

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE VETERINARIA
Departamento de Sanidad Animal



**PUESTA A PUNTO DE UNA METODOLOGÍA PARA LA
DETECCIÓN DE COCOS GRAM POSITIVOS
PATÓGENOS DE PECES EN PIENSOS COMPUESTOS Y
MUESTRAS AMBIENTALES: ESTUDIO DE SU
PRESENCIA Y CARACTERIZACIÓN DE
“LACTOCOCCUS GARVIEAE” EN ESTAS MATRICES**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

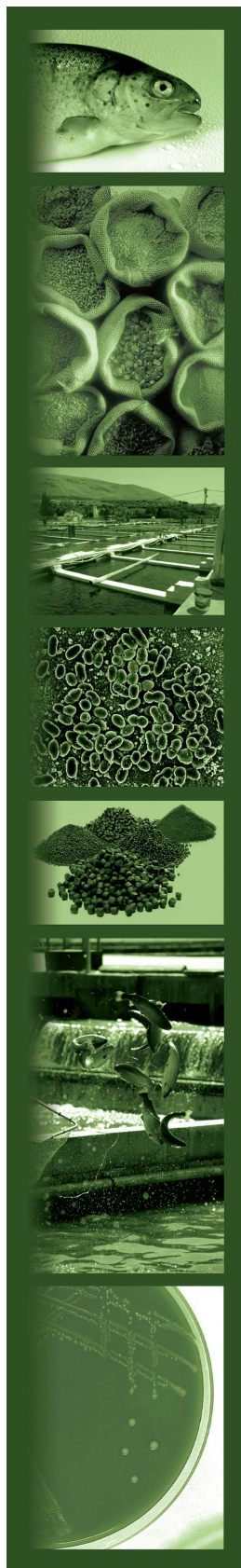
PRESENTADA POR

José Luis Tejedor del Real

Bajo la dirección de los doctores
Lucas Domínguez Rodríguez y José Francisco Fernández-Garayzabal
Férrandez

Madrid, 2009

• **ISBN: 978-84-692-1041-3** © José Luis Tejedor del real, 2008



TESIS DOCTORAL



DEPARTAMENTO DE SANIDAD ANIMAL
FACULTAD DE VETERINARIA
UNIVERSIDAD COMPLUTENSE

PUESTA A PUNTO DE UNA METODOLOGÍA
PARA LA DETECCIÓN DE COCOS
GRAM POSITIVOS PATÓGENOS DE PECES EN
PIENSOS COMPUESTOS Y MUESTRAS AMBIENTALES.
ESTUDIO DE SU PRESENCIA Y CARACTERIZACIÓN
DE *Lactococcus garvieae* EN ESTAS MATRICES.

JOSÉ LUIS TEJEDOR DEL REAL

MADRID 2008

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE VETERINARIA**

DEPARTAMENTO DE SANIDAD ANIMAL



**PUESTA A PUNTO DE UNA METODOLOGÍA
PARA LA DETECCIÓN DE COCOS GRAM
POSITIVOS PATÓGENOS DE PECES EN
PIENSOS COMPUESTOS Y MUESTRAS
AMBIENTALES. ESTUDIO DE SU PRESENCIA
Y CARACTERIZACIÓN DE *Lactococcus garvieae*
EN ESTAS MATRICES**

TESIS DOCTORAL

JOSE LUIS TEJEDOR DEL REAL

MADRID, 2008

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE VETERINARIA**

DEPARTAMENTO DE SANIDAD ANIMAL



**PUESTA A PUNTO DE UNA METODOLOGÍA
PARA LA DETECCIÓN DE COCOS GRAM
POSITIVOS PATÓGENOS DE PECES EN
PIENSOS COMPUESTOS Y MUESTRAS
AMBIENTALES. ESTUDIO DE SU PRESENCIA
Y CARACTERIZACIÓN DE *Lactococcus garvieae*
EN ESTAS MATRICES**

Memoria para optar al título de Doctor, presentada por el Licenciado

José Luis Tejedor del Real

Madrid, febrero de 2008



DEPARTAMENTO DE SANIDAD ANIMAL
FACULTAD DE VETERINARIA
UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
Ciudad Universitaria s/n
28.040. Madrid



LUCAS DOMÍNGUEZ RODRÍGUEZ Y JOSÉ FRANCISCO FERNÁNDEZ-GARAYZÁBAL FERNÁNDEZ, CATEDRÁTICOS DE SANIDAD ANIMAL DE LA FACULTAD DE VETERINARIA DE LA UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID Y ANA ISABEL VELA ALONSO, PROFESORA TITULAR DE SANIDAD ANIMAL DE LA FACULTAD DE VETERINARIA DE LA UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID.

CERTIFICAN:

Que la Tesis Doctoral titulada **“Puesta a punto de una metodología para la detección de cocos Gram positivos patógenos de peces en piensos compuestos y muestras ambientales. Estudio de su presencia y caracterización de *Lactococcus garvieae* en estas matrices”**, de la que es autor el Licenciado en Veterinaria por la Universidad Complutense de Madrid, **D. José Luis Tejedor del Real**, ha sido realizada en el Departamento de Sanidad Animal de la Facultad de Veterinaria de la Universidad Complutense de Madrid, bajo la dirección conjunta de los que suscriben y cumple las condiciones exigidas para optar al título de Doctor.

Madrid, 29 de febrero de 2008

Los Directores de la Tesis Doctoral,

Lucas Domínguez
Rodríguez

José Francisco
Fernández-Garayzábal
Fernández

Ana Isabel Vela
Alonso

A mis padres.

*“La ciencia, a pesar de sus progresos increíbles,
no puede ni podrá nunca explicarlo todo.
Cada vez ganará nuevas zonas a lo que hoy
parece inexplicable.
Pero las rayas fronterizas del saber, por muy
lejos que se eleven, tendrán siempre delante un
infinito mundo de misterio”.*

Gregorio Marañón

AGRADECIMIENTOS

Fin del trayecto y momento de escribir este capítulo tan utópico como ansiado en la fantástica etapa predoctoral que aquí termina. Por ello no quiero desaprovechar la oportunidad de agradecer de corazón a todas aquellas personas que han pasado por mi vida durante estos cinco largos años regalándome experiencias irrepetibles y tremendamente enriquecedoras. Especialmente a todos los que habéis sufrido casi como yo, este final agónico, incierto y de aspecto casi interminable.

En primer lugar me gustaría agradecer muy sinceramente la oportunidad brindada por Lucas Domínguez, que en una mañana de recién licenciado, y como no podía ser de otra manera, muy acertadamente, me cambió mi vocación hacia el ganado porcino por este apasionante mundo del agua y de la acuicultura. Gracias Lucas por el empuje, la colaboración diaria y tus constantes dosis de optimismo en esta Tesis doctoral que han supuesto el motor necesario para llegar a esta anhelada línea de meta. Espero que la colaboración continúe en esta nueva etapa que comienza. Personas como tú, no son fáciles de encontrar.

Igualmente agradecer a mis otros dos directores Anabel Vela y José Garayzábal la revisión crítica, el apoyo y la colaboración en este trabajo, aportando en ocasiones ese punto de cordura necesario en las eternas correcciones que conformaron las mil y una versiones. Ahora entiendo como aquellos incómodos cambios, que se enfrentaban día a día con mis ganas irrefrenables por acabar, fueron del todo necesarios para colocar este trabajo en el sitio que se merece.

También gracias sinceras y de corazón a Joaquín Goyache, primero profesor, después compañero de trabajo y ahora buen amigo. Gracias Decan por estar siempre con los brazos abiertos, dispuesto a tomar una cerveza o entablar una conversación “agradable”. Envidiable tu disposición y amistad en todo momento. No olvido que me debes una cena.

Agradecer a Alicia Gibello sus primeras y sólidas nociones en la PCR y su constante interés y a Miguel Angel Moreno por su apoyo en la fase estadística.

A Blanca Mas, por su revisión en las últimas fases de la corrección y por brindarme su colaboración y consejo durante mi etapa universitaria.

Gracias a la Universidad Complutense de Madrid, por concederme la beca predoctoral FPI y las ayudas para las estancias en el extranjero que han permitido completar mi formación y la realización de esta Tesis Doctoral de una manera mucho más fructífera y llevadera.

Mi más sincero agradecimiento a toda la plantilla de DIBAQ Acuicultura, porque sin su ayuda y activa participación, no hubiera superado ciertos baches que me he ido encontrando en el camino. Especiales gracias a Raquel Lázaro, Rosa Villagrán, Elvira Alcalde, Eva Martín, Alvaro Rodríguez, Javier Villa, Lola Rodríguez, Rubén González, Mónica Tejedor y Victoria Navas por vuestro apoyo desde el comienzo y por recibirme con los brazos abiertos en esta nueva etapa profesional.

*A todos los piscicultores de España, porque cada uno de vosotros me ha enseñado algo nuevo en la visitas que he tenido oportunidad de realizar, con especial cariño a los hermanos Medina y sus piscifactorías Granáinas por doctorarme antes de tiempo. También un recordatorio para vosotras, las truchas, eternas sufridoras, pero las de colorines, las arco iris, la *Oncorhynchus mykiss*.*

A todas las personas que han pasado por VISAVET durante estos 5 años y que tanto voy a echar de menos. Gracias por haber acogido y acompañado a este segoviano en su etapa predoctoral. Ahora, y no antes, me toca pedir perdón si alguno de esos bailes, gritos, sustos o repentines a destono, os hayan podido molestar en alguna ocasión. Me consta que no. Objetivo, la sonrisa.

Especiales y primeras gracias a mis “Niñas de la Moñoño”, Nerea y Maguis, por hacer de un despacho un ambiente envidiable y de unas compañeras de trabajo una amistad que ya no tiene fin. Ya sabéis, BA nunca muere, ni con él morirán los recuerdos tan fantásticos que me llevo en el bolsillo. Ya os estoy echando muchísimo de menos.

A Julito, el típico Vis, sufridor y competidor nato en tantos y tantos juegos, que de una manera u otra, pasadas las siete de la tarde, convertían VISAVET en un auténtico Casino. Gracias también Julito por nuestras charlas y divagaciones en aquellos momentos duros, ya sabes, pa'lante. Vengahastaluego!

A Sergio, compañero, por tu gran amistad final y por la constante ayuda informática durante estos años, con carácter boicoteante o no, realmente útil (incluido ese Copyright que tenemos a medias). Gracias a Javi y Cebo, por ayudarme a luchar encarnizadamente contra esa jauría femenina Visavetiana, aunque fuéramos pocos, no pudieron con nosotros (o si). Prometo volver a pasarme por el círculo hormonal “Pepe’s Bar”.

A Pilar Liébana, mi primera gran jefa y grandísima persona, por todo aquello que desde el primer día me enseñaste y que aún hoy sigo utilizando. A Sonia por tu gran disposición, Gema, “La Princesa de los Mares”, Maria Mazariegos, por ser sencillamente genial y porque te tengo guardada la revancha y Laura de las Heras, mi adorable vecina. A las Lauras (Delgado y Cuesta), por esos comienzos inocentes de risas mezcladas con confusión, a David, por la curación de esos estigmas contagiosos y para que taches la campana de una vez y a Marga, porque siempre encontrábamos ese momento de relajación y alegría dentro del ambiente de trabajo.

Gracias y ánimos a Bea Romero, Sabrina y Elena, mis últimas compañeras de despacho y sufridoras finales de toda la escritura. A Isa, Tiru, Lucía, Alicia, Concha, M^a Carmen, Fany, Fran, María... y a toda la gente que han pasado por el extinto grupo de AR. Especiales gracias a Almu, mi paisana y Olga por ese empuje final con el PFGE, que me permitió meter otro montón de cepas. A Arancha (nchan), por me encantaba hacerte sonreír y asustarte por los pasillos. Y también por

supuesto agradecer a todos los recogedores espontáneos de aguas, que me han permitido obtener un muestreo mucho más amplio del que yo solo hubiera podido tener.

Y no me olvido de las últimas incorporaciones, Bea Tamés, Ester Royo, Marta Sigüenza, Nurias... que aunque breve, fue intensa nuestra coincidencia. Al resto de la plantilla de VISAVET, por entender que citar uno por uno sería demasiado, que ya no éramos tan pocos... por todos esos buenos momentos, dentro y fuera del laboratorio. Prometo volver cuando necesitéis arrancar una sonrisa. Y a todos los que os quedasteis en el camino, especialmente a Rut, Delia y a Kike, por permitirme ser un “moscón cajonero”.

También me gustaría recordar a todos los profesores, becarios y ayudantes del departamento de Sanidad Animal que de una forma desinteresada me han ofrecido su colaboración y compañía a lo largo de este ciclo. Especialmente a Ana Mata por su apoyo molecular y a Alvarito y toda la tropa Bruno, por esos buenos momentos de lucha amistosa por conseguir un gel limpio y listo para correr.

Gracias al Dr. Michael Kent del Center for Fish Disease, del departamento de Microbiología de la Universidad de Oregon (EE.UU.), por la oportunidad americana, por tu gran hospitalidad, por las barbacoas en la playa y esas nociones de surf. Prometo volver y aguantar más “on the wave”. Gracias a Chris Whipps por ayudarme a comprender y divertirme con la biología molecular y porque ahora si que si...A journey of a thousand miles, begins with a simple step. A Adam y Jen, por el Bluegrass, los Grizzlies en las montañas, el rey del pollo frito y por subir el volumen cuando Mike ya no andaba por allí. También un saludo en varias lenguas para Andreas, Rolf, Naomi, Fred, Eileen, Tomonouri, Marta, Romina, Antje, Oscar... y toda la gente que habitó la Internacional House en Corvallis.

Gracias a los Dres. Jeremy Carson, Barbara Nowak y Robert Adlard, del Tasmanian Aquaculture and Fisheries Institute y del Department of Primary Industries Water and Environment (Tasmania, Australia), porque aunque in extremis, permitisteis mi sueño de viajar a

las antípodas y conocer vuestro maravilloso país (y el Vegemite). Gracias a Mark Hawes y Richmond Loh por vuestra amistad y esa disponibilidad para echar siempre un 21 seguido de una cervecita. A ver si cumplís la promesa de venir por aquí. No me olvido de Ally, Collette y Erin y todos sus Demonios de Tasmania. Mucha suerte con el proyecto. Y gracias a Lesley Ikin y sus 6 geniales mascotas, por vuestra hospitalidad y por haberme echo sentir como en casa a 19.000 Km de distancia.

Me toca ahora quitarme el sombrero, para agradecer al abuelo José Luis (Tejedor I), su espíritu emprendedor e impulsor de grandes y tantas cosas que sin duda son la génesis de mi instinto veterinario. No olvidaré, Abuelo, todos aquellos veranos que te acompañaba a cuidar a las madres del Rancho cuando no levantaba ni medio metro del suelo. Me hubiera gustado mucho que ahora me vieras continuar con gran ilusión aquella realidad que tú un día empezaste. Y hablando en el cielo, no me quiero bajar sin dar un besazo enorme al Titu (ay! si llego a conocer tus ovejas...) y a la abuela Ana que se han marchado sin poder disfrutar de su nieto Doctor. Se que estaríais muy orgullosos de mi. A ti Yaya, que sí lo verás, te lo agradeceré en persona en cuanto te vea. Un besazo!

A Elena y Lucía, mis hermanas, mis compañeras de piso, colegas de fiestas y novias de mis amigos, por saberme siempre entender, por vuestro apoyo constante y porque sabéis que aunque sea a veces un poco morugo y no lo demuestre, os quiero muchísimo.

Gracias a Pepe y Tania, Papa y Mama, el pilar básico de todo aquello que voy consiguiendo. Sin vuestra ayuda, esfuerzo y comprensión, definitivamente no podría estar escribiendo estas líneas finales de agradecimiento. Soy lo que soy gracias a vosotros. Gracias por vuestro cariño, por vuestra paciencia infinita y por ser un verdadero ejemplo a seguir, que me hace sentir tremendamente orgulloso de ser vuestro primer puntal y vuestro hijo de las entretelas.

A mi tía Celia, por tu constante interés y por ser la madrina más guapa del mundo y a mi tío Carlos, mi colega, mi asesor, confesor y ahora al fin, compañero de trabajo.

A toda la primada Tejedor y a los del Real, veinticuatro primos con muchas historietas detrás, desafortunadamente sin espacio para ser contadas aquí. Y a todos los tíos de las dos familias (especialmente a ti Paco, que te marchaste muy pronto), por que siempre he sentido vuestro empuje, nos veamos mucho, poco o regular.

A Fuencis, Carlos, Luis y Tigrín, mi segunda familia. Mi más sincera admiración por haber aprendido a vivir a base de golpes y por haber demostrado una fuerza impresionante en momentos realmente duros. El cariño es mutuo y ya sabéis, podéis con todo.

En mi tierra segoviana, plagada de buenos amigos, imperiosamente necesito agradecer los 28 años de amistad de Alex; gracias Xindar por todos esos buenos recuerdos marcados con tinta indeleble. Y ahora viene la tropa, gracias a Nacho, Angel y Juancar, porque en el fondo siempre mantendremos vivo el espíritu de los M.J. Gracias Pablo por tu incalculable apoyo en los momentos de marejada y por dejarme el timón solo cuando ya estabas seguro, ahora te toca a ti. Gracias Jorge por tu siempre disposición y disfrute en tantos y tantos hobbies comunes, especialmente en esas Jam Sessions que ponen los pelos de punta a cualquiera; Peli, por permitirme ese momento tan especial en tu boda y por nuestro November Rain. Mariano, ¡pero que grande eres! Miguel, perroncho, gracias por la experiencia holandesa, no la olvidaré nunca. Andrés y César, gracias por demostrar al resto que el gol de oro es posible (a ver si algunos toman nota). A Raúl por el grito de la grulla y a Rubén, Alfredivo y al Moro, porque aunque ya distanciados, nos seguimos sintiendo muy cerca. A todas vuestras novias que estuvieron, están o estarán en la “Pandilla Sueca de la Paciencia”, porque definitivamente, sois parte muy importante de nuestras vidas.

Gracias también al Dibaq C.B, por permitirme demostrar que trasnochar no es incompatible con el baloncesto y los jolynes y por convertir cada fin de semana en una verdadera emoción al límite (creo que solo me quedan por citar al Ciri, Cade, Guille, Lobo y Antonio, Gracias!).

Llego a Fuentepelayo y todo aquello que le rodea, el gran molde de mi juventud y de lo que hoy en día soy, que hace una auténtica delicia la expresión de “bajarse al pueblo”. Gracias Carlitos por todos esos momentos de apoyo y de fiesta y por esa ironía presionante que quieras o no, me ha empujado en esta última fase. Mi obra del Escorial pone aquí su último ladrillo. Gracias Ronchi y Dani, socios fundadores, por vuestra larga amistad llena de anécdotas alucinantes y vuestras clases magistrales de música de la buena. Un besazo enorme para Marga y Diana, grandes coristas y mejor amigas. También para Roberto, Teto, León, Asier, César, Borja, Alvarito, Rocío, Laura, Perre, Ildé...y a todo el Bare Nostrum en general, un orgullo y toda una filosofía de seguir la vida...porque ¡¡¡somos la peña mas grande y mejor!!! Y con ella a The Tokens, el Chiquetere, la máquina de humo y los futuros tubos de neón.

Un cariñoso saludo a Sergio “León” Ferreiro, mi Gran Amigo de Licenciatura, por acudir siempre que se te llama y a toda la promoción de Veterinaria de 1997, estéis donde estéis, ¡mucha suerte! También a Sir Bob Mann Francis, el “Teacher” y estupendo amigo, y a Rebe y Bea Coco por su apoyo y amistad.

Gracias a Shannon Birchall, por nuestra increíble historietta que comenzó en el aeropuerto de Singapur y que tantas veces he repetido orgulloso. Gracias por abrirme de esa manera las puertas de Melbourne, por tu amistad y por el concierto de Colonia. A ver si venís ya para España y podemos telonear a The John Butler Trio.

A los Kitchengarden, FD/3C, el Baloncesto y el Rock´n Roll, cuatro de mis vicios confesables y estupendas vías de descarga de adrenalina, porque si en algún momento se cruzaron en la buena marcha de esta Tesis, fue sin premeditación ni alevosía.

Al ingenioso Hidalgo, porque el ya bien lo sabe de tantas veces que ha sido nombrado en estos años. Una buena vía de escape, a seguir igual. También a Metallica, Rage Against the Machine y a Joaquín Sabina, porque escuchándoos en aquella noche de invierno sin salir por escribir, las palabras parecían fluir mas fácilmente.

¡Ya solo quedas tu Princesa! Aquí la última pero constantemente la primera. Te quiero agradecer de todo corazón cada uno de estos geniales años de aquello que empezó con un “Puedo escribir los versos más tristes esta noche...”. Gracias Virgy por permanecer a mi lado regalándome tu compañía y confiando en mí. Gracias por tu paciencia, tu cariño, tu comprensión; por tu empuje en los días grises y tu sonrisa en los más soleados. Recuerda que tu equilibrio es también el mío. Te Quiero.

Y finalmente Gracias de todo corazón a todos los que involuntariamente he olvidado citar y que en mayor o menor medida me han animado y han participado en la realización de esta Tesis Doctoral.

¡¡GRACIAS!!

ÍNDICE



Listado de tablas.	VIII
Listado de figuras.	XII
Listado de fotos.	XV
Listado de abreviaturas.	XVI
1. INTRODUCCIÓN.	19
1.1. LA ACUICULTURA.	21
1.1.1. Definición e historia.	21
1.1.2. Acuicultura y pesca.	23
1.1.3. La Acuicultura en el Mundo.	27
1.1.4. La Acuicultura en Europa.	29
1.1.5. La Acuicultura en España.	31
1.2. NUTRICIÓN EN ACUICULTURA.	35
1.2.1. Generalidades.	35
1.2.2. Tipos de piensos.	36
1.2.3. Harinas de pescado.	41
1.2.3.1. Fabricación y clasificación.	41
1.2.3.2. Situación actual de la producción de harina de pescado.	43
1.2.4. Transmisión de enfermedades a través de la alimentación animal.	44
1.2.5. Enriquecimiento selectivo y PCR como control de calidad en la nutrición piscícola.	46
1.3. ACUICULTURA Y PATOLOGÍA BACTERIANA.	49
1.3.1. Importancia de las infecciones por bacterias Gram positivas en acuicultura.	51

1.3.2. <i>Lactococcus garvieae</i>, agente productor de la lactococosis de la trucha arco iris (<i>Oncorhynchus mykiss</i>).	54
1.3.2.1. Etiología.	54
1.3.2.2. Epidemiología.	62
1.3.2.3. Transmisión.	64
1.3.2.4. Patogenia y sintomatología.	69
1.3.2.5. Diagnóstico.	74
1.3.2.6. Tratamiento.	79
1.3.2.7. Control y profilaxis.	80
2. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS.	85
3. MATERIAL Y MÉTODOS.	89
3.1. PUESTA A PUNTO DE UNA METODOLOGÍA PARA LA DETECCIÓN DE <i>Lactococcus garvieae</i>, <i>Streptococcus parauberis</i> Y <i>Streptococcus iniae</i> EN MATERIAS PRIMAS, PIENSOS COMPUESTOS Y MUESTRAS MEDIOAMBIENTALES.	91
3.1.1. Diseño y evaluación de medios de enriquecimiento selectivos.	91
3.1.1.1. Diseño	91
3.1.1.2. Evaluación.	94
3.1.2. Selección del medio de enriquecimiento, condiciones de incubación y protocolo de extracción.	95
3.1.2.1. Selección de muestras.	95
3.1.2.2. Preparación e incubación de las muestras.	96
3.1.2.3. Protocolos de extracción de ADN.	98
3.1.3. Identificación molecular. Técnica de PCR múltiple.	103
3.1.3.1. Elección de oligonucleótidos.	103

3.1.3.2.	Reacción de PCR.	104
3.1.3.3.	Condiciones de la PCR.	104
3.1.4.	Determinación de la eficacia de la metodología.	105
3.1.4.1.	Ausencia de patógenos diana en la harina problema.	105
3.1.4.1.1.	Selección de la muestra.	105
3.1.4.1.2.	Incubación, extracción de ADN y PCR múltiple.	106
3.1.4.2.	Contaminación artificial de harinas de pescado.	106
3.1.4.2.1.	Selección de cepas.	106
3.1.4.2.2.	Contaminación artificial individual.	107
3.1.4.2.3.	Contaminación artificial simultánea.	109
3.1.4.2.4.	Incubación, extracción de ADN y PCR múltiple.	110
3.1.4.3.	Ensayos adicionales con <i>Streptococcus iniae</i> .	111
3.2.	DETECCIÓN DE <i>Lactococcus garvieae</i> y <i>Streptococcus parauberis</i> EN HARINAS DE PESCADO, PIENSOS COMPUESTOS Y AGUAS.	113
3.2.1.	Harinas de pescado.	114
3.2.1.1.	Supervivencia bacteriana en las harinas de pescado.	115
3.2.2.	Piensos compuestos.	116
3.2.3.	Muestras de aguas.	116
3.2.4.	Enriquecimiento selectivo, extracción de ADN y PCR múltiple.	118
3.3.	AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE <i>Lactococcus garvieae</i>.	119

3.3.1. Aislamiento de <i>Lactococcus garvieae</i> a partir de harinas de pescado, piensos y aguas.	119
3.3.1.1. Medios de cultivo y condiciones de incubación.	119
3.3.1.2. Harinas de pescado.	121
3.3.1.3. Aguas.	121
3.3.1.4. Determinación de la validez y seguridad de la metodología de aislamiento.	123
3.3.2. Aislamiento de <i>Lactococcus garvieae</i> a partir de diferentes especies animales y humanos.	124
3.3.2.1. Medios de cultivo y condiciones de incubación.	124
3.3.2.2. Peces.	124
3.3.2.3. Ganado porcino.	125
3.3.2.4. Otras especies animales y humanos.	126
3.3.3. Identificación por PCR.	127
3.3.4. Conservación de los aislados.	128
3.4. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.	128
3.5. CARACTERIZACIÓN DE <i>Lactococcus garvieae</i> AISLADO A PARTIR DE DIFERENTES ESPECIES ANIMALES, HARINAS DE PESCADO Y AGUAS.	128
3.5.1. Caracterización bioquímica.	129
3.5.2. Caracterización molecular: Electroforesis de Campo Pulsado (PFGE).	129
3.5.2.1. Materiales.	130
3.5.2.2. Preparación de los bloques.	131
3.5.2.3. Lisis bacteriana.	132
3.5.2.4. Restricción enzimática.	132

3.5.2.5.	Separación de los fragmentos de ADN y condiciones de la electroforesis.	135
3.5.2.6.	Interpretación de los resultados.	137
4.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.	137
4.1.	PUESTA A PUNTO DE UNA METODOLOGÍA PARA LA DETECCIÓN DE <i>Lactococcus garvieae</i>, <i>Streptococcus parauberis</i> y <i>Streptococcus iniae</i> EN MATERIAS PRIMAS, PIENSOS COMPUESTOS Y MUESTRAS MEDIOAMBIENTALES.	139
4.1.1.	Diseño y evaluación de medios de enriquecimiento selectivos.	139
4.1.2.	Selección del protocolo de extracción, medio de enriquecimiento y condiciones de incubación.	146
4.1.2.1.	Diseño y elección del protocolo de extracción de ADN.	147
4.1.2.2.	Elección del medio de enriquecimiento.	154
4.1.2.3.	Elección del periodo de incubación.	157
4.2.	DETERMINACIÓN DEL LÍMITE DE DETECCIÓN DE LA METODOLOGÍA.	160
4.2.1.	Ausencia de patógenos diana en la harina problema.	160
4.2.2.	Contaminación artificial individual.	161
4.2.3.	Contaminación artificial simultánea.	165
4.2.4.	Ensayos adicionales con <i>Streptococcus iniae</i>.	168
4.3.	DETECCIÓN DE <i>Lactococcus garvieae</i> y <i>Streptococcus parauberis</i> en HARINAS DE PESCADO, PIENSOS COMPUESTOS Y AGUAS.	171

