

# Inducción de IgA e IgG anti-omp48 en conejos inmunizados intragástricamente con una fracción extracelular de *Aeromonas veronii*

## Induction of omp48-specific IgA and IgG in rabbits intragastrically immunized with an extracellular fraction of *Aeromonas veronii*

Eduardo Ruiz-Bustos<sup>a</sup>, Arturo Pedro Sierra-Beltrán<sup>b</sup>, María de Jesús Romero-Geraldo<sup>b</sup>, Felipe Ascencio<sup>b</sup>

### RESUMEN

Una proteína de membrana externa de 48 kDa (omp48) de *Aeromonas veronii* (*A. veronii*), que tiene afinidad por secreciones de la mucosa (tal como mucina, lactoferrina, inmunoglobulinas o colágeno), induce una respuesta inmune estadísticamente significativa al ser administrada intragástricamente a conejos blancos de Nueva Zelanda. Estudios posteriores mostraron una correlación positiva entre las inmunoglobulinas y la respuesta de células productoras de anticuerpo (CPA). La administración intragástrica del antígeno induce una respuesta vigorosa, tanto local como sistémica, principalmente de inmunoglobulinas A y G contra la omp48 de *A. veronii*. Estas se evidenciaron por la presencia de (i) células productoras de anticuerpos contra omp48 en el tracto gastrointestinal, bazo y sangre, y (ii) elevados niveles de anticuerpos circulantes. La estimulación del sistema inmune de mucosa mediante antígenos bacterianos inmunogénicos, puede ser una importante alternativa para el control y prevención de enfermedades asociadas a *Aeromonas*.

**PALABRAS CLAVE:** Inmunidad de mucosas, *Aeromonas veronii*, Adhesinas, Proteínas de membrana externa, Vacunas.

### ABSTRACT

A 48 kDa outer membrane protein (omp48) of *Aeromonas veronii* exhibiting affinity for mucosal secretions (mucin, lactoferrin, immunoglobulins, or collagen), induced a statistically-significant immune response when given intragastrically to white New Zealand rabbits. Further studies showed a positive correlation between immunoglobulins and antibody-producing cells (APC). Intragastric administration of the antigen induces vigorous local and systemic responses, mostly IgA and IgG against *A. veronii* omp48. Responses were evident by the presence of (i) APC to omp48 in the gastrointestinal tract, spleen and blood; and (ii) high levels of circulating antibodies. Stimulation of the mucosal immune system by immunogenic bacterial antigens can be a major alternative for the control and prevention of *Aeromonas*-associated diseases.

**KEY WORDS:** Mucosal immunity, *Aeromonas veronii*, Adhesins, Outer membrane proteins, Vaccines.

Las especies móviles de *Aeromonas* han sido reconocidas como patógenos de animales tanto de sangre fría como caliente, incluido el hombre<sup>(1-4)</sup>. En humanos, la manifestación clínica más común es diarrea, aunque también se han descrito infecciones de heridas, septicemia, así como otras infecciones extraintestinales. Se han documentado

Motile *Aeromonas* species have been recognized as pathogens affecting both cold- and warm-blooded animals, humans included<sup>(1-4)</sup>. In humans, the most common clinical manifestation is scours, but *Aeromonas* spp. have also been reported to be associated with wound infections, septicemia, and other extraintestinal infections. Non-symptomatic

Recibido el 17 de agosto de 2010. Aceptado el 18 de enero de 2011.

<sup>a</sup> Universidad de Sonora, Departamento de Ciencias Químico Biológicas. Blvd. Luis Encinas y Rosales, Hermosillo, Sonora 83000, México. Tel +52(662)259-2163 erbustos@guayacan.uson.mx. Correspondencia al primer autor.

<sup>b</sup> Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste.

varios reportes de infecciones gastrointestinales por *Aeromonas* en humanos asintomáticos, asociadas a la ingestión de agua no tratada o al consumo de alimentos marinos<sup>(5,6)</sup>. Aunque se ha demostrado que algunas cepas de *Aeromonas* producen diversos factores de virulencia<sup>(6,7,8)</sup>, la administración de *Aeromonas* vivas a ratones tratados con estreptomycin, aves gnotobióticas o voluntarios saludables, no indujo una diarrea significativa<sup>(9,10,11)</sup>. Pese a que se han realizando ensayos en animales para probar la virulencia de cepas aisladas, ninguno resulta práctico para el estudio de los mecanismos patogénicos de diarrea o la invasión de mucosas, que pudieran ocurrir en las infecciones intestinales en humanos. Se han empleado ensayos intestinales en ratón, rata y conejos, para probar la producción de una enterotoxina producida por cepas de *Aeromonas*<sup>(12,13)</sup>.

Pazzaglia et al<sup>(14)</sup> han desarrollado un modelo de sección removible de intestino en conejo para la evaluación de los mecanismos patogénicos de cepas de *Aeromonas*, sugiriendo al conejo como un modelo animal alternativo para el estudio de infecciones por *Aeromonas* en mamíferos e incluso para el estudio de herramientas inmunoterapéuticas e inmunoproliféricas. Si consideramos la posibilidad de utilizar vacunas basadas en adhesinas contra infecciones por *Aeromonas*, es importante evaluar la extensión de la respuesta inmune tanto local como sistémica inducida por las adhesinas bacterianas, mediante la determinación de los niveles de anticuerpos y células productoras de anticuerpos de distintos isotipos posterior a la inmunización con antígenos de *Aeromonas*, tanto asociados a la célula como extracelulares, administrados directamente al estómago mediante intubación. Uno de tales antígenos es una proteína de 48 kDa de *A. veronii* (omp48) que exhibe afinidad por constituyentes de secreciones de mucosa tales como mucina, lactoferrina e inmunoglobulinas y que predominantemente es secretada por *A. veronii*<sup>(15)</sup>.

Los objetivos del trabajo fueron determinar (i) la actividad inmunoestimulante de una fracción extracelular rica en omp48 de *A. veronii*, sobre el sistema inmune de mucosa en conejos como modelo experimental; (ii) evaluar adyuvantes sobre la mucosa como potenciadores de la respuesta inmune;

gastrointestinal (GI) infections have also been reported in humans, associated with the intake of non-treated water or seafood<sup>(5,6)</sup>. Even though some *Aeromonas* strains have shown to produce various virulence factors<sup>(6,7,8)</sup>, the administration of live *Aeromonas* to streptomycin-treated mice, gnotobiotic birds, or healthy human volunteers did not result in significant diarrhea<sup>(9,10,11)</sup>. Despite having performed animal assays in an attempt to proof the virulence of several *Aeromonas* isolates, none of them has been instrumental for the study of the pathogenic mechanisms involved in scouring and mucosal invasion that can occur in human intestinal infections. Intestinal assays have been used in mice, rats and rabbits to show the production of an enterotoxin by *Aeromonas* strains<sup>(12,13)</sup>.

Pazzaglia et al<sup>(14)</sup> have developed a model of removable intestinal sections in rabbits for the evaluation of pathogenic mechanisms in *Aeromonas* strains, proposing the rabbit as an alternative animal model for the study of *Aeromonas* infections in mammals, and even for the study of immunotherapeutic/ and immunoprophylactic tools. If using adhesin-based vaccines against *Aeromonas* infections is to be considered, evaluating the extent of the bacterial adhesin-induced immune response, both locally and systemically, will also be important. This can be achieved by the determination of both antibody levels and APC of different isotypes after the immunization with cell-associated and extracellular *Aeromonas* antigens given directly to the stomach by means of a gastric probe. One of such antigens is the 48 kDa protein (omp48) of *A. veronii*, that exhibits affinity for mucosal secretion constituents such as mucin, lactoferrin, and immunoglobulins, and that is predominantly secreted by *A. veronii*<sup>(15)</sup>.

The goals of this research were to (i) determine the immunostimulating activity of an omp48-rich extracellular fraction of *A. veronii* on the rabbit-mucosal immune system used as an experimental model; (ii) evaluating adjuvants on the mucosa as immune response potentiators; (iii) evaluating the potential induction of local/systemic antibodies and APC after the intragastric administration of the *A. veronii* omp48 immunogen; and (iv) determining

(iii) evaluar la posible inducción de anticuerpos y células productoras de anticuerpo, local y sistémica, por la administración intragástrica del inmunógeno omp48 de *A. veronii*; y (iv) determinar los isotipos predominantes de inmunoglobulinas.

