debido a la presentación eficiente de antígenos producidos endógenamente en las moléculas de clase I del CMH, además de potentes respuestas de células T CD4+ (Chahal et al., 2017). Además, a diferencia de la inmunización con ADN, las vacunas de ARNm han demostrado la capacidad de generar potentes respuestas de anticuerpos neutralizantes en animales con sólo una o dos inmunizaciones de baja dosis (Richner et al., 2017)

Las vacunas de ARN autorreplicantes (disponen de la maquinaria para replicar ARN multiplicándose mediante transcripción de sí mismo) más utilizadas en la actualidad se basan en el genoma de un alfavirus (Perri et al., 2003). Suelen administrarse con una cobertura lipídica (*Lipid In Organic Nanoparticle*, LION) que favorece el paso del antígeno a la célula presentadora de antígeno, potencia la inmunogenicidad y hace estable la vacuna a temperatura ambiente durante una semana. La vacuna vectorial de alfavirus tiene un único gen de ARN que codifica la maquinaria de replicación del ARN (replicasa), que se deja intacto, pero los genes que codifican las proteínas estructurales se sustituyen por el antígeno de interés. Esta plataforma de replicación de antígenos de ARN permite producir un gran número de antígenos a partir de una dosis extremadamente pequeña de vacuna transcrita in vitro (IVT) a partir de una plantilla de ADN (Perri et al., 2003). La replicación viral tiene lugar en el citoplasma de la célula huésped y es independiente del sistema de replicación del huésped, lo que hace que estas vacunas de ácidos nucleicos sean un vehículo de administración muy eficiente y atractivo (Restifo et al., 2000). Las investigaciones previas han demostrado que las vacunas de ARN alfaviral son más eficientes a la hora de estimular las respuestas inmunitarias específicas al antígeno, en particular las respuestas celulares, en comparación con las vacunas convencionales de ADN plasmídico (Leitner et al., 1999).

La replicasa del alfavirus funciona en una amplia gama de células huésped, como las de mamíferos, aves, reptiles, anfibios, insectos y peces. Por lo tanto, al sustituir los genes de las proteínas estructurales del virus por un antígeno patógeno de interés para los peces, la vacuna de ARN autoamplificable podría proteger contra una serie de importantes enfermedades de los peces (Karlsen et al., 2009; Wolf et al., 2014).

5.4 Vacuna anti-idiotipo

Esta vacuna se elabora con anticuerpos que ven a otros anticuerpos como si fueran antígenos y se les adhieren. Las interacciones entre los idiotipos (Ids) y los anticuerpos anti-idiotipo (Abs anti-Id) han demostrado su capacidad para regular y controlar el sistema inmunitario en un estado inmunológico estable (Naveed et al., 2018). Después de que un antígeno entre en el cuerpo del huésped, la primera oleada de anticuerpos, Ab1, se evoca bajo la estimulación de epítomos inmunogénicos de un antígeno. Después, según los diferentes fragmentos de unión al antígeno (Fabs), también llamados idiotipos (Ids), mostrados por Ab1, el sistema inmunitario produce además los anticuerpos anti-idiotipo (Abs anti-Id), denominados Ab2, que pueden presentar diferentes imágenes internas que se asemejan a los epítomos originales. Asimismo, los Ab2 pueden estimular la producción de

anticuerpos anti-idiotipo, Ab3, que son principalmente de especificidad similar a los Ab1 (figura 3).

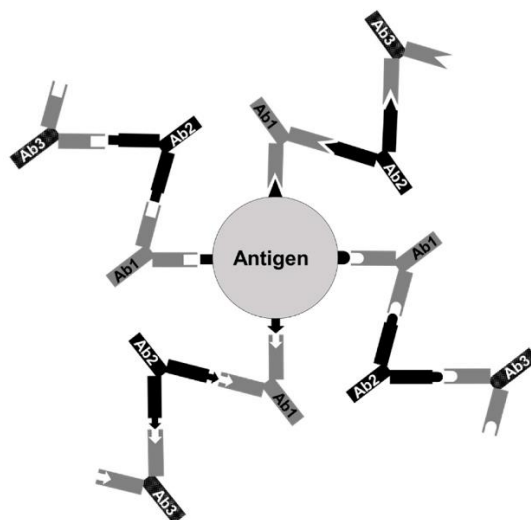


Figura 3. Interacción de los anticuerpos y anti-idiotipos con el antígeno

En otras palabras, los Abs anti-Id que expresan imágenes internas similares a diferentes epítomos de los antígenos originales pueden servir como una potencial vacuna anti-Id para inducir respuestas inmunitarias específicas a los antígenos originales que imitan (Kohler et al., 2019). Las vacunas basadas en Abs anti-Id se han aplicado hasta ahora en el control de numerosas enfermedades infecciosas en humanos (Naveed et al., 2018; Kohler et al., 2019) y cánceres (De Cerio et al., 2007). Por lo tanto, los Abs anti-Id que muestran epítomos inmunogénicos sustitutos han abierto un área adicional de desarrollo de vacunas. Sin embargo, los Abs anti-Id son hasta ahora raramente utilizados como estrategia en el desarrollo de vacunas para peces (Huang et al., 2019).

Sólo dos estudios sobre vacunas anti-Id para peces han demostrado una inmunidad eficaz y una protección contra diversos patógenos bacterianos como *Vibrio anguillarum* en la platija japonesa (*Paralichthy olivaceus*) (Yongjuan et al., 2002) y *Edwardsiella tarda* en el corvinón rojo (*Sciaenops ocellatus* L.) (Qin et al., 2010) inducida por la inyección intraperitoneal con Abs anti-Id.