4.3.1. Muestreo en harinas de pescado.	171
4.3.1.1. Estudio comparativo por tipo de harina de pescado.	175
4.3.1.2. Estudio comparativo por procedencia de las muestras.	177
4.3.1.3. Estudio comparativo por año de muestreo.	180
4.3.1.4. Supervivencia bacteriana en harinas de pescado.	182
4.3.2. Muestreo de piensos compuestos.	186
4.3.2.1. Estudio comparativo según el modo de fabricación del pienso.	188
4.3.2.2. Estudio comparativo según la presencia de harina de pescado en la composición.	190
4.3.2.3. Estudio comparativo de harinas de pescado y piensos compuestos.	192
4.3.2.4. Muestreo pareado harinas de pescado – piensos compuestos.	193
4.3.3. Muestreo de aguas.	199
4.4. AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE <i>Lactococcus garvieae</i>.	205
4.4.1. Aislamiento de <i>Lactococcus garvieae</i> a partir de harinas de pescado, piensos compuestos y aguas.	205
4.4.1.1. Selección del medio de cultivo.	205
4.4.1.2. Aislamiento bacteriano.	210
4.4.1.3. Determinación de la validez y seguridad de la metodología de aislamiento.	218
4.4.2. Aislamiento de <i>Lactococcus garvieae</i> a partir de diferentes especies animales y humanos.	222
4.4.3. Identificación por PCR.	223

4.5. CARACTERIZACIÓN DE <i>Lactococcus garvieae</i> AISLADO A PARTIR DE DIFERENTES ESPECIES ANIMALES, HARINAS DE PESCADO Y AGUAS.	224
4.5.1. Recopilación de cepas.	224
4.5.2. Caracterización bioquímica.	225
4.5.3. Caracterización molecular: Electroforesis de Campo Pulsado (PFGE).	226
5. CONCLUSIONES.	243
6. RESUMEN.	247
7. SUMMARY.	253
8. BIBLIOGRAFIA.	259

LISTADO DE TABLAS

Tabla 1.	Producción acuícola mundial en millones de toneladas en el año 2005. APROMAR 2007.	24
Tabla 2.	Producción de la piscicultura europea por especies cultivadas en el año 2006. EAFP, 2006.	30
Tabla 3.	Producción acuícola española en el año 2006 por especies. JACUMAR y APROMAR 2007.	32
Tabla 4.	Principales enfermedades de etiología bacteriana que afectan a los peces de cultivo.	50
Tabla 5.	Principales descripciones de aislamientos de <i>L. garvieae</i> en diferentes especies animales, sustratos y orígenes geográficos.	59
Tabla 6.	Características bioquímicas y fisiológicas de <i>L. garvieae</i> .	61
Tabla 7.	Composición del Bacto™ Brain Heart Infusión BHI, BD.	92
Tabla 8.	Composición de los medios de enriquecimiento selectivos (M.E.S.).	93
Tabla 9.	Relación de antibióticos utilizados: potencia y concentración final en la que son añadidos al medio de enriquecimiento.	93
Tabla 10.	Cepas de <i>L. garvieae</i> , <i>S. parauberis</i> y <i>S. iniae</i> utilizadas en la evaluación de los medios de enriquecimiento.	95
Tabla 11.	Composición del buffer de lisis para un volumen final de 10ml.	99
Tabla 12.	Secuencias de los oligonucleótidos incluidos en la PCR Múltiple.	103
Tabla 13.	Programa de ciclos y temperaturas de la PCR Múltiple.	104
Tabla 14.	Relación de las 9 contaminaciones individuales y recuentos realizados en cada una de las cepas.	108
Tabla 15.	Ensayos de contaminación bacteriana simultánea y recuentos.	109

Tabla 16.	Programa de ciclos y temperaturas de la PCR simple de <i>S. iniae</i> .	112
Tabla 17.	Número de muestras de harinas de pescado procesadas según el año de fabricación, procedencia y tipo.	115
Tabla 18.	Número de muestras de piensos compuestos procesados según el año modo de fabricación, destino y composición.	116
Tabla 19.	Número de muestras de aguas procesadas según el país de procedencia, tipo y año de muestreo.	117
Tabla 20.	Composición del medio Agar Peptona Sangre.	119
Tabla 21.	Composición del medio de cultivo diferencial.	120
Tabla 22.	Relación de cepas de <i>L. garvieae</i> procedentes de harinas de pescado.	121
Tabla 23.	Relación de cepas de <i>L. garvieae</i> procedentes de muestras de aguas.	122
Tabla 24.	Relación entre el resultado de la PCR y el aislamiento bacteriano.	123
Tabla 25.	Relación de cepas de <i>L. garvieae</i> procedentes de diferentes especies animales.	126
Tabla 26.	Medio de congelación para la conservación de cepas de <i>L. garvieae</i> .	128
Tabla 27.	Mezcla de predigestión enzimática de los bloques de PFGE.	133
Tabla 28.	Mezcla de digestión enzimática de los bloques de PFGE.	133
Tabla 29.	Resultados de detección de <i>L. garvieae</i> , <i>S. parauberis</i> y <i>S. iniae</i> con la metodología diseñada sobre 30 muestras de harinas de pescado comerciales.	149
Tabla 30.	Límites de detección de <i>L. garvieae</i> , <i>S. parauberis</i> y <i>S. iniae</i> tras la contaminación artificial individual.	161
Tabla 31.	Recuentos y resultado de la PCR de los 4 aislados de <i>L. garvieae</i> y las cepas tipo de <i>S. iniae</i> y <i>S. parauberis</i> en la contaminación artificial individual.	164

Tabla 32.	Recuentos y resultado de la PCR Múltiple para la detección de <i>L. garvieae</i> , <i>S. iniae</i> y <i>S. parauberis</i> en la contaminación artificial simultánea.	165
Tabla 33.	Resultados de la PCR Múltiple y comparación del número total de muestras positivas a cada especie bacteriana según el tipo de harina de pescado.	176
Tabla 34.	Resultados de la PCR Múltiple y comparación del número total de muestras positivas a cada especie bacteriana según la procedencia de las harinas de pescado.	178
Tabla 35.	Resultados de la PCR Múltiple y comparación del número total de muestras positivas a cada especie bacteriana según el año de muestreo.	181
Tabla 36.	Comparación de los resultados de PCR Múltiple obtenidos sobre cinco harinas de pescado procesadas en los años 2003 y 2006.	183
Tabla 37.	Resultados de la PCR Múltiple y comparación del número total de muestras positivas a cada especie bacteriana según el modo de fabricación de los piensos compuestos.	189
Tabla 38.	Resultados de la PCR Múltiple y comparación del número total de muestras positivas a cada especie bacteriana según la presencia o ausencia de harina de pescado en la composición.	191
Tabla 39.	Resultados de la PCR Múltiple y comparación del número total de muestras positivas a cada especie bacteriana en harinas de pescado y pienso compuestos.	192
Tabla 40.	Resultados de la PCR Múltiple obtenidos en el muestreo pareado de piensos compuestos y harinas de pescado.	195
Tabla 41.	Relación del número de muestras de agua positivas a <i>L. garvieae</i> con respecto al total en cada tipo de muestreo tras la PCR Múltiple.	201
Tabla 42.	Relación de muestras de harinas de pescado positivas a la PCR y resultados de aislamiento de <i>L. garvieae</i> .	211
Tabla 43.	PCR y aislamiento de <i>L. garvieae</i> en las muestra de aguas.	212

Tabla 44.	Eficacia de aislamiento de <i>L. garvieae</i> sobre muestras positivas a la PCR.	213
Tabla 45.	Relación de resultados entre la detección de <i>L. garvieae</i> por PCR y su aislamiento en medio sólido a partir de harinas de pescado.	219
Tabla 46.	Relación de resultados entre la detección de <i>L. garvieae</i> por PCR y su aislamiento en medio sólido a partir de piensos compuestos.	220
Tabla 47.	Relación de resultados entre la detección de <i>L. garvieae</i> por PCR y su aislamiento en medio sólido a partir de muestras de agua.	220
Tabla 48.	Distribución de cepas, pulsotipos y diversidad genética.	230

LISTADO DE FIGURAS

Figura 1.	Evolución de la producción pesquera (pesca y acuicultura) en el mundo, 1950-2005. APROMAR, 2007.	25
Figura 2.	Producción de la acuicultura en el mundo, 2005. APROMAR, 2007.	27
Figura 3.	Producción acuícola de las cinco especies de peces más representativas en España (2006).	33
Figura 4.	Producción acuícola española de trucha arco iris, dorada, lubina, rodaballo y túnidos (periodo 1997-2006). APROMAR, 2007.	34
Figura 5.	Factores predisponentes y vías de transmisión de la lactococosis de la trucha arco iris.	68
Figura 6.	Protocolo de preparación, inoculación e incubación de los medios de enriquecimiento selectivo.	98
Figura 7.	Protocolo de extracción de ADN por el método Fast DNA Modificado.	102
Figura 8.	Protocolo de contaminación artificial de harinas de pescado.	111
Figura 9.	Cinética de crecimiento de diferentes cepas de <i>L. garvieae</i> incubadas en el medio MES-4AB a 14°C.	140
Figura 10.	Cinética de crecimiento de diferentes cepas de <i>L. garvieae</i> incubadas en el medio MES-4AB a 24°C.	141
Figura 11.	Cinética de crecimiento de diferentes cepas de <i>L. garvieae</i> incubadas en el medio MES-4AB a 30°C.	142
Figura 12.	Control de inhibición de la PCR para la extracción de ADN con el método Casas Modificado.	148
Figura 13.	Comparación entre el número de determinaciones negativas y positivas (individuales y mixtas) en los dos métodos de extracción de ADN.	151

Figura 14.	Comparación entre el número total de determinaciones positivas en los dos métodos de extracción de ADN.	151
Figura 15.	Comparación entre el número de determinaciones negativas y positivas (individuales y mixtas) en los dos medios de enriquecimiento selectivo y utilizando el protocolo de extracción Fast DNA Modificado.	156
Figura 16.	Comparación entre el número total de determinaciones positivas en los dos medios de enriquecimiento selectivo y utilizando el protocolo de extracción Fast DNA Modificado.	156
Figura 17.	Comparación entre el número de determinaciones negativas y positivas (individuales y mixtas) en los tres tiempos de incubación, utilizando el medio MES-CNA y el protocolo de extracción Fast DNA Modificado.	159
Figura 18.	Comparación entre el número total de determinaciones positivas en los tres tiempos de incubación y utilizando el medio MES-CNA y el protocolo de extracción Fast DNA Modificado.	159
Figura 19.	Enriquecimiento selectivo y PCR múltiple de la harina problema libre de patógenos.	160
Figura 20.	Límite de detección individual de la metodología para <i>L. garvieae</i> .	162
Figura 21.	Límite de detección individual de la metodología para <i>S. parauberis</i> .	162
Figura 22.	Límite de detección individual de la metodología para <i>S. iniae</i> .	163
Figura 23.	Límite de detección simultánea de la metodología para <i>L. garvieae</i> , <i>S.iniae</i> y <i>S. parauberis</i> .	166
Figura 24.	Distribución de los resultados obtenidos en el total de muestras de harinas de pescado procesadas tras la PCR Múltiple.	172
Figura 25.	PCR Múltiple sobre muestras reales de harinas de pescado.	172
Figura 26.	Distribución de los resultados porcentuales en harinas de pescado según el tipo de muestra.	176

Figura 27. Distribución de los resultados porcentuales en harinas de pescado según la procedencia de las muestras.	179
Figura 28. Distribución de los resultados porcentuales en harinas de pescado por año de muestreo.	181
Figura 29. Distribución de los resultados obtenidos en el total de muestras de piensos compuestos procesados tras la PCR Múltiple.	186
Figura 30. Distribución de los resultados porcentuales en piensos compuestos según el modo de fabricación.	190
Figura 31. Distribución de los resultados porcentuales en piensos compuestos según la presencia o ausencia de harina de pescado en la composición.	191
Figura 32. Distribución de los resultados porcentuales en el total de harinas de pescado y piensos compuestos.	193
Figura 33. Distribución de los resultados obtenidos en el total de muestras de aguas procesadas tras la PCR Múltiple.	200
Figura 34. PCR Múltiple sobre muestras reales de aguas.	200
Figura 35. Distribución geográfica de las muestras de aguas procesadas, atendiendo al resultado tras la PCR Múltiple.	202
Figura 36. Comparación en la eficacia de selección e identificación de <i>L. garvieae</i> en harinas de pescado, piensos y aguas.	214
Figura 37. Identificación por PCR de cepas aisladas en ganado porcino.	223
Figura 38. Distribución de las cepas de <i>L. garvieae</i> según su procedencia.	224
Figura 39. Gel de caracterización molecular por PFGE de diferentes aislados de <i>L. garvieae</i> .	231
Figura 40. Dendrograma mostrando la relación genética por PFGE entre las 260 cepas de <i>L. garvieae</i> incluidas en el estudio	232

LISTADO DE FOTOS

Fotos 1 y 2.	Aspecto macroscópico de dos tipos de harinas de pescado.	42
Fotos 3 y 4.	Vistas dorsal y frontal de trucha arco iris con exoftalmo bilateral.	71
Foto 5.	Diferentes grados de exoftalmia y melanosis en trucha arco iris.	71
Foto 6 y 7.	Encefalitis hemorrágica y hemorragias petequiales en trucha arco iris con lactococosis.	73
Foto 8.	Congestión generalizada de todos los órganos y enteritis hemorrágica	73
Foto 9.	Muestras de harinas de pescado y piensos compuestos (25g) preparadas para ser enriquecidas.	97
Foto 10.	Medio de enriquecimiento selectivo siendo distribuido en las muestras (225ml).	97
Foto 11.	Cultivo de <i>L. garvieae</i> en Columbia Agar Sangre tras 24h de incubación a 30°C	210
Foto 12.	Cultivo de <i>E. faecalis</i> en Columbia Agar Sangre tras 24h de incubación a 30°C	210

LISTADO DE ABREVIATURAS

a.d.C	antes de Cristo
ADN	Ácido desoxirribonucleico
APROMAR	Asociación Empresaria de Productores de Cultivos Marinos
ARN	Ácido ribonucleico
ARNr	Ácido ribonucleico ribosomal
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i> (Colección Americana de Cultivos Tipo)
BEA	<i>Bile Esculin Agar</i> (Agar Bilis-Esculina)
BHI	<i>Brain Heart Infusion</i> (Infusión Cerebro Corazón)
BKD	<i>Bacterial Kidney Disease</i> (Enfermedad Bacteriana del Riñón)
°C	Grado centígrado
CNA	<i>Colistine - Nalidixic Acid</i> (Colistina –Ácido Nalidixico)
DES	<i>DNA Elution Solution Ultra-pure water</i> (Solución de agua ultra pura para Extracción de ADN)
DL₅₀	Dosis Letal 50
dNTPs	Desoxirribonucleótidos trifosfato
EAFP	<i>European Association of Fish Pathologists</i> (Asociación Europea de Patólogos de Peces)
FAO	Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación
FEAP	Federación Europea de Productores de Acuicultura
g	Gramo
h	Hora
H₂O	Agua
HCl	Cloruro de hidrógeno
HP	Harina de pescado

ISO	<i>Internacional Organization for Standarization</i> (Organización Internacional de Estandarización)
JACUMAR	Junta Asesora de Cultivos Marinos
Kb	Kilobase
l	Litro
lctO	Gen lactato oxidasa
LT	<i>Low temperature</i> (baja temperatura)
M	Molar
MAPA	Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación
MES-4AB	Medio de Enriquecimiento Selectivo 4 Antibióticos
MES-CNA	Medio de Enriquecimiento Selectivo Colistina/Ac.Nalidíxico
mg	Miligramo
MgCl₂	Cloruro de magnesio
min	Minuto
ml	Mililitro
mM	Milimolar
N	Normal
NaCl	Cloruro sódico
NaOH	Hidróxido sódico
NCDO	<i>National Collection of Dairy Organism</i> (Colección Nacional de Organismos Lácteos)
ng	Nanogramos
nm	Nanómetro
pb	Pares de bases
PCR	<i>Polimerase Chain Reaction</i> (Reacción en Cadena de la Polimerasa)
PFGE	<i>Pulsed Field Gel Electrophoresis</i> (Electroforesis de Campo Pulsado)

pH	potencial hidrógeno
Pyra	Ácido piroglutámico arilamidasa
RAPD	<i>Random Amplified Polymorphic DNA Analysis</i> (Análisis Polimórfico Amplificado de ADN)
REDP	<i>Restriction Endonuclease Digestión Profile</i> (Perfil de Digestión por Endonucleasas de Restricción)
RFLP	<i>Restriction Fragment Length Polymorphism</i> (Polimorfismo de Longitud en Fragmentos de Digestión)
rpm	Revoluciones por minuto
SDS	Sodio Dodecil Sulfato
seg	Segundo
SEWS-M	<i>Salt Ethanol Wash Solution</i> (Solución de Lavado Sal-Etanol)
spp	Especie
TAE	Tris Acetato EDTA
Taq	<i>Thermophilus aquaticus</i>
TBE	Tris Borato EDTA
TE	Tris EDTA
Tm	Tonelada métrica
TSA	<i>Trypticase Soy Agar</i> (Agar Soja Trypticasa)
TVN	Nitrógeno Volátil Total
µg	Microgramo
µl	Microlitro
U	Unidades Internacionales
UFC	Unidades Formadoras de Colonia
V	Voltio



1. INTRODUCCIÓN

1.1. LA ACUICULTURA.

1.1.1. DEFINICIÓN E HISTORIA.

Según el diccionario de la Real Academia Española de la Lengua, la acuicultura es “la técnica de cría y explotación de especies acuáticas vegetales y animales con fines científicos, económicos o industriales”. Dado que la palabra cría entraña el control de una o más fases del ciclo vital de una especie, podemos concluir que cuando se ejerce algún tipo de control sobre al menos una fase del ciclo vital de una especie acuícola, se está realizando acuicultura.

Mientras que el término global de acuicultura agrupa la producción de peces, crustáceos, moluscos y plantas acuáticas, existen denominaciones específicas para cada tipo de producción acuícola. Así la producción de peces se englobaría bajo el nombre de piscicultura o producción piscícola, que igualmente podemos desglosarla por especies producidas como la ciprinicultura (producción de carpas), truchicultura (producción de truchas) o salmonicultura (producción de salmones).

Existen varios criterios para clasificar los diferentes tipos de acuicultura. En primer lugar, en función del tipo de agua en la que se crían o engordan los animales, se distinguen la acuicultura marina, que utiliza agua de mares y océanos, y la continental, que usa la de ríos, lagos y aguas salobres. Según se producen una o varias especies en la misma explotación acuícola, se habla de monocultivo o policultivo. Y las granjas pueden ser extensivas o intensivas según el volumen y uso del agua, así como dependiendo de la productividad por unidad de volumen. También se diferencian instalaciones de circuito abierto o cerrado, en estas últimas se trata y recicla el agua de forma total.

Además, por otra parte, en función de las técnicas de producción y del grado en que se controla el ciclo productivo, existen explotaciones de ciclo completo, donde los animales se reproducen, se fecundan e incuban los huevos y se crían, recrían y engordan hasta tamaños o pesos comerciales, con reposición controlada y selección de reproductores. Otras instalaciones de ciclo parcial, pastoreo o sólo de cebo, son aquellas que retienen o capturan las crías procedentes del medio natural hasta que alcanzan el tamaño deseado o las que retienen o capturan los reproductores del medio natural para la obtención de huevos ya embrionados, incubación, cría, recría y engorde de ejemplares para comercializar, sin control de la reproducción (Mas Álvarez, 2006).

Respecto a los inicios de la acuicultura, se tiene constancia del aprovechamiento del agua para la cría de carpas hace 4000 años en China. En el año 1.400 a.d.C. existían leyes de protección frente a ladrones de pescado y el primer tratado de ciprinicultura en este país se data en el año 475 a.d.C.

También en las antiguas culturas mediterráneas, Aristóteles hace referencia en sus escritos a la ciprinicultura y ostricultura. Igualmente existen reseñas históricas, en el antiguo Egipto y en la época del Imperio Romano, referentes a la práctica de la piscicultura y a la invención del

estanque de cultivo por el general Lucinius Murena; así como sobre la cría de ostras en diferentes países asiáticos.

En la Edad Media, la cría de truchas y carpas se fue introduciendo poco a poco en abadías y monasterios de la Europa Occidental, que aprovechaban su proximidad a cauces fluviales. En 1758 el descubrimiento de la fecundación artificial de huevas de trucha y salmón por el austriaco Stephen Ludvig Jakobi, se considera la base de la piscicultura moderna.

En la década de 1950, la piscicultura se empezaba a considerar como una actividad industrial y años más tarde su desarrollo experimentó un incremento espectacular, aumentando la producción de truchas de piscifactoría un 50% entre los años 1990 y 1998 (APROMAR, 2006).

Hoy en día, la acuicultura es una actividad estable y en pleno desarrollo y expansión, tanto en países desarrollados como en países en vías de desarrollo; esta forma de producción animal, junto a la pesca extractiva, debe hacer frente a la creciente demanda de productos acuícolas en el mundo.

1.1.2. ACUICULTURA Y PESCA.

La producción acuícola en el año 2005 (Tabla 1), ascendió a 156,7 millones de toneladas entre la pesca de captura (59,9%) y la acuicultura (40,1%), siendo mayoritaria la obtención de productos marinos, con un 75%. Respecto a la utilización de esta producción, 118,6 millones de toneladas (75,7%) fueron destinadas al consumo humano y los 38,1 millones de toneladas restantes (24,3%) tuvieron usos no alimentarios (FAO, 2006).

Gracias a que el pescado supone una de las más importantes fuentes de proteína animal, los hábitos alimenticios de la alimentación humana vienen apostando por un mayor consumo de productos pesqueros en

destrimento de los cárnicos. Esto ha contribuido a que en los últimos 30 años se haya triplicado la demanda de pescado en el mundo y que su consumo *per cápita* haya pasado de 11 Kg/persona/año en 1970 a 16,6 Kg/persona/año en 2005 (FAO, 2006).

Tabla 1. Producción acuícola mundial en millones de toneladas en el año 2005. APROMAR 2007.

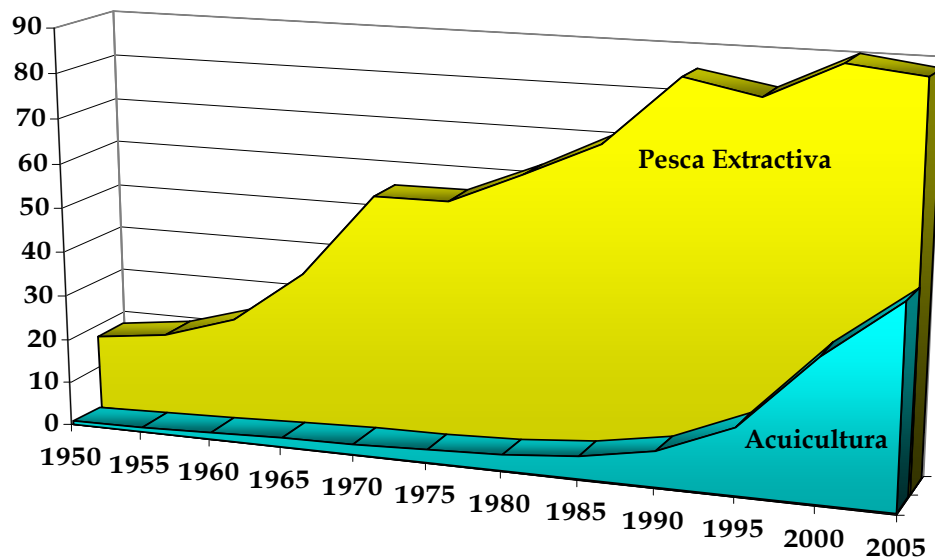
	CONTINENTAL		MARINA		TOTAL	
	Mill. Tm	%	Mill. Tm	%	Mill. Tm	%
PESCA	9,6	10,2%	84,2	89,8%	93,8	59,9%
ACUICULTURA	29,6	47%	33,3	53%	62,9	40,1%
TOTAL	39,2	25%	117,5	75%	156,7	100%

Según datos de APROMAR (2006), la producción de la pesca tradicional alcanzó sus niveles máximos a finales de los años 80 y desde entonces fluctúa en torno al mismo nivel (entre 90 y 95 millones de toneladas anuales), indicando que los océanos se están explotando cerca de su producción máxima (Figura 1). Por todo ello, para cubrir la creciente demanda de pescado por parte de la población, los futuros incrementos de productos sólo podrán provenir de la acuicultura, como ya ha venido sucediendo en varios países en los últimos 15 años (APROMAR, 2006). Esta expansión se espera que continúe en las próximas décadas, alcanzando según la FAO, los 100 millones de toneladas en 2030.

Para que la acuicultura moderna tenga éxito, de cara al futuro, en la satisfacción de las necesidades de la población, su desarrollo debe basarse en el control de la reproducción de las especies, gracias al mejor conocimiento de su biología, en las innovaciones tecnológicas y en el desarrollo de alimentos específicos (APROMAR, 2006).

En contrapartida, existe una creciente preocupación de esa misma población respecto al bienestar de los peces (de la Gándara, 2006) y respecto a las repercusiones de la acuicultura sobre el hábitat acuático, la dinámica de poblaciones piscícolas y su ecología, que exige a los piscicultores cumplir una serie de condiciones biológicas, éticas y medioambientales para garantizar el éxito de sus actividades (Naylor y col., 2000).

Figura 1. Evolución de la producción pesquera (pesca y acuicultura) en el mundo, 1950-2005. APROMAR, 2007.



Por otro lado, el espectacular incremento de la acuicultura en los últimos 15 años y el estancamiento de la producción pesquera, origina uno de los debates de mayor actualidad en el ámbito que nos ocupa, ante la posible futura sustitución de la pesca tradicional por la crianza de los peces y otras especies como método de obtención de alimentos. Si bien este hecho aún no se ha producido, a continuación exponemos una serie de ventajas e inconvenientes de la acuicultura frente a la pesca y por tanto a favor y en contra de la total sustitución (Mas Álvarez, 2006):

Ventajas

- ✚ Tipificación de los productos. Calidad y frescura uniformes.
- ✚ Regularización de la producción y producción fuera de temporada.
- ✚ Uso de aguas y zonas improductivas o de difícil empleo para otras actividades.
- ✚ Transformación y aprovechamiento de residuos y subproductos de otras actividades humanas.
- ✚ Aprovechamiento de energías residuales.
- ✚ Oferta de empleo estable.
- ✚ Aprovechamiento de aguas jurisdiccionales e independencia para el autoabastecimiento.
- ✚ Estabilización de precios en mercado.
- ✚ Posibilidad de control sanitario, mejoras zootécnicas y de selección y manipulación genética de los animales producidos.
- ✚ Repoblación de especies marinas y continentales; restauración o mejora de poblaciones y hábitat naturales.

Inconvenientes

- ✚ La pesca tradicional seguirá siendo un método económico de abastecer la demanda de pescado para determinadas especies de difícil domesticación.
- ✚ Las aguas constituyen una reserva de pescado que se repone de forma natural y que resulta difícil de agotar si se respetan los límites de capturas en cantidad, tallas o temporadas.
- ✚ Los animales acuáticos requieren procedimientos especiales de domesticación, manejo y producción, difíciles y costosos y no siempre realmente económicos. Puede que siga siendo mucho más fácil, e incluso barato, pescar (y no criar) a algunos de ellos.
- ✚ El impacto medioambiental negativo de las actividades de crianza en acuicultura es potencialmente elevado. Aunque debemos recordar que la pesca extractiva también lo tiene (contaminación por combustibles de embarcaciones, daños a bancos y poblaciones

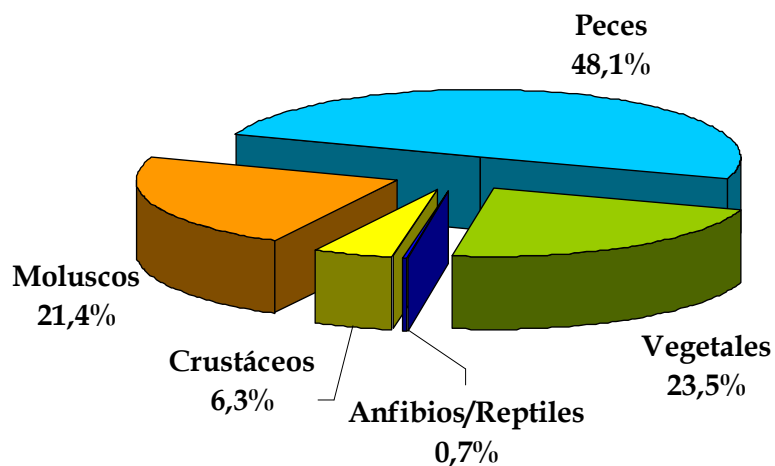
naturales, etc.) y que, en el caso de la acuicultura, es posible disminuirlo con adecuado diseño y gestión de las instalaciones.