Para el desarrollo del presente trabajo, se empleó la cepa *Aeromonas veronii* biovar *veronii* (cepa A186), aislada de heces de un hombre con infección diarreica en el hospital de la Universidad de Lund, Suecia; esta cepa reconoce mucina, lactoferrina, colágeno e inmunoglobulinas<sup>(16,17)</sup>. Para el aislamiento y purificación de la omp48 liberada al medio de cultivo, la bacteria fue cultivada a 32 °C en una botella de polipropileno de 20 L en caldo Luria Bertani con aeración constante hasta que el cultivo alcanzó la fase estacionaria (aproximadamente 30 h). Las células se removieron por centrifugación a 5,000 xg. La omp48 se aisló del sobrenadante de cultivo mediante precipitación con sulfato de amonio (60 a 80 % de saturación) y purificada por cromatografía de afinidad en una columna de Mucina-sefarosa (Pharmacia), previamente equilibrada con buffer de fosfato 0.015 M, pH 7.2, conteniendo NaCl 0.15 M. La omp48 se eluyó posteriormente con NaCl 1 M y dializó contra bicarbonato de amonio 0.01 M. Análisis de electroforesis (SDS-PAGE) y transferencias Western del material purificado revelaron una proteína principal de 48 kDa y una proteína secundaria de 38 kDa, que también reconoce mucina marcada con peroxidasa. El material purificado por elusión pasiva de geles de poliácridamida libre de LPS, se liofilizó y almacenó a 4 °C hasta su uso (Ascencio *et al*, datos no publicados).

La fracción rica en la proteína de 48 kDa (omp48) se acopló covalentemente a la subunidad B de la toxina del cólera (CTB) para incrementar la respuesta inmune tipo IgA en mucosa. La omp48 y CTB se acoplaron al N-succinimidil-(3-[2-piridil]-ditio) propionato (SPDP) en proporciones equimolares 1:30 (omp48) y 1:10 (CTB) de acuerdo a las instrucciones del fabricante (Boehringer Mannheim Biochemicals, Mannheim, Alemania). Las preparaciones se sometieron a filtración en gel para eliminar el SPDP libre, empleando columnas de Sephadex G25 (Pharmacia). El derivado de

the major immunoglobulin isotypes involved.

For this study, the *A. veronii* biovar *veronii* A186 strain isolated from the feces of a man with a scouring infection in Lund University Hospital, Sweden, was used. This strain recognizes mucin, lactoferrin, collagen, and immunoglobulins<sup>(16,17)</sup>. For the isolation and purification of the omp48 released to the culture medium, the organism was cultivated at 32 °C in a 20-L, polypropylene bottle containing Luria Bertani's broth with constant aeration until the culture reached the plateau phase (approximately 30 h). Cells were removed by centrifugation at 5,000 xg. The omp48 was isolated from culture supernatant by precipitation with ammonium sulfate (60 to 80 % saturation) then purified by affinity chromatography in a mucin-Sepharose column (Pharmacia) previously equilibrated with 0.015 M phosphate buffer (pH: 7.2) containing 0.15M NaCl. The omp48 was then eluted using 1M NaCl and dialyzed against 0.01M ammonium bicarbonate. SDS-PAGE electrophoresis and Western transfer analyses of the purified material showed both a major 48 kDa protein and a minor 38 kDa protein, the latter also recognizing peroxidase-labeled mucin. The material purified by passive elution in LPS-free polyacrylamide gel was freeze-dried and stored at 4 °C until used (Ascencio *et al*, unpublished data).

The omp48-rich fraction was covalently coupled to a cholera toxin B (CTB) subunit in order to enhance the mucosal IgA immune response. The omp48+CTB was coupled to N-succinimidyl-(3-[2-pyridyl]-dithio) propionate (SPDP) at an equimolar ratio (1:30 omp48 and 1:10 CTB), as per manufacturer's (Boehringer Mannheim Biochemicals, Mannheim, Germany) directions. The preparations were gel-filtered in order to remove the free SPDP, using Sephadex G25 columns (Pharmacia). The omp48 derivative was reduced with 1 mM dithiothreitol in a 0.1 M sodium acetate - 0.1 M NaCl buffer (pH 4.5). The resulting omp48 preparation was incubated for 16 h at 22 °C in the presence of the CTB derivative in equimolar proportions. This facilitates the coupling between both molecules (~ 90 % coupling). After incubation, the mixture was dialyzed against PBS. The resulting

omp48 se redujo con ditioneitol 1 mM en buffer de acetato de sodio 0.1 M-NaCl 0.1 M (pH 4.5). La preparación resultante de omp48 se incubó por 16 h a 22 °C en presencia del derivado de la CTB en proporciones equimolares, que favorece el acoplamiento entre las dos moléculas (~90 % de acoplamiento). Posteriormente a la incubación, la mezcla fue dializada contra PBS. El conjugado resultante omp48-CTB se evaluó tanto por su capacidad de reconocimiento del gangliósido GM1 como por la actividad de unión a inmunoglobulinas, lactoferrina, mucina y colágeno. Estas actividades se evaluaron mediante ELISA empleando GM1 como sistema de captura de la fase sólida, así como inmunoglobulinas, lactoferrina, mucina y colágeno marcados con peroxidasa (POD), como sondas. Otras preparaciones evaluadas fueron (i) una mezcla de omp48, covalentemente acoplada a la CTB y CTB libre (omp48-CTB+CTB); (ii) una mezcla de omp48, covalentemente acoplada a la CTB y toxina del cólera (CT) libre, (omp48-CTB+CT); (iii) una mezcla de omp48, covalentemente acoplada a albúmina sérica bovina, y CT libre (omp48-BSA+CT); (iv) una mezcla de omp48 y CT, y (v) omp48 sola. Como testigo también se incluyó un grupo de animales que recibieron solamente buffer de bicarbonato de sodio; así mismo grupos testigo con CT y/o CTB solamente, cuyas lecturas fueron sustraídas de las obtenidas de las preparaciones correspondientes.

Para cada preparado de inmunógeno se emplearon grupos de 10 conejos hembras, cepa Nueva Zelanda de dos meses de edad con un peso promedio de  $2.3 \pm 0.4$  Kg. Estos fueron inmunizados con las preparaciones de los inmunógenos de *A. veronii*-omp48 diluidas en  $\text{NaHCO}_3$  0.35 M, a una concentración final de 150  $\mu\text{g/ml}$ . Los grupos de prueba, recibieron intragástricamente, 150  $\mu\text{g}$  por animal, realizándose las inmunizaciones a los días 0, 10 y 20. Diez días después de cada inmunización, 10 conejos inmunizados con cada inmunógeno y 10 conejos no inmunizados se sacrificaron y se tomaron muestras de sangre, intestino delgado y bazo, para cuantificar el número de células productoras de anticuerpo (CPA) específicas y no específicas mediante una técnica de inmunoabsorción antigénica acoplado a enzimas (ELISPOT). Paralelamente,

omp48-CTB conjugate was evaluated for both its ability to recognize the GM1 ganglioside and its activity to bind immunoglobulins, lactoferrin, mucin, and collagen. These activities were evaluated by an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) using GM1 as the solid phase capture system, and peroxidase (POD)-labeled immunoglobulins, lactoferrin, mucin, and collagen as probes. Other preparations evaluated included (i) a mix of omp48 covalently coupled to CTB and free CTB (omp48-CTB+CTB); (ii) a mixture of omp48 covalently coupled to CTB and free cholera toxin (CT) (omp48-CTB+CT); (iii) a mixture of omp48 covalently coupled to bovine serum albumin (BSA), and free CT (omp48-BSA+CT); (iv) a mixture of omp48 and CT; and (v) omp48 alone. A group of animals receiving only sodium bicarbonate buffer, a group receiving only CT, and a group receiving only CTB were also included as controls. The readings from these control groups were subtracted from those obtained in the groups receiving the corresponding preparations.