5.5 Vacunas vegetales comestibles

Dado que el uso de vacunas convencionales, como las vacunas vivas atenuadas e inactivadas, es costoso y también que la inyección es poco práctica para inmunizar a una gran

población de peces (Shahid & Daniell, 2016), las plantas podrían proporcionar una plataforma económica para desarrollar vacunas eficientes (Dhama et al., 2013). Las vacunas comestibles son vacunas subunitarias en las que los genes seleccionados se introducen en las plantas y luego se induce a la planta transgénica a expresar la proteína codificada (Saxena & Rawat, 2013). Entre los alimentos que se aplican de este modo se encuentran la patata, el plátano, la lechuga, el maíz, la soja, el arroz y las legumbres. Las vacunas vegetales son rentables y no contienen patógenos vivos atenuados, son potentes vacunas comestibles capaces de proteger frente a varias enfermedades patógenas de los peces promoviendo una acuicultura sostenible (Kolotilin et al., 2014). Las vacunas de origen vegetal pueden ayudar a reducir la ingesta de múltiples refuerzos de vacunas víricas o bacterianas vivas atenuadas (Dadar et al. 2016).

5.6 Vacunación inversa

En los últimos años, con el aumento de los avances en biotecnología, se ha puesto de manifiesto una tecnología de vanguardia, la vacunación inversa (figura 4). Esta última tecnología es útil para desarrollar una vacuna contra diversos organismos patógenos. Rappuoli (2000) señaló que se necesitan varios años para desarrollar una vacuna eficaz y potente. Este concepto de vacunología ha reducido el tiempo de producción de la vacuna de 5-10 años a 1-2 años. Predice las secuencias inmunogénicas utilizando el enfoque bioinformático y también las regiones que son predichas por los programas bioinformáticos expresándose como proteínas recombinantes.

Recientemente, esta tecnología se ha aplicado a especies marinas como *Photobacterium damsela subsp. piscicida*. El diseño de vacunas mediante el uso de software se ha logrado en dos importantes patógenos intracelulares de los peces, *Flavobacterium columnare* y *E.tarda*, causantes de la enfermedad de la columna y la edwardsiellosis, respectivamente (Mahendran et al., 2016). El estudio realizado por Ellul et al. (2021) destacó el potencial de la vacunación inversa en el pez globo (*Cyclopterus lumpus*) contra *Pasteurella atlantica* para prevenir la pasteurellosis en la acuicultura. En este trabajo se realizó un estudio in silico y un análisis funcional para revelar aquellos genes que son fuertes candidatos para el desarrollo de la vacuna para la prevención de estos brotes de la enfermedad.

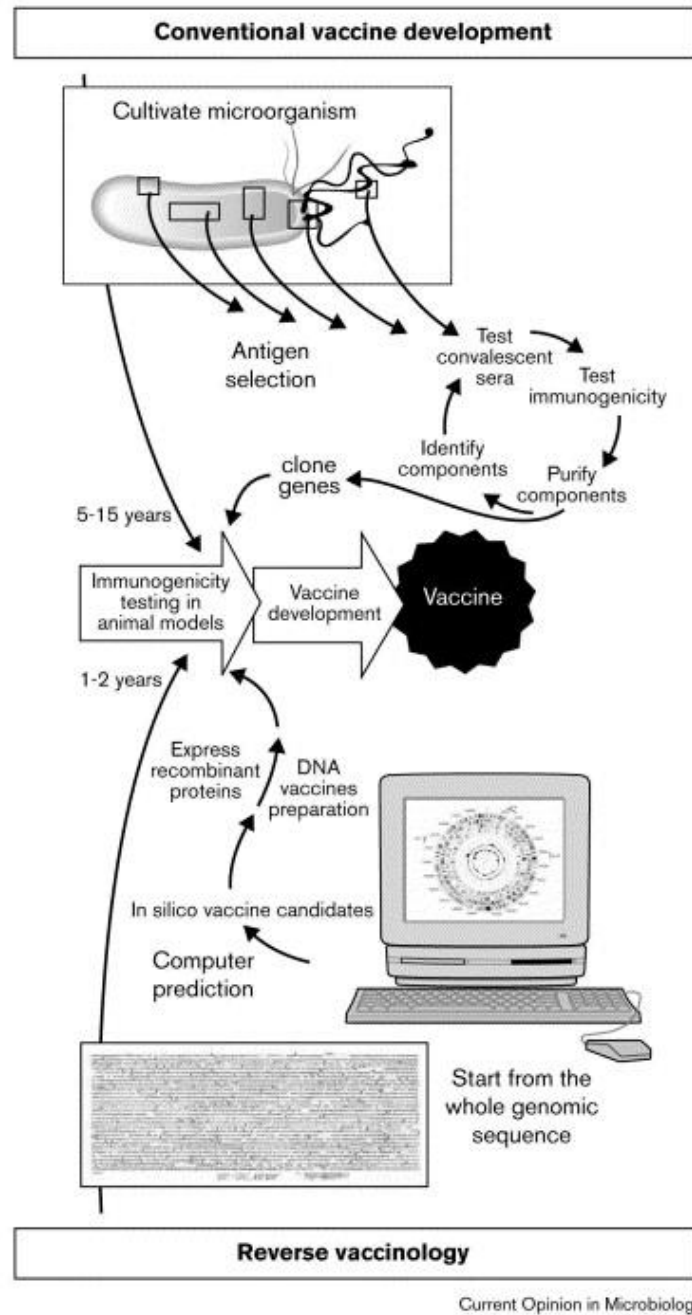


Figura 4. Desarrollo de una vacuna convencional y según vacunología inversa

6. Comparación entre técnicas

A continuación, se van a comparar las distintas técnicas en cuánto a su capacidad de generar una respuesta del sistema inmune tanto a nivel humoral como celular, las ventajas que posee cada técnica y sus desventajas.