✚ Precios estabilizados, pero por debajo de los conseguidos por productos de la pesca (que se siguen considerando, muchas veces sin justificación, de mayor calidad) que pueden afectar negativamente a la comercialización y frenar el negocio, la expansión y crecimiento de las empresas acuícolas.

1.1.3. LA ACUICULTURA EN EL MUNDO.

La producción acuícola mundial estimada en el año 2005 fue de 62,9 millones de toneladas, incluyendo un total de 240 especies de plantas y animales acuáticos en todo el mundo (APROMAR, 2007). El 48,1 % de esta producción son peces, el 23,5 % son vegetales acuáticos, un 21,4 % son especies de moluscos, el 6,3 % crustáceos y un 0,7 % especies de anfibios y reptiles (Figura 2). El 49,9 % del total de la producción se desarrolla en aguas marinas, correspondiendo el 44,0 % a producciones de agua dulce y un 6,1% a aguas salobres.

Figura 2. Producción de la acuicultura en el mundo, 2005. APROMAR, 2007.



Por áreas de producción, China representa un 68,7% de la producción mundial con 43,3 millones de toneladas anuales, mientras que el resto del continente asiático y región del océano Pacífico (por este orden India, Indonesia, Filipinas, Vietnam, Japón, Tailandia, República de Corea, Bangladesh y Chile) agrupan el 21,2% con 13,4 millones de toneladas anuales, quedando el 10% restante (6,3 millones de toneladas) para el resto de continentes y países (FAO, 2006).

Según las estadísticas del último informe de la FAO (2006), la contribución de la acuicultura al suministro mundial de pescado, crustáceos y moluscos continúa creciendo cada año. Así lo demuestra el hecho de que en 1970 representaba el 3,9 % de la producción total en peso y en los últimos datos, del año 2005, ya supone el 40 % de la producción mundial (62,9 millones de toneladas anuales) y se estima que supere porcentajes del 50 % en 2020 (APROMAR, 2006). El crecimiento de este sector, aproximadamente de un 8,9 % cada año desde 1970, sigue siendo más rápido que el logrado en cualquier otro sector de producción de alimentos de origen animal, como la producción de carne de especies de abasto convencionales, que es de un 2,8 % al año, o la de la pesca de captura, un 1,2 % al año en las buenas épocas.

La lista compuesta por las diez especies criadas más importantes (excluyendo el cultivo de plantas acuáticas), suma alrededor del 90 % de la producción mundial; de todas ellas, el ostión u ostra japonesa (*Crassostrea gigas*) con 4,5 millones de toneladas en el año 2005, es la especie más importante en la acuicultura mundial, seguida por tres especies de carpas de agua dulce: la plateada (*Hypophthalmichthys molitrix*), la común (*Cyprinus carpio*) y la herbívora (*Ctenopharyngodon idella*), con cerca de 4 millones de toneladas cada una. Es por ello que el grupo de peces criados más importante en el mundo, en términos de biomasa producida, sea el de las carpas y otros ciprínidos, que representa el 42 % - cerca de 20 millones de toneladas - de la producción total acuícola de peces, crustáceos y moluscos.

Las tilapias, con una producción por encima de los 2 millones de toneladas anuales, son la segunda especie de agua dulce más producida en el mundo.

La producción de crustáceos en 2004 se elevó a 3,6 millones de toneladas y detrás, con una producción cercana a los 2 millones de toneladas, aparecen los salmónidos, familia en la que se encuentra el salmón atlántico (*Salmo salar*), del que se produjeron 1,24 millones de toneladas y la trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*), de la que se crían aproximadamente 750.000 toneladas anuales.

Respecto a la piscicultura marina, gracias a la producción asiática, las especies englobadas en el género *Seriola* siguen siendo, desde hace muchos años las protagonistas, con cifras anuales en torno a las 170.000 toneladas (de la Gándara, 2006).

Finalmente cabe destacar, en los últimos años, la aparición en acuicultura de dos especies con un incremento de producción importante: en primer lugar, el bacalao (*Gadus morhua*), criado principalmente en Noruega e Islandia, con una producción de sólo 4.000 toneladas anuales pero con incrementos anuales espectaculares; y, en segundo lugar, el atún (*Thunnus thynnus*), que se engorda en jaulas flotantes y es una actividad emergente en México, Australia y el mar Mediterráneo que suma en todo el mundo 11.000 toneladas anuales (Annon, 2004; de la Gándara, 2006).

1.1.4. LA ACUICULTURA EN EUROPA.

La acuicultura es una fuente cada vez más importante de pescado en Europa, representando el 18% del volumen de su producción pesquera; en algunos países, como Finlandia, Noruega, Grecia o Alemania, su relevancia económica y social supera ya a la de la pesca extractiva. Si bien la producción europea solo representa poco más del 3 % de la producción mundial, Europa es líder de producción en las principales especies

piscícolas que cultiva: salmón atlántico (*Salmo salar*), trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*), dorada (*Sparus aurata*), lubina (*Dicentrarchus labrax*), y rodaballo (*Psetta maxima*).

Según datos de 2006, el 67,8 % de la producción total europea corresponde a crianza de peces, el 32,1 % a la producción de moluscos y un escaso 0,01 % a la cría de crustáceos. Centrándonos en la piscicultura (producción de peces), el principal productor europeo en 2006 ha sido Noruega con 690.950 toneladas, seguida de Reino Unido (135.814 toneladas), Grecia (100.000 toneladas), Turquía (86.250 toneladas), España (65.472 toneladas) e Italia (59.480 toneladas) (Federación Europea de Productores de Acuicultura, FEAP, 2006) (Tabla 2).

El ritmo de crecimiento de la piscicultura en Europa ha sido del 7 % anual en los últimos 10 años, alcanzándose en 2006 más de 1,4 millones de toneladas (FEAP, 2006). La Comisión Europea pretende que, en los próximos diez años, la acuicultura europea alcance la situación de una actividad estable e importante en el desarrollo de las zonas rurales y costeras, y que, al mismo tiempo, ofrezca al sector de la pesca extractiva alternativas en producción y empleo (APROMAR, 2006).

Tabla 2. Producción de la piscicultura europea por especies cultivadas en el año 2006. EAFP, 2006.

Especie	Toneladas	%
Salmón	763.648	53,6%
Trucha	334.060	23,5%
Dorada	113.585	8%
Lubina	96.447	6,8%
Carpa	72.660	5,1%
Peces planos	9.020	0,6%
Anguila	7.790	0,5%
Silúridos	6.760	0,5%
Tilapia	750	0,1%
Esturión	65	0,004%
Otros continental	350	0,02%
Otros marinos	18.695	1,3%
TOTAL	1.423.830	100,0

1.1.5. LA ACUICULTURA EN ESPAÑA.

La acuicultura en España es hoy un sector productivo maduro, afianzado y en continuo crecimiento. Situado en el puesto número 15 de la clasificación mundial de productores acuícolas, y segundo país europeo después de Noruega, España aporta el 25 % de la producción acuícola europea (JACUMAR, 2007).

El importante desarrollo de la acuicultura en España puede justificarse por sus características geográficas - abundancia de costas y acuíferos con potencial productivo - y de clima, así como por las progresivas dificultades para obtener pescado suficiente mediante la pesca, para cubrir la demanda creciente de este grupo de alimentos. Todo ello se basa en los hábitos alimenticios tradicionales de la población española, cuyo consumo de pescado *per cápita*, (46 Kg/persona/año), es de los más elevados si se compara con la media mundial (16,2 Kg/persona/año), y permite vislumbrar un buen futuro a este sector de la economía española (APROMAR, 2007).

Hasta la década de 1980 la producción acuícola española se centraba en el cultivo del mejillón, iniciado en Galicia en los años 40, y en la crianza de trucha arco iris, cuyo desarrollo se consolidó en los años 70. Sin embargo, a partir de los 90, con la incorporación de nuevas tecnologías y una mayor industrialización del sector, se comenzaron a criar nuevas especies piscícolas, como el rodaballo en el norte, y la dorada y la lubina en el sur y levante de España, Baleares y Canarias. Además, se incrementó la producción de mejillón y se mejoraron los métodos empresariales en las explotaciones de trucha arco iris (JACUMAR, 2007).

En el año 2006, la producción acuícola en España alcanzó un total de 374.365,3 toneladas (APROMAR y JACUMAR, 2007), de las que un 82,4 % correspondió a la producción de moluscos y un 17,5 % a la piscicultura, completando con un 0,001 % la producción de crustáceos (Tabla 3). Esta

INTRODUCCIÓN

producción supone un 38,5 % de la producción pesquera española en ese mismo año.

Tabla 3. Producción acuícola española en el año 2006 por especies. JACUMAR y APROMAR 2007.

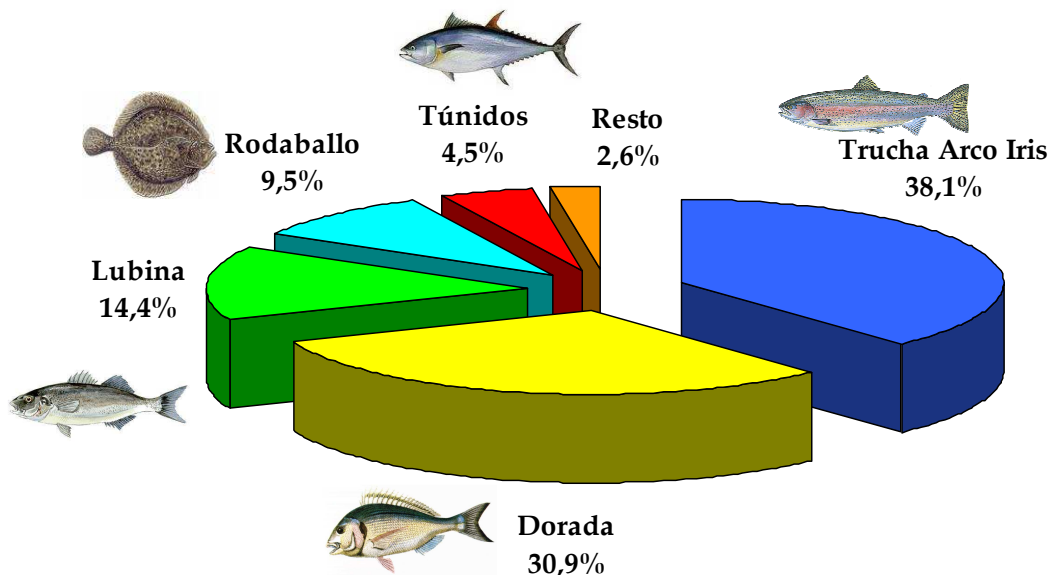
ACUICULTURA MARINA		ACUICULTURA CONTINENTAL	
Especie	Toneladas	Especie	Toneladas
Peces		Peces	
Dorada	20.220,9	Trucha Arco Iris	24.942,7
Lubina	9.438,8	Esturión	102,0
Rodaballo	6.214,2	Anguila	70,0
Túnidos	2.938,7	Tenca	42,8
Corvina	845,2	Total	25.157,5
Anguila	328,3	Crustáceos	
Besugo	134,4	Cangrejo Señal	0,4
Lisa	103,2		
Lenguado	80		
Abadejo	9,9		
Sargo	0,7		
Baila	0,4		
Total	40.314,7		
Moluscos			
Mejillón	301.865,9		
Ostras	4.787,9		
Almejas	1.505,9		
Berberecho	507,2		
Pulpo	10,7		
Escupiña	4,4		
Pectínidos	0,4		
Navaja	0,04		
Total	308.682,4		
Crustáceos			
Camarón	133,2		
Langostino	76,7		
Cangrejo Rojo	0,4		
Total	210,3		
Total		Total	
Acuicultura		Acuicultura	
Marina	349.207,4	Continental	25.157,9
TOTAL ACUICULTURA ESPAÑOLA		374.365,3	

En términos de biomasa, el primer puesto en crianza de especies acuícolas lo ocupa el mejillón, con una producción de 301.865,8 toneladas y

representando un 80,6 % del total de la producción de la acuicultura española en 2006. Este tipo de producción acuícola, que se obtiene mayoritariamente en bateas flotantes fondeadas en las rías gallegas, es muy dependiente de las condiciones naturales y sufre importantes altibajos. Es por ello que, al considerar las estadísticas dentro de España y al igual que ocurre con las algas y microalgas en los datos de producción mundial, su presencia siempre importante, pero variable según los años, enmascara o cubre las variaciones de la producción de otras especies.

Al mismo tiempo, existen grandes esperanzas en la completa domesticación del pulpo (*Octopus vulgaris*) de gran valor comercial en el mercado (Chapela y col., 2006), aunque los problemas de mortalidad encontrados en las fases juveniles están retardando su desarrollo y expansión (Iglesias y col., 2000).

Figura 3. Producción acuícola de las cinco especies de peces más representativas en España (2006).

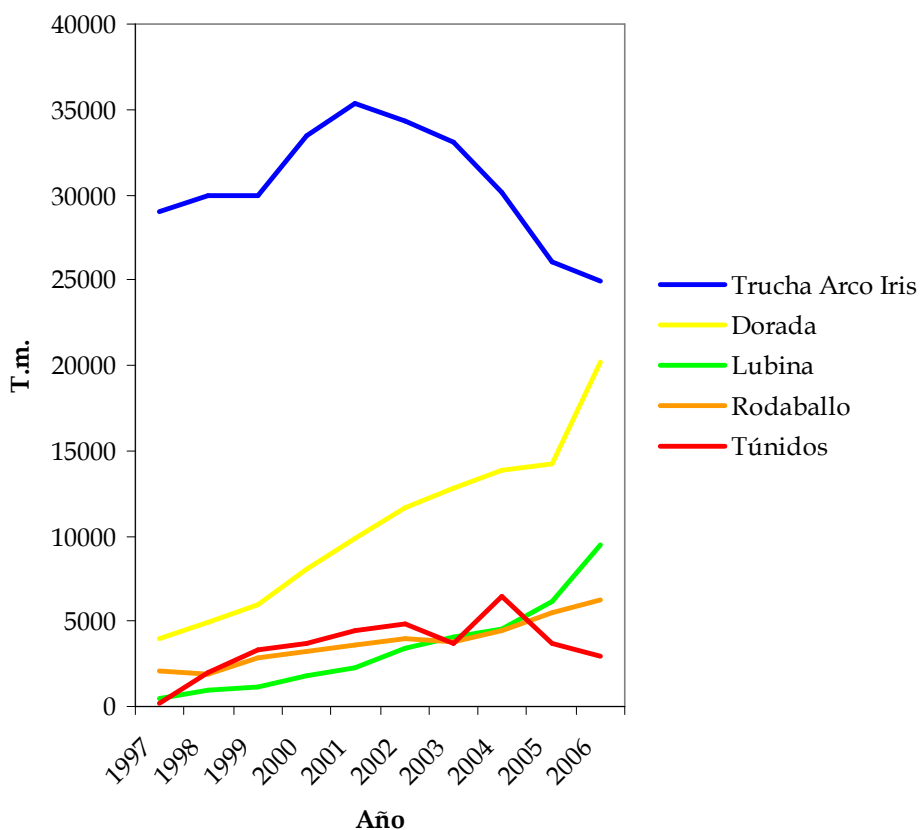


Centrándonos en la piscicultura, la producción total alcanzada en 2006 fue de 65.472,2 toneladas, correspondiendo un 61,6 % a especies marinas y un 38,4 % a especies continentales. La cría de la trucha, dorada, lubina, rodaballo y el engorde de atún, representan el 97,4 % de la

producción total (Figura 3). Y, si bien la producción de trucha arco iris en España ha sufrido un descenso de casi 10.000 toneladas en los últimos cuatro años, las otras cuatro especies marinas están en continua expansión, gracias a la diversidad y buenas condiciones de las costas españolas (Figura 4). Así, el incremento anual de la producción de dorada y lubina en el año 2006 ha sido superior al 45% en ambas especies y en el caso del rodaballo, España, con una producción de 6.214 toneladas en 2006 es el primer productor mundial representando el 82% de la producción total europea.

Por otra parte, en los últimos años se viene desarrollando la crianza de nuevas especies con objeto de diversificar la oferta y así mantener la demanda (de la Gándara, 2006). A este respecto, están empezando a aparecer en el mercado producciones importantes de anguila (*Anguilla anguilla*), lenguado (*Solea senegalensis*) y corvina (*Argyrosomus regius*).

Figura 4. Producción acuícola española de trucha arco iris, dorada, lubina, rodaballo y túnidos (periodo 1997-2006). APROMAR, 2007.



1.2. NUTRICIÓN EN ACUICULTURA.

1.2.1. GENERALIDADES.

El desarrollo sostenible de la acuicultura intensiva, basada en la alimentación controlada de los peces, depende de la utilización óptima de los nutrientes por parte de las especies criadas o engordadas y del mantenimiento de la calidad del agua. Por norma general, se debe tener en cuenta el cómo, el cuándo, el cuánto y el qué a la hora de hablar de alimentación de peces, considerando las distintas especies y las diferentes condiciones de crianza (Lázaro, 2001). El control sobre el equilibrio nutricional, la disponibilidad de materias primas y nutrientes esenciales, la palatabilidad y las propiedades físicas de los alimentos para los peces resultan necesarios para conseguir una correcta nutrición y el éxito en la producción (Maura i Rayó, 1990).

Los orígenes de la alimentación en piscicultura se remontan lógicamente a los orígenes de los distintos sectores como tales. Los primeros piscicultores de truchas usaban pescado fresco, de suministro irregular y difícil conservación. Con la aparición de los primeros piensos compuestos, se facilitó el desarrollo de la producción industrial; aunque bien es cierto que, debido a los escasos conocimientos sobre la nutrición de los peces disponibles en los años 70, la composición de estos piensos distaba mucho de ser la más adecuada, cuando no producía problemas directos.

La técnica de formulación y fabricación de piensos compuestos contribuye en gran medida al éxito de la acuicultura por ser el factor de mayor coste en la producción oscilando entre un 50 y 70 % de la misma. La selección de las materias primas constituyentes de los piensos y el conocimiento de su composición química, mineral y vitamínica, incluyendo los factores nutricionales y antinutricionales, es de extrema importancia para obtener piensos equilibrados al menor coste posible (Maura i Rayó,

1990). Además de conocer las características de los alimentos para los peces, el éxito de la nutrición piscícola también pasa por el conocimiento de las necesidades de nutrientes y de las características etológicas de las diferentes especies piscícolas en cada fase de su desarrollo.

De esta manera, se pueden fabricar piensos con mayor o menor flotabilidad, humedad o relación grasa-proteína en función de necesidades nutricionales y hábitos alimenticios específicos o condiciones particulares del agua. Asimismo, existen toda una serie de fórmulas específicas para cubrir necesidades diferentes en cada fase del ciclo productivo, como son, por ejemplo, las de preparados para larvas de peces marinos, los piensos medicados, las raciones enriquecidas para combatir procesos de estrés y las fórmulas pigmentantes, que en unos casos confieren tono asalmonado al filete de pescado y en otros realzan o acentúan el brillo o irisación exterior de los ejemplares producidos (Más Alvarez, 2006).

Igualmente importante resulta considerar, que la alimentación de los peces con piensos compuestos puede acarrear la transmisión de agentes infecciosos, parasitarios o tóxicos y puede producir efectos indeseables sobre el color y el sabor de los pescados obtenidos (Maura i Rayó, 1990).

1.2.2. TIPOS DE PIENSOS.

Los alimentos para los peces de granja se dividen en tres grupos: piensos húmedos, piensos semihúmedos y piensos secos (Barnabé, 1996; Lázaro, 2001).

A.- PIENSOS HÚMEDOS.

Los piensos húmedos contienen más del 50 % de agua y se elaboran con pescados de escaso valor en el mercado y desechos de restaurantes, pollería o mataderos. Es necesaria cierta trituración y elaboración para que

el alimento quede con una textura, consistencia y tamaño aceptables para el pez que se cría y se deben de almacenar en congelación si su consumo no va a ser inmediato. El índice de transformación de estos alimentos es bastante elevado (New, 1987) y suelen estar indicados en áreas geográficas en las que, por el precio de los ingredientes, resultan más económicos que otros tipos de piensos o como complemento de piensos secos principalmente para reproductores, o de finalizadores o para aquellas especies de alevines que no aceptan otro tipo de alimentos.

Los inconvenientes de los piensos húmedos son varios: (1) los gastos elevados de almacenamiento y preparación, (2) las pérdidas de nutrientes, (3) la alteración de la calidad del agua, (4) la posible transmisión de enfermedades, (5) la composición variable y (6) la estabilidad limitada. Si a ello añadimos la competencia por algunas de las materias primas con otras industrias con mayor poder adquisitivo, casi siempre será más recomendable el uso de piensos semihúmedos o secos (Lázaro, 2001).

B.- PIENSOS SEMIHÚMEDOS.

Se consiguen al mezclar alguno de los ingredientes de piensos húmedos con una parte seca, formada generalmente por distintos tipos de harinas de pescados, carne, huesos y vegetales, así como por premezclas vitamínicas y/o minerales, de forma que se obtiene entre un 20 y 45 % de agua. Tienen mayor valor nutritivo y menores pérdidas de nutrientes que los piensos húmedos y su parte seca requiere formulación y fabricación industrial.

La presentación final puede ser en forma de una masa pastosa, ideal para la alimentación de anguilas (Usui, 1979), o presentarse como granulados semihúmedos, obtenidos industrialmente al hacer pasar la mezcla por máquinas similares a las de fabricación de macarrones o spaghetti. No obstante, también requieren un almacenamiento refrigerado,

así como agentes aglomerantes para no disgregarse en el agua y están indicados en aquellas especies piscícolas que no toleran bien del todo los piensos secos.

El primer pienso producido a gran escala para acuicultura fue uno de tipo semihúmedo granulado fabricado en Oregón (*Oregon Moist Pellet, OMP*) para la alimentación completa de truchas y salmones, compuesto por un 40% de parte húmeda pasteurizada y un 60% de parte seca (harina de pescado, salvado de trigo y levadura).

C.- PIENSOS SECOS.

Los piensos secos están ampliamente extendidos en la actualidad para la alimentación de los peces de crianza. Su fabricación requiere procesos industriales y su contenido en agua es menor del 12 %. Debido a las ventajas nutritivas, productivas y de manejo que presentan con respecto a los piensos húmedos y semihúmedos (Scheideler, 1995), la investigación y desarrollo se centra actualmente en el uso de este tipo de alimentos, a ser posible, desde la alimentación de fases larvarias hasta alcanzar el peso comercial en los ejemplares adultos, sin olvidar el crecimiento durante la recría y el mantenimiento de reproductores de cada especie. Las ventajas que determinan el uso de piensos secos compuestos, siempre que sea posible son (Lázaro, 2001):

- ✚ Composición y suministro constante y regular.
- ✚ Fácil almacenamiento y distribución: no necesitan frío y ocupan menos espacio, ya que los nutrientes están más concentrados.
- ✚ Menor olor del producto final.
- ✚ Hacen posible la automatización del suministro a los peces en las piscifactorías.

- ✚ Mayor palatabilidad y digestibilidad de los nutrientes. Dan lugar a poco desperdicio.
- ✚ Requieren manipulaciones mínimas en las instalaciones acuícolas.
- ✚ Reducen el riesgo de transmisión de enfermedades infecciosas, parasitarias y de biotoxinas, gracias al calor y/o presión de los procesos de fabricación.
- ✚ Mejor consistencia y propiedades organolépticas de los animales alimentados con ellos, que se pueden ajustar a preferencias del mercado con raciones adaptadas, como las de tipo pigmentante o saborizante.
- ✚ Más estables en el agua, cuya calidad se mantiene mejor que con el uso de piensos húmedos o semihúmedos.
- ✚ Menor coste por kilogramo producido, en la mayoría de los casos.

Los piensos compuestos secos para peces, pueden clasificarse, a su vez, en dos tipos, dependiendo del modo de fabricación: piensos granulados - fabricados mediante aglomeración o prensado- y piensos extrusionados - elaborados mediante extrusión-.

C.1.-Piensos granulados

Los piensos granulados fueron los primeros piensos secos fabricados para la alimentación en piscicultura. La granulación o aglomeración consiste en la asociación y prensado de la mezcla de ingredientes, previamente homogeneizada, proporcionando una presentación adecuada. Durante el proceso se utiliza vapor de agua, calentando la mezcla entre 50° y 80° C durante 3-5 minutos. Además, la fricción de la maquinaria con los ingredientes de la fórmula proporciona un calentamiento adicional de la masa de 5° a 10° C, por lo que, para evitar su degradación, los lípidos y vitaminas deben ser añadidos con posterioridad

y remezclados después (Barnabé y Lecoz, 1987). La adición de aceite en esta mezcla no debe sobrepasar el 12 % para evitar la rotura del gránulo (Barnabé, 1996) y, para facilitar la cohesión del producto, suelen añadirse agentes aglutinantes, como sepiolitas o gelatinas, no siendo práctica común añadir agua (Lázaro, 2001).

C.2.-Piensos extrusionados

Para mejorar la calidad, composición y digestibilidad de los alimentos secos en acuicultura, a principios de los años 90 se empezó a aplicar, en la fabricación de piensos para peces, una nueva tecnología basada en la cocción-extrusión de los ingredientes (antes de la granulación) mediante una fuerte presión de vapor de agua (Hancock, 1992).

La extrusión es un proceso completo y continuo que combina distintas operaciones unitarias: transporte, mezcla, amasado, cocción y moldeado. Su principal objetivo es homogeneizar y diversificar los ingredientes básicos en la fórmula para obtener productos de alta digestibilidad y muy variados en cuanto a forma y textura. Esta técnica permite mejorar la digestibilidad de ciertos nutrientes, especialmente la del almidón, carbohidrato importante en las fórmulas sometidas a este proceso, permitiendo incorporarlas en mayor o menor medida, a la vez que produce cierta esterilización del producto debido a las altas temperaturas a las que se somete la mezcla inicial. Gracias a todo el proceso, el agua del almidón se vaporiza, produciéndose la gelatinización y expansión del mismo, lo que permite obtener gránulos moldeables, de flotabilidad controlada y que no producen polvo (Barnabé, 1996).

A diferencia de la granulación, la extrusión del pienso permite conferirle mayor estabilidad en el agua y controlar mejor la adición de grasas de acuerdo con las necesidades de cada especie piscícola. Hoy en día, muchos de los peces de granja se alimentan con piensos extrusionados,

cuyo proceso de fabricación básicamente incluye los siguientes pasos (Rokey, 1995):

- ✚ **Formulación**: elección de ingredientes y materias primas principales. Pesaje y premezcla.
- ✚ **Molienda**: mediante fricción de martillos alcanzándose temperaturas de 75°C durante 10 minutos.
- ✚ **Mezcla**: adición de pigmentos, aditivos, vitaminas y minerales.
- ✚ **Preacondicionamiento**: calor por vapor y prehumidificación durante 3 minutos a 95-100°C.
- ✚ **Extrusión**: calor por presión y fricción mecánica en tornillos poligonales, alcanzando durante 10 segundos temperaturas de 140°C.
- ✚ **Secado**: calor por vapor seco decreciente con temperaturas de 155-175°C durante 6 minutos.
- ✚ **Reengrasamiento y enfriamiento**: adición de aceites hasta alcanzar temperatura ambiente.
- ✚ **Envasado y almacenamiento**.