For each immunogenic preparation, a group of 10 New Zealand strain, 2-mo-old, female rabbits with an average body weight of  $2.3 \pm 0.4$  kg was used. Rabbits were immunized with *A. veronii* omp48 immunogen preparations diluted in 0.35M  $\text{NaHCO}_3$  at a final concentration of 150  $\mu\text{g/mL}$ . Test groups received intragastrically 150  $\mu\text{g/animal}$ . Immunizations were performed on d 0, 10, and 20. Ten (10) days after each immunization, 10 rabbits immunized with each immunogen and 10 non-immunized rabbits were killed. Blood, small intestine, and spleen samples were collected in order to enumerate both specific and non-specific APCs using an enzyme-coupled antigen immunosorbent (ELISPOT) technique. Serum, bile, and intestine mucus samples were also collected in parallel, in order to determine omp48 antibody levels (IgG, IgM, IgA, and secretory immunoglobulins) using the ELISA technique. The animals were sedated with chloroform then killed by cervical dislocation. After abdominal dissection, bile was collected directly from the gall bladder using a 27-gauge needle. Bile collections were immediately placed on ice then processed. Ten (10) cm duodenum sections were surgically collected then internally

muestras de suero, bilis y moco intestinal se recolectaron y se determinaron, por ELISA, los niveles de anticuerpos (IgG, IgM, IgA e inmunoglobulinas secretorias) contra omp48. Los animales fueron sedados con cloroformo y sacrificados mediante dislocación cervical. Mediante disección abdominal se obtuvo la bilis de la vesícula biliar con una aguja número 27, colocándose inmediatamente en hielo y procesada. Así mismo se removieron quirúrgicamente segmentos de 10 cm del duodeno y lavados interiormente con 10 ml de PBS frío. El segmento intestinal fue abierto longitudinalmente y se removió el moco utilizando un raspador de células. Los linfocitos intestinales fueron aislados por disgregación enzimática con dispasa<sup>(18)</sup>, mientras que los linfocitos de sangre periférica se aislaron por centrifugación con gradiente isopícnico estándar en Histopaque 1177 (Sigma Co., St. Louis MO) como se establece por el fabricante. Las células aisladas fueron lavadas, y suspendidas en medio de Iscove suplementado con suero fetal de bovino 5 % (medio completo). Las suspensiones celulares también fueron obtenidas del bazo mediante ruptura suave del tejido a través de una malla de acero estéril y purificadas como se ha descrito previamente<sup>(18)</sup>. La viabilidad celular, determinada por exclusión con azul de tripano, fue del 80 al 90 % para el bazo, células linfoides intestinales y linfocitos periféricos. Las células productoras de anticuerpo se cuantificaron por ELISPOT<sup>(19)</sup>. Los pozos de las microplacas de ELISA se recubrieron con omp48 (10 µg en 100 µl por pozo) y bloqueados con albúmina sérica bovina (BSA) al 3% en PBS. Las proteínas no adsorbidas fueron removidas con tres lavados con PBS que contenía Tween-20 0.1 % v/v, se añadieron 200 µl de medio completo a los pozos e incubados a 37 °C por 30 min. Los contenidos de los pozos fueron reemplazados con 100 µl de medio completo que contenía cantidades distintas de células linfoides. Para cada determinación se utilizaron tres repeticiones, analizándose por triplicado cada una de ellas. Después de lavar con PBS-Tween 20, se añadieron 100 µl de PBS-Tween 20 que contenía FCS 1% y anticuerpos porcinos contra IgA, IgG e IgM de conejo, conjugados con fosfatasa alcalina (FA). Las placas se incubaron por 90 min a 37 °C. Después de lavar con PBS-Tween, 100 µl de

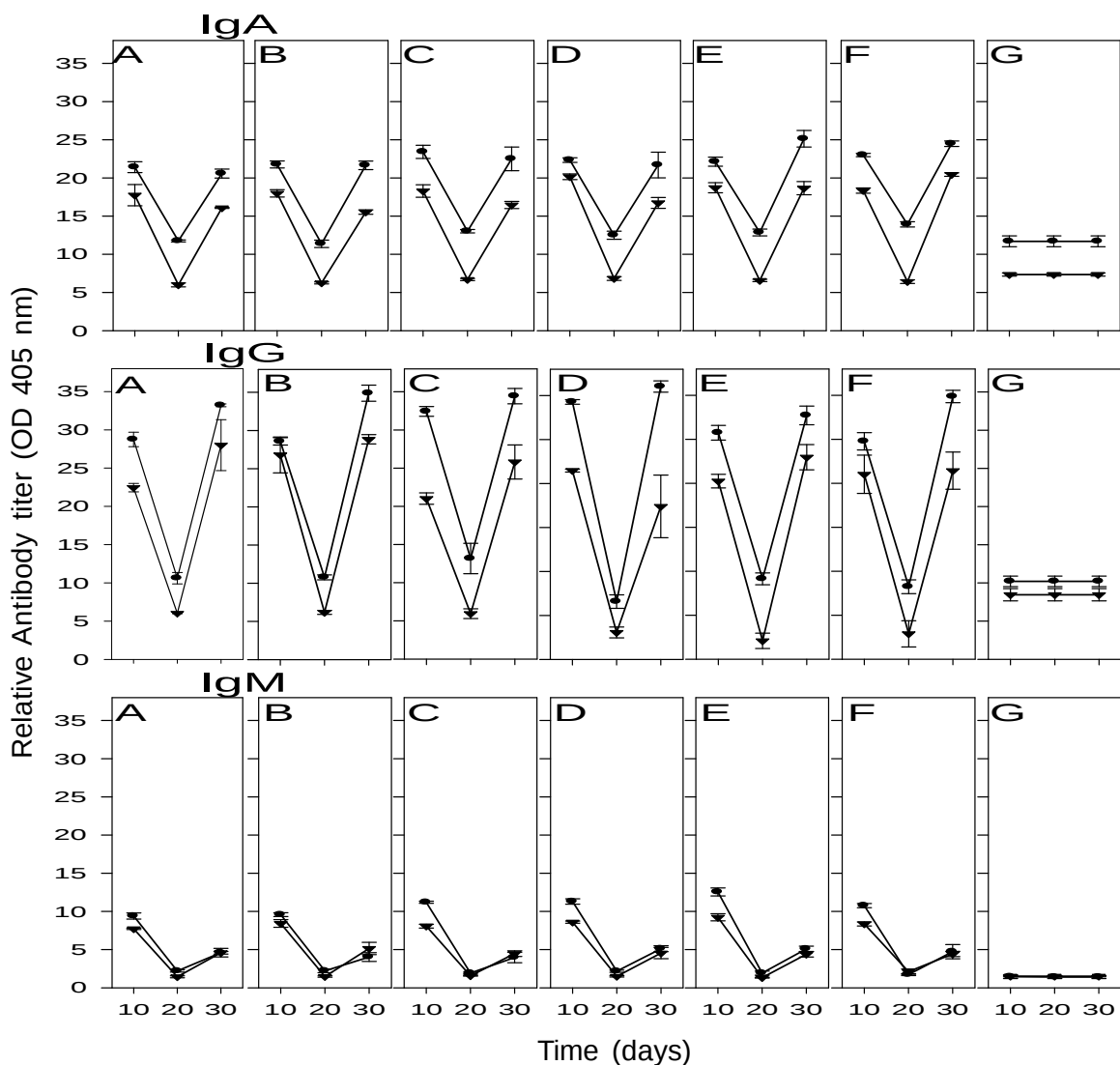
washed with 10 ml cold PBS. Intestinal segments were longitudinally open and mucus was removed using a cell scraper. Intestinal lymphocytes were isolated using dispase<sup>(18)</sup> enzyme disaggregation. Peripheral blood lymphocytes were isolated by standard isopícnico gradient centrifugation in Histopaque 1177 (Sigma Co., St. Louis MO), as stated by the manufacturer. The isolated cells were washed and suspended in Iscove's medium supplemented with 5% fetal bovine serum (whole medium). Cell suspensions were also collected from the spleen by gentle tissue rupture through a sterile stainless steel screen then purified as described elsewhere<sup>(18)</sup>. Cell livability, as determined by the trypan blue exclusion was 80 to 90 % for spleen, intestinal lymphoid cells, and peripheral lymphocytes. APC were quantified using ELISPOT<sup>(19)</sup>. ELISA microplate wells were coated with omp48 (10 µg in 100 µL per well) and blocked with 3% BSA in PBS. Non-adsorbed proteins were removed by three washings with PBS containing 0.1% Tween-20 (v/v). Two hundred (200) µL whole medium were added to the wells then incubated at 37 °C for 30 min. Well contents were replaced by 100 µL whole medium containing different amounts of lymphoid cells. For each determination, three repetitions were used, each of which was analyzed in triplicate. After the PBS-Tween 20 wash, 100 µL PBS-Tween 20 containing 1% fetal calf serum (FCS) and anti-rabbit IgA, IgG, and IgM swine antibodies conjugated with alkaline phosphatase (AP) were added. Plates were incubated for 90 min at 37 °C. After a PBS-Tween 20 wash, 100 µL of a 5-bromo-4-chloro-3-indolylphosphate p-toluidine (0.15 mg/ml) solution were added to each well, and incubated for 20 min at 22 °C. Once this time was elapsed, wells were washed with water, dried off, and examined under the microscope at low magnification (40x) for the presence of blue spots. On the other hand, intestine mucosal secretions from the sacrificed rabbits were collected using standard procedures. The mucus was diluted 1:5 with 0.1M TRIS buffer containing 10 mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF) then centrifuged in order to remove the particulate matter. The secreted immunoglobulins were quantified as follows: the 96-well polyvinyl ELISA microplates were coated with omp48 (10 µg in 100