Tabla 4. Comparación entre técnicas experimentales de vacunación

	Tipo de respuesta	Ventajas	Desventajas
Nanopartículas	Humoral y celular	Abundancia de distintos nanomateriales que pueden ser usados Protege a los antígenos de la vacuna hasta alcanzar su objetivo.	Falta de información sobre los cambios en los parámetros fisicoquímicos tanto de las nanopartículas como de los antígenos tras su unión. Es necesario adaptar los avances en mamíferos al sistema inmune de los peces
Mucosas	Humoral y celular	Alta duración de la inmunidad. Produce poco estrés	Algunas vacunas solo producen una respuesta local. Difícil determinación de la dosis de antígeno necesaria.
ARN	Humoral y celular	Las vacunas de ARN no se fabrican a partir de partículas patógenas o patógenos inactivados, por lo que no son infecciosas. A diferencia de la vacuna de ADN, la vacuna de ARN no se integra en el genoma del huésped y se degrada una vez que la proteína está hecha.	Tecnología muy nueva, por lo que se ha probado de forma muy limitada en la vacunación de peces.
Anti-idiotipo	Humoral y celular	Los anti-idiotipos pueden purificarse a partir del suero o diseñarse mediante un enfoque de acoplamiento molecular basado en la bioinformática y utilizarse como sustitución de antígenos.	Aún no se ha explorado en los peces la vacunación.
Planta	Humoral y celular	Su producción es potencialmente barata y constituye una alternativa viable a los sistemas de producción habituales, como los microbios y las células de mamíferos cultivados en biorreactores a gran escala. - A diferencia de otras tecnologías recombinantes, están libres de componentes	Esta tecnología de vacunas se encuentra en una fase inicial para las vacunas de peces (Shin et al., 2013), pero es probable que se desarrolle en un futuro próximo.

indeseables (endotoxinas en las bacterias y proteínas hiperglucosiladas producidas por las levaduras).

No hay límite a su escala de producción y el coste de ampliación es bajo.

Inversa	Humoral y celular	Permite identificar los antígenos de un patógeno. Diseño de vacunas polivalentes Menor tiempo de producción	Es necesario disponer del genoma del patógeno. Utilización de muchos programas bioinformáticos
----------------	-------------------	---	---

7. Conclusión

En la actualidad existe una amplia gama de estrategias de vacunación experimentales. Estas estrategias experimentales ofrecen una serie de características propias que las hacen unas candidatas potenciales a la implementación en la acuicultura comercial. Dado que muchas de estas técnicas son muy recientes hay ciertos aspectos que todavía se desconocen, por lo que es necesario que se continúe y se fomente la investigación para que en un futuro se disponga de estas estrategias en la vacunación en la acuicultura.

8. Referencias bibliográficas

- Adams, A. (2019). Progress, challenges and opportunities in fish vaccine development. *Fish and Shellfish Immunology*, 90(April), 210–214. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2019.04.066>
- Adams, A., Aoki, T., Berthe, F., Grisez, L., & Karunasagar, I. (2008). Recent technological advancements on aquatic animal health and their contributions toward reducing disease risks - a review. *Diseases in Asian Aquaculture VI*.
- Anderson, E. D., Mourich, D. V, Fahrenkrug, S. C., LaPatra, S., Shepherd, J., & Leong, J. A. (1996). Genetic immunization of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) against infectious hematopoietic necrosis virus. *Molecular Marine Biology and Biotechnology*, 5(2), 114–122.
- Andreoni, F., Amagliani, G., & Magnani, M. (2016). Selection of Vaccine Candidates for Fish Pasteurellosis Using Reverse Vaccinology and an In Vitro Screening Approach. In: Thomas, S. (eds) *Vaccine Design. Methods in Molecular Biology*, vol 1404. Humana, New York, NY. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-3389-1_12.