1.2.3. HARINAS DE PESCADO.

1.2.3.1. FABRICACIÓN Y CLASIFICACIÓN.

Las harinas de pescado se obtienen por molturación y desecación de pescados enteros, de partes de éstos o de residuos de la industria conservera sin ningún valor para el consumo humano (FEDNA, 2006). El rendimiento aproximado del procesado industrial del pescado suele ser de un 72 % en agua, un 22 % en harina y un 6 % de aceite. El proceso consiste en picado, molido y cocción a 90°C, seguido de prensado y centrifugación para extraer el aceite; la última fase es la desecación de la harina hasta un

INTRODUCCIÓN

máximo de un 10 % de humedad y la adición de antioxidantes y estabilizantes para evitar el rápido proceso de enranciamiento de la grasa (Sandbol, 1993).

Hoy en día las harinas de pescado se clasifican en función del porcentaje aproximado de proteína bruta que contienen. Así, existen harinas del 57, 60, 65 y 70 % y, recientemente, se han desarrollado nuevos procedimientos basados en la utilización de pescado entero fresco y bien conservado que se deseca a temperaturas inferiores a 70°C. Gracias a este nuevo proceso de fabricación, las harinas pueden llegar a contener más de un 70 % de proteína bruta denominándose harinas de pescado LT.

Los usos de las harinas de pescado son variados, aunque básicamente se emplean para la nutrición de peces, así como para ganado porcino y aves en sus primeras etapas de vida, aprovechando la escasa antigenicidad de las proteínas que contienen (Pike, 1998). Las fotos 1 y 2 muestran el aspecto macroscópico de dos tipos de harinas de pescado comerciales.

La producción mundial de harina de pescado en 2005 fue superior a los seis millones y medio de toneladas, siendo Perú el principal fabricante del mundo, con casi 2 millones de toneladas. Este país y Chile, aportan algo más de la mitad de la producción mundial, obteniendo las harinas, principalmente, mediante el procesado de anchoas del Pacífico Sur (IFFO, 2005).



Fotos 1 y 2. Aspecto macroscópico de dos tipos de harinas de pescado.

1.2.3.2. SITUACIÓN ACTUAL DE LA PRODUCCIÓN DE HARINA DE PESCADO.

El desarrollo de la acuicultura intensiva a nivel mundial, se encuentra condicionado a la disponibilidad de materias primas para la alimentación de las especies criadas. La harina y el aceite de pescado son las principales materias primas utilizadas como fuente de proteína y energía, respectivamente, en alimentos para peces, sobre todo para la cría intensiva de especies carnívoras.

Las harinas de pescado de alta calidad son, sin duda, la mejor fuente proteica para los peces de granja, gracias a su alta digestibilidad y a que su composición aminoacídica es muy próxima al perfil de necesidades de la mayoría de las especies (Cowey, 1994). Este hecho ha determinado que, paralelamente al desarrollo de la piscicultura intensiva, se haya disparado la demanda de harina de pescado, ya que, en ocasiones, representa hasta un 60 % del total de las fórmulas para piensos de peces. Como consecuencia, existe la posibilidad de que la oferta de harinas de pescado a nivel mundial no siga el mismo ritmo que su demanda para la nutrición ganadera y sobre todo piscícola y, por ello, que peligren las garantías de su suministro (Pike, 1998). Entre tanto, su precio se ha encarecido de tal forma que la sustitución total o parcial de la harina de pescado por otras materias primas proteicas se ha convertido en objetivo prioritario de la investigación de nutrición y formulación en acuicultura.

Como alternativas a la harina de pescado, actualmente se está probando el uso de proteína vegetal, como la procedente de harinas de soja, guisante, altramuz, colza, arroz o girasol, así como de gluten de maíz o trigo (de la Gándara, 2006). Estas materias primas tienen un precio más asequible por su mayor disponibilidad; sin embargo, pueden contener factores antinutricionales y no aportar suficientes minerales, energía y aminoácidos esenciales para garantizar la correcta nutrición de los peces de granja.

Por otra parte, también se ha estudiado el uso de otras proteínas de origen animal, como las de harinas de carne, hemoderivados e hidrolizados proteicos. A diferencia de los vegetales, estas materias primas suponen una fuente de energía, vitaminas, minerales y aminoácidos esenciales muy buena y no contienen factores antinutricionales. Aunque en el caso de las harinas de carne, tras la aparición de casos de encefalopatías espongiformes en Europa, se prohibió su uso para la fabricación de casi todos los piensos compuestos para evitar problemas y riesgos sanitarios (Reglamento Europeo 1774/2002).

1.2.4. TRANSMISIÓN DE ENFERMEDADES A TRAVÉS DE LA ALIMENTACIÓN ANIMAL.

La transmisión de bacterias a través de las materias primas y los piensos compuestos utilizados para la alimentación animal, es un hecho ampliamente conocido y de plena actualidad a raíz de la aparición de enfermedades emergentes (Crump y col., 2002). Las materias primas utilizadas para fabricar piensos compuestos, así como el producto final acabado - si no es sometido a tratamientos térmicos eficaces durante la propia fabricación - pueden suponer una importante vía de transmisión de bacterias zoonóticas en producción animal (Rokey, 1995; Tejedor y col., 2005). Bacterias de los géneros *Salmonella*, *Campylobacter*, *Listeria* o *Escherichia*, cobran un especial interés en este ámbito por su implicación en graves e importantes problemas de Salud Pública, pudiendo llegar al hombre a través de alimentos procedentes de animales que, previamente, pueden haber sido contaminados por los piensos que consumieron durante su explotación (Gangarosa y col., 1973; Skirrow, 1990; Mead y Griffin, 1998).

Existen numerosos ejemplos de aislamientos de microorganismos de diferentes géneros bacterianos aislados a partir de animales (ganado vacuno, porcino, aves o roedores), infectados a través del pienso

consumido, así como casos de toxiinfecciones alimentarias en humanos tras el consumo de alimentos contaminados (Crump y col., 2002).

En el caso de las harinas de pescado, al tratarse de residuos de origen animal, presentan el riesgo de contener agentes bacterianos que pudieran estar presentes en los peces de los que proceden (Hauge, 1969; Nesse, 2003). Con el fin de preservar las características nutricionales de las harinas de pescado, las fábricas de procesado de esta materia prima no siempre someten al producto a elevadas temperaturas mantenidas en el tiempo (Sandbol, 1993), por lo que no garantizan la eliminación total de los agentes bacterianos que la harina pudiera vehicular (Morris y col, 1970).

Sin embargo, como hemos comentado anteriormente, la nutrición piscícola actual presenta un alto grado de innovación y tecnología, no solo por las características de las materias primas que incorpora, sino también porque las temperaturas alcanzadas en los procesos de extrusión, a diferencia de las aplicadas para granulación, garantizan la eliminación de cualquier forma bacteriana existente en la mezcla inicial (Welti y col., 2000), y permiten obtener productos considerados microbiológicamente estériles (Rokey, 1995).

No obstante, subsiste la posibilidad de que se produzcan contaminaciones cruzadas de los piensos compuestos, desde un amplio rango de materias primas y otros sustratos, durante los procesos de almacenamiento y transporte (Morris y col., 1970). Así, se ha comprobado que los patógenos bacterianos que pudieran vehicularse en las materias primas e ingredientes que constituyen el pienso, pueden acantonarse en diferentes estructuras y ambientes de las fábricas de piensos compuestos (silos, utensilios, polvo...), existiendo el riesgo de producirse posteriormente contaminaciones cruzadas sobre el pienso recién fabricado (Nesse y col., 2003). Aunque la implantación de estrictos programas de limpieza y desinfección pudiera minimizar estas contaminaciones, su aplicación eficaz sobre determinadas estructuras y ambientes resulta

complicada y no garantiza la eliminación de que estas contaminaciones cruzadas se produzcan.

Por todo ello, resulta necesario la implantación de estrictos controles de calidad en las diferentes fases de fabricación de los piensos compuestos, desde la recepción de las materias primas hasta la obtención del producto final, independientemente del tipo de fabricación del pienso (Ivanek y col., 2004; Nesse y col., 2005; Miettinen y col., 2006).

Respecto al caso que nos ocupa, se ha comprobado que la transmisión de las estreptocosis de los peces se produce de manera horizontal desde los peces enfermos a los sanos, con la entrada de nuevos lotes de alevines o a través de alimentos contaminados (Minami, 1979; Yasunaga, 1982; Kitao, 1993), siendo la vía alimentaria una de las hipótesis más aceptadas para explicar la difusión de estas enfermedades en especies de crianza (Toranzo y col., 1994; Doménech y col., 1996; Romalde y col., 1996; Eldar y col., 1999; Vendrell y col., 2006).

1.2.5. ENRIQUECIMIENTO SELECTIVO Y PCR COMO CONTROL DE CALIDAD EN LA NUTRICIÓN PISCÍCOLA.

Todo lo anteriormente expuesto justifica la necesidad de establecer controles de calidad en las diferentes fases de fabricación de piensos, desde la recepción de materias primas e ingredientes, hasta el producto final acabado, haciendo especial hincapié en las contaminaciones ambientales que pudieran existir en el interior de las fábricas y durante el transporte (Nesse y col., 2003). De esta manera, se podrían detectar y, en algunos casos si se toman medidas a tiempo, reducir la contaminación de materias primas y piensos y la consiguiente transmisión de la misma a los peces con ellos alimentados.

Para este control es necesario disponer de metodologías altamente sensibles que permitan detectar microorganismos específicos en muestras potencialmente contaminadas con un amplio rango de especies bacterianas. La combinación del enriquecimiento selectivo y la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es una metodología muy adecuada para el análisis de muestras muy contaminadas (Wilson y Carson, 2001).

Podemos definir medios de enriquecimientos selectivos, aquellos normalmente complejos que constan de aditivos adicionales en su composición para potenciar el crecimiento de determinados microorganismos y/o inhibir el de otros.

Por otra parte, la técnica PCR está basada en la amplificación *in vitro* de fragmentos específicos del ADN, que se encuentran situados entre dos regiones conocidas del genoma. El objetivo es la obtención de un gran número de copias de ese fragmento, para poder ser detectado a continuación de manera específica. Esta técnica aporta rapidez, sensibilidad, especificidad y reproducibilidad sin restar sencillez.

Los límites de sensibilidad de la detección bacteriana por PCR directa sin enriquecimiento previo en muestras biológicas, alimentarias y medioambientales están entre 10^4 y 10^5 Unidades Formadoras de Colonia (UFC) por gramo (Sayer y Layton, 1990; Swaminathan y Feng, 1994; McIntosh y col., 1996). Sin embargo, la baja concentración bacteriana y la distribución irregular de las bacterias diana en este tipo de muestras, así como la presencia de micropoblaciones competitivas y sustancias inhibitoras de la PCR (Löfström y col., 2004), podrían dificultar la detección de los microorganismos. Por tanto, para evitar estos inconvenientes es necesaria en ocasiones la combinación de la técnica PCR con el uso de medios de enriquecimiento selectivo. Ello puede permitir también aproximarnos al estándar internacional de 1 UFC en 25g de muestra (Malorny y col., 2003). De todo ello se deduce que el enriquecimiento selectivo previo a la PCR puede tener efectos positivos en

la sensibilidad de detección agentes bacterianos (Bohner y col., 1992; Fitter y col., 1992; Witham y col., 1996; Sharma y col., 2000; Wilson y Carson, 2001), ya que:

- ✚ Multiplica el número de bacterias diana hasta niveles fácilmente detectables.
- ✚ Diluye las sustancias inhibidoras presentes en la muestra que pudieran interferir en la reacción.
- ✚ Reduce la proporción de micropoblaciones competitivas.
- ✚ Diluye el ADN de las células muertas.
- ✚ Aumenta y facilita las posibilidades de aislar los patógenos estudiados para realizar pruebas complementarias con posterioridad.

A pesar de que esta combinación resulta especialmente eficiente cuando se aplica sobre medios de enriquecimiento inoculados con un cultivo puro, la sensibilidad disminuye ostensiblemente cuando se trata de muestras en las que van a estar presentes elevadas concentraciones de micropoblaciones competitivas, así como posibles sustancias inhibidoras de la PCR (Lantz y col., 2000). Por otra parte, su aplicación conjunta, así como la optimización de los protocolos de extracción de ADN, han permitido la detección de concentraciones bacterianas muy bajas en las muestras problema (Giesendorf y col., 1992; Hernández y col., 1995; Thisted Lambertz y col., 1996; Kim y col., 2006).

Una vez finalizado el proceso de enriquecimiento y detección, y si los objetivos de la técnica o el estudio fueran más amplios, puede resultar conveniente el aislamiento bacteriano para realizar, por ejemplo, estudios de caracterización fenotípica y genética, serológicos o inmunológicos. Sin embargo, al tratarse de muestras naturalmente contaminadas con bacterias, y al ser éstas posteriormente enriquecidas, es probable que en el medio de enriquecimiento puedan multiplicarse otras especies bacterianas distintas a las deseadas. Estas micropoblaciones competitivas, si bien no van a

interferir en la reacción específica de PCR, si pueden, sin embargo, dificultar las tareas de aislamiento de las bacterias problema si no se dispone de medios de aislamiento selectivos y diferenciales.

El empleo de estos medios para el aislamiento de la mayoría de los agentes implicados en toxiinfecciones alimentarias [como los pertenecientes a los géneros *Listeria*, *Salmonella*, *Escherichia* o *Clostridium* (Kim y col., 2006)], es una práctica ampliamente difundida, pero desafortunadamente no existen medios adecuados para géneros bacterianos con menos importancia clínica en medicina humana o veterinaria cuyo aislamiento en muestras enriquecidas puede resultar por tanto muy laborioso.

1.3. ACUICULTURA Y PATOLOGÍA BACTERIANA.

El espectacular desarrollo que ha experimentado la producción intensiva de peces en las últimas décadas, ha producido paralelamente un incremento progresivo en la incidencia y gravedad de las enfermedades infecciosas, especialmente las de etiología bacteriana (Domínguez y col., 2000; Padrós y Furones, 2002; Vendrell y col., 2006). Hoy por hoy, estas patologías representan las principales pérdidas económicas de las explotaciones piscícolas, motivadas en primer lugar por la muerte o devaluación comercial de los peces enfermos, en segundo lugar por el descenso de la producción que ocasionan las infecciones bacterianas en los peces de crianza y en tercer lugar los gastos de tratamiento, profilaxis y control sanitario que se deben realizar en las instalaciones afectadas (Blanco y col., 2004).

Tabla 4. Principales enfermedades de etiología bacteriana que afectan a los peces de cultivo

	ENFERMEDAD	AGENTE ETIOLÓGICO
GRAM POSITIVAS	Estreptococosis	<i>Lactococcus garvieae</i> <i>Streptococcus iniae</i> <i>Streptococcus parauberis</i> <i>Streptococcus agalactiae</i> <i>Lactococcus piscium</i> <i>Vagococcus salmoninarum</i> <i>Carnobacterium piscicola</i>
	Enfermedad Bacteriana Renal (BKD)	<i>Renibacterium salmoninarum</i>
	Micobacteriosis	<i>Mycobacterium fortuitum</i> <i>Mycobacterium chelonae</i> <i>Mycobacterium marinum</i>
	Nocardiosis	<i>Nocardia</i> spp.
GRAM NEGATIVAS	Forunculosis	<i>Aeromonas salmonicida</i> subsp. <i>salmonicida</i>
	Vibriosis	<i>Listonella anguillarum</i> <i>Vibrio vulnificus</i> <i>Vibrio alginolyticus</i> <i>Vibrio ordalii</i> <i>Vibrio harveyi</i> <i>Photobacterium damsela</i> subsp. <i>damsela</i>
	Pasteurellosis	<i>Photobacterium damsela</i> subsp. <i>piscicida</i>
	Yersiniosis (Enfermedad de la boca roja)	<i>Yersinia ruckeri</i>
	Edwardsielosis	<i>Edwardsiella tarda</i> <i>Edwardsiella ictaluri</i>
	Enfermedad del Invierno	<i>Pseudomonas anguilliseptica</i>
	Flexibacteriosis	<i>Tenacibaculum maritimum</i>
	Flavobacteriosis	<i>Flavobacterium psychrophilum</i> <i>Flavobacterium columnare</i> <i>Flavobacterium branchiophilum</i>

En comparación con los sistemas de cría animal en tierra, el medio acuático en el que se desarrolla la piscicultura presenta un contexto totalmente distinto al medio terrestre (tanques de cultivo de circuito abierto, recirculaciones de agua, jaulas en mar...) donde los microorganismos, y en especial las bacterias, juegan un papel extremadamente importante (Padrós y Furones, 2002). Sin embargo, a diferencia de otros ambientes, en el medio acuático existen un número relativamente reducido de bacterias consideradas como patógenas obligadas de peces (Tabla 4). La gran mayoría son oportunistas, microorganismos que en determinadas condiciones pueden actuar como patógenos. Entre estas condiciones destacan todas aquellas modificaciones ocasionadas por la misma actividad de la acuicultura, como los excesos de biomasa, la variación de las condiciones físico-químicas del agua, la inmunosupresión debida al estrés o los contactos forzados entre diferentes especies piscícolas cuando se trata de policultivos.

Por todo ello, en el caso particular del cultivo y cría de peces, los problemas patológicos de origen bacteriano suponen en la actualidad un lastre muy importante para el desarrollo presente y futuro de esta actividad (Padrós y Furones, 2002).

1.3.1. IMPORTANCIA DE LA INFECCIONES POR BACTERIAS GRAM POSITIVAS EN ACUICULTURA.

A excepción de *Renibacterium salmoninarum*, las enfermedades producidas por bacterias Gram positivas han recibido siempre un menor grado de atención comparadas con ictiopatógenos Gram negativos clásicos, tales como *Yersinia*, *Aeromonas* o *Vibrio* (Schäperclaus 1992; Austin y Austin, 1993; Furones y col., 1993), por considerarse que su impacto económico y sanitario en la producción piscícola era poco relevante. Sin embargo, los procesos septicémicos ocasionados por cocos y cocobacilos Gram positivos

catalasa negativos, conocidos de forma general como estreptococosis (Shiomitsu, 1982; Baya y col., 1990; Ceshia y col., 1992; Austin y Austin, 1993; Toranzo y col., 1994; Vendrell y col., 2006), son, a día de hoy, patologías de gran importancia en la acuicultura marina y continental, debido a su aumento notable, tanto en la frecuencia de presentación como en la virulencia con la que se manifiestan, produciendo graves repercusiones económicas para los piscicultores.

Aún así, no son procesos nuevos. Las primeras descripciones de estreptococosis fueron en trucha arco iris a finales de la década de 1950 en Japón (Hoshina y col., 1958) y Estados Unidos (Robinson y Meyer, 1966), sin causar mucho interés. A partir de estos primeros casos, otros nuevos brotes fueron asociados a otras especies cultivables como la lubina, anguila, seriola, esturión o el rodaballo, afectando a los principales países de tradición piscícola como Corea, Estados Unidos, Australia, Sudáfrica y la Europa mediterránea, en los que se observó un aumento significativo en la incidencia anual y la gravedad de los brotes producidos. Desde un punto de vista particular y debido a sus características geográfico-climáticas, España es en la actualidad uno de los países más afectados por estas patologías emergentes (Domínguez y col., 2000).

La gran semejanza en la sintomatología de los brotes producidos por este grupo de bacterias (independientemente del microorganismo implicado en la infección), dificulta su diagnóstico clínico; así mismo, la heterogeneidad fenotípica de las especies bacterianas encuadradas en las estreptococosis de los peces dificulta su identificación mediante sistemas bioquímicos y enzimáticos (Carson y col., 1993a; Toranzo y col., 1994; Moreno y col., 1995, Ravelo y col., 2001; Michel, 2007). Sin embargo, la utilización de técnicas moleculares como la PCR, hibridación del ADN y la secuenciación del ARN ribosómico 16S, han aportado valiosa información. Hoy en día se puede afirmar que existen al menos siete especies diferentes de cocos Gram positivos catalasa negativos responsables de enfermedades en peces sometidos a cría intensiva. De esta manera se demuestra que bajo

el término de estreptocosis se encuentra un conjunto de enfermedades y no una entidad única, como en un principio se afirmaba (Domínguez y col., 2000; Padrós y Furones, 2002).

Podemos dividir las estreptocosis en dos grupos generales relacionando su aparición con la temperatura del agua:

A.- Estreptocosis de agua fría: afectan a los peces cuando la temperatura no sobrepasa los 15 °C y generalmente son procesos crónicos. Este grupo está formado por *Lactococcus piscium*, *Carnobacterium piscicola* y *Vagococcus salmoninarum*.

B.- Estreptocosis de agua caliente: afectan a los peces que se encuentran en aguas con temperaturas superiores a los 15°C ocasionando mortalidades elevadas. A diferencia del grupo anterior, se caracterizan por ser cuadros agudos o hiperagudos. Este segundo grupo está formado por *Lactococcus garvieae*, *Streptococcus iniae*, *Streptococcus parauberis* y *Streptococcus difficilis*. A este respecto, estudios recientes han revelado que *Streptococcus agalactiae* y *S. difficilis* son la misma especie bacteriana (Kawamura y col., 2005).

Respecto a este último grupo, resulta necesario señalar la gran importancia que *S. iniae* representa para la acuicultura de Israel, habiéndose descrito casos en tilapia, trucha arco iris, dorada y lubina ocasionando mortalidades del 30-50% en las explotaciones afectadas (Eldar y col., 1994; Zlotkin y col., 1998b; Shoemaker y col. 2001; Colorni y col., 2002). Además, recientemente se ha descrito su implicación en Salud Pública, habiéndose aislado en humanos con meningitis y osteomielitis, que previamente habían estado en contacto con peces de cultivo enfermos y por tanto cobrando este patógeno un carácter oportunista para los humanos (Lehane y Rawlin, 2000; Lau y col 2003; Romano y Mejía, 2003; Agnew y col., 2007).

Por otra parte, *S. parauberis* significó hace unos años un grave problema para el sector del rodaballo en explotaciones españolas. Sin embargo, gracias al desarrollo de una vacuna particularmente eficaz y a un correcto sistema de vacunación, se consiguió minimizar el impacto de esta enfermedad (Padrós y Furones, 2002). Tras el estudio de los brotes, se sugirió la implicación de la alimentación, como responsable de la introducción de la enfermedad en las piscifactorías afectadas (Toranzo y col., 1994; Doménech y col., 1996).

Por el contrario, la incidencia y gravedad de los brotes producidos por *S. difficilis* es mucho más reducida, habiéndose descrito tan solo brotes en el cultivo de tilapia en Israel, produciendo lesiones y sintomatología nerviosa (meningoencefalitis y natación errática) debido a la afección del sistema nervioso central (Eldar y col., 1994)

Finalmente *L. garvieae*, agente productor de la lactococosis de la trucha arco iris, produjo los primeros brotes en España a finales de los años 80 y principios de los 90 (Doménech y col., 1993; Prieta y col., 1993). Desde entonces todos los años se han diagnosticado brotes de lactococosis, siendo en estos momentos una de las enfermedades infecciosas de mayor repercusión sanitaria y económica para los piscicultores españoles de trucha arco iris (principal especie piscícola criada en España con más de 25.000 toneladas anuales).

1.3.2. *Lactococcus garvieae*, AGENTE PRODUCTOR DE LA LACTOCOCOSIS DE LA TRUCHA ARCO IRIS (*Oncorhynchus mykiss*).

1.3.2.1. ETIOLOGÍA.

El género *Lactococcus* está incluido en la familia *Streptococcaceae* y forma parte del grupo de microorganismos caracterizados como cocos

Gram positivos, catalasa negativos, anaerobios facultativos, cuya importancia clínica, tanto en medicina humana y veterinaria, ha aumentado considerablemente en los últimos años. Constituye uno de los grupos de microorganismos que ha experimentado mayores modificaciones en su clasificación en los últimos 15 años, fundamentalmente tras la utilización en taxonomía bacteriana de criterios quimiotaxonómicos y moleculares (Hardie y Whiley, 1997). En este sentido, quizás el cambio taxonómico más importante fue la creación del género *Lactococcus*, en 1985, para incluir los microorganismos clasificados inicialmente como estreptococos lácticos (Scheilfer y col., 1985). Desde el punto de vista filogenético, se encuadran en el grupo de bacterias Gram positivas de bajo contenido en guanina-citosina, donde se encuentran asimismo otros géneros de gran importancia sanitaria, como *Clostridium*, *Bacillus*, *Listeria* o *Staphylococcus*.

Los microorganismos del género *Lactococcus* se han considerado hasta la última década únicamente como patógenos oportunistas (Aguirre y Collins, 1993). Sin embargo, su papel como patógenos en medicina humana y veterinaria ha cobrado especial importancia clínica en los últimos años, siendo actualmente considerados como patógenos emergentes. De las cinco especies reconocidas en el género *Lactococcus*, tres de ellas, *L. piscium*, *L. garvieae* y *Lactococcus lactis* (con sus dos subespecies, *L. lactis* subsp. *lactis* y *L. lactis* subsp. *cremoris*) son patógenas para el hombre y/o los animales (Wood y col. 1985; Aguirre y Collins, 1993; Facklam y Elliot, 1995; Fefer y col., 1998; Goyache y col., 2001; Antolín y col., 2004; Vendrell y col., 2006).

L. garvieae es un microorganismo anaerobio facultativo, inmóvil, que no forma esporos, positivo a la tinción de Gram que a su vez revela una agrupación en parejas o cadenas cortas. Produce hemólisis- α cuando es cultivado en agar sangre, crece en un 6,5% de NaCl y pH 9,6, y aunque es capaz de multiplicarse entre 4 y 45°C, su temperatura óptima de crecimiento son 30°C (Prieta y col., 1993). Igualmente es capaz de crecer en un variado rango de medios de cultivo, tales como BHI, TSA o BEA

(Vendrell y col., 2006). Sin embargo, este microorganismo es incapaz de multiplicarse en Agar McConkey ni en Agar Enterococcus (Toranzo y col., 1994).

L. garvieae, originalmente denominado *Streptococcus garvieae*, fue aislado por primera vez en Reino Unido en leche de ganado vacuno afectado con mamitis clínica (Collins y col., 1983). Sin embargo, su verdadera importancia clínica surge como agente patógeno de peces produciendo pérdidas de la producción por encima del 50% en acuicultura.

Aunque es asumible su implicación en las estreptocosis de la seriola (*Seriola quinqueradiata*) durante más de 50 años en Japón (Hoshina y col., 1958; Kusuda y Kawai, 1982), no fue hasta 1991 [al volverse a identificar cepas aisladas en los años 70 (Kusuda y col., 1976; Kusuda y col., 1991; Eyngor y col., 2004)], cuando se relacionó su implicación como agente causal de la estreptocosis durante las últimas décadas en este país (Kusuda y col., 1991). En esta ocasión, debido a errores taxonómicos fue identificado y clasificado como *Enterococcus seriolicida*.

Casi al mismo tiempo (finales de los años 80 y principios de los 90), se empezaron a registrar los primeros brotes de lactocosis en truchas arco iris (*Oncorhynchus mykiss*) criadas en piscifactorías españolas (Palacios y col., 1993; Doménech y col., 1993; Prieta y col., 1993), produciendo cuadros clínicos idénticos a los observados en la seriola en Japón (Kusuda y col., 1991).