una solución de 5-bromo-4-cloro-3-indolilfosfato p-toluidina (0.15 mg/ml) se agregaron a cada pozo, e incubados por 20 min a 22 °C. Después de este tiempo, los pozos se lavaron con agua, y después de secarlos se examinaron por microscopía de bajo

μL per well) and blocked with 3% BSA in PBS. One hundred (100) μL mucosal secretions, bile, and serum (1:5 with 0.1M TRIS buffer) were added, in triplicate, and then incubated at 37 °C for 90 min. After washing, the AP-conjugated anti-rabbit

Figura 1. Respuesta inmune humoral en bilis (—●—) y moco intestinal (—▼—) de conejos intragástricamente inmunizados con las preparaciones omp-48-inmunógeno definidas en el texto

Figure 1. Humoral immune response in the bile (—●—) and intestinal mucus (—▼—) of rabbits intragastrically immunized with the omp48 immunogen preparations defined in the text



A) omp48-CTB, B) omp48-CTB+CT, C) omp48-CTB+CTB, D) omp48-BSA+CT, E) omp48, F) omp48+CT, and G) Buffer. Symbols show the average optical density (OD) at 405 nm of 10-rabbit groups as well as one standard error of the mean  $P<0.01$ .

aumento (40x) para determinar la presencia de manchas azules. Por otro lado, las secreciones de la mucosa intestinal de los conejos sacrificados se recolectaron mediante procedimientos estándares. El moco, diluido 1:5 con buffer TRIS 0.1 M conteniendo fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF) 10 mM, se centrifugó para remover la materia particulada, y se cuantificaron las inmunoglobulinas secretadas, como se describe a continuación: las microplacas de ELISA de polivinilo de 96 pozos se cubrieron con omp48 (10  $\mu$ g en 100  $\mu$ l por pozo) y bloqueados con BSA 3% en PBS. Posteriormente se agregaron, por triplicado, 100  $\mu$ l de secreciones de mucosa, así como de bilis y suero (1:5 con buffer TRIS 0.1 M) y se incubaron a 37 °C por 90 min. Después de lavar, se agregaron los anticuerpos porcinos anti-IgG, IgM e IgA de conejo, conjugados a fosfatasa alcalina, incubando las placas a 37 °C por 90 min. Después de lavar, se agregaron a cada pozo 100  $\mu$ l de una solución (1 mg/ml) del sustrato p-nitrofenil fosfato en buffer dietanolamina al 10 %, y las placas se leyeron a 405 nm después de incubar a 22 °C por 20 min. Los niveles de anticuerpos son expresados como unidades de densidad óptica (a 405 nm) por factor de dilución. Los resultados se expresan como los promedios  $\pm$  errores estándar. Las diferencias entre los grupos se evaluaron empleando la prueba t de Student de dos colas. Las diferencias en las variaciones entre organismos inmunizados y sus correspondientes no inmunizados se evaluaron por la prueba F. Las diferencias entre todos los grupos fueron comparados con la prueba multifactorial ANOVA<sup>(18,19)</sup>. Las mediciones entre los grupos inmunizados fueron consideradas significativas a una probabilidad de  $P < 0.01$ .

La inoculación con los diferentes preparados de omp48, indujo una respuesta inmune y, como se esperaba, los animales testigos no mostraron respuesta (Figura 1). Dentro de los grupos experimentales, no se observó diferencia alguna en la respuesta por IgA después de las dos primeras inmunizaciones. Por otro lado, al final del período de inmunización, se pudo detectar una respuesta significativa ( $P < 0.01$ ) en el nivel de IgA en mucosa con el inmunógeno omp48+CT (Figura 1 IgA, panel F). Respecto a la respuesta por IgA en bilis,

IgG, IgM and IgA swine antibodies were added and the plates were incubated at 37 °C for 90 min. After washing, 100  $\mu$ L of the 10% p-nitrophenylphosphate (PNPP) in a diethanolamine buffer solution (1 mg/mL) were added, and the plates were read at 405 nm after incubation at 22 °C for 20 min. Antibody levels are expressed as optic density (OD) units at 405 nm times the dilution factor. Results are expressed as averages  $\pm$  standard errors. The differences among groups were evaluated using a two-tailed Student's T test. Variation differences between the immunized rabbits and their non-immunized counterparts were evaluated using the F test. The differences among all groups were compared using multifactorial ANOVA<sup>(18,19)</sup>. Measurements among immunized groups were considered significant at a  $P < 0.01$  probability level.

Inoculation with the various omp48 preparations induced an immune response while, as expected, no response was seen in the controls (Figure 1). Among the experimental groups no difference was observed whatsoever in the IgA response after the two first immunizations. On the other hand, at immunization period completion, a significant ( $P < 0.01$ ) response was observed in the mucosal IgA level with the omp48+CT immunogen (Figure 1 IgA, panel F). As far as the IgA response in bile is concerned, the antibody titer was significantly higher than that in the mucosa, including the production of antibodies of the IgG isotype. Similar to the first case, no significant difference was observed among the immunogens tested.