- Angelidis, P., Karagiannis, D., & Crump, E. M. (2006). Efficacy of a *Listonella anguillarum* (syn. *Vibrio anguillarum*) vaccine for juvenile sea bass *Dicentrarchus labrax*. *Diseases of Aquatic Organisms*, 71(1), 19–24. <https://doi.org/10.3354/dao071019>
- Angulo, C., Tello-Olea, M., Reyes-Becerril, M., Monreal-Escalante, E., Hernández-Adame, L., Angulo, M., & Mazon-Suastegui, J. M. (2021). Developing oral nanovaccines for fish: a modern trend to fight infectious diseases. *Reviews in Aquaculture*, 13(3), 1172–1192. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/raq.12518>
- Assefa, A., & Abunna, F. (2018). Maintenance of Fish Health in Aquaculture: Review of Epidemiological Approaches for Prevention and Control of Infectious Disease of Fish. *Veterinary Medicine International*, 2018. <https://doi.org/10.1155/2018/5432497>
- Bassity, E., & Clark, T. G. (2012). Functional Identification of Dendritic Cells in the Teleost Model, Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*). *PLOS ONE*, 7(3), e33196.
- Bedekar, M., & Kole, S. (2022). Fundamentals of Fish Vaccination. In *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* (Vol. 2411, pp. 147–173). https://doi.org/10.1007/978-1-0716-1888-2_9
- Bijker, M. S., Melief, C. J. M., Offringa, R., & van der Burg, S. H. (2007). Design and development of synthetic peptide vaccines: past, present and future. *Expert Review of Vaccines*, 6(4), 591–603. <https://doi.org/10.1586/14760584.6.4.591>
- Bly, J. E., & Clem, L. W. (1992). Temperature and teleost immune functions. *Fish & Shellfish Immunology*, 2(3), 159–171. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S1050-4648\(05\)80056-7](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S1050-4648(05)80056-7)
- Boshra, H., Li, J., & Sunyer, J. O. (2006). Recent advances on the complement system of teleost fish. *Fish & Shellfish Immunology*, 20(2), 239–262. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2005.04.004>
- Bowden, T. J. (2008). Modulation of the immune system of fish by their environment. *Fish & Shellfish Immunology*, 25(4), 373–383. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2008.03.017>
- Chahal, J. S., Fang, T., Woodham, A. W., Khan, O. F., Ling, J., Anderson, D. G., & Ploegh, H. L. (2017). An RNA nanoparticle vaccine against Zika virus elicits antibody and CD8+ T cell responses in a mouse model. *Scientific Reports*, 7(1), 252. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-00193-w>
- Chien, M.-H., Wu, S.-Y., & Lin, C.-H. (2018). Oral immunization with cell-free self-assembly virus-like particles against orange-spotted grouper nervous necrosis virus in grouper larvae, *Epinephelus coioides*. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 197, 69–75. <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2018.01.012>
- Cho, S. Y., Kim, H. J., Lan, N. T., Han, H.-J., Lee, D.-C., Hwang, J. Y., Kwon, M.-G., Kang, B. K., Han, S. Y., Moon, H., Kang, H. A., & Kim, H.-J. (2017). Oral vaccination through voluntary consumption of the convict grouper *Epinephelus septemfasciatus* with yeast producing the capsid protein of red-spotted grouper nervous necrosis virus. *Veterinary Microbiology*, 204, 159–164. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2017.04.022>
- Cooper, N. R. (1985). The classical complement pathway: activation and regulation of the first complement component. *Advances in Immunology*, 37, 151–216. [https://doi.org/10.1016/s0065-2776\(08\)60340-5](https://doi.org/10.1016/s0065-2776(08)60340-5)
- Dadar, M., Dhama, K., Vakharia, V. N., Hoseinifar, S. H., Karthik, K., Tiwari, R., Khandia, R., Munjal, A., Salgado-Miranda, C., & Joshi, S. K. (2016). Advances in Aquaculture Vaccines Against Fish

-
- Pathogens: Global Status and Current Trends. *Reviews in Fisheries Science and Aquaculture*, 25(3), 184–217. <https://doi.org/10.1080/23308249.2016.1261277>
- De Cerio, A., Zabalegui, N., Rodriguez-Calvillo, M., Inoges, S., & Bendandi, M. (2007). Anti-idiotypic antibodies in cancer treatment. *Oncogene*, 26(25), 3594–3602.
- Dezfuli, B. S., Pironi, F., Giari, L., & Noga, E. J. (2010). Immunocytochemical localization of piscidin in mast cells of infected seabass gill. *Fish & Shellfish Immunology*, 28(3), 476–482. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.fsi.2009.12.012>
- Dhama, K., Wani, M. Y., Deb, R., Karthik, K., Tiwari, R., Kumar, A., Verma, A. K., & Singh, S. D. (2013). Plant based oral vaccines for human and animal pathogens – A new era of prophylaxis: current and future perspectives. *Journal of Experimental Biology and Agricultural Sciences*, 1(2320), 1–12.
- Dhar, A. K., Bowers, R. M., Rowe, C. G., & Allnutt, F. C. T. (2010). Expression of a foreign epitope on infectious pancreatic necrosis virus VP2 capsid protein subviral particle (SVP) and immunogenicity in rainbow trout. *Antiviral Research*, 85(3), 525–531. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2009.12.009>
- Duff, D. C. B. (1939). Some serological relationships of the S, R, and G phases of *Bacillus salmonicida*. *Journal of Bacteriology*, 38(1), 91–101.
- Duff, D. C. B. (1942). The Oral Immunization of Trout Against *Bacterium Salmonicida*. *The Journal of Immunology*, 44(1), 87 LP – 94.
- Edholm, E.-S., Bengten, E., & Wilson, M. (2011). Insights into the function of IgD. *Developmental & Comparative Immunology*, 35(12), 1309–1316. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.dci.2011.03.002>
- Ellul, R. M., Kalatzis, P. G., Frantzen, C., Haugland, G. T., Gulla, S., Colquhoun, D. J., Middelboe, M., Wergeland, H. I., & Rønneseth, A. (2021). Genomic Analysis of *Pasteurella atlantica* Provides Insight on Its Virulence Factors and Phylogeny and Highlights the Potential of Reverse Vaccinology in Aquaculture. In *Microorganisms* (Vol. 9, Issue 6). <https://doi.org/10.3390/microorganisms9061215>
- Evelyn, T. P. (1997). A historical review of fish vaccinology. *Developments in Biological Standardization*, 90, 3–12.
- FAO. (2022). *The State of World Fisheries and Aquaculture 2022*. FAO. <https://doi.org/10.4060/cc0461en>
- Flajnik, M. F., & Kasahara, M. (2010). Origin and evolution of the adaptive immune system: genetic events and selective pressures. *Nature Reviews. Genetics*, 11(1), 47–59. <https://doi.org/10.1038/nrg2703>
- Fridholm, H., Eliasson, L., & Everitt, E. (2007). Immunogenicity Properties of Authentic and Heterologously Synthesized Structural Protein VP2 of Infectious Pancreatic Necrosis Virus. *Viral Immunology*, 20(4), 635–648. <https://doi.org/10.1089/vim.2007.0043>
- Grgacic, E. V. L., & Anderson, D. A. (2006). Virus-like particles: Passport to immune recognition. *Methods*, 40(1), 60–65. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2006.07.018>
-