Estudios bioquímicos de los aislados españoles y la cepa tipo *E. seriolicida* (ATCC 49156^T), mostraron que todos estos aislados eran a nivel fenotípico prácticamente idénticos (Prieta y col., 1993; Doménech y col., 1993). Igualmente, el análisis de proteínas de membrana y la secuenciación del ARN ribosómico 16S determinó, que todas las cepas clínicas aisladas a partir de truchas españolas presentaban una homología del 100% con *E. seriolicida* y sorprendentemente eran indistinguibles de la especie *L.*

garvieae, proponiéndose por ello el término de lactococosis para definir a este proceso septicémico que afectaba a la trucha arco iris cultivada (Prieta y col., 1993). Asimismo, se sugirió la red denominación de *E. seriolicida* dentro de la especie *L. garvieae* (Doménech y col., 1993). La identidad entre estas dos especies bacterianas se ha confirmado posteriormente mediante diferentes estudios genéticos (Pot y col., 1996; Eldar y col., 1996; Teixeira y col., 1996).

La difusión de *L. garvieae* a los principales países productores de truchas de la Europa Mediterránea fue rápida; así un año después de los primeros brotes en España, este microorganismo fue detectado en Italia (Ghittino y Prearo, 1992). Desde entonces se ha difundido rápidamente a un amplio rango de países y animales acuáticos, animales terrestres y variados ambientes (Tabla 5), siendo esto un claro ejemplo de cómo el desarrollo de la acuicultura intensiva influye de manera decisiva en el establecimiento y difusión de patógenos, y como éstos son capaces de adaptarse a nuevos y diferentes nichos.

Sin embargo, a pesar de la gran importancia clínica de la lactococosis en cultivos de trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*) en Europa y de seriola (*Seriola quinqueradiata*) en Japón, todavía se desconocen muchos aspectos relacionados con la epidemiología de esta enfermedad. En España, la cepa epidémica causante de la lactococosis desde el año 1991 a 1994, era diferente a la cepa epidémica actual, que prevalece invariable desde el año 1994 (Vela y col., 2000; Tejedor y col., 2004). Esta información ha quedado corroborada en estudios similares mediante PFGE, RAPD y RFLP, en los que también se ha demostrado que este clon epidémico que afecta a las piscifactorías españolas, no tiene ninguna relación genética con el resto de países afectados como Italia, Israel, Australia (Eldar y col., 1999; Vela y col., 2000; Ravelo y col., 2003; Eyngor y col., 2004) o Japón (Kawanishi y col., 2006). Además, las cepas patógenas en cada uno de estos países, conservan relaciones genéticas estables dentro de la misma región geográfica, siendo sin embargo diferentes respecto al resto de países afectados.

Por otra parte, la capacidad patógena de *L. garvieae* tan solo ha quedado demostrada en especies acuáticas y ganado bovino (vacas y búfalos) (Tabla 5). A este respecto, hasta la fecha se ha realizado un único estudio de patogenicidad en seriola y ratones con cepas aisladas a partir de diferentes especies animales (Kawanishi y col., 2006). Estos autores sugieren que la virulencia y patogenicidad de *L. garvieae* también dependen de su adaptación a la especie hospedadora concreta, no siendo posible demostrar efectos patógenos de esta bacteria en especies diferentes al origen del aislamiento, especialmente entre animales homeotermos y poiquilotermos. A pesar de todo, la falta de información al respecto hace necesario profundizar en estudios epidemiológicos que confirmen la importancia patógena de esta bacteria en el resto de especies animales, así como su distribución ecológica y las fuentes de infección.

Existen grandes lagunas respecto al potencial zoonótico de *L. garvieae*. No cabe duda de que este microorganismo se ha visto implicado en variados procesos clínicos en humanos (principalmente en personas inmunocomprometidas), tales como infecciones urinarias y de piel (Elliot y col., 1991), endocarditis (Fefer y col., 1998; Fihman y col., 2006; Vinh y col., 2006; Yiu y col., 2007), septicemias y abscesos en hígado (Mofredj y col., 2000), osteomielitis (James y col., 2000) o trastornos digestivos (Wang y col., 2007). Sin embargo, a pesar de todos estos casos, la capacidad zoonótica de *L. garvieae* aún no ha podido ser demostrada con las herramientas epidemiológicas adecuadas, no habiéndose encontrado hasta la fecha relaciones genéticas estables entre aislados de *L. garvieae* en humanos y las diferentes especies animales (Vela y col., 2000).

Tabla 5. Principales descripciones de aislamientos de *L. garvieae* en diferentes especies animales, sustratos y orígenes geográficos.

ORIGEN	PAIS	REFERENCIA
PECES	G° Seriola	
	<i>Seriola quinqueradiata</i>	Japón Kusuda y col., 1991
	<i>Seriola dumerili</i>	Japón Kawanishi y col, 2005
	<i>Seriola lalandi</i>	Japón Kawanishi y col, 2005
	Trucha arco iris	Italia Ghittino y col., 1992
	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	España Prieta y col., 1993
		Australia Carson y col., 1993a
		Sudáfrica Carson y col., 1993a
		Inglaterra Bark y col., 2001
		Taiwan Chang y col., 2002
		Turquía Diler y col., 2002
		Portugal Pereira y col., 2004
		Francia Eyngor y col., 2004
		Israel Eyngor y col., 2004
		Grecia Eyngor y col., 2004
		Bulgaria Eyngor y col., 2004
	Tilapia	Japón Kusuda y col., 1991
	<i>Oreochromis sp.</i>	
	Anguila japonesa	Japón Kusuda y col., 1991
	<i>Anguilla japonica</i>	
	Pez gato	Italia Ravelo y col., 2001
	<i>Ictalurus punctatus</i>	
	Chancharro coreano	Corea Kang y col., 2004
	<i>Sebastes schlegeli</i>	
	Anguila europea	España Domínguez y col., 2000
	<i>Anguilla anguilla</i>	
	Esturión adriático	Italia Ghittino , 1999
	<i>Acipenser nacaari</i>	
	Pez doncella	Israel Colorni y col., 2003
	<i>Coris aygula</i>	
	Lisa común	Taiwan Chen y col., 2002
	<i>Mugil cephalus</i>	
	Platija Japonesa	Corea Lee y col., 2001
	<i>Paralichtys olivaceus</i>	
CRUSTÁCEOS	Camarón	Taiwan Chen y col., 2001
	<i>Macrobrachium rosenbergii</i>	

Tabla 5. Principales descripciones de aislamientos de *L. garvieae* en diferentes especies animales, sustratos y orígenes geográficos (cont.).

INTRODUCCIÓN

ORIGEN		PAIS	REFERENCIA
MAMIFEROS MARINOS	Delfín mular <i>Tursiops truncatus</i>	Kuwait	Evans y col., 2006
MAMIFEROS TERRESTRES	Vacas Perros Gatos Caballos Búfalos Cerdos	Inglaterra Bélgica Bélgica Bélgica Brasil España	Collins y col., 1983 Pot y col., 1996 Pot y col., 1996 Pot y col., 1996 Carvalho y col., 1997 Tejedor y col., 2004
AVES	Urraca Herrerillos	España España	Tejedor y col., 2004 Tejedor y col., 2004
HUMANOS		EE.UU Canada Francia Inglaterra China Taiwan	Elliot y col., 1991 Fefer y col., 1998 Mofredj y col., 2000 James y col., 2000 Yiu y col., 2007 Wang y col., 2007
PRODUCTOS CARNICOS	Carne de Ave Carne de Cerdo Salchichas Sangre de Cerdo	Canada Italia Italia España	Barakat y col., 2000 Aquilanti y col., 2007 Rantsiou y col., 2005 Zamora, 2005
PRODUCTOS LÁCTEOS	Leche de vaca Leche de oveja Leche de Yegua Queso de vaca Queso de oveja Queso de cabra	Holanda Grecia Mongolia Italia Grecia Grecia	Kljin y col., 1995 Promodrou y col., 2001 An y col., 2004 Parente y col., 1997 Promodrou y col., 2001 Hatzikamari y col., 1999
VEGETALES	Rábano Brócoli	Japón Japón	Kawanishi y col., 2007 Kawanishi y col., 2007
MEDIOAMBIENTE	Suelos Agua	Holanda España	Klijin y col., 1995 Vela y col., 2000

La identificación de *L. garvieae* se puede llevar a cabo mediante distintos ensayos bioquímicos y de crecimiento bacteriano incluidos en los protocolos de microbiología tradicional (Tabla 6). No obstante, debe tenerse presente la posible variabilidad de ciertas pruebas bioquímicas en función de la especie animal o el origen geográfico. Ello ha permitido proponer la utilización de ciertos azúcares como marcadores epidemiológicos (Eldar y col., 1999; Vela y col., 2000; Ravelo y col., 2001). Sin embargo, la gran variabilidad fenotípica existente en el género *Lactococcus* puede también

dificultar una correcta identificación por técnicas bioquímicas, siendo necesario en la gran mayoría de los casos, recurrir a la identificación molecular (Zlotkin y col., 1998a; Eldar y col., 1999; Aoki y col., 2000; Ravelo y col., 2003).

Tabla 6. Características bioquímicas y fisiológicas *L. garvieae*.

Prueba	Resultado	Prueba	Resultado
Morfología	Coco Ovoide	Producción de:	
Gram	+	Arginina	+
Motilidad	-	Ornitina	-
Crecimiento a		Lisina	-
4°C	+	Acidificación de:	
20°C	+	Rafinosa	-
37°C	+	Arabinosa	-
45°C	+	Sorbitol	-
pH 9,6	+	Manitol	V+
6,5% NaCl	+	Celobiosa	+
Hemólisis	α	Galactosa	+
Catalasa	-	D-Glucosa	+
Oxidasa	-	Maltosa	V+
Oxidación/Fermentación	F	Trehalosa	+
Reducción Nitratos	-	D-manosa	+
Citrato	-	Inositol	-
Urea	-	Glicógeno	-
Indol	-	Melibiosa	-
Esculina	+	Melecitosa	-
V.P.	+	Almidón	-
Producción de H ₂ S	-	Tagatosa	V
Arginina Dihidrolasa	+	L-Ramnosa	-
Pirrolidonil-Arilamidasa	+	D-Xylosa	-
Fosfatasa Alcalina	-	Salicina	+
β-Glucuronidasa	V-	Glicerol	-
Leucina Arilamidasa	+	Lactosa	(+)
Hidrólisis Hipurato	V-	Ribosa	V
N-Acetil Glucosaminidasa	-	Sacarosa	V
β-Manosidasa	-	Adonitol	-
β-Galactosidasa	-	Ciclodextrina	V
β-Glucosidasa	+	Pululano	-
α-Galactosidasa	-	D-Arabitol	-
Alanil-F-Prolina Arilamidasa	-	β-Glucopiranosida	V+
A.Piroglutámico Arilamidasa	V		
Glicil Triptófano Arilamidasa	-	Grupo Lancefield	N

(V): reacción variable. (V+): reacción variable-positiva. (V-): reacción variable negativa. (+): reacción positiva débil o lenta.

1.3.2.2. EPIDEMIOLOGÍA.

A pesar de la importancia actual de *L. garvieae* como bacteria patógena de peces, la epidemiología de la enfermedad que este microorganismo causa no es completamente conocida. Se ha señalado que la mera presencia de este agente no conlleva necesariamente el desarrollo de la enfermedad (Domínguez y col., 2000), necesitando por tanto que se presenten ciertos factores para su desarrollo. El conocimiento de los factores predisponentes que condicionan la aparición de la lactococosis, resultan de vital importancia para el establecimiento de programas de prevención, control y erradicación eficaces:

A.- Hospedador.

Aunque se ha descrito el aislamiento de *L. garvieae* en un amplio rango de especies de peces de agua marina y agua dulce (Tabla 5), la trucha arco iris parece ser la especie más susceptible y en la que se manifiesta de forma más aguda la infección presentando mayores mortalidades (Ghittino, 1999). La existencia de estirpes genéticamente más resistentes a la enfermedad no se ha estudiado hasta la fecha, aunque sí se ha demostrado que especies de agua dulce como la carpa común (*Cyprinus carpio*), que son criadas en condiciones similares a la trucha arco iris, son resistentes a la acción de este agente patógeno (Eldar y col., 1995).

B.- Edad y Tamaño.

En los primeros brotes de lactococosis estudiados se observó que los peces con tamaños comprendidos entre 80g y 220g solían ser refractarios a la enfermedad ya que no mostraban ningún tipo de sintomatología clínica si no eran inoculados artificialmente (Ceschia y col., 1992; Prieta y col., 1993; Bercovier y col., 1997). Posteriormente, se ha comprobado que *L. garvieae* es capaz de producir la enfermedad de forma natural en todo tipo de tamaños y edades, desde alevines de 5 gramos hasta peces adultos que

superan el kilogramo de peso vivo (Chang y col., 2002, Pereira y col., 2004). A pesar de ello, se ha demostrado de forma experimental que el curso clínico de la lactococosis es más agudo en truchas arco iris de menor tamaño - 50g - que en aquellas de tamaños superiores - 100g - (Múzquiz y col., 1999).

C.- Estirpe bacteriana.

Se ha demostrado que la virulencia de *L. garvieae* está directamente relacionada con la expresión de un antígeno de la pared celular denominado KG que permite dividir las cepas de *L. garvieae* en dos grupos distintos (Kitao y col., 1982).

En primer lugar, las cepas que no expresan este antígeno (KG-) son estirpes capsuladas que contienen una envoltura externa que inhibe la aglutinación del antisuero KG 7409 y que presentan una mayor resistencia a la fagocitosis (Yoshida y col., 1996). En segundo lugar, las cepas que expresan el antígeno KG en su pared celular (KG+), carecen de esa envoltura externa (no capsuladas) y son capaces de producir aglutinación cuando reaccionan con el antisuero KG 7409. Estudios específicos realizados con estos dos tipos de cepas en trucha arco iris y seriola, han demostrado que las cepas capsuladas (KG-) son mucho más virulentas que las no capsuladas (KG+) (Alim y col., 1996; Barnes y col., 2002; Kang y col., 2004; Kawanishi y col., 2006).

D.- Temperatura y calidad del agua.

Un último factor predisponente para la lactococosis, es el que se refiere a las condiciones y a la calidad del agua en que se encuentran los peces criados, puesto que ha sido demostrado que la presencia de *L.*

garvieae en el agua de la piscifactoría no implica la aparición de un brote clínico (Domínguez y col., 2000).

En primer lugar, la temperatura del agua es un factor importante que influye en el desarrollo de la enfermedad hasta el punto de que la lactococosis está considerada como una enfermedad estacional asociada a altas temperaturas. Así, la mayoría de los brotes agudos aparecen en primavera y verano cuando la temperatura supera los 16°C, aunque también se han dado casos de enfermedad en aguas con temperaturas de 14 y 15 °C (Prieta y col., 1993; Ghittino, 1999).

En segundo lugar, la mala calidad microbiológica del agua (causada por un déficit en el control sanitario y limpieza de las instalaciones) unida a las altas densidades de población y a las condiciones estresantes de la acuicultura intensiva, pueden favorecer el desarrollo de la enfermedad (Kusuda y Salati, 1999). Así, se ha comprobado que la falta de oxígeno en las piscifactorías potencia la capacidad virulenta de *L. garvieae* y su difusión en la instalación (Fukuda y col., 1997a,b), y que un exceso de amonio también es capaz de producir un aumento de la mortalidad en los brotes clínicos (Hurvitz y col., 1997).

1.3.2.3. TRANSMISIÓN.

La transmisión de la enfermedad, al igual que sucede con otras patologías de peces, es de tipo horizontal, siendo las vías de entrada oral y branquial las más habituales (Romalde y col. 1996; Zlotkin y col. 1998b). Esta transmisión se puede producir por contacto con peces infectados en el mismo tanque, o con peces que ya han superado la enfermedad y adoptan un estado de portador asintomático, eliminando la bacteria por las heces, branquias y mucus de la piel. Además, la existencia de lesiones abiertas en la piel podría favorecer la infección de los animales (Afonso y col., 2003).

Tal y como detallamos en el capítulo 1.3.2.1, el hecho de que se registraran en primer lugar casos clínicos de esta enfermedad en Japón (Hoshina y col., 1958; Kusuda y col., 1991), y que décadas más tarde de forma casi simultánea aparecieran por primera vez brotes de enfermedad en los principales países europeos productores de trucha arco iris (Ghittino y Prearo, 1992; Prieta y col., 1993; Carson y col., 1993a; Bark y col., 2001; Diler y col., 2003; Pereira y col., 2004; Eyngor y col., 2004), parece indicar que la difusión del agente al continente europeo se pudiera haber producido a través de la importación de lotes de alimentación o huevos y/o alevines. A su vez, la propagación del agente en una misma zona geográfica, pudiera producirse por cuatro posibles vías: (A) a través del agua o lodos, (B) vehiculado desde alguno de los reservorios de *L. garvieae* presentes en el medioambiente y la naturaleza, o utensilios y vehículos utilizados entre piscifactorías, (C) a través de nuevos lotes de entrada de huevos o alevines infectados de forma subclínica, (D) o vehiculado en piensos, subproductos alimenticios o residuos de la actividad acuícola con un tratamiento térmico deficiente.

A. Transmisión a través del agua y lodos.

Una de las posibles vías de introducción de *L. garvieae* en una instalación es a través del agua de los ríos que abastecen a la piscifactoría. *L. garvieae* es una bacteria ubicua que se encuentra presente en el lodo de los ríos y en el agua con mucha materia orgánica (Kusuda y Salati, 1999). También se ha conseguido aislar en los alrededores de las piscifactorías afectadas con lactococosis (Yasunaga y col., 1982; Vela y col., 2000) y se ha comprobado que este microorganismo es capaz de permanecer en el agua (Múzquiz y col., 1999; Vela y col., 2000). El origen de estas cepas pudieran ser los peces enfermos que eliminan la bacteria a través de las heces o bien cualquier otro reservorio presente en la naturaleza o medioambiente y en contacto con el agua contaminada, tal y como expondremos a continuación.

B. Transmisión a través de reservorios de la naturaleza y medioambiente, utensilios y vehículos.

L. garvieae es una bacteria muy ubicua y ambiental que se encuentra presente en un amplio rango de especies animales (terrestres y acuáticas) (Tabla 5). Por ello, el mantenimiento y difusión de esta bacteria en el medio ambiente, puede estar asociado a animales reservorios (domésticos o de vida libre), tanto mamíferos como diferentes especies acuáticas presentes en los ríos y en el mar, que no desarrollan la enfermedad pero que pueden eliminar la bacteria junto con las heces. A este respecto, *L. garvieae*, ha sido aislado en peces marinos asintomáticos (Kusuda y Kawai, 1982), ganado vacuno (Devriese y col., 1999), ganado porcino y aves silvestres (Tejedor y col., 2004) o a partir de muestras ambientales (Kljic y col., 1995). Este tipo de aislamientos podría ser el origen de los brotes infecciosos que se producen en las piscifactorías de truchas localizadas en el mismo área y que no tienen fácil explicación, tal y como se ha sugerido para otras estreptococosis (Romalde y col. 1996). Sin embargo, hasta el momento no existen estudios que demuestren la existencia de una relación entre los aislados ambientales y los procedentes de otras especies animales con las cepas patógenas para los peces (Vela y col., 2000; Kawanishi y col., 2006).

De la misma manera, la gran ubicuidad y resistencia medioambiental de *L. garvieae*, le permite sobrevivir en condiciones desfavorables, siendo factible su difusión y transmisión a través de utensilios, ropas o vehículos que pudieran utilizarse entre diferentes piscifactorías.

C.- Transmisión a través de huevos y alevines infectados.

Una de las forma más frecuente de introducción de un patógeno en una piscifactoría es a través de la entrada de nuevos lotes de huevos y peces (Vendrell y col., 2006). Los juveniles que actúan como portadores

asintomáticos pueden eliminar las bacterias con las heces infectando así al resto de los animales (Afonso y col., 2003), lo que concuerda con la transmisión fecal-oral demostrada en infecciones producidas en truchas arco iris (Romalde y col., 1996). También son muy importantes los peces de recría y engorde que son trasladados a otras explotaciones para continuar el ciclo reproductivo y que han sobrevivido a la infección, ya que continúan eliminando la bacteria durante algún tiempo, además de por heces, por branquias y el mucus de la piel (Múzquiz y col., 1999). Estos animales asintomáticos podrán desarrollar de nuevo la enfermedad cuando las condiciones medioambientales resulten óptimas para *L. garvieae* (Cheng y col., 2002).

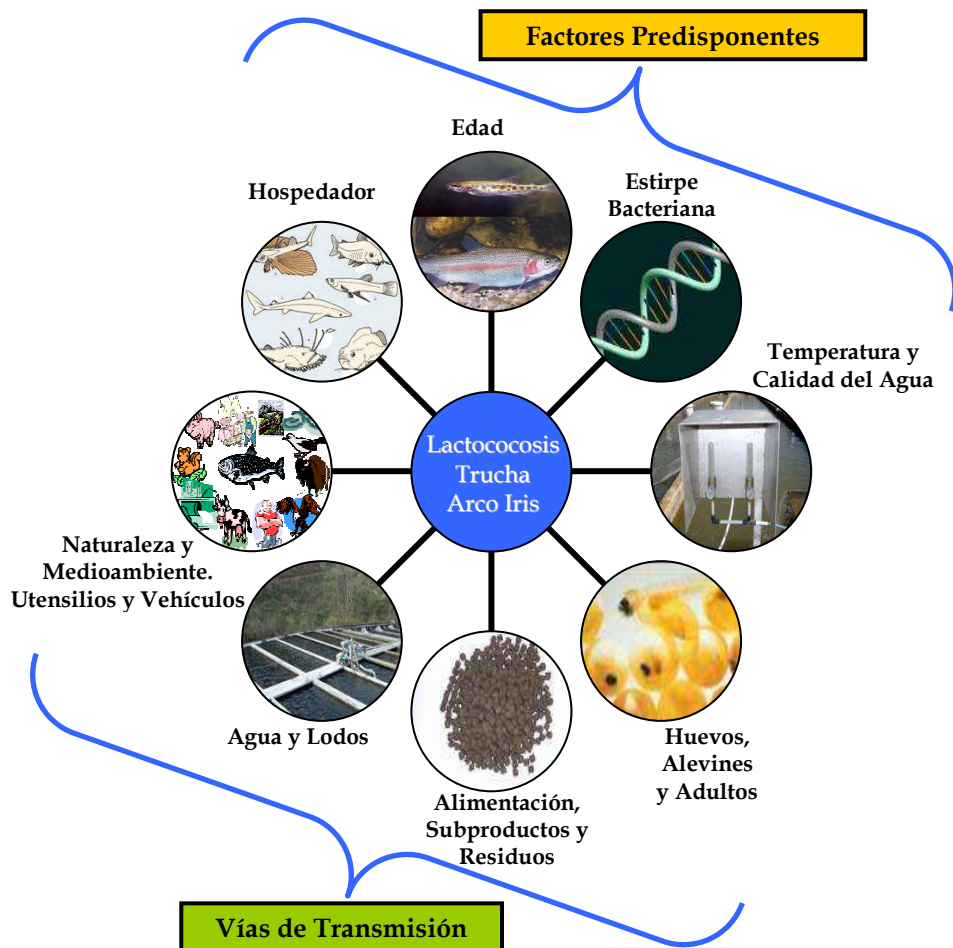
D. Transmisión a través de la alimentación, subproductos y residuos.

Los piensos compuestos con tratamientos térmicos deficientes, pueden suponer un riesgo de transmisión de agentes patógenos. Afortunadamente, la práctica totalidad de los piensos comerciales utilizados hoy en día para la alimentación piscícola incorporan tratamientos eficientes que aseguran la eliminación de cualquier microorganismo presente en las materias primas o ingredientes (Lázaro, 2001). Sin embargo, es importante controlar el origen de las materias primas empleadas en la elaboración de piensos, en especial las harinas de pescado importadas. Algunos autores consideran que los piensos que fueron fabricados con peces enfermos o portadores podrían haber sido una de las fuentes de infección y del establecimiento de la lactococosis en el continente Europeo (Minami, 1979; Toranzo, 1994; Doménech, 1996; Eldar y col., 1996, Teixeira y col., 1996; Romalde y col., 1996; Kusuda y Salati, 1999; Vendrell y col., 2006). A este respecto, en algunos países como Japón, se describió el aislamiento de *E. seriolícida* (reclasificado posteriormente como *L. garvieae*) a partir de pescado de vida libre mantenido en congelación que iba a ser utilizado para la alimentación de peces de cultivo (Yasunaga,

1982), siendo estos microorganismos capaces de sobrevivir en pescados congelados durante más de seis meses (Minami, 1979).

Igualmente, los subproductos alimenticios y residuos de la industria acuícola procedentes de animales enfermos, pueden suponer una vía de transmisión de *L. garvieae* si no han sido tratados eficientemente.

Figura 5. Factores predisponentes y vías de transmisión de la lactococosis de la trucha arco iris.



1.3.2.4. PATOGENIA Y SINTOMATOLOGÍA.

La lactococosis es una enfermedad septicémica generalizada que cursa con congestión de los órganos internos y en la mayoría de los casos exoftalmia, encefalitis y enteritis hemorrágica (Domínguez y col., 2000). Tiene un curso de evolución hiperaguda, y provoca la muerte a un elevado porcentaje de individuos del estanque afectado, así como la disminución de las tasas de crecimiento y del valor comercial de los peces. Clínicamente los peces enfermos muestran sintomatología inespecífica, como son letargia y natación errática, oscurecimiento de la piel y exoftalmia (Prieta y col., 1993) y esta sintomatología se repite independientemente de la especie afectada (Kusuda y col., 1991; Chen y col., 2002).

El periodo de incubación de esta enfermedad es muy corto y la bacteria actúa con gran virulencia (Vendrell y col., 2006). Tras inoculaciones experimentales por vía intraperitoneal, se ha comprobado que *L. garvieae* es capaz de producir sintomatología evidente y la muerte de las truchas arco iris en apenas tres días después de la inoculación (Múzquiz y col., 1999).

Tal y como hemos señalado previamente, la bacteria puede entrar por vía oral, por branquias o abrasiones externas procedente del agua o vehiculada con restos de heces contaminadas o con el pienso. En estos últimos casos, la bacteria puede resistir mejor las condiciones ácidas del estómago al estar protegida por los componentes fecales o del pienso (Romalde y col., 1996), y al llegar al intestino puede multiplicarse más activamente y establecer una infección sistémica. Una vez que la bacteria pasa a la sangre origina una septicemia de evolución hiperaguda.

Durante la fase más aguda de la enfermedad, que coincide con la diseminación generalizada de la bacteria y la mayor mortalidad en los estanques, *L. garvieae* puede aislarse con facilidad de los órganos internos, de la sangre y del intestino (Prieta y col., 1993; Múzquiz y col., 1999). Con posterioridad a esta fase aguda, en muchas de las truchas que sobreviven a

la infección, el microorganismo sólo puede recuperarse de intestino. Este hecho parece indicar que los peces son capaces de eliminar la bacteria de órganos internos, posiblemente a través de la respuesta inmune, tal y como se ha descrito en otras estreptococosis (Nieto y col., 1995), estableciendo un estado de portador asintomático.

Como hemos comentado anteriormente, estos animales pueden eliminar durante algún tiempo el microorganismo por heces, aunque también se ha podido aislar de branquias y del mucus de la piel (Múzquiz y col., 1999). La forma en la que la bacteria permanece en los peces portadores no se conoce, aunque algunos autores (Schmidtke y Carson, 1999) han sugerido que adopta la forma L (deficiente en pared celular), que es avirulenta tal y como se ha observado en otros patógenos de peces, como *Aeromonas salmonicida* y *Yersinia ruckeri* (McIntosh y Austin 1990, 1991). Según esta teoría, la reversión de formas L inestables al tipo normal de la bacteria por mecanismos desconocidos reproduciría la enfermedad, caso que se podría dar en situaciones estresantes para el animal (Domínguez y col., 2000).

La patogenicidad de *L. garvieae* está mediada por una serie de factores capaces de reproducir los síntomas clínicos característicos de la lactococosis cuando son inoculados en peces sanos (Kusuda y Hamaguchi., 1989). Así, entre los posibles factores de patogenicidad de *L. garvieae* estudiados, podríamos señalar la presencia de una toxina extracelular similar a la estreptolisina O, que estaría implicada en la actividad hemolítica de la bacteria, y que podría ser responsable de las lesiones hemorrágicas típicas de la infección (Kusuda y Salati 1999). Otro factor de patogenicidad, sería (tal y como hemos comentado previamente) la presencia de una cápsula celular, que se asocia con una mayor virulencia de las cepas, ya que al igual que en otros patógenos Gram positivos, está ligada a la mayor resistencia a la opsonización y a la fagocitosis (Yoshida y col. 1996, 1997; Ooyama y col., 1999).