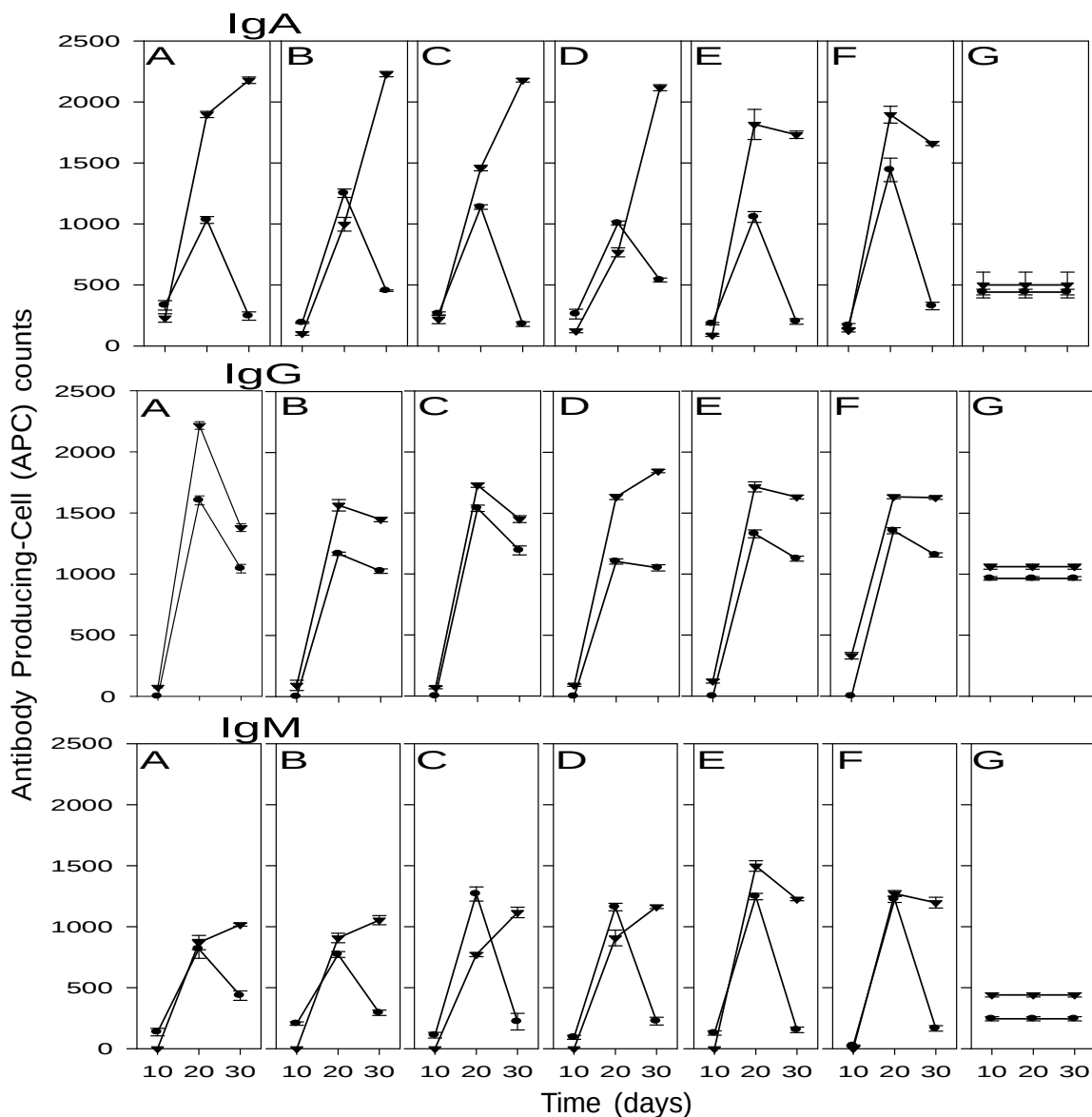
The APC profile showed a different trend (Figure 2). Even though the response to the first immunization was similar among all the immunogens evaluated, after the second immunization, counts were significantly higher in the immunized rabbits, as compared to the controls. The intragastric administration of the omp48-CTB immunogen, induced increased APC counts, which were significantly higher than those obtained with all other immunogens after the second immunization with the same immunogen, for both mucosal IgG and IgA. Nevertheless, the IgG response elicited at 30 d by both omp48 and omp48+CT was higher

el título de anticuerpos fue significativamente mayor al observado en la mucosa, incluyendo la producción de anticuerpos del isotipo IgG. Como en el primer caso, no se detectó diferencia significativa entre los inmunógenos probados.

than that induced by omp48-CTB. When the different immunogen preparations were used the primary immune response, as revealed by the ALISA results, was significantly higher ( $P < 0.01$ ) than that in the controls. Nevertheless, the

Figura 2. Resultados de ELISPOT señalando las cuentas de CPA en bazo (—●—) e intestino (—▼—) de conejos inmunizados intragástricamente

Figure 2. ELISPOT results showing the APC counts in the spleen (—●—) and the intestine (—▼—) in intragastrically-immunized rabbits



Treatments are described in Figure 1. Symbols show the average optical density (OD) at 405 nm of 10-rabbit groups as well as one standard error of the mean  $P < 0.01$

El perfil de las células productoras de anticuerpos (CPA) demostró una tendencia distinta (Figura 2). Aunque la respuesta a la inmunización inicial fue similar entre los inmunógenos evaluados, después de la segunda inmunización las cuentas fueron significativamente superiores en los conejos inmunizados, en comparación con el grupo testigo. La administración intragástrica del inmunógeno omp48-CTB indujo un incremento en las cuentas de CPA que fue significativamente superior al resto de los inmunógenos a partir de la segunda inmunización con el mismo inmunógeno, tanto para IgG como IgA en mucosa; sin embargo, la respuesta de IgG inducida a los 30 días por omp48 y omp48+CT fue superior a la inducida por omp48-CTB. Al emplear las distintas preparaciones de los inmunógenos, la respuesta inmune primaria, como se reveló por los resultados de ELISA, fue significativa ( $P < 0.01$ ) al compararla con el grupo testigo; sin embargo, los resultados de ELISPOT mostraron incremento similar al del grupo testigo (Figura 2). Después del primer refuerzo, los niveles de anticuerpos disminuyeron significativamente al compararse con los de la primera respuesta, pero la estimulación de las CPA alcanzó su valor más elevado, que fue significativamente influida por el inmunógeno omp48-CTB, estimulando la generación de CPA en la mucosa intestinal. El segundo refuerzo resultó en un número de CPA similar para todos los inmunógenos probados al compararse con la respuesta inicial, con mayores cuentas de células productoras de IgA en bazo.

Los títulos de anticuerpos fueron, de nuevo, significativamente distintos (Figura 1), siendo la IgG sérica la más predominante en comparación con el grupo testigo. La respuesta principal fue observada en las inmunoglobulinas séricas, determinadas por ELISA (Figura 3). Los análisis por ELISPOT de los distintos tejidos también mostraron una elevación del número de células productoras de anticuerpo (Figura 2). Posterior al primer refuerzo, hubo una elevación significativa ( $P < 0.01$ ) de las células productoras de IgG en suero, demostrando una fuerte afinidad hacia la omp48, que se mantuvo a lo largo del esquema de inmunización con el inmunógeno omp48-CTB. El principal isotipo de inmunoglobulina inducido por

ELISPOT results showed a similar increase in the control group (Figure 2). After the first booster, antibody levels decreased significantly when compared with those from the first response, but APC stimulation peaked reaching its maximum level, and this was significantly impacted by the omp48-CTB immunogen, by stimulating the generation of APC in the intestinal mucosa. The second booster resulted in similar numbers of APC for all the immunogens tested when compared to the initial response, with higher IgA-producing cells in the spleen.

Once again, antibody titers were significantly different (Figure 1), serum IgG prevailing, when compared with the control. The main response was observed in the serum immunoglobulins determined by ELISA (Figure 3). ELISPOT analyses of the same tissues also showed increased numbers of APC (Figure 2). After the first booster, a significant ( $P < 0.01$ ) increase in serum IgG-producing cells was observed, showing a strong affinity to omp48, which was maintained throughout the immunization program with the omp48-CTB immunogen. The main immunoglobulin isotype induced by the immunization protocol was the IgG found in the serum of immunized rabbits (Figure 3). After the primary immunization, this increase was similar for all preparations, all of which were significantly different from the control. The IgA isotype was also significantly increased in serum, and it was also higher in the bile and mucosal secretions as compared to the controls (Figure 1). Likewise, APC counts were also significantly increased, mostly for the IgG isotype (Figures 2, 3). IgA-producing cell counts were also positively impacted by immunization.