- Gudding, R., & Van Muiswinkel, W. B. (2013). A history of fish vaccination: science-based disease prevention in aquaculture. In *Fish & shellfish immunology* (Vol. 35, Issue 6, pp. 1683–1688). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2013.09.031>
- Guo, M., Shi, W., Wang, Y., Wang, Y., Chen, Y., Li, D., Ren, X., Hua, X., Tang, L., Li, Y., & Liu, M. (2018). Recombinant infectious hematopoietic necrosis virus expressing infectious pancreatic necrosis virus VP2 protein induces immunity against both pathogens. *Fish & Shellfish Immunology*, *78*, 187–194. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.fsi.2018.04.047>
- Hansen, J. D., Vojtech, L. N., & Laing, K. J. (2011). Sensing disease and danger: a survey of vertebrate PRRs and their origins. *Developmental and Comparative Immunology*, *35*(9), 886–897. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2011.01.008>
- Harikrishnan, R., Balasundaram, C., & Heo, M.-S. (2011). Fish health aspects in grouper aquaculture. *Aquaculture*, *320*(1), 1–21. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2011.07.022>
- Hart, S., Wrathmell, A. B., Harris, J. E., & Grayson, T. H. (1988). Gut immunology in fish: A review. *Developmental & Comparative Immunology*, *12*(3), 453–480. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0145-305X\(88\)90065-1](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0145-305X(88)90065-1)
- Hølvold, L. B., Myhr, A. I., & Dalmo, R. A. (2014). Strategies and hurdles using DNA vaccines to fish. *Veterinary Research*, *45*(1), 21. <https://doi.org/10.1186/1297-9716-45-21>
- Huang, W.-L., Chuang, S.-C., & Yang, C.-D. (2019). Anti-Idiotypic Vaccine Provides Protective Immunity Against *Vibrio Harveyi* in Grouper (*Epinephelus Coioides*). In *Vaccines* (Vol. 7, Issue 4). <https://doi.org/10.3390/vaccines7040210>
- Irie, T., Watarai, S., Iwasaki, T., & Kodama, H. (2005). Protection against experimental *Aeromonas salmonicida* infection in carp by oral immunisation with bacterial antigen entrapped liposomes. *Fish & Shellfish Immunology*, *18*(3), 235–242. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.fsi.2004.07.006>
- Ji, J., Torrealba, D., Ruyra, À., & Roher, N. (2015). Nanodelivery Systems as New Tools for Immunostimulant or Vaccine Administration: Targeting the Fish Immune System. In *Biology* (Vol. 4, Issue 4). <https://doi.org/10.3390/biology4040664>
- Karlsen, M., Villoing, S., Rimstad, E., & Nylund, A. (2009). Characterization of untranslated regions of the salmonid alphavirus 3 (SAV3) genome and construction of a SAV3 based replicon. *Virology Journal*, *6*, 173. <https://doi.org/10.1186/1743-422X-6-173>
- Keller, S. A., Bauer, M., Manolova, V., Muntwiler, S., Saudan, P., & Bachmann, M. F. (2010). Cutting Edge: Limited Specialization of Dendritic Cell Subsets for MHC Class II-Associated Presentation of Viral Particles. *The Journal of Immunology*, *184*(1), 26 LP – 29. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0901540>
- Kohler, H., Pashov, A., & Kieber-Emmons, T. (2019). The promise of anti-idiotypic revisited. *Frontiers in Immunology*, *10*, 808.
- Kolotilin, I., Topp, E., Cox, E., Devriendt, B., Conrad, U., Joensuu, J., Stöger, E., Warzecha, H., McAllister, T., Potter, A., McLean, M. D., Hall, J. C., & Menassa, R. (2014). Plant-based solutions for veterinary immunotherapeutics and prophylactics. *Veterinary Research*, *45*(1), 117. <https://doi.org/10.1186/s13567-014-0117-4>