Fotos 3 y 4. Vistas dorsal y frontal de trucha arco iris con exoftalmo bilateral.



Foto 5. Diferentes grados de exoftalmia y melanosis en trucha arco iris.

A.- Sintomatología y Lesiones Macroscópicas.

La sintomatología de la lactococosis se caracteriza por una anorexia prolongada, melanosis, letargia, pérdida de orientación y natación errática. En periodos más avanzados suele observarse exoftalmia unilateral o bilateral que puede terminar incluso con la pérdida ocular (Fotos 3, 4 y 5).

La capacidad de *L. garvieae* para dañar el endotelio vascular, provoca la extravasación sanguínea y petequias en la superficie de los órganos internos y la piel. Esto se traduce en presencia de zonas hemorrágicas especialmente en la base de las aletas y en la región perianal, así como en los globos oculares y en la zona peribucal.

Internamente se puede apreciar líquido ascítico en la cavidad peritoneal, que puede tener una composición seropurulenta o incluso

hemorrágica. Los principales órganos afectados suelen ser el riñón, el bazo, el hígado y el corazón por su gran vascularización, así como el cerebro y el estómago (Prieta y col., 1993; Pereira y col., 2004). Todos estos órganos, en mayor o menor medida, pueden presentar diferentes niveles de congestión y hemorragia (Fotos 6, 7 y 8). Igualmente, y dependiendo de la intensidad de la infección, se pueden desarrollar lesiones congestivas en la vejiga natatoria, peritoneo, ciegos pilóricos, grasa perivisceral y musculatura.

La enteritis hemorrágica, con aumento del contenido líquido intestinal, suele presentarse en la gran mayoría de los peces de mayor tamaño con infecciones crónicas, lo que la diferencia claramente de una infección similar producida por *S. iniae* (Eldar y Ghittino, 1999). Igualmente, la mayoría de los peces presenta meningoencefalitis aguda, que junto con la presencia de edema intracraneal en algunos casos (Foto 6), podría explicar la natación errática y la letargia observada en las truchas enfermas (Austin y Austin, 1993; Kitao, 1993b). Además es muy común observar hipertrofia esplénica, zonas necróticas en hígado y bazo, pericarditis, distensión abdominal y prolapso anal.

B.- Histopatología.

Histológicamente, las lesiones oculares descritas consisten en fibroplasias, con agrupación de células inflamatorias, panoftalmitis hemorrágica y destrucción de la cámara anterior y posterior del ojo. Además suele producirse una lesión superficial del nervio óptico y de la musculatura estriada que lo rodea (Eldar y Ghittino, 1999; Chang y col., 2002).

En los órganos internos se ha observado peritonitis, necrosis de la grasa abdominal y congestión subaguda multiorgánica, con necrosis miliar esplénica, lo que coincide con una septicemia generalizada típica de infecciones por estreptococos y lactococos (Nieto y col, 1995). En el corazón aparecen lesiones fibroplásicas con infiltraciones de macrófagos y linfocitos

en el pericardio. En el riñón se han evidenciado depósitos hialinos en el epitelio y en el lumen de los túbulos renales, que también presentan hiperplasia (Eldar y Ghittino, 1999). Hay que destacar las alteraciones detectadas a nivel del tejido intestinal, con una severa enteritis necrotizante subaguda difusa, afectando tanto a la capa mucosa, como submucosa y muscular, produciéndose un colapso generalizado de la arquitectura glandular y aparición de formaciones pseudomembranosas (Domínguez y col., 2000).

Así mismo, se han observado lesiones a nivel de meninges, cerebro y cerebelo con fibroplasias e infiltraciones de linfocitos y macrófagos. Estas lesiones se traducen en una meningitis bacteriana de los peces afectados con exudados bacterianos distribuidos por toda la superficie meningítica y los espacios de Virchhoff (Eldar y Ghittino, 1999).



Fotos 6 y 7. Encefalitis hemorrágica y hemorragias petequiales en trucha arco iris con lactococosis.



Foto 8. Congestión generalizada de todos los órganos y enteritis hemorrágica.

1.3.2.5. DIAGNÓSTICO.

A.- Diagnóstico Clínico.

El diagnóstico clínico de la enfermedad resulta complicado fundamentalmente debido a que casi todas las enfermedades que afectan a los peces continentales producen una sintomatología muy parecida e inespecífica, por lo que en la mayoría de los casos es necesaria la confirmación laboratorial (Zlotkin y col., 1998a, Domínguez y col., 2000).

La letargia, anorexia, melanosis, natación errática, exoftalmia, prolapso anal y las hemorragias en la base de las aletas y regiones peribucales y perioculares no son síntomas y lesiones patognomónicas. Sin embargo, el diagnóstico de este proceso puede orientarse por una serie de parámetros medioambientales (tales como el aumento de la temperatura del agua y su escasa calidad) o epidemiológicos [como la elevada incidencia en los tanques afectados y las mortalidades, que pueden alcanzar al 80% de la población (Ghittino, 1999)].

B.- Diagnóstico Histopatológico.

Un estudio anatómo-patológico preciso, necesita la recogida de los órganos adecuados, los cuales deberán ser fijados en formol al 10% tamponado. La tinción más apropiada en estos casos es la de Hematoxilina y Eosina (Chen y col., 2000).

Al igual que en el diagnóstico clínico, la ausencia de lesiones específicas impide realizar un diagnóstico únicamente basado en el estudio histológico. Sin embargo, aunque la degeneración ocular y la enteritis necrotizante subaguda no son lesiones patognomónicas de la lactococosis, pueden resultar un complemento adecuado para el diagnóstico definitivo.

C.- Diagnóstico Microbiológico.

Para obtener un diagnóstico fiable, es necesario realizar correctamente los muestreos. En el caso de un brote de lactococosis, las muestras deben ser recogidas tras el sacrificio de animales moribundos. Si se tratara de animales muertos, éstos deben ser mantenidos en todo momento en refrigeración. Los órganos más adecuados para la toma de muestras son la región anterior del riñón y el cerebro, aunque en septicemias generalizadas se puede aislar *L. garvieae* en hígado, corazón, bazo, ojo, humor acuoso, intestino o sangre (Padrós y col., 1996).

C.1.- Diagnóstico Bacteriológico.

Tal y como queda reflejado en la Tabla 6 del apartado 1.3.2.1, *L. garvieae* es una bacteria capaz de multiplicarse en un amplio rango de temperaturas (4°-45°C), pH (hasta 9,6) y salinidad (6,5% NaCl), que unido a sus poco exigentes requisitos nutritivos, facilita su aislamiento en medios de cultivo generales (Agar Sangre o TSA).

Una vez obtenidas colonias aisladas, la correcta identificación de *L. garvieae* por técnicas tradicionales puede entrañar ciertas dificultades debido a la gran variabilidad de las bacterias ácido lácticas asociadas a enfermedades piscícolas y ambientes acuáticos (Michel y col., 2007). Así, aunque desde el punto de vista filogenético los lactococos están más próximos a los estreptococos que a los enterococos, los mayores problemas de diferenciación se presentan con estos últimos. El crecimiento de los enterococos a temperatura de 45°C, a pH 9,6, o en presencia de 6,5% de NaCl son criterios que se han utilizado para la diferenciación entre lactococos y enterococos (Facklam y Elliott, 1995). Sin embargo, estos criterios no siempre son válidos, ya que la gran mayoría de las cepas de *L. garvieae* son capaces de crecer en estas condiciones (Murray, 1990; Vendrell y col., 2006).

En definitiva, la identificación de los lactococos, basada en criterios fisiológicos o bioquímicos, es complicada y como consecuencia, son frecuentes las identificaciones erróneas o las identificaciones únicamente a nivel de género (Kusuda y col., 1991; Eldar y col., 1994; Toranzo y col., 1994; Teixeira y col., 1996).

Dentro del género *Lactococcus*, no es sencilla la diferenciación entre las especies *L. garvieae* y *L. lactis* subsp. *lactis*, dado que ambas son muy similares fenotípicamente y presentan perfiles bioquímicos muy parecidos (Facklam y Elliott, 1995). Sin embargo, se ha propuesto la presencia del enzima pirrolidónilarilamidasa y la resistencia a la clindamicina como pruebas para su diferenciación (Collins y col., 1983; Elliot y Facklam., 1996). A pesar de ello, aproximadamente una tercera parte de las cepas de *L. lactis* son también pirrolidónilarilamidasa positivas (Facklam y col., 1990), y se han descrito cepas de *L. lactis* resistentes a la clindamicina; ambos hechos podrían afectar a la utilidad exclusiva de estas dos pruebas para su diferenciación, siendo frecuentes las identificaciones erróneas entre ambas especies bacterianas (Facklam y Elliott, 1995).

La identificación bioquímica puede ser un método de diagnóstico eficaz si se cuenta con la suficiente experiencia. A este respecto, existen sistemas comerciales multisustrato, consistentes en galerías que incorporan diferentes test bioquímicos (Tabla 6), los cuales utilizados convenientemente (preparación rigurosa de los inóculos y condiciones estandarizadas), podrían aproximarnos a una identificación y diagnóstico certeros a la vez que nos proporcionan una caracterización bioquímica de los aislados (Vela y col., 2000; Ravelo y col., 2001).

C.2.- Identificación Serológica.

La técnica más utilizada para la identificación serológica de este agente es la aglutinación en porta a partir de cultivo puro de *L. garvieae*

como antígeno (Kitao, 1982). No obstante, se han propuesto otras técnicas más complejas basadas en la tinción fluorescente de anticuerpos (Kawahara y col., 1987) o la citometría rápida de flujo, técnica muy útil para la detección de *L. garvieae* a partir de cultivos mixtos (Endo y col., 1998).

C.3.- Diagnóstico Molecular.

En los últimos años, la aplicación de técnicas moleculares ha supuesto una buena alternativa a la identificación microbiológica tradicional. En este sentido, la PCR es una de las técnicas más utilizadas en ictiopatología por su facilidad de realización e interpretación, y su elevada sensibilidad y especificidad, habiéndose mostrado enormemente útil para la identificación de distintas bacterias patógenas de peces (Gibello y col., 2001). Su aplicación resulta especialmente importante en bacterias de crecimiento lento, de identificación bioquímica complicada o de localización intracelular y permite un diagnóstico precoz, incluso en animales portadores asintomáticos, hecho que es importante para la prevención y el control de las enfermedades.

En los últimos años se han desarrollado cuatro sistemas de PCR para la identificación de *L. garvieae*. Estas técnicas se diferencian fundamentalmente en los iniciadores utilizados, en la secuencia específica al ADN y en sus posibles aplicaciones.

En primer lugar, Zlotkin y col. (1998a) propusieron la amplificación específica del gen que codifica para la molécula del ARN ribosomal 16S de *L. garvieae*. Esta técnica, cuya sensibilidad (4 UFC/tubo de reacción PCR) y especificidad fue testada con aislados de diferentes orígenes geográficos, así como otras bacterias responsables de estreptococosis en los peces, amplifica un fragmento de 1.100 pb. Dado que la secuencia del gen del ARN ribosomal 16S de *L. garvieae* muestra más de un 90% de homología con las secuencias correspondientes a otras especies, como *L. lactis*, *L. piscium*, *L.*

plantarum, *L. raffinolactis* y diversos estreptococos, el diseño de estos iniciadores, así como de las condiciones de PCR, resulta enormemente difícil para la identificación específica de una sola especie (Zlotkin y col., 1998a).

En segundo lugar, Aoki y col. (2000) desarrollaron una técnica de PCR basada en la amplificación del gen cromosómico de *L. garvieae* (709 pb.) que codifica la dihidropteroato sintetasa. Sin embargo, la ausencia de datos sobre la existencia de un gen homólogo en otras bacterias Gram positivas filogenéticamente relacionadas, cuestionan la especificidad de esta PCR.

En tercer lugar, Pu y col. (2002), desarrollaron un sistema de detección e identificación de diferentes especies y subespecies del género *Lactococcus*, incluida *L. garvieae*. Esta PCR está basada en la amplificación de secuencias del ARN 16S ribosomal específicas de cada especie [de forma similar a la técnica descrita por Zlotkin y col. (1998a)]. Posteriormente el producto es sometido a restricción enzimática.

Finalmente, Mata y col (2004a), diseñaron un sistema de PCR múltiple para la detección simultánea de los principales patógenos implicados en las estreptocosis de agua caliente. En esta ocasión, amplificaron las secuencias específicas del ARN 16S ribosomal de *L. garvieae*, del ARN 23S ribosomal de *S. parauberis*, de la región intergénica 16S-23S ribosomal de *S. difficilis* y del gen que codifica la enzima lactato oxidasa (lctO) de *S. iniae*. Esta técnica resultó efectiva para la detección de cada uno de los cuatro patógenos, tanto en cultivo puro como en el caso de contaminaciones artificiales de cerebros e hígados procedentes de los peces.

Además de estos cuatro sistemas de PCR, Goh y col (2000) diseñaron un método de hibridación indirecta del ADN para diferenciar varias especies de cocos Gram positivos entre los que también incluyeron a *L. garvieae*. En esta ocasión utilizaron la secuencia del gen que codifica la

Chaperona 60 (Cpn60). Esta secuencia es una región altamente conservada y presente en gran cantidad de microorganismos Gram positivos de importancia clínica y veterinaria (Goh y col., 2000).

1.3.2.6. TRATAMIENTO.

Al igual que las primeras descripciones de la enfermedad, las primeras referencias acerca del tratamiento y control de las infecciones por *L. garvieae* (*E. seriolicida*) proceden de Japón, donde el uso de antibióticos como tratamiento de las estreptocosis de los peces resultó efectivo durante los comienzos de los primeros brotes en la seriola cultivada (Katao, 1982). Posteriormente, se llegó a la conclusión de que resultaba extremadamente difícil evitar la entrada de este agente en las piscifactorías por encontrarse tanto en el agua, como en los peces de vida libre y en los peces congelados utilizados como alimento de los criados en la misma piscifactoría (Kusuda y Salati, 1999). Por todo ello se hizo necesaria la utilización de quimioterápicos que ayudaran a controlar la aparición de los brotes.

Los primeros antibióticos utilizados fueron penicilinas, cloranfenicol, tetraciclina, eritromicina, josamicina y espiramicina. De todos ellos, fueron los tres últimos los que parecieron dar mejores resultados si bien, pronto se pudo comprobar como el efecto de estos antibióticos en el campo no se correspondía con el esperado de acuerdo con los estudios de susceptibilidad *in vitro* (Kusuda y Salati, 1999). La posterior aparición de la lactocosis en truchas en Europa (España, Italia, Francia), no hizo sino confirmar la dificultad de controlar a este agente mediante el uso de quimioterápicos (Bercovier y col., 1997). Este fenómeno puede tener dos posibles explicaciones: 1) la enfermedad cursa como una septicemia aguda, lo cual implica que para cuando comienza el tratamiento ya existe un alto número de peces afectados que sufren un estado precoz de anorexia, y que, por tanto, no van a tomar el fármaco que se suministra por

vía oral a través del pienso; y 2) la aparición de resistencias (Domínguez y col., 2000).

A este respecto, estudios de sensibilidad antibiótica de *L. garvieae* procedente de diferentes orígenes geográficos mostraron que todos ellos presentaban una clara resistencia frente al ácido oxolínico y trimetoprim-sulfametazol, mientras que eran sensibles a la enrofloxacin, vancomicina y nitrofurantoína. Además las cepas analizadas presentaron resultados variables para la eritromicina, lincomicina, penicilina, tobramicina, cloranfenicol, oxitetraciclina y ampicilina (Ooshima y col., 1997; Domínguez y col., 2000; Ravelo y col., 2001, Diler y col., 2004; Kawanishi y col., 2005).

1.3.2.7. CONTROL Y PROFILAXIS.

A.- Manejo y control de barreras primarias.

Un programa de prevención completo debe disponer de las barreras primarias esenciales para evitar la introducción del agente en la piscifactoría. Con el fin de disminuir los riesgos de introducción de *L. garvieae* en la instalación, y minimizar los factores predisponentes a la lactococosis (capítulo 1.3.2.2.), deben realizarse programas periódicos de limpieza y desinfección de utensilios, control de la calidad físico-química y microbiológica del agua y alimentación, inspección y vigilancia de nuevos lotes de huevos o alevines en la instalación (con certificados de garantía y periodos de cuarentena), así como el control de los vectores que pudieran vehicular el agente patógeno (Brown, 1993).

Igualmente, para disminuir el estrés de los animales, debe efectuarse una mínima manipulación de los peces, la eliminación diaria de cadáveres y el mantenimiento de bajas densidades de cultivo (Vendrell y col., 2006).

B.- Vacunación y utilización de otros productos.

Como hemos comentado anteriormente, los tratamientos antibióticos en la lactococosis son ineficaces para controlar la enfermedad en condiciones naturales, haciendo necesario el diseño de vacunas y productos inmunógenos eficaces.

La primera referencia sobre el empleo de una vacuna procede de Japón (Sakai y col., 1987, citado por Newman, 1993), donde se llegó a probar, a finales de los años 80, una vacuna preparada con células completas de estreptococos β -hemolíticos inactivadas mediante formol. Esta vacuna tuvo muy buenos resultados de protección tanto por inmersión, como por inyección intraperitoneal con y sin adyuvante, obteniéndose en todos los casos una reducción importante de la mortalidad.

Con posterioridad se comenzaron a desarrollar en Italia e Israel las primeras autovacunas utilizando cepas aisladas a partir de brotes en cada país (Bercovier y col., 1997). Con el fin de probar la efectividad de estos productos, se inocularon truchas y tilapias por vía intraperitoneal con distintas dosis. Aunque los resultados obtenidos parecieron prometedores de forma experimental, a nivel de campo no fueron tan buenos y no se consiguió prolongar el tiempo de protección frente a *L. garvieae* más allá de cuatro meses (Bercovier y col., 1997). Por tanto, estas vacunas no serían capaces de proteger a las truchas durante todo el tiempo crítico de la enfermedad.

La división de *L. garvieae* en dos fenotipos, según presenten o no cápsula, y la constatación de una mayor virulencia en los casos de presencia de la misma, llevó a investigadores japoneses a probar estos fenotipos en vacunas, y a estudiar si existían diferencias en cuanto a la respuesta inmune protectora del hospedador (Ooyama y col., 1999). Los resultados obtenidos por estos investigadores sugieren que la cápsula no

está ligada con la respuesta inmune protectora, ya que independientemente de la presencia o no de la cápsula, la protección frente a una infección artificial fue la misma. A pesar de ello pudo detectarse diferencias en los títulos de aglutinación y en los índices de fagocitosis entre los dos tipos de bacterias. Además debe indicarse que la infección artificial se llevó a cabo mediante inoculación intraperitoneal, lo que implica la eliminación del papel protector de piel y mucosas (Ooyama y col., 1999).

Con el propósito de aumentar la eficacia y el tiempo de protección, se han testado diferentes tipos de vacunas mixtas que incluían otros patógenos, antibióticos (Prieta y col., 1993), antisueros para inducir la inmunidad pasiva (Akhlaghi y col., 1996) o glucanos para inducir la inmunidad innata (Itami y col., 1996).

A día de hoy, la gran mayoría de las vacunas utilizadas para prevenir la lactococosis de la trucha arco iris, se administran por vía intraperitoneal, utilizando adyuvantes (principalmente oleosos) que ayudan a aumentar el periodo de protección (Ravelo y col., 2005). El momento óptimo de la vacunación suele ser antes de la época estival, cuando el tamaño de los peces oscila entre los 40 y 80g y la temperatura del agua esta próxima a 12-14°C (Ghittino, 1999). Sin embargo, las vacunas intraperitoneales también cuentan con ciertos inconvenientes, ya que aumentan los estados de estrés en los peces. Este hecho junto a condicionantes ambientales (temperatura, altas concentraciones de peces por tanque, presencia del agente en el agua o de portadores en la explotación, etc), podría aumentar el riesgo de aparición de un brote de lactococosis así como los costes de producción de la piscifactoría (Domínguez y col., 2000).

Una alternativa podría ser la utilización de vacunas por inmersión que pueden incluir antígenos capsulados o no capsulados. La efectividad señalada para este tipo de vacunas es variable (Romalde y col., 1996; Doménech y col., 1999; Domínguez y col., 2000), aunque recientemente se

ha comprobado que su combinación con micropartículas de alginato puede producir un apoyo importante para la vacunación frente a la lactococosis de la trucha arco iris (Romalde y col., 2004). Por otra parte, la utilización de estos inmunógenos podría reducir los inconvenientes señalados anteriormente para vacunas inyectadas intraperitonealmente, aunque para ello sería necesario obtener una protección que abarcara el periodo crítico de la enfermedad.

Finalmente citar que, se han realizado diferentes estudios respecto al uso de antibióticos ionóforos (Carson y col., 1993b), bacteriófagos (Park y col., 1998; Nakai y col., 1999) y recientemente se ha estudiado la aplicación vía oral de *Aeromonas sobria* como probiótico (Brunt y col., 2005). A pesar de obtener buenos resultados en condiciones experimentales y las buenas impresiones respecto al futuro uso de inmunoestimulantes y prebióticos a través del pienso, el control actual de esta enfermedad sigue recayendo en un buen programa de prevención basado en el manejo y el diseño de vacunas eficaces.

2. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS



A pesar de la importancia que *L. garvieae* tiene como agente productor de la lactococosis en la trucha arco iris, y de ser considerado un agente potencialmente zoonótico, todavía se desconocen aspectos de su epidemiología y de sus mecanismos de transmisión. La comprensión de las causas que provocaron a finales de los años 80 la difusión en la Europa mediterránea de una serie de cepas responsables de brotes de una forma septicémica bacteriana en la trucha arco iris cultivada y su mantenimiento, facilitaría la implantación de medidas correctoras para disminuir la alta incidencia de esta enfermedad.

Su transmisión a los peces es de tipo horizontal y desde los primeros estudios se especulaba con la posibilidad de que la vía de entrada de este patógeno en las explotaciones piscícolas pudiera ser a través del agua de entrada de la piscifactoría, a través de la alimentación o mediante vehículos animales.

Al inicio del presente estudio se desconocía que *L. garvieae* estuviera ampliamente difundido en el medio ambiente mostrando una gran ubicuidad y resistencia medioambiental. Por tanto, a pesar de estas hipótesis, eran muy pocos los estudios que hacían referencia a la detección de esta bacteria en muestras de alimentos, muestras ambientales y en otras especies animales domésticos y salvajes. A este respecto, la baja concentración de las bacterias problema en proporción con la micropoblación competitiva en las muestras señaladas, unido a la falta de técnicas de detección suficientemente sensibles, podían haber impedido hasta ahora corroborar estas hipótesis.

Por todo ello, los objetivos específicos de este trabajo de investigación han sido los siguientes:

1. Puesta a punto de una metodología sensible y específica para la detección de *L. garvieae* en materias primas, piensos compuestos, muestras ambientales y otros vehículos, que permitiera profundizar en el estudio de su epidemiología.
2. Estudio de la presencia de *L. garvieae* en muestras de harinas de pescado y piensos compuestos utilizados de forma rutinaria en la nutrición piscícola, así como en muestras de animales domésticos y salvajes y aguas de diferentes orígenes geográficos.
3. Caracterización genética de cepas de *L. garvieae* aisladas a partir de diferentes especies animales, muestras alimentarias y ambientales de variados orígenes geográficos, prestando especial atención a las cepas patógenas de peces y a las posibles relaciones epidemiológicas con cepas aisladas en harinas, piensos y aguas.
4. Aplicación de la metodología diseñada para la detección de otros cocos Gram positivos patógenos de peces de importancia en la acuicultura actual.



3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1. PUESTA A PUNTO DE UNA METODOLOGÍA PARA LA DETECCIÓN DE *Lactococcus garvieae*, *Streptococcus parauberis* y *Streptococcus iniae* EN MATERIAS PRIMAS, PIENSOS COMPUESTOS Y MUESTRAS MEDIOAMBIENTALES.

3.1.1. DISEÑO Y EVALUACIÓN DE MEDIOS DE ENRIQUECIMIENTO SELECTIVOS.

3.1.1.1. DISEÑO.

Se desarrollaron dos medios de enriquecimiento selectivo, que fueron denominados **MES-4AB** y **MES-CNA**. Ambos medios tan solo diferían en los antibióticos que incorporaban y compartían la base nutritiva formada por Bacto™ Brain Heart Infusión - BHI (BD), que se incorpora en una concentración de 37g/l y acetato de sodio (Panreac) a 1.5g/l. El acetato de sodio, se incluye en el medio como inhibidor del crecimiento de bacterias no lácticas, y por consiguiente es un potenciador del crecimiento

de las bacterias ácido lácticas, entre las que se encuentran los géneros *Lactococcus* y *Streptococcus* (Aguirre y col., 1993).

Tabla 7. Composición del Bacto™ Brain Heart Infusión – BHI, BD. (*)

Infusión de cerebro de ternero (200g)	7.7g
Infusión de corazón de ternera (250g)	9.8g
Peptona Proteosa	10.0g
Dextrosa	2.0g
Cloruro Sódico	5.0g
Fosfato diSódico	2.5g

(*) Composición aproximada por litro.

Partiendo de esta base nutritiva, procedimos a la selección de los antibióticos que deberíamos añadir con el fin de inhibir el crecimiento de otros microorganismos que pudieran estar presentes. En primer lugar seleccionamos el ácido nalidíxico y la colistina (Sigma) por su clásica actividad bactericida frente a bacterias Gram negativas, en las concentraciones ya descritas por Ellner y col. (1966). Estos dos antibióticos serían incorporados en los dos medios antes mencionados.

En segundo lugar, con el **MES-4AB**, quisimos desarrollar un medio de enriquecimiento selectivo para *L. garvieae*. Para ello, junto al ácido nalidíxico y colistina, incluimos otros dos antibióticos frente a los cuales las cepas de *L. garvieae* patógenas de peces y aisladas en nuestro laboratorio presentan una clara resistencia (Domínguez y col., 2000): sulfametazina y lincomicina (Sigma). Por tanto, los dos medios utilizados, únicamente se diferenciaban en los antibióticos que los componían: el medio **MES-CNA**, con colistina y ácido nalidíxico y el medio **MES-4AB** con los 4 antibióticos (Tabla 8). La mezcla de la base nutritiva (BHI y acetato de sodio) se esterilizaba en el autoclave (121°C - 15min) y los antibióticos se añadían una vez el medio estuviera atemperado (Figura 6).

Los cuatro antibióticos eran conservados en soluciones *stock* a una temperatura de -80°C hasta el momento de su utilización. Las concentraciones finales de la colistina y el ácido nalidíxico en las que eran añadidos al medio fueron basadas en los parámetros descritos por Ellner y

col. (1956). En el caso de la lincomicina y sulfametazina, nos basamos en resultados previos obtenidos en nuestro laboratorio, relacionados con la sensibilidad de *L. garvieae*.

Tabla 8. Composición de los medios de enriquecimiento selectivos (M.E.S.).

	MES-CNA	MES-4AB
Brain Heart Infusión	37g/l	37g/l
Acetato de Sodio	1,5g/l	1,5g/l
Colistina Sulfato	10 µg/ml	10 µg/ml
Ácido Nalidíxico	15 µg/ml	15 µg/ml
Lincomicina	-	20 µg/ml
Sulfametazina	-	100 µg/ml

Los protocolos de preparación y optimización de estas soluciones variaban entre los antibióticos. Así, la sulfametazina era disuelta en NaOH 2.5 N, el ácido nalidíxico en NaOH 1N, mientras la lincomicina y colistina se disolvían en agua destilada estéril. Una vez disueltas las soluciones, se alcanzaba el volumen final con agua destilada estéril en todos los casos. En la Tabla 9, se muestra las potencias de los cuatro antibióticos empleados, la concentración final en la que eran añadidos al medio y la fórmula matemática para el cálculo del volumen final requerido usando dichos parámetros.