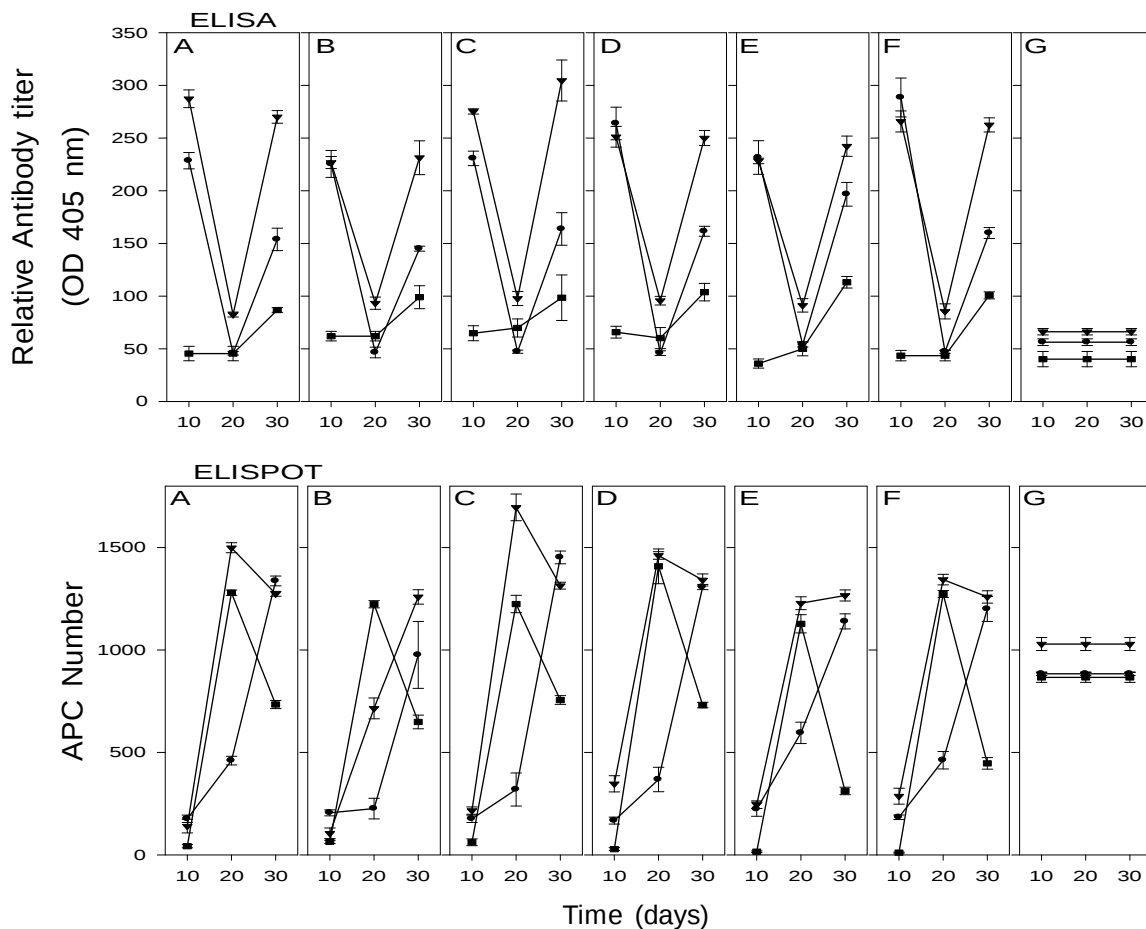
Towards the end of the immunization protocol, an increase in the IgG isotype response was also observed, as the main immunoglobulin stimulated, particularly in the serum (Figure 3). Similarly, the responses in both bile and mucus were significantly increased (Figure 1). IgA was similarly affected by all preparations in all the tissues studied. The highest level of IgG was found in the serum of the immunized rabbits. The immune response induced by the administration of omp48-CTB resulted in antibody

el protocolo de inmunización fue la IgG encontrada en el suero de conejos inmunizados (Figura 3). Después de la primera inmunización, este incremento fue similar en todas las preparaciones, todas ellas significativamente diferentes al grupo testigo. El isotipo IgA también se incrementó significativamente en el suero, y también fue mayor en bilis y secreciones de mucosas al compararse con el testigo (Figura 1). De igual forma, se incrementaron significativamente las cuentas de CPA, principalmente del isotipo IgG (Figuras 2,

production, as observed by the correlation of specific antibodies in the tissues ( $P < 0.05$ ,  $r > 0.9$ ). For example, after the primary immunization a positive correlation existed between intestinal IGA-producing cells and IgA/IgG titers in the mucus (Table 1). These responses can be highly beneficial for the host, since they can reinforce the immune response in the mucosa, the site for *A. veronii* colonization. It is worthy to underscore that a negative correlation was observed between intestinal IgA-producing cells and serum IgA titers.

Figura 3. Resultados de ELISA y ELISPOT sobre la respuesta inmune sistémica en sangre de conejos intragástricamente inmunizados con las preparaciones

Figure 3. ELISA and ELISPOT results of the blood systemic immune response in rabbits intragastrically immunized with the preparations



Treatments are described in Figure 1. Symbols show the average optical density (OD) at 405 nm of 10-rabbit groups as well as one standard error of the mean  $P < 0.01$ .

IgA —●—; IgG —▼—; and IgM —■— ( $P < 0.01$ )

3). También se afectaron de forma positiva por la inmunización las cuentas de células productoras de IgA. Hacia el final del protocolo de inmunización, también se observó un incremento en la respuesta del isotipo IgG como la principal inmunoglobulina estimulada, principalmente a nivel de suero (Figura 3), e igualmente la respuesta en bilis y moco se incrementó significativamente (Figura 1). La IgA se encontró afectada de forma similar por las diferentes preparaciones en todos los tejidos estudiados; y respecto a la IgG, el nivel más alto se encontró en el suero de los conejos inmunizados.

La respuesta inmune inducida por la administración de omp48-CTB indujo una producción de anticuerpo, observada por la correlación de los anticuerpos tejido-específicos ( $P < 0.05$ ,  $r > 0.9$ ). Por ejemplo, después de la primera inmunización, existe correlación positiva entre las células productoras de IgA intestinal, y los títulos de IgA e IgG en moco (Cuadro 1), respuestas que pueden ser de mucho beneficio para el huésped, fortaleciendo de esta forma, la respuesta inmune a nivel de mucosa, sitio de colonización por *A. veronii*. Algo interesante de resaltar fue que se encontró una correlación negativa entre las células productoras de IgA intestinal y los títulos de IgA sérico.

Con el primer refuerzo, el efecto del inmunógeno sobre la interacción entre las CPA y las respuestas de anticuerpo secretor disminuyó y no se observó un impacto significativo. Después del segundo refuerzo, aparecieron interacciones entre el número de células productoras de IgA e IgG de moco ( $r = 0.9922$ ), así como entre las células productoras de IgG intestinal e IgA biliar ( $r = 0.9895$ ). Estas respuestas pueden conferir protección del huésped contra la presencia de omp48, y, por lo tanto, actuar contra infecciones asociadas a *A. veronii*. La presencia de CPA de los isotipos IgA e IgG en el bazo de animales inmunizados, pudieran también conferir la habilidad de reaccionar contra futuras exposiciones a este patógeno.

Aun cuando la inducción de una respuesta inmune sistémica es útil en la prevención o limitación de manifestaciones extraintestinales de infecciones por

Cuadro 1. Análisis de correlación del principal agente inmunoestimulador (omp48-CTB), considerando las cuentas de células productoras de anticuerpo y niveles de anticuerpo (OD 405 nm).  $P < 0.05$

Table 1. Correlation analysis of the main immunostimulating agent (omp48-CTB), considering both antibody-producing cell counts and antibody levels (OD 405 nm).  $P < 0.05$

| Immunization | APC (ELISPOT) /<br>Ig (ELISA) | Correlation<br>coefficient (r) |
|--------------|-------------------------------|--------------------------------|
| First        | IgG Blood / IgG Mucosa        | -0.9753                        |
|              | IgA Intestinal / IgA Mucosa   | 0.9988                         |
|              | IgA Intestinal / IgG Mucosa   | 0.9691                         |
|              | IgA Intestinal / IgA Serum    | -0.9996                        |
|              | IgA Intestinal / IgM Sserum   | 0.9598                         |
|              | IgM Spleen / IgA Mucosa       | 0.9721                         |
|              | IgM Spleen/ IgA Serum         | -0.9845                        |
| Second       | IgA Intestinal / IgM Mucosa   | -0.9751                        |
|              | IgA Spleen / IgG Bile         | -0.9848                        |
|              | IgM Spleen / IgG Bile         | -0.9952                        |
| Third        | IgM Blood / IgG Mucosa        | -0.9776                        |
|              | IgA Intestinal / IgG Mucosa   | 0.9922                         |
|              | IgG Intestinal / IgA Bile     | 0.9895                         |
|              | IgM Intestinal / IgM Serum    | -0.9567                        |
|              | IgA Spleen / IgA Serum        | -0.9814                        |
|              | IgG Spleen / IgG Mucosa       | 0.9573                         |
|              | IgM Spleen / IgG Mucosa       | -0.9661                        |

After the first booster, the effect of the immunogen on the APC/secretory antibody response interaction was decreased, and no significant impact was observed. After the second booster, interactions appeared between the number of IgA-producing cells and mucus IgG ( $r = 0.9922$ ), and the same is valid among intestinal IgG-producing cells and bile IgA ( $r = 0.9895$ ). These responses can protect the host against the presence of omp48 and, therefore, work against *A. veronii*-associated infections. The presence of APC of the IgA and IgG isotypes in the spleen of the immunized animals can also confer the ability to react against future exposures to this pathogen.