- Kurath, G. (2008). Biotechnology and DNA vaccines for aquatic animals. *Revue Scientifique et Technique*, 27(1), 175–196. <https://doi.org/10.20506/rst.27.1.1793>
- Kushnir, N., Streatfield, S. J., & Yusibov, V. (2012). Virus-like particles as a highly efficient vaccine platform: Diversity of targets and production systems and advances in clinical development. *Vaccine*, 31(1), 58–83. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2012.10.083>
- Leitner, W. W., Ying, H., & Restifo, N. P. (1999). DNA and RNA-based vaccines: principles, progress and prospects. *Vaccine*, 18(9–10), 765–777. [https://doi.org/10.1016/s0264-410x\(99\)00271-6](https://doi.org/10.1016/s0264-410x(99)00271-6)
- Lillehaug, A. (1991). Vaccination of Atlantic salmon (*Salmo salar*) against cold-water vibriosis — duration of protection and effect on growth rate. *Aquaculture*, 92, 99–107. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0044-8486\(91\)90011-U](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0044-8486(91)90011-U)
- Lillehaug, A. (1997). Vaccination strategies in seawater cage culture of salmonids. *Developments in Biological Standardization*, 90, 401–408.
- Lillehaug, A. (2014a). Vaccination Strategies and Procedures. *Fish Vaccination*, 9780470674, 140–152. <https://doi.org/10.1002/9781118806913.ch12>
- Lillehaug, A. (2014b). Vaccination Strategies and Procedures. In *Fish Vaccination* (pp. 140–152). <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/9781118806913.ch12>
- Lorenzen, E., Einer-Jensen, K., Rasmussen, J. S., Christensen, M. B., Collet, B., Secombes, C. J., & Lorenzen, N. (2011). *The Protective Mechanisms Induced by a DNA Vaccine in Fish Depend on Temperature*. 392–392.
- Ma, J., Bruce, T. J., Jones, E. M., & Cain, K. D. (2019). A review of fish vaccine development strategies: Conventional methods and modern biotechnological approaches. *Microorganisms*, 7(11). <https://doi.org/10.3390/microorganisms7110569>
- Mahendran, R., Jeyabaskar, S., Michael, D., Vincent Paul, A., & Sitharaman, G. (2016). Computer-aided vaccine designing approach against fish pathogens *Edwardsiella tarda* and *Flavobacterium columnare* using bioinformatics softwares. *Drug Design, Development and Therapy*, 10, 1703. <https://doi.org/10.2147/DDDT.S95691>
- Midtlyng, P. J. (2022). *Current Use and Need for New Fish Vaccines BT - Principles of Fish Immunology : From Cells and Molecules to Host Protection* (K. Buchmann & C. J. Secombes, Eds.; pp. 599–608). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-030-85420-1_19
- Muktar, Y., Tesfaye, S., & Tesfaye, B. (2016). Present Status and Future Prospects of Fish Vaccination: A Review. *Journal of Veterinary Science & Technology*, 07(02). <https://doi.org/10.4172/2157-7579.1000299>
- Munang'andu, H. M., Fredriksen, B. N., Mutoloki, S., Brudeseth, B., Kuo, T.-Y., Marjara, I. S., Dalmo, R. A., & Evensen, Ø. (2012). Comparison of vaccine efficacy for different antigen delivery systems for infectious pancreatic necrosis virus vaccines in Atlantic salmon (*Salmo salar*) in a cohabitation challenge model. *Vaccine*, 30(27), 4007–4016. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2012.04.039>
- Muñoz-Atienza, E., Díaz-Rosales, P., & Tafalla, C. (2021). Systemic and Mucosal B and T Cell Responses Upon Mucosal Vaccination of Teleost Fish. In *Frontiers in Immunology* (Vol. 11).

- Nakao, M., Tsujikura, M., Ichiki, S., Vo, T. K., & Somamoto, T. (2011). The complement system in teleost fish: progress of post-homolog-hunting researches. *Developmental and Comparative Immunology*, 35(12), 1296–1308. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2011.03.003>
- Nasr-Eldahan, S., Nabil-Adam, A., Shreadah, M. A., Maher, A. M., & El-Sayed Ali, T. (2021). A review article on nanotechnology in aquaculture sustainability as a novel tool in fish disease control. *Aquaculture International*, 29(4), 1459–1480. <https://doi.org/10.1007/s10499-021-00677-7>
- Naveed, A., Rahman, S. U., Arshad, M. I., & Aslam, B. (2018). Recapitulation of the anti-idiotypic antibodies as vaccine candidate. *Translational Medicine Communications*, 3(1), 1–7.
- Noad, R., & Roy, P. (2003). Virus-like particles as immunogens. *Trends in Microbiology*, 11(9), 438–444. [https://doi.org/10.1016/S0966-842X\(03\)00208-7](https://doi.org/10.1016/S0966-842X(03)00208-7)
- Noga, E. J., Ullal, A. J., Corrales, J., & Fernandes, J. M. O. (2011). Application of antimicrobial polypeptide host defenses to aquaculture: Exploitation of downregulation and upregulation responses. *Comparative Biochemistry and Physiology. Part D, Genomics & Proteomics*, 6(1), 44–54. <https://doi.org/10.1016/j.cbd.2010.06.001>
- Øvergård, A.-C., Fiksdal, I. U., Nerland, A. H., & Patel, S. (2011). Expression of T-cell markers during Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus* L.) ontogenesis. *Developmental & Comparative Immunology*, 35(2), 203–213. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.dci.2010.09.009>
- Palm, N. W., & Medzhitov, R. (2009). Pattern recognition receptors and control of adaptive immunity. *Immunological Reviews*, 227(1), 221–233. <https://doi.org/10.1111/j.1600-065X.2008.00731.x>
- Pardi, N., Hogan, M. J., Porter, F. W., & Weissman, D. (2018). mRNA vaccines—a new era in vaccinology. *Nature Reviews Drug Discovery*, 17(4), 261–279. <https://doi.org/10.1038/nrd.2017.243>
- Perri, S., Greer, C. E., Thudium, K., Doe, B., Legg, H., Liu, H., Romero, R. E., Tang, Z., Bin, Q., Dubensky Jr, T. W., Vajdy, M., Otten, G. R., & Polo, J. M. (2003). An alphavirus replicon particle chimera derived from Venezuelan equine encephalitis and Sindbis viruses is a potent gene-based vaccine delivery vector. *Journal of Virology*, 77(19), 10394–10403. <https://doi.org/10.1128/jvi.77.19.10394-10403.2003>
- Plouffe, D. A., Hanington, P. C., Walsh, J. G., Wilson, E. C., & Belosevic, M. (2005). Comparison of select innate immune mechanisms of fish and mammals. *Xenotransplantation*, 12(4), 266–277. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3089.2005.00227.x>
- Praveen, K., Evans, D. L., & Jaso-Friedmann, L. (2004). Evidence for the existence of granzyme-like serine proteases in teleost cytotoxic cells. *Journal of Molecular Evolution*, 58(4), 449–459. <https://doi.org/10.1007/s00239-003-2566-7>
- Press, C. M., & Lillehaug, A. (1995). Vaccination in European salmonid aquaculture: a review of practices and prospects. *The British Veterinary Journal*, 151(1), 45–69. [https://doi.org/10.1016/s0007-1935\(05\)80064-8](https://doi.org/10.1016/s0007-1935(05)80064-8)
- Qin, H., Jin, X., Huang, W., & Liu, Y. (2010). Production of an anti-idiotypic antibody single chain variable fragment vaccine against *Edwardsiella tarda*. *Acta Biochim Biophys Sin*, 42(2), 129–136.
- Rappuoli, R. (2000). Reverse vaccinology. *Current Opinion in Microbiology*, 3(5), 445–450. [https://doi.org/10.1016/S1369-5274\(00\)00119-3](https://doi.org/10.1016/S1369-5274(00)00119-3)