Tabla 9. Relación de antibióticos utilizados: potencia y concentración final en la que son añadidos al medio de enriquecimiento.

	POTENCIA	CONCENTRACION FINAL
Sulfametazina	1000 µg/ml	100 µg/ml
Lincomicina	1000 µg/ml	20 µg/ml
Acido Nalidíxico	1000 µg/ml	15 µg/ml
Colistina	753 µg/ml	10 µg/ml

$$\text{Volumen final} = \frac{\text{Peso del Antibiótico (mg)} \times \text{Potencia (µg/ml)}}{\text{Concentración solución stock}}$$

3.1.1.2.EVALUACIÓN.

Una vez diseñados los medios de enriquecimiento selectivos, decidimos evaluar en ellos el crecimiento de las bacterias en estudio. Para ello, y gracias a la amplia bacterioteca existente en nuestro laboratorio, seleccionamos un total de 9 cepas de *L. garvieae* aisladas a partir de diferentes especies animales y orígenes geográficos para obtener un grupo heterogéneo y representativo. Además, incluimos las dos cepas tipo de *S. parauberis* y *S. iniae* (Tabla 10).

Todas las cepas fueron descongeladas en el momento de iniciar la experiencia y sembradas por agotamiento en placas de Columbia Agar Sangre (BioMérieux España, S.A.). Las condiciones de incubación de las placas fueron 30°C, durante 24 horas en el caso de *L. garvieae* y *S. parauberis* y 48 horas para *S. iniae*.

Con cada una de ellas se realizó una suspensión en solución salina estéril (9% NaCl), equiparable al 0,5 de la escala de McFarland ($1,5 \times 10^8$ UFC/ml). Tras realizar 7 diluciones decimales seriadas, inoculamos 1 ml de la 7ª dilución (aproximadamente 10^2 UFC), en 30 ml de cada uno de los medios de enriquecimiento diseñados (MES-4AB y MES-CNA). Posteriormente, se recogían periódicamente alícuotas de 100µl, para realizar diluciones y recuentos y cuantificar la concentración bacteriana en el medio. En el caso de *L. garvieae*, esta experiencia se realizó 3 veces con cada cepa, ya que se realizaron incubaciones a 14°C, 24°C y 30°C con el fin de conocer la temperatura óptima de crecimiento de esta bacteria en los medios diseñados. La prueba se detenía cuando la concentración bacteriana estaba próxima a 10^9 UFC/ml. En el caso *S. parauberis* y *S. iniae*, tan solo se incubaron a 30°C, en base a los resultados obtenidos con la prueba anterior de *L. garvieae*.

Tabla 10. Cepas de *L. garvieae*, *S. parauberis* y *S. iniae* utilizadas en la evaluación de los medios de enriquecimiento.

Especie	Cepa	
<i>L. garvieae</i>	CP1	Trucha arco iris (España) - 1992
	5664/01	Trucha arco iris (España) - 2001
	1684	Trucha arco iris (Italia) - 1997
	396/02b	Cerdo (España) - 2002
	1364/02	Cerdo (España) - 2002
	306/79	Humano (EE.UU) - 1979
	4289	Agua piscifactoría (España) - 1998
	G-34	Vaca (España) - 1999
	30/02S	Urraca (España) - 2002
<i>S. iniae</i>	ATCC 29178 ^T	Cepa tipo
<i>S. parauberis</i>	NCDO 2020 ^T	Cepa tipo

3.1.2. SELECCIÓN DEL MEDIO DE ENRIQUECIMIENTO, CONDICIONES DE INCUBACIÓN Y PROTOCOLO DE EXTRACCIÓN.

En este apartado enriquecimos en los medios diseñados 30 muestras de harinas de pescado comerciales utilizadas de forma rutinaria en la formulación de piensos compuestos. Utilizamos los dos medios de enriquecimiento diseñados, 3 tiempos de incubación (24, 48 y 72h) y dos protocolos de extracción del ADN bacteriano. En función de los resultados obtenidos, seleccionaríamos la metodología más adecuada para la detección de *L. garvieae*, *S. parauberis* y *S. iniae* en muestreos posteriores.

3.1.2.1. SELECCIÓN DE MUESTRAS.

Dos empresas españolas, dedicadas a la nutrición animal, nos proporcionaron en 2003 un total de 30 muestras de harinas de pescado. Todas ellas habían sido, o iban a ser, incluidas en sus formulaciones para la fabricación de piensos compuestos destinados a la explotación piscícola o

porcina. Todas las muestras se recibieron en contenedores de plástico individuales y correctamente identificadas (numero de referencia, procedencia y tipo). Tras su recepción, fueron referenciadas con las letras HP seguidas de números consecutivos del 1 al 30. Todas ellas fueron procesadas a lo largo de las 4 semanas posteriores a su recepción. Las 30 muestras seleccionadas, tuvieron la siguiente distribución:

- ✚ **21 harinas** procedentes de Perú. Todas ellas provienen de pesca extractiva (excedentes que no se destinan al consumo humano, bien por que la calidad no sea válida para su consumo o por tratarse de especies sin valor comercial en el mercado). De esta selección 12 de ellas pertenecían a la categoría LT, con un porcentaje de proteína superior al 70%, 1 muestra con el 70% de proteína bruta y el resto (8) con un 65%.

- ✚ **9 harinas** procedentes de empresas conserveras del norte de España, fundamentalmente de atún, sardina, anchoa, jurel y caballa. Seleccionamos 8 muestras con un porcentaje del 60% en proteína bruta y 1 muestra con un 57% (Raquel Lázaro, conversación personal).

3.1.2.2. PREPARACIÓN E INCUBACIÓN DE LAS MUESTRAS.

Tal y como sugiere la Normativa Europea UNE-EN ISO 6579 de Microbiología de los alimentos para consumo humano y alimentación animal [Método horizontal para la detección de *Salmonella* spp (ISO 6579:2002)], las determinaciones deben realizarse en una dilución 1/10. En nuestro caso, decidimos acogernos a esta normativa para todas nuestras determinaciones, puesto que las muestras analizadas eran materias primas destinadas a la alimentación animal. De esta manera, estandarizamos las

muestras en 25 gramos, para ser enriquecidas en 225 ml del medio de enriquecimiento selectivo.

Después de pesar las muestras, se añadían en condiciones de máxima higiene en botellas de vidrio Pirex® previamente esterilizadas y a continuación se añadía el medio de enriquecimiento completo y atemperado. Todas estas operaciones se realizaron en cabina de flujo laminar acreditada EN 12469 (Modelo Telstra Cytostar. España).

Las muestras se incubaron a 30°C y en condiciones de agitación a 150 r.p.m., proceso que garantizaba la homogeneización de las muestras en el medio de enriquecimiento, así como la oxigenación de la mezcla y la distribución de los nutrientes.



Foto 9. Muestras de harinas de pescado y piensos compuestos (25g) preparadas para ser enriquecidas.

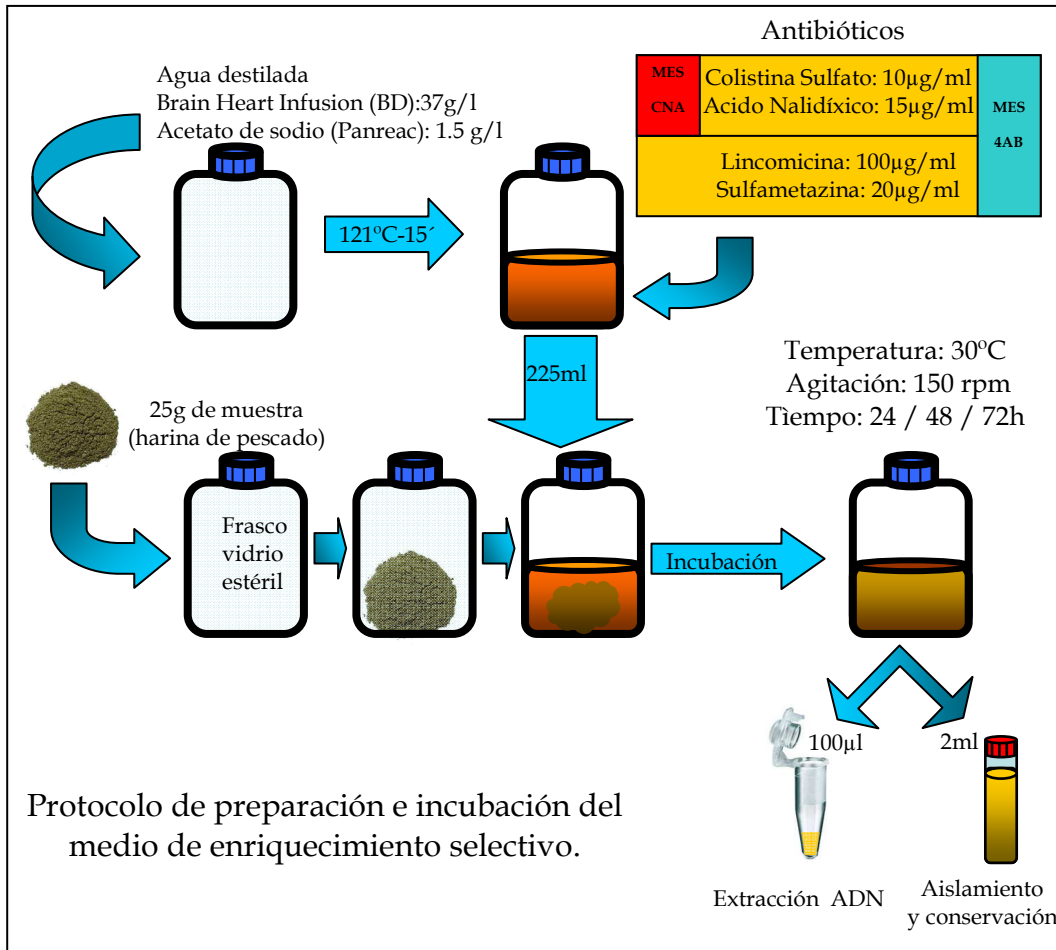


Foto 10. Medio de enriquecimiento selectivo (225ml) siendo distribuido en las muestras.

Las 30 muestras de harinas de pescado fueron incubadas por duplicado en los dos medios de enriquecimiento (MES-4AB y MES-CNA) a lo largo de 72 horas, obteniéndose alícuotas de 100µl a las 24, 48 y 72 horas para la extracción de ADN. Estas podían ser congeladas a -20°C hasta su procesado o iniciar el protocolo de extracción de ADN seguidamente al enriquecimiento. Además se guardó un volumen mayor (2 ml), para aquellos casos positivos por PCR donde se efectuaría el aislamiento

bacteriano (Figura 6). En total se obtuvieron 180 alícuotas (30 muestras x 3 tiempos de incubación x 2 medios de enriquecimiento).

Figura 6. Protocolo de preparación, inoculación e incubación de los medios de enriquecimiento selectivo.



3.1.2.3. PROTOCOLOS DE EXTRACCIÓN DE ADN.

Utilizamos 2 métodos de extracción de ADN diferentes para cada una de las 180 alícuotas de harinas de pescado enriquecidas en el apartado anterior, sumando así un total de 360 determinaciones.

A. Protocolo de Casas Modificado.

Este protocolo estuvo basado en la técnica descrita por Casas y col. (1995), que utiliza el tiocianato de guanidinio como ingrediente fundamental por su capacidad de lisis bacteriana. Introduciendo leves modificaciones, el protocolo finalmente aplicado se detalla a continuación:

- ✚ Añadíamos 400µl del Buffer de lisis (Tabla 11) a los 100µl de la muestra en un tubo de 1.5ml.
- ✚ Tras agitar activamente la mezcla en vortex, se dejaba reposar a temperatura ambiente durante 10 minutos, para que la acción del buffer fuera efectiva.
- ✚ Transcurrido este tiempo, añadíamos 500µl de isopropanol [2-Propanol (Panreac)], conservado a -20°C. La mezcla de nuevo era homogenizada y centrifugada 10 minutos a 13.500rpm.
- ✚ Eliminábamos mediante decantación el sobrenadante y añadíamos 500µl de Etanol 70%, igualmente conservado a -20°C. Volvíamos a agitar vigorosamente (en vortex), intentando desprender el pellet de las paredes del tubo y de nuevo centrifugábamos la mezcla durante 10 minutos a 13.500rpm.
- ✚ Transcurrido este tiempo, se eliminaba el sobrenadante por decantación activa y se mantenían los tubos abiertos durante 30 minutos para facilitar la evaporación de los restos de etanol.
- ✚ El pellet final se resuspendía en 40µl de Agua libre de ADNAsas (Sigma). Tras un pulso de centrifugación, el ADN estaría listo para ser añadido a la PCR.

Tabla 11. Composición del buffer de lisis para un volumen final de 10ml.

Tiocianato de Guanidinio (Sigma) 5M	8025 µl
Citrato Sódico (Sigma) pH 7 - 1M	250 µl
DTT (1,4 Dithiothreitol) 1M (Merck)	10 µl
Sarkosyl 3% (Sigma)	1665 µl
Glicógeno 20mg/ml (Roche)	50 µl
Volumen Final	10.000µl

B. Protocolo Fast DNA Modificado.

En esta ocasión utilizamos la base del kit comercial *FastDNA*® *SPIN Kit for Soil* [Q-biogene Inc, (BIO101 Systems, Carlsbad, USA)]. Este método está especialmente diseñado para la extracción de ADN en muestras de suelos y otras fuentes medioambientales y basa su efectividad en cuatro puntos fundamentales (de Juan, 2005):

- ✚ Homogeneización y rotura celular mecánica con microbolas de Zirconio y sistema Fastprep® FP120 (Qbiogene Inc,)
- ✚ Precipitación de las proteínas.
- ✚ Adsorción selectiva del ADN a un gel de sílice y eliminación de inhibidores de la PCR.
- ✚ Lavado y purificación del ADN

Al igual que hicimos con el protocolo anterior (Casas Modificado) fuimos adaptando este sistema a nuestras necesidades, y la primera gran modificación fue prescindir de las dos fases iniciales del protocolo prescrito por la casa comercial, por no considerarlas necesarias debido a la naturaleza líquida de nuestras muestras (medio de enriquecimiento). Finalmente conseguimos estandarizar el protocolo más eficaz, rápido y sencillo de todos los testados, y que detallamos a continuación:

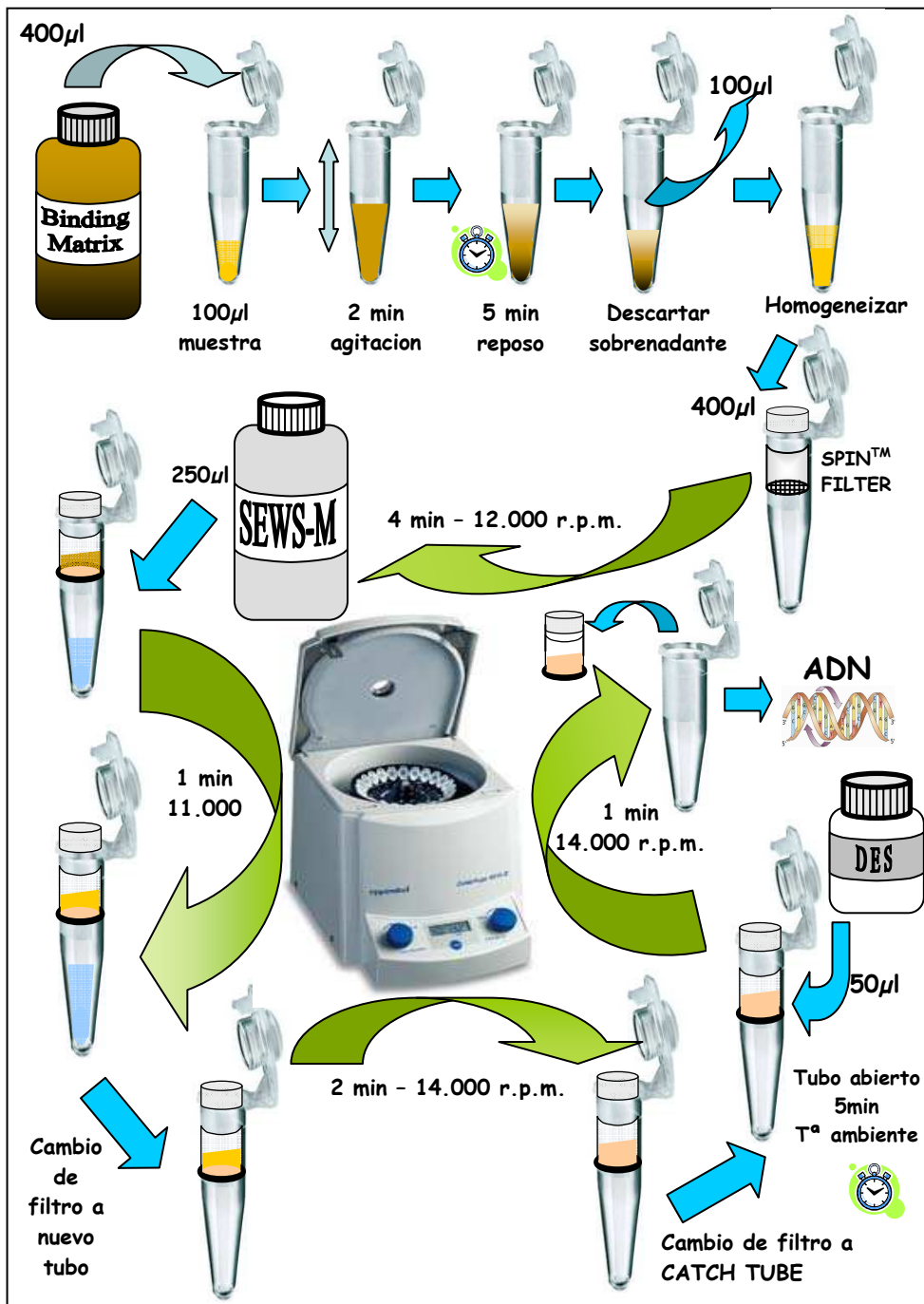
- a. Partimos de una alícuota de 100µl del medio de enriquecimiento (Figura 7) en un tubo Eppendorf de 1,5ml.
- b. Añadimos 400µl del reactivo *Binding Matrix* (DNA Binding Matrix Solution) a la muestra.
- c. La mezcla de la muestra y el *Binding Matrix* es agitada durante dos minutos, para facilitar que la acción del tiocianato de guanidinio sea efectiva y la correcta homogeneización Muestra-Reactivo. A continuación se deja en reposo durante 5 minutos, permitiendo así la decantación de la matriz de sílice que envuelve el ADN,

quedando en el sobrenadante los restos de materia orgánica e inhibidores de la reacción PCR.

- d. Descartamos 100µl del sobrenadante, para concentrar la porción válida del extracto. Homogeneizamos con micropipeta el sobrenadante con la fracción decantada y lo añadimos todo (400µl) conjuntamente a los tubos SPIN™ FILTER (tubos de polipropileno con membranas y filtros).
- e. Centrifugamos la muestra 4 minutos a 12.000 r.p.m., siendo decantado todo el sobrenadante en el depósito inferior del SPIN™ FILTER, que por el contrario retiene la matriz con el ADN en el filtro.
- f. Añadimos al filtro 250µl del tampón SEWS-M (Salt Ethanol Wash Solution) y centrifugamos 1 minuto a 11.000 r.p.m. Este tampón al tener una alta concentración iónica y un alcohol, lava el filtro y la matriz de sílice con el ADN, depurando y retirando impurezas.
- g. A continuación cambiamos el filtro a un nuevo tubo de 1,5ml, el cual es centrifugado de nuevo 2 minutos a 14.000 r.p.m para facilitar el secado de las paredes del filtro.
- h. Volvemos a cambiar el filtro a un tubo *Catch Tube* proporcionado en el kit, y se mantiene abierto durante 5 minutos a temperatura ambiente para secar la matriz de sílice.
- i. Transcurrido este tiempo añadimos 50 µl de DES (*DNA Elution Solution Ultra-pure water*) y homogeneizamos la suspensión. Centrifugamos otro minuto a 14.000 r.p.m., descartamos el filtro y el filtrado obtenido es el ADN listo para ser utilizado.

El ADN obtenido podía ser utilizado para la reacción de PCR en el mismo día de la extracción o ser congelado a -20°C hasta el momento de su utilización. Para asegurarnos que la muestra no se contaminaba durante el proceso, se incluía un control negativo (100 µl agua destilada estéril), junto al procesado rutinario de las muestras (de Juan, 2005).

Figura 7. Protocolo de extracción de ADN por el método Fast DNA Modificado.



Finalmente, con el fin de evaluar en condiciones artificiales la eficacia de los dos protocolos de extracción utilizados, contaminamos 25g de harina de pescado [la misma muestra que la seleccionada para la experiencia de la medición de la sensibilidad de la técnica (capítulo 3.1.4.1.1.)] con 10^6 UFC de *L. garvieae* (5664/01). Tras el enriquecimiento en

los medios MES-4AB y MES-CNA durante 48h, extrajimos el ADN con los dos protocolos de extracción. Repetimos este experimento en 5 ocasiones con cada protocolo para obtener resultados reproducibles.

Seguidamente, para comprobar la posible presencia de inhibidores de la PCR, repetimos la experiencia con los mismos lisados descritos en el párrafo anterior, pero antes de incorporar los 5µl del ADN en el Mix de la PCR, este fue mezclado con otros 5µl de ADN del control positivo de *L. garvieae* (5664/01) que utilizamos en todas las reacciones.

3.1.3. IDENTIFICACIÓN MOLECULAR. TÉCNICA DE PCR MÚLTIPLE.

En este estudio hemos aplicado una PCR múltiple para la detección conjunta de *L. garvieae*, *S. iniae* y *S. parauberis* en una sola reacción de amplificación (Mata y col., 2004a; Baeck y col., 2006).

3.1.3.1. ELECCIÓN DE OLIGONUCLEÓTIDOS.

En la Tabla 12, se muestran las secuencias de los oligonucleótidos utilizados en la PCR múltiple (Mata y col., 2004a). Todos ellos fueron sintetizados por Roche Diagnostic S.L. (TIB Mol Biol, Berlin, Alemania).

Tabla 12. Secuencias de los oligonucleótidos incluidos en la PCR múltiple.

Patógeno	Primers	Secuencia (5´- 3´)	Gen	Amplícón
<i>L. garvieae</i>	pLG-1	CATAACAATGAGAATCGC	16S	1.100pb
	pLG-2	GCACCTCGCGGGTTG	ARNr	
<i>S. iniae</i>	LOX-1	AAGGGGAAATCGCAAGTGCC	lctO	870pb
	LOX-2	ATATCTGATTGGGCCGTCTAA		
<i>S. parauberis</i>	Spa 2152	TTTCGTCTGAGGCAAGTGCC	23S	718pb
	Spa 2870	GCTTCATATATCGCTATACT	ARNr	

3.1.3.2. REACCIÓN DE PCR.

La reacción de PCR se efectuó en un volumen final de 50 µl que presentaba la siguiente composición:

- ✚ 5 µl (Casas Modificado) o 10µl de ADN (Fast DNA Modificado).
- ✚ 5 µl de Standard PCR Buffer 10X con Mg₂Cl 2mM (Biotools; B&M Laboratories, S.A.).
- ✚ 1,25 µl de la mezcla de dNTPs 10mM (Biotools; B&M Laboratories, S.A.).
- ✚ 0,5 µl de cada oligonucleótido empleado 150ng/µl (Roche Diagnostic S.L.). 3 pares de oligonucleótidos, total 3µl.
- ✚ 0,75 µl de Taq-DNA Polimerasa 5U/µl (Biotools; B&M Laboratories, S.A.).
- ✚ 35 µl (Casas Modificado) o 30 µl (Fast DNA Modificado) de Agua libre de DNasas-RNasas (Sigma-Aldrich)

3.1.3.3. CONDICIONES DE LA PCR.

El programa de amplificación de la PCR, constaba de los pasos descritos en la siguiente Tabla (Mata y col., 2004a).

Tabla 13. Programa de ciclos y temperaturas de la PCR múltiple.

	Ciclo	Temperatura	Tiempo
25 Ciclos	Desnaturalización inicial	94°C	2 min
	Desnaturalización	92°C	1 min
	Hibridación	55°C	1 min
	Elongación	72°C	1,5 min
	Elongación final	72°C	5 min

Todas las reacciones PCR se realizaron en un termociclador MyCycler™ (BioRad®) y el producto amplificado se visualizó en geles de agarosa al 2%, con buffer TAE 1X, utilizando 80µl/ml de iQ™ SYBR Green SuperMix (BIO-RAD) para teñir el ADN. Como marcador de peso

molecular se utilizó 100bp Ladder, Biotools (B&M Laboratorios, S.A., Madrid).

3.1.4. DETERMINACIÓN DE LA EFICACIA DE LA METODOLOGÍA.

En esta prueba, planteamos una serie de contaminaciones artificiales seriadas en harina de pescado con el fin de conocer el umbral de detección para cada una de las bacterias del estudio aplicando la metodología de enriquecimiento selectivo, extracción de ADN y PCR múltiple seleccionada.

3.1.4.1. AUSENCIA DE PATÓGENOS DIANA EN LA HARINA PROBLEMA.

Con este apartado pretendíamos asegurar que la muestra objeto de contaminación artificial no contenía ninguno de las 3 bacterias diana que queríamos estudiar (*L. garvieae*, *S. iniae* y *S. parauberis*).

3.1.4.1.1. Selección de la muestra.

Se seleccionó una muestra de harina de pescado de alta calidad por considerarla menos susceptible de estar contaminada que otras con tratamientos y procesados menos exigentes. Esta harina está encuadrada en la categoría *Vacuum Dried LT* y procede de excedentes de pesca extractiva de Perú. Contiene un porcentaje de proteína bruta superior al 70% (por las bajas temperaturas de fabricación que disminuyen la desnaturalización de las proteínas) y una tasa de T.V.N. (Nitrógeno Volátil Total) inferior a 30mg/100g (www.etsia.upm.es/fedna/Tablas.htm).

3.1.4.1.2. Incubación, extracción de ADN y PCR múltiple.

Tal y como detallamos en el capítulo 3.1.2.2., pesamos 25g de la harina seleccionada que fue mezclada en 225ml de medio de enriquecimiento MES-CNA en contenedores de vidrio previamente esterilizados. La mezcla fue incubada durante 48 horas transcurridas las cuales recogimos una alícuota de 100µl para la extracción de ADN. Repetimos este experimento un total de 6 veces para asegurar la ausencia de los 3 patógenos en estudio.

La extracción de ADN se realizó utilizando el método Fast-DNA Modificado (Figura 7) y la PCR múltiple se llevó a cabo tal y como se detalla en el capítulo anterior (3.1.3).

3.1.4.2. CONTAMINACIÓN ARTIFICIAL DE HARINAS DE PESCADO.

3.1.4.2.1. Selección de cepas.

Al igual que en la experiencia de evaluación de los medios de enriquecimiento para el crecimiento bacteriano, consideramos interesante seleccionar varias cepas de *L. garvieae* para determinar la sensibilidad de la metodología con cada una de ellas (Tabla 10). En esta ocasión, escogimos las cepas **5664/01** (trucha arco iris, 2001), **1364/02b** (cerdo, 2002), **G-34** (vaca, 1999) y **306/79** (humano, 1979). En el caso de los dos *Streptococcus*, incluimos las cepas tipo de *S. iniae* **ATCC 29178^T** y *S. parauberis* **NCDO 2020^T**.

Todas las cepas fueron descongeladas en el momento de iniciar la experiencia y sembradas por agotamiento en placas de Columbia Agar Sangre (BioMérieux España, S.A.). Las condiciones de incubación de las

placas fueron 30°C, durante 24 horas en el caso de *L. garvieae* y *S. parauberis* y 48 horas para *S. iniae*.