Even though inducing a systemic immune response is useful for the prevention/limitation of extraintestinal

*Aeromonas*, la generación de una respuesta inmune efectiva a nivel de mucosas en la superficie intestinal pudiera ser crucial para prevenir la adhesión bacteriana y posiblemente limitar o impedir las infecciones por *Aeromonas* tanto intestinales como extraintestinales.

Este estudio demostró que se puede inducir una immunoestimulación significativa mediante la administración intragástrica de omp48 de *A. veronii*. La administración intragástrica de pequeñas cantidades (150  $\mu$ g) de omp48 induce la producción de anticuerpos IgA, IgG e IgM específicos en mucosas, en bilis y sistémicos de conejos. Los conejos inmunizados intragástricamente con 150  $\mu$ g de omp48 produjeron un elevado número de células productoras de anticuerpos específicas a omp48 en el tejido intestinal al compararse con animales no inmunizados. El mismo tipo de análisis en sangre y linfocitos de bazo mostró resultados similares en cuanto a la distribución de isotipos de anticuerpos anti-omp48; sin embargo, el número de células productoras de anticuerpo en la mucosa fue mayor. El análisis por ELISA de suero, bilis y moco intestinal obtenidos de conejos inmunizados intragástricamente indicó niveles elevados de IgA e IgG circulantes, pero no de IgM específicos contra omp48.

Después de la primera inmunización, los inmunógenos formados por los complejos omp48-CTB y omp48-CTB+CTB estimularon niveles significativamente elevados de IgG e IgA específicos a omp48 en suero y, en un nivel menor, en bilis y moco intestinal, al compararse con la inmunización con omp48 solo. Estos niveles de anticuerpos séricos inducidos por los inmunógenos complejos pueden proporcionar una segunda línea de defensa contra infecciones por la familia *Vibrionaceae* que hubieran atravesado la barrera de la mucosa intestinal<sup>(9,19)</sup>. Por otro lado, se pudo observar una respuesta general significativa en conejos intragástricamente inmunizados con el inmunógeno omp48-CT, sin embargo la administración de tal adyuvante ha sido relacionada anteriormente con daño tisular y procesos necróticos<sup>(20)</sup>, razón por la cual no se considera como candidato.

manifestations of *Aeromonas* infections, the generation of an effective mucosal immune response in the intestinal surface can be crucial to prevent bacterial adhesion and possibly limit or even prevent *Aeromonas* infections both at intestinal and extraintestinal levels. This study demonstrated that a significant immune stimulation can be induced by the intragastric administration of *A. veronii* omp48. The intragastric administration of small amounts (150  $\mu$ g) of omp48 induces the production of specific IgA, IgG, and IgM antibodies in the mucosa, bile, and serum (i.e. systemic) of rabbits. The rabbits immunized intragastrically with 150  $\mu$ g omp48 produced a high number of omp48-specific APC in the intestinal tissue, when compared with the non-immunized controls. The same type of analysis in blood and spleen lymphocytes showed similar results regarding the distribution of omp48 antibody isotypes. Nevertheless, the number of APC in the mucosa was higher. The ELISA analysis of serum, bile, and intestinal mucus samples from intragastrically-immunized rabbits showed high levels of circulating omp48-specific IgA and IgG, but not IgM.

After the first immunization both the omp48-CTB and the omp48-CTB+CTB-based immunogens stimulated significantly high levels of omp48-specific IgG and IgA in the serum, and lower levels in the bile and the intestinal mucus, when compared to the immunization with omp48 alone. These serum antibody levels induced by the complex immunogens can serve as a second line of defense against infections caused by members of the bacterial *Vibrionaceae* family that might have crossed the intestinal mucosa barrier<sup>(9,19)</sup>. On the other hand, a significant general response was observed in the rabbits immunized intragastrically with the omp48-CT immunogen, but the administration of such adjuvant has previously been related with tissue damage and necrotic processes<sup>(20)</sup>, so that it has been ruled out as a candidate.

Apparently, homologous immune response kinetics occurred in the serum and intestinal secretions. The omp48-specific IgA responses in the bile, intestinal mucus and serum become evident >10 d after the first intragastric immunization. Omp48-

Al parecer ocurrieron cinéticas homólogas de la respuesta inmune en suero y secreciones intestinales. Las respuestas de IgA anti-omp48 en bilis, moco intestinal y suero se hacen evidentes después de 10 días posteriores a la primera inmunización intragástrica. Las respuestas de anticuerpo IgG anti-omp48 no aparecieron en suero con la primera inmunización, alcanzando niveles elevados después del tercer refuerzo manteniéndose más elevados que los anticuerpos IgA anti-omp48.

Se han estudiado ampliamente los mecanismos para la inducción de respuestas IgA intestinales asociadas a inmunizaciones intragástricas<sup>(20,21,22)</sup>. Por lo general, la estimulación de los tejidos linfoides de las mucosas (por ejemplo células M cubiertas de folículos linfoides) puede resultar en la diseminación y reclutamiento de células linfoides a remotos sitios efectores en mucosas. Sin embargo, se observan las diferencias en la respuesta inmune de mucosa dependiendo del antígeno, adyuvante, y la especie animal. Prueba del origen de los anticuerpos anti-omp48 en suero y el tracto gastrointestinal fue proporcionada por los análisis ELISPOT. Por ejemplo, sólo se encontraron CPA del tipo IgA contra omp48 en el intestino de un conejo al que se le dio intragástricamente omp48. La presencia de números elevados de IgG anti-omp48, después del primer refuerzo, en el bazo de conejos intragástricamente inmunizados con omp48-CTB y omp48-CTB+CTB apoyaron más la hipótesis de que los anticuerpos de IgG séricos son derivados del tejido linfóide periférico, como lo es el bazo. Respuestas inmunológicas similares han sido reportadas en ratones intragástricamente inmunizados con el toxoide tetánico, con la toxina del cólera como adyuvante<sup>(18)</sup>. Debido a que la expresión de adhesinas extracelulares con afinidad hacia mucinas u otros constituyentes de mucosas es una propiedad común en especies de *Aeromonas* y otras *Vibrionaceae*<sup>(23)</sup>, estamos ahora evaluando si las respuestas inmunes inducidas por la estrategia de inmunización descrita en este artículo protege contra infecciones de *A. veronii* y otras *Vibrionaceae*, en mamíferos, tal como lo hemos realizado en peces experimentalmente infectados, encontrando no sólo una respuesta inmune significativa, sino una acción protectora de la

specific IgG responses did not appear in the serum after the first immunization, but they reached high levels after the 3rd booster, and remained higher than omp48-specific IgA.

The mechanisms for the induction of intestinal IgA associated with intragastric immunizations have been broadly studied<sup>(20,21,22)</sup>. Typically, stimulation of mucosa-associated lymphoid tissues (i.e., lymphoid follicle-associated M cells) can result in the spread and recruitment of lymphoid cells at remote mucosal effector sites. Nevertheless, differences are observed in the mucosal immune response depending on the antigen, the adjuvant, and the animal species. Proof of the origin of the omp48 antibodies in the serum and the GI tract was given by the ELISPOT tests. For example, omp48 APC of the IgA type were only found in the intestine of one rabbit receiving the omp48 intragastrically. The presence of high omp48 IgG levels after the first booster in the spleen of rabbits intragastrically immunized with omp48-CTB and omp48-CTB+CTB further supported the hypothesis that serum IgG antibodies derive from the peripheral lymphoid tissue (i.e., spleen). Similar immune responses have been reported in mice intragastrically immunized with the tetanus toxoid, using the cholera toxin as an adjuvant<sup>(18)</sup>. Given that the expression of extracellular adhesins with affinity for mucins and other mucosal constituents is a common trait of *Aeromonas* species and other *Vibrionaceae*<sup>(23)</sup>, we are currently evaluating whether the immune responses induced by the immunization strategy described in this paper protects against *A. veronii* and other *Vibrionaceae* infections in mammals, as we have previously seen in experimentally-infected fish, where we have found not only a significant immune response, but also a protective action from the response elicited in fish against such *Aeromonas* experimental infections<sup>(24)</sup>.