- Reite, O. B., & Evensen, O. (2006). Inflammatory cells of teleostean fish: a review focusing on mast cells/eosinophilic granule cells and rodlet cells. *Fish & Shellfish Immunology*, 20(2), 192–208. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2005.01.012>
- Restifo, N. P., Ying, H., Hwang, L., & Leitner, W. W. (2000). The promise of nucleic acid vaccines. *Gene Therapy*, 7(2), 89–92. <https://doi.org/10.1038/sj.gt.3301117>
- Richner, J. M., Himansu, S., Dowd, K. A., Butler, S. L., Salazar, V., Fox, J. M., Julander, J. G., Tang, W. W., Shrestha, S., Pierson, T. C., Ciaramella, G., & Diamond, M. S. (2017). Modified mRNA Vaccines Protect against Zika Virus Infection. *Cell*, 168(6), 1114–1125.e10. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.02.017>
- Ricklin, D., Hajishengallis, G., Yang, K., & Lambris, J. D. (2010). Complement: a key system for immune surveillance and homeostasis. *Nature Immunology*, 11(9), 785–797. <https://doi.org/10.1038/ni.1923>
- Rosenthal, J. A., Chen, L., Baker, J. L., Putnam, D., & DeLisa, M. P. (2014). Pathogen-like particles: biomimetic vaccine carriers engineered at the nanoscale. *Current Opinion in Biotechnology*, 28, 51–58. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2013.11.005>
- Saxena, J., & Rawat, S. (2013). Edible Vaccines. In *Advances in Biotechnology* (pp. 207–226). https://doi.org/10.1007/978-81-322-1554-7_12
- Schrøder, M. B., Villena, A. J., & Jørgensen, T. Ø. (1998). Ontogeny of lymphoid organs and immunoglobulin producing cells in atlantic cod (*Gadus morhua* L.). *Developmental & Comparative Immunology*, 22(5), 507–517. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0145-305X\(98\)00030-5](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0145-305X(98)00030-5)
- Schroeder, H. W., & Cavacini, L. (2010). Structure and function of immunoglobulins. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 125(2, Supplement 2), S41–S52. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jaci.2009.09.046>
- Secombes, C. J., & Wang, T. (2012). The innate and adaptive immune system of fish. In B. B. T.-I. D. in A. Austin (Ed.), *Infectious Disease in Aquaculture* (pp. 3–68). Elsevier. <https://doi.org/10.1533/9780857095732.1.3>
- Seternes, T., Sørensen, K., & Smedsrød, B. (2002). Scavenger endothelial cells of vertebrates: a nonperipheral leukocyte system for high-capacity elimination of waste macromolecules. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(11), 7594–7597. <https://doi.org/10.1073/pnas.102173299>
- Sevatdal, S., & Dalen, V. (1997). Immunization of Atlantic salmon (*Salmo salar* L) against furunculosis and cold water vibriosis at low temperatures. *Fish Vaccinology*, 90, 472.
- Shahid, N., & Daniell, H. (2016). Plant-based oral vaccines against zoonotic and non-zoonotic diseases. *Plant Biotechnology Journal*, 14(11), 2079–2099. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/pbi.12604>
- Shefat, S. H. T. (2018). Vaccines for Use in Finfish Aquaculture. *Acta Scientifica Pharmaceutical Sciences*, 2(11 October 2018).
- Shin, Y. J., Kwon, T. H., Seo, J. Y., & Kim, T. J. (2013). Oral immunization of fish against iridovirus infection using recombinant antigen produced from rice callus. *Vaccine*, 31(45), 5210–5215. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2013.08.085>