3.1.4.2.2. Contaminación artificial individual.

La primera parte de este experimento estuvo basada en la contaminación de 25g de la harina de pescado problema con un solo aislado bacteriano. El objetivo era medir la eficacia de nuestra metodología en ausencia del resto de patógenos piscícolas. A partir de este punto todos los experimentos se realizaron en cabina de flujo laminar acreditada (EN 12469, Modelo *Telstra Cytostar*. España).

A partir de cultivos puros en Agar Sangre preparamos una suspensión bacteriana en 5ml de solución salina estéril (9% NaCl) hasta alcanzar una turbidez igual al 0,5 en la escala de McFarland (equiparable a $1,5 \times 10^8$ UFC/ml) que fue medida en un densitómetro (DENSIMAT, BioMérieux France S.A.). A continuación, realizamos 7 diluciones decimales seriadas (desde 10^7 UFC/ml hasta 10 UFC/ml) a partir de la suspensión inicial (Figura 8). Con el fin de contaminar las harinas con suspensiones bacterianas aproximadas de 1, 5, 10, 20, 50, 100, 200, 500 y 1000 UFC (9 suspensiones), inoculamos las harinas con los volúmenes necesarios de cada dilución, tal y como se expresa en la Tabla 14. Estas 9 suspensiones bacterianas, se realizaron con cada una de las 6 cepas del estudio de manera individual, sumando así un total de 54 determinaciones.

Una vez que los 25g de harina en el recipiente estéril, habían absorbido completamente la dilución bacteriana correspondiente, añadíamos los 225 ml del medio de enriquecimiento.

Tabla 14. Relación de las 9 contaminaciones individuales y recuentos realizados en cada una de las cepas.

Nº	UFC	CONTAMINACIÓN			RECUENTO		
		Volumen	Dilución	UFC/ml	Volumen	Dilución	UFC/ml
9	1000	1 ml	5 ^a	10 ³	2 x 100µl	4 ^a	10 ⁴
8	500	500µl	5 ^a	10 ³	2 x 500µl	5 ^a	10 ³
7	200	200µl	5 ^a	10 ³	2 x 200µl	5 ^a	10 ³
6	100	1ml	6 ^a	10 ²	2 x 100µl	5 ^a	10 ³
5	50	500µl	6 ^a	10 ²	2 x 500µl	6 ^a	10 ²
4	20	200µl	6 ^a	10 ²	2 x 200µl	6 ^a	10 ²
3	10	1ml	7 ^a	10	2 x 100µl	6 ^a	10 ²
2	5	500µl	7 ^a	10	2 x 500µl	7 ^a	10
1	1	100µl	7 ^a	10	2 x 100µl	7 ^a	10

UFC: numero aproximado de colonias que queremos inocular en la harina con la contaminación correspondiente.

Paralelamente realizamos recuentos de las diferentes suspensiones para comprobar que éstas se correspondían con las estimaciones esperadas y cerciorarnos de la pureza de las contaminaciones. Para ello sembramos en superficie con asa de Drigalsky los volúmenes detallados en la Tabla 14, utilizando en cada ocasión 2 placas de Columbia Agar Sangre (BioMérieux España, S.A.). Estas fueron incubadas a 30°C durante 48 horas, para asegurarnos el crecimiento visible de las colonias.

Transcurrido el tiempo de incubación, realizamos la cuantificación de las colonias y calculamos la media aritmética de los recuentos de ambas placas, considerando ésta como el número aproximado de unidades formadoras de colonia (UFC) que habría en las muestras problema tras su contaminación. En los casos de contaminación aproximada con 1000 UFC y 500 UFC (1ml y 500µl de la 5^a dilución), resultó imposible realizar una cuantificación fiable, y la concentración bacteriana fue calculada con las medias ponderadas del resto de inóculos, ajustando cada uno a su factor de dilución.

3.1.4.2.3. Contaminación artificial simultánea.

Una vez conocida la sensibilidad de nuestra metodología para cada uno de los aislados bacterianos por separado, nos propusimos realizar la misma experiencia simultáneamente con las tres especies bacterianas (Tabla 15). En esta ocasión utilizamos las dos cepas tipo de *Streptococcus* (*S. iniae* ATCC 29178^T y *S. parauberis* NCDO 2020^T) y respecto a *L. garvieae*, seleccionamos la cepa epidémica de trucha arco iris española (5664/01) (Vela y col., 2000).

Tabla 15. Ensayos de contaminación bacteriana simultánea y recuentos.

ENSAYO 1 - Contaminación bacteriana simultánea igual al límite de detección individual.					
BACTERIAS	UFC	CONTAMINACIÓN		RECUESTO	
		Volumen	Dilución	Volumen	Dilución
<i>L. garvieae</i>	1	100µl	7 ^a	2x 100 µl	7 ^a
<i>S. iniae</i>	50	500µl	6 ^a	2x 500 µl	6 ^a
<i>S. parauberis</i>	1	100µl	7 ^a	2x 100 µl	7 ^a
ENSAYO 2 - Contaminación bacteriana simultánea 10 veces superior al límite de detección individual.					
BACTERIAS	UFC	CONTAMINACIÓN		RECUESTO	
		Volumen	Dilución	Volumen	Dilución
<i>L. garvieae</i>	10	1ml	7 ^a	2x 100 µl	6 ^a
<i>S. iniae</i>	5x10 ²	500µl	5 ^a	2x 500 µl	5 ^a
<i>S. parauberis</i>	10	1ml	7 ^a	2x 100 µl	6 ^a
ENSAYO 3 - Contaminación bacteriana simultánea 100 veces superior al límite de detección individual.					
BACTERIAS	UFC	CONTAMINACIÓN		RECUESTO	
		Volumen	Dilución	Volumen	Dilución
<i>L. garvieae</i>	10 ²	1ml	6 ^a	2x 100 µl	5 ^a
<i>S. iniae</i>	5X10 ³	500µl	4 ^a	2x 500 µl	4 ^a
<i>S. parauberis</i>	10 ²	1ml	6 ^a	2x 100 µl	5 ^a

UFC: numero aproximado de colonias que queremos inocular en la harina con la contaminación correspondiente.

Esta experiencia de contaminación simultánea fue planteada basándose en los límites de detección individual determinados en el capítulo anterior. En este caso, organizamos el experimento en 3 ensayos con 3 contaminaciones simultáneas diferentes en progresión decimal tal y como detallamos en la Tabla 15. Por lo tanto, en esta ocasión se realizaron un total de 9 determinaciones (3 contaminaciones bacterianas x 3 repeticiones).

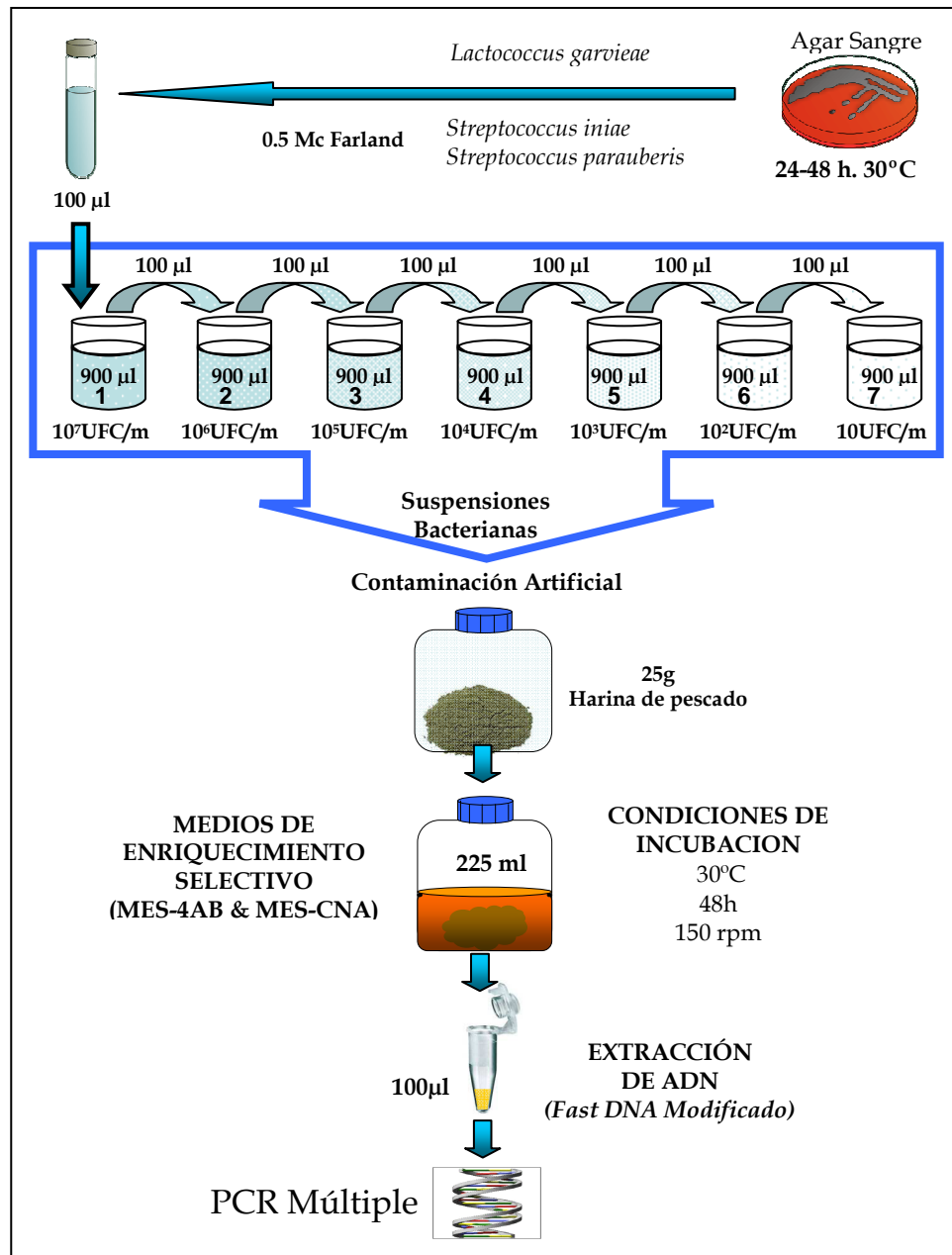
Los procedimientos realizados para el cálculo de diluciones, inóculos y recuentos siguieron las mismas pautas que los realizados en la contaminación artificial individual del capítulo anterior.

Los inóculos bacterianos fueron preparados simultáneamente y a continuación se procedía a la contaminación de la harina, con los tres inóculos de las tres especies bacterianas. Cada una de las experiencias fue repetida por triplicado para comprobar la repetibilidad de la técnica, alternándose el orden de contaminación de la harina con los tres patógenos piscícolas.

3.1.4.2.4. Incubación, extracción de ADN y PCR múltiple.

Las muestras contaminadas artificialmente (individual y simultáneamente) fueron posteriormente incubadas en el medio de enriquecimiento MES-CNA a 30°C, durante 48h en régimen de agitación a 150 r.p.m. El lisado celular de las alícuotas obtenidas tras el enriquecimiento selectivo se realizó con el protocolo de extracción FastDNA Modificado aplicando la técnica PCR múltiple descrita en el capítulo 3.1.3.

Figura 8. Protocolo de contaminación artificial de harinas de pescado.



3.1.4.3. ENSAYOS ADICIONALES CON *Streptococcus iniae*.

Tras la obtención de resultados dispares en la detección de *S. iniae* en la experiencia de contaminación artificial simultánea, decidimos plantear una serie de ensayos que explicaran la ausencia de amplificación de esta especie bacteriana aún en contaminaciones bacterianas muy altas (capítulo 4.2.3.).

1.- En primer lugar, aplicamos de nuevo la extracción de ADN y la PCR múltiple a los caldos enriquecidos y conservados a -20°C . Este ensayo se realizó sobre una de las tres repeticiones de los tres ensayos de contaminación simultánea del capítulo anterior.

2.- En segundo lugar, utilizando el ADN extraído de las tres experiencias del capítulo anterior, realizamos una PCR individual, incluyendo tan solo los cebadores específicos de *S. iniae*. La composición del Mix para la PCR fue la siguiente:

- ✚ 10 μl de la extracción de ADN obtenida en el paso 1.1.3.
- ✚ 5 μl de Standard PCR Buffer 10X con Mg_2Cl 2mM (Biotools; B&M Laboratories, S.A.).
- ✚ 2 μl de la mezcla dNTPs 10mM (Biotools; B&M Laboratories, S.A.).
- ✚ 1 μl de cada oligonucleótido - 150ng/ μl (Roche Diagnostic S.L.).
- ✚ 2,5 μl de Taq-DNA Polimerasa 5U/ μl (Biotools; B&M Laboratories, S.A.).
- ✚ 28,5 μl de Agua DNase-RNase free (Sigma-Aldrich).

Las condiciones de la reacción PCR, fueron las descritas por Mata y col., en 2004b, y las cuales se detallan a continuación:

Tabla 16. Programa de ciclos y temperaturas de la PCR simple de *S. iniae*.

	Ciclo	Temperatura	Tiempo
35 ciclos	Desnaturalización inicial	95°C	2 min
	Desnaturalización	92°C	1 min
	Hibridación	55°C	1 min
	Elongación	72°C	2 min
	Elongación final	72°C	5 min

3.- En tercer lugar, decidimos plantear un pequeño ensayo consistente en la recontaminación de los medios incubados en los ensayos 1, 2 y 3 de la experiencia de contaminación simultánea (capítulo 3.1.4.2.3). Para ello transferimos 100 μl de suspensiones bacterianas de *S. iniae* (con

concentraciones aproximadas de 50, 500 y 5000 UFC) a 1 ml de los caldos enriquecidos en la experiencia anterior. En esta ocasión los caldos recontaminados, no fueron sometidos a un proceso de enriquecimiento, sino que acto seguido extrajimos el ADN directamente, utilizando para ello el método Fast DNA Modificado. Con ello pretendíamos comprobar si el proceso de enriquecimiento pudiera ser la causa de la ausencia de amplificación de *S. iniae* aún con concentraciones bacterianas muy altas. Con los lisados obtenidos, procedimos a realizar la PCR múltiple descrita anteriormente (3.1.3).

3.2.DETECCIÓN DE *Lactococcus garvieae* y *Streptococcus parauberis* EN HARINAS DE PESCADO, PIENSOS COMPUESTOS Y AGUAS.

En este nuevo capítulo del estudio aplicamos la metodología descrita para el enriquecimiento y detección molecular diseñada, en harinas de pescados, piensos compuestos y aguas. Nuestro propósito era conocer la presencia de estos importantes patógenos piscícolas en este tipo de matrices.

Tal y como hemos comentado en el capítulo de Justificación y Objetivos, la detección de *L. garvieae* supone uno de los objetivos fundamentales del presente estudio. A este respecto, *S. parauberis* también resulta de gran importancia por la seria amenaza que representa para los cría del rodaballo en el norte de España. Sin embargo, debido a la escasa trascendencia de *S. iniae* para la acuicultura española [unido a los resultados obtenidos en la puesta a punto de la metodología, (capítulos 4.2.3 y 4.2.4 de Resultados y Discusión)], dejamos de incluir a esta especie bacteriana en los protocolos de PCR múltiple.

3.2.1. HARINAS DE PESCADO.

Se procesaron un total de 83 muestras de harinas de pescado remitidas a nuestro laboratorio en contenedores de plástico individuales, con información acerca del año de fabricación, número de lote, destino y composición. Todas ellas habían sido fabricadas e incluidas en la formulación de piensos compuestos durante los años 2003 (30 muestras) y 2006 (53 muestras).

Un total de 4 empresas de fabricación de piensos compuestos nos abastecieron las muestras: 77 harinas repartidas en 3 empresas españolas y 6 muestras de una fábrica alemana. La procedencia y lugar de fabricación de las harinas se distribuyó de la siguiente manera:

- ✚ Industria conservera en España: 54 muestras
- ✚ Excedentes de la pesca extractiva en: Perú (22 muestras), Alemania (6 muestras) y Noruega (1 muestra).

Atendiendo al porcentaje de proteína bruta de las muestras, recibimos 2 harinas con un 57%, 56 harinas con un 60%, 10 clasificadas como 65%, 2 del 70% y 13 de la categoría LT. Ochenta de las muestras recibidas formaron parte de la formulación para piensos de peces de crianza (piensos extrusionados) y 3 habían sido incorporadas en fórmulas para ganado porcino (piensos granulados).

Cabe destacar, que en el total de las muestras de harinas de pescado procesadas (83) se encuentran incluidas las 30 harinas de 2003 utilizadas en la puesta a punto de la metodología (capítulo 3.1.2.1). Las harinas europeas (España, Alemania y Noruega) se recibieron en laboratorio transcurridos 10-15 días desde su fabricación. Sin embargo, las muestras procedentes de Perú llevaban entre 5 y 7 meses fabricadas cuando se recibieron en el laboratorio.

Todas las muestras de 2003 se procesaron transcurridos 6-8 meses desde su recepción. Las harinas del 2006 se procesaron dentro de los 7 días posteriores. El total de las muestras recibidas se repartió de la forma indicada en la Tabla 17.

Tabla 17. Número de muestras de harinas de pescado procesadas según el año de fabricación, procedencia y tipo.

Año Fabricación	País	Tipo	Nº Muestras
2003	España	57%	1
		60%	8
	Perú	65%	8
		70%	1
		LT	12
2006	España	60%	45
	Alemania	57%	1
		60%	3
		65%	2
	Perú	70%	1
	Noruega	LT	1

3.2.1.1. SUPERVIVENCIA BACTERIANA EN LAS HARINAS DE PESCADO.

En este apartado, estudiamos la supervivencia de las bacterias objeto de nuestro estudio cuando las harinas de pescado se almacenan durante un tiempo prolongado en sus contenedores originales y en lugar fresco, seco y protegido de la luz.

En primer lugar, seleccionamos un total de 19 harinas, que fueron recibidas en el laboratorio durante el año 2003 y que habían sido almacenadas durante 3 años desde su fabricación. Todas las harinas formaron parte de dietas para peces de crianza. Once de ellas procedían de la pesca extractiva de Perú (10 del 65% de proteína bruta y 1 LT) y el resto provenían de la industria conservera española (todas ellas con un 60% de proteína). En segundo lugar, procesamos de nuevo en 2006, 5 muestras de

harinas almacenadas durante 3 años, que habían resultado claramente positivas a *L. garvieae* y *S. parauberis* en el año 2003.

3.2.2. PIENSOS COMPUESTOS.

Seis empresas españolas dedicadas a la nutrición animal nos abastecieron un total de 56 piensos compuestos durante el año 2006. Tan solo los piensos que iban a ser destinados a los peces de crianza, fueron fabricados mediante extrusión y todos ellos contenían harina de pescado en su composición. El resto fueron fabricados mediante granulación tradicional y fueron destinados al ganado porcino, vacuno, ovino y conejos con la distribución y composición detallada en la Tabla 18. Todos los piensos recibidos se procesaron en los 7 días posteriores a su recepción y antes de 15 días desde su fabricación.

Tabla 18. Número de muestras de piensos compuestos procesados según el año modo de fabricación, destino y composición.

Tipo Fabricación	Destino	Harina Pescado	Nº Muestras
Extrusión	Peces	Si	38
Granulado	Cerdos	Si	6
		No	6
	Terneros	Si	1
		No	1
	Conejos	Si	3
Corderos	Si	1	

3.2.3. MUESTRAS DE AGUAS.

Inicialmente el diseño de este estudio estuvo dirigido a las aguas de entrada y salida de las piscifactorías de trucha arco iris, con el objetivo de conocer la incidencia y características genéticas de las cepas aisladas en cada punto de muestreo. Sin embargo, durante el año 2006, decidimos ampliar la prueba a una extensa selección de aguas, independientemente

de si estas ubicaban alguna explotación piscícola en su curso, incluyendo también aguas residuales de plantas depuradoras.

Se recopilaron un total de muestras 48 aguas, pertenecientes a 6 países diferentes: España (35), Italia (5), República Checa (3), Polonia (2), Francia (2) y Portugal (1). Todas ellas fueron recogidas y procesadas entre los años 2004 y 2006 (Tabla 19). Las muestras españolas se dividieron en:

- ✚ 10 muestras del agua de entrada y 6 de salida de piscifactorías de trucha arco iris, repartidas en las provincias de Granada, Teruel, Salamanca, Segovia, Lérida y Jaén.
- ✚ 16 muestras del agua del curso natural ríos, a su paso por las provincias de Segovia, Madrid, Ávila, Toledo, Córdoba y Soria.
- ✚ 3 muestras de aguas residuales recogidas de la balsa de decantación de depuradoras de la Comunidad de Madrid.

El resto de muestras de otros países pertenecen todas al curso natural de los ríos. Las cinco muestras italianas fueron recogidas en otros tantos ríos, ubicados en las provincias de Udine y Treviso. Los 3 ríos de la República Checa pertenecen a las regiones de Liberec y Plzen, los 2 ríos de Polonia a la provincia de Elblag, los 2 franceses a Flandes y la muestra portuguesa fue recogida en la provincia de Lisboa (Tabla 42 del capítulo 4.4.1.4).

Tabla 19. Número de muestras de aguas procesadas según el país de procedencia, tipo y año de muestreo.

País	Tipo de Muestra	Año	Nº Muestras
España	Entrada Piscifactoría	2004-2006	10
	Salida Piscifactoría	2004-2006	6
	Curso natural de ríos	2006	16
	Agua Residuales	2004-2006	3
Francia	Curso natural de ríos	2006	2
Portugal	Curso natural de ríos	2006	1
Italia	Curso natural de ríos	2006	5
Polonia	Curso natural de ríos	2006	2
República Checa	Curso natural de ríos	2006	3

Las muestras de agua eran recogidas en contenedores de polipropileno estériles, estancos y cerrados herméticamente. En la gran mayoría de los casos, y siempre que era posible, se remitían inmediatamente después al laboratorio en condiciones de refrigeración para ser procesadas el mismo día de su recepción (evitando superar las 24 horas tras la recogida). El volumen recogido fue 250 ml. Todas las aguas fueron debidamente identificadas y se acompañaban de una hoja de trabajo con datos de temperatura a la recogida, proximidad a explotaciones ganaderas y piscícolas, condiciones y aspectos sanitarios de las mismas afluentes y efluentes, localidad, provincia y país.

3.2.4. ENRIQUECIMIENTO SELECTIVO, EXTRACCIÓN DE ADN Y PCR MÚLTIPLE.

Todas las muestras de harinas de pescado, piensos compuestos y aguas fueron cultivadas en el medio de enriquecimiento MES-CNA, a una temperatura de 30°C, durante 48 horas y en agitación a 150 r.p.m. La cantidad de muestra de harinas y piensos fue de 25g en 225ml de MES-CNA (relación 1/10). En el caso de las aguas, el volumen de muestra analizado fue en esta ocasión de 110 ml, disminuyendo consecuentemente el volumen del medio de enriquecimiento selectivo a 115 ml (relación aproximada 1/1).

El protocolo de extracción de ADN fue el método Fast DNA Modificado. A todas las alícuotas obtenidas, fue aplicada una PCR múltiple con los oligonucleótidos de *L. garvieae* y *S. parauberis*, sustituyendo por agua libre de ADNasas y RNAasas (Sigma-Aldrich), el volumen correspondiente a los cebadores de *S. iniae* (1µl) del protocolo inicial (capítulo 3.1.3.2.), que como acabamos de comentar, dejamos de incluir en los protocolos de PCR.

3.3. AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE *Lactococcus garvieae*.

3.3.1. AISLAMIENTO DE *Lactococcus garvieae* A PARTIR DE HARINAS DE PESCADO, PIENSOS Y AGUAS.

En este apartado, con el fin de profundizar el estudio y ante la importancia de *L. garvieae* como agente productor de la lactococosis de la trucha arco iris, nos planteamos su aislamiento partir de los medios de enriquecimiento positivos a la PCR y almacenados a temperatura de -20°C.

3.3.1.1. MEDIOS DE CULTIVO Y CONDICIONES DE INCUBACIÓN.

Para el aislamiento de *L. garvieae* utilizamos diferentes medios de cultivo y condiciones de incubación antes de seleccionar el medio y protocolo más apropiado, tal y como detallamos a continuación:

1. **Columbia Agar Sangre** (BioMérieux España, S.A.).
2. **Medio de Agar Peptona Sangre**: con agua de peptona como base nutritiva, al que se incorporaba sangre desfibrinada de cordero (en concentraciones del 1 y 2%), tal y como se detalla en la siguiente Tabla:

Tabla 20. Composición del medio Agar Peptona Sangre.

	1% Sangre	2% Sangre
Peptona tamponada (BioMérieux)	20g/l	20g/l
Agar bacteriológico Europeo (Pronadisa)	15g/l	15g/l
Sangre desfibrinada de cordero (Oxoid)	10ml/l	20ml/l

Autoclave 121°C - 15min

3. **Medio de cultivo diferencial:** sobre una base de peptona tamponada, incorporamos lactulosa, para diferenciar las bacterias del género *Enterococcus*. Junto a este azúcar, incluimos púrpura de bromocresol como indicador de acidificación en las siguientes proporciones:

Tabla 21. Composición del medio de cultivo diferencial.

Peptona tamponada (BioMérieux)	20g/l
Agar bacteriológico Europeo (Pronadisa)	15g/l
Lactulosa (QuimiBios)	5g/l
Púrpura de Bromocresol	2,5ml/l
pH	7,8

Autoclave 121°C - 15min

4. **Medio de cultivo selectivo - 1:** utilizamos en esta ocasión el “Elliker Agar Médium” (Elliker y col., 1956) (Scharlau Microbiology. Chemie S.A., Barcelona. Spain), especialmente diseñado para el aislamiento de *Lactococcus* spp. y que contiene acetato de sodio en su composición. En la preparación y uso seguimos las recomendaciones del fabricante.
5. **Medio de cultivo selectivo - 2:** Columbia CNA (bioMérieux, España S.A.) que contiene colistina y ácido nalidíxico en su composición, inhibiendo el crecimiento de bacterias Gram negativas que pudieran estar en la muestra.

Además de medios de cultivo, combinamos diferentes temperaturas (entre 16 y 30°C) y períodos de incubación (24 y 48h) buscando las condiciones más adecuadas para el aislamiento de *L. garvieae*. El protocolo definitivo adoptado consistió en sembrar los caldos por agotamiento en Columbia CNA (bioMérieux, España S.A.), siendo incubados a 30°C durante 48 horas.

El número de colonias seleccionadas en cada placa dependía del número de colonias diferentes sospechosas y el aislamiento del cultivo. Tratábamos de seleccionar todas aquellas que presentaran una morfología macroscópica similar a la que mostraría *L. garvieae* (forma, tamaño, elevación, superficie, forma del borde, color y hemólisis). Tal y como detallaremos en la Tabla 44 del capítulo de Resultados y Discusión, solíamos resembrar entre 2 y 7 colonias sospechosas en Columbia Agar Sangre, siendo incubadas a 30°C durante 24h para su posterior identificación.

3.3.1.2. HARINAS DE PESCADO.

Tras el procesado de las muestras de harinas de pescado detallado en el capítulo anterior, obtuvimos un total de 18 cepas a partir de medios de enriquecimiento positivos a la PCR. Doce (12) procedían de 4 harinas de la industria conservera española y las otras 6 fueron aisladas de 3 harinas procedentes de la pesca extractiva de Perú (Tabla 22).

Tabla 22. Relación de cepas de *L. garvieae* procedentes de harinas de pescado.

Procedencia	Tipo	Referencia	Año	Cepas
España	57%	HP61	2003	3
	60%	HP60	2003	1
		HP102	2003	5
		BA06/00720	2006	3
Perú	65%	HP84	2003	4
		HP85	2003	1
	70%	BA06/01681	2006	1

3.3.1.3. AGUAS.

En este apartado recopilamos un total de 63 cepas de *L. garvieae* aisladas a partir de medios de enriquecimiento positivos a la PCR (capítulo 3.2.). Veintidós (22) cepas procedían de un total de 12 ríos españoles, 8

cepas de 4 ríos italianos