From all the above, we can conclude that the intragastric administration of the antigen induces a vigorous response both locally and systemically, including IgA, IgG and IgM against *A. veronii* omp48, based on: (i) the number of antibody-producing cells in the GI tract, spleen, and blood; and (ii) high levels of circulating antibodies.

respuesta inducida en peces, contra infecciones experimentales con *Aeromonas*<sup>(24)</sup>.

Por todo lo anterior podemos concluir que la administración intragástrica de microgramos del antígeno induce una respuesta vigorosa, tanto local como sistémica de inmunoglobulinas A, G y M contra la omp48 de *A. veronii* con base en (i) el número de células productoras de anticuerpo en el tracto gastrointestinal, bazo y sangre, y (ii) elevados niveles de anticuerpos circulantes. La estimulación del sistema inmune de mucosa mediante antígenos bacterianos inmunogénicos, puede ser una importante alternativa para el control y prevención de enfermedades asociadas a *Aeromonas*.

## AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue apoyado por Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, CONACyT (39510A/1), la Fundación Internacional de Ciencias, IFS (A/2125), y el Centro de Investigaciones Biológicas (PAC-11). Agradecemos al Dr. Juan Carlos Gálvez Ruiz por la edición del escrito. ERB fue receptor de una beca por parte de CONACyT (59291).

## LITERATURA CITADA

1. Dumontet S, Pasquale V, Mancino M, Normanno G, Krovacek K. Incidence and characterization of *Aeromonas* spp in environmental and human samples in southern Italy. *New Microbiol* 2003;26:215-225.
2. Janda JM, Abbott SL. Evolving concepts regarding the genus *Aeromonas*: an expanding panorama of species, disease presentations, and unanswered questions. *Clin Infect Dis* 1998;19:77-83.
3. Pasquale V, Baloda SB, Dumontet S, Krovacek K. An outbreak of *Aeromonas hydrophila* infection in turtles (*Pseudemys scripta*). *Appl Environ Microbiol* 1994;60:1678-1680.
4. Rahman M, Colque-Navarro P, Jun I, Huys G, Swings J, Mollby R. Identification and characterization of pathogenic *Aeromonas veronii* biovar *sobria* associated with epizootic ulcerative syndrome in fish in Bangladesh. *Appl Environ Microbiol* 2002;68:650-655.
5. Altwegg M, Martinetti Luccini G, Lüthy-Hottenstein J, Rohrbach M. *Aeromonas*-associated gastroenteritis after consumption of contaminated shrimp. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1991;10:44-45.

Stimulation of the mucosal immune system with immunogenic bacterial antigens can be an important alternative for the control and prevention of *Aeromonas*-associated diseases.

## ACKNOWLEDGEMENTS

This research was supported by Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT, Mexico's National Council for Science and Technology) (39510A/1); the International Foundation for Science (IFS) (A/2125); and Centro de Investigaciones Biológicas (Biologic Research Center) (PAC-11). Gratitude is expressed to Dr. Juan Carlos Gálvez Ruiz for the edition of this manuscript. ERB is the recipient of a CONACyT scholarship (59291).

*End of english version*

6. Gracey M, Burke V. Characteristics of *Aeromonas* species and their association with human diarrheal diseases. *J Diarrhoeal Dis Res* 1986;4:70-73.
7. Gonzalez-Serrano CJ, Santos JA, Garcia-Lopez ML, Otero A. Virulence markers in *Aeromonas hydrophila* and *Aeromonas veronii* biovar *sobria* isolates from freshwater fish and from a diarrhoea case. *J Appl Microbiol* 2002;93:414-419.
8. Guimaraes MS, Andrade JR, Freitas-Almeida AC, Ferreira MC. *Aeromonas hydrophila* vacuolating activity in the Caco-2 human enterocyte cell line as a putative virulence factor. *FEMS Microbiol Let* 2002;207:127-131.
9. Merino S, Rubires X, Aguillar A, Guillot JF, Tomas JM. The role of the O-antigen lipopolysaccharide on the colonization in vivo of the germfree chicken gut by *Aeromonas hydrophila* serogroup O:34. *Microb Patog* 1996;20:325-333.
10. Morgan DR, Jonson PC, Dupont HL, Satterwhite K, Wood LV. Lack of correlation between known virulence properties of *Aeromonas hydrophila* and enteropathogenicity for humans. *Infect Immun* 1985;50:62-65.
11. Sanderson K, Ghazali FM, Kirov SM. Colonization of streptomycin-treated mice by *Aeromonas* species. *J Diarrhoeal Dis Res* 1996;14:27-32.
12. Burke V, Robinson J, Berry RJ, Gracey M. Detection of enterotoxins of *Aeromonas hydrophila* by a suckling mouse test. *J Med Microbiol* 1981;14:401-408.
13. Ljung Å, Kronevi T. *Aeromonas hydrophila* toxins- intestinal fluid accumulation and mucosal injury in animal models. *Toxicol* 1982;20:397-407.
14. Pazzaglia G, Sack RB, Bourgeois AL, Froehlich J, Eckstein J. Diarrhea and intestinal invasiveness of *Aeromonas* strains in

- the removable intestinal tie rabbit model. *Infect Immun* 1990;58:1924-1931.
15. Vazquez-Juarez RC, Barrera-Saldana HA, Hernandez-Saavedra NY, Gomez-Chiarry M, Ascencio F. Molecular cloning, sequencing, and characterization of omp48, the gene encoding for an antigenic outer membrane protein from *Aeromonas veronii*. *J Appl Microbiol* 2003;94:908-918.
  16. Ascencio F, Aleljung P, Wadström T. Particle agglutination assay to identify fibronectin and collagen cell surface receptors and lectins in *Aeromonas* and *Vibrio* species. *Appl Environ Microbiol* 1990;56:1926-1931.
  17. Ascencio F, Ljung Å, Wadström T. Characterization of lactoferrin binding by *Aeromonas hydrophila*. *Appl Environ Microbiol* 1992;58:42-47.
  18. Jackson RJ, Fujihashi K, Xu-Amano J, Kiyono H, Elson CO, McGhee JR. Optimizing oral vaccines: Induction of systemic and mucosal B-cell and antibody responses to tetanus toxoid by use of cholera toxin as an adjuvant. *Infect Immun* 1993;61:4272-4279.
  19. Czerkinsky C, Russell MW, Licke N., Lindbald M, Holmgren J. Oral administration of a streptococcal antigen coupled to cholera toxin B subunit evokes strong antibody responses in salivary gland and extramucosal tissues. *Infect Immun* 1989;57:1072-1077.
  20. Lycke N, Holmgren J. Strong adjuvant properties of cholera toxin on gut mucosal immune responses to orally presented antigens. *Immunology* 1986;59:301-308.
  21. Hathaway LJ, Kraehenbuhl JP. The role of M cells in mucosal immunity. *Cell Mol Life Sci* 2000;57:323-332.
  22. Van Ginkel FW, Nguyen HH, McGhee JR. Vaccines for mucosal immunity to combat emergin infectious diseases. *Emerg Infect Dis* 2000;6:123-132.
  23. Ascencio F, Martinez-Arias W, Romero MJ, Wadström T. Analysis of the interaction of *Aeromonas caviae*, *A. hydrophila* and *A. sobria* with mucins. *FEMS Immunol Med Microbiol* 1998;20:219-229.
  24. Merino-Contreras ML, Guzman-Murillo MA, Ruiz-Bustos E, Romero MJ, Cadena-Roa MA, Ascencio F. Mucosal immune response of spotted sand bass *Paralabrax maculatofasciatus* (Steindachner, 1868) orally immunised with an extracellular lectin of *Aeromonas veronii*. *Fish Shellfish Immunol* 2001;11:115-126.