- Shinn, A. A. P., Pratoomyot, J., Bron, J. E., Paladini, G. G., Brooker, E., & Brooker, A. J. (2015). Economic impacts of aquatic parasites on global finfish production. *Global Aquaculture Advocate*, *Setembro/Outubro*, 82–84.
- Shoemaker, C. A., Klesius, P. H., & Bricker, J. M. (1999). Efficacy of a modified live *Edwardsiella ictaluri* vaccine in channel catfish as young as seven days post hatch. *Aquaculture*, *176*(3), 189–193. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(99\)00116-7](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0044-8486(99)00116-7)
- Shoemaker, C. A., Klesius, P. H., Evans, J. J., & Arias, C. R. (2009). Use of modified live vaccines in aquaculture. *Journal of the World Aquaculture Society*, *40*(5), 573–585. <https://doi.org/10.1111/j.1749-7345.2009.00279.x>
- Siderits, D., & Bielek, E. (2009). Rodlet cells in the thymus of the zebrafish *Danio rerio* (Hamilton, 1822). *Fish & Shellfish Immunology*, *27*(4), 539–548. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2009.06.020>
- Smith, V. J., Desbois, A. P., & Dyrinda, E. A. (2010). Conventional and unconventional antimicrobials from fish, marine invertebrates and micro-algae. *Marine Drugs*, *8*(4), 1213–1262. <https://doi.org/10.3390/md8041213>
- Snieszko, S. F., & Friddle, S. B. (1949). Prophylaxis of Furunculosis in Brook Trout (*Salvelinus Fontinalis*) by Oral Immunization and Sulfamerazine. *The Progressive Fish-Culturist*, *11*(3), 161–168. [https://doi.org/https://doi.org/10.1577/1548-8640\(1949\)11\[161:POFIBT\]2.0.CO;2](https://doi.org/https://doi.org/10.1577/1548-8640(1949)11[161:POFIBT]2.0.CO;2)
- Snieszko, S., Piotrowska, W., Kocylowski, B., & Marek, K. (1938). Badania bakteriologiczne i serologiczne nad bakteriami posocznicy karpia. *Memoires de l'Institut d'Ichtyobiologie et Pisciculture de La Station de Pisciculture Experimentale a Mydlniki de l'Universite Jagiellonienne a Cracovie*, *38*.
- Sun, K., Zhang, W.-W., Hou, J.-H., & Sun, L. (2009). Immunoprotective analysis of VhhP2, a *Vibrio harveyi* vaccine candidate. *Vaccine*, *27*(21), 2733–2740. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2009.03.012>
- Tafalla, C., Bøgwald, J., Dalmo, R. A., Munang'andu, H. M., & Evensen, Ø. (2014). Adjuvants in Fish Vaccines. In *Fish Vaccination* (pp. 68–84). <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/9781118806913.ch7>
- Tatner, M. F., & Horne, M. T. (1985). The effects of vaccine dilution, length of immersion time, and booster vaccinations on the protection levels induced by direct immersion vaccination of brown trout, *Salmo trutta*, with *Yersinia ruckeri* (ERM) vaccine. *Aquaculture*, *46*(1), 11–18. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0044-8486\(85\)90170-X](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0044-8486(85)90170-X)
- Tavares-Dias, M., & Martins, M. L. (2017). An overall estimation of losses caused by diseases in the Brazilian fish farms. *Journal of Parasitic Diseases: Official Organ of the Indian Society for Parasitology*, *41*(4), 913–918. <https://doi.org/10.1007/s12639-017-0938-y>
- Tebbit, G. L., Erikson, J. D., & Vande Water, R. B. (1980). Development and use of *Yersinia ruckeri* bacterins to control enteric redmouth disease. *Developments in Biological Standardization*.
- Toranzo, A. E., Romalde, J. L., Magariños, B., & Barja, J. L. (2009). Present and future of aquaculture vaccines against fish bacterial diseases. In B. B. & R. C. (Eds.), *The use of veterinary drugs and vaccines in Mediterranean aquaculture* (Vol. 86, pp. 155–176). Zaragoza: CIHEAM.
- Vallejos-Vidal, E., Reyes-López, F., & McKenzie, S. (2017). Immunostimulant Diets and Oral Vaccination in Fish. In *Diagnosis and Control of Diseases of Fish and Shellfish* (pp. 147–184). <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/9781119152125.ch6>

- Vartak, A., & Sucheck, S. J. (2016). Recent Advances in Subunit Vaccine Carriers. In *Vaccines* (Vol. 4, Issue 2). <https://doi.org/10.3390/vaccines4020012>
- Whyte, S. K. (2007). The innate immune response of finfish--a review of current knowledge. *Fish & Shellfish Immunology*, 23(6), 1127–1151. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2007.06.005>
- Wolf, A., Hodneland, K., Frost, P., Hoeijmakers, M., & Rimstad, E. (2014). Salmonid alphavirus-based replicon vaccine against infectious salmon anemia (ISA): impact of immunization route and interactions of the replicon vector. *Fish & Shellfish Immunology*, 36(2), 383–392. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2013.12.018>
- Xia, H., Wu, K., Liu, W., Wang, W., & Zhang, X. (2015). Experimental immunology spatio-temporal expression of blunt snout bream (*Megalobrama amblycephala*) mIgD and its immune response to *Aeromonas hydrophila*. *Central European Journal Of Immunology*, 40(2), 132–141. <https://doi.org/10.5114/ceji.2015.52825>
- Xia, H., Yang, P., Zang, Y., Liu, L., Chen, Z., Ming, S., Fang, X., Hu, S., Deng, X., & Sun, G. (2022). Research progress in molecular biology of fish immunoglobulin D. *Israeli Journal of Aquaculture - Bamidgeh*, 74. <https://doi.org/10.46989/001c.34683>
- Ye, J., Kaattari, I. M., Ma, C., & Kaattari, S. (2013). The teleost humoral immune response. *Fish & Shellfish Immunology*, 35(6), 1719–1728. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2013.10.015>
- Yongjuan, X., Weiquan, H., Baocheng, H., Xiaohang, J., & Rongqing, Z. (2002). Production and characterisation of monoclonal anti-idiotypic antibody to *Vibrio anguillarum*. *Fish & Shellfish Immunology*, 12(3), 273–281. <https://doi.org/https://doi.org/10.1006/fsim.2001.0370>
- Yu, Y., Wang, Q., Huang, Z., Ding, L., & Xu, Z. (2020). Immunoglobulins, Mucosal Immunity and Vaccination in Teleost Fish . In *Frontiers in Immunology* (Vol. 11).
- Zapata, A., Diez, B., Cejalvo, T., Gutiérrez-de Frías, C., & Cortés, A. (2006). Ontogeny of the immune system of fish. *Fish & Shellfish Immunology*, 20(2), 126–136. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.fsi.2004.09.005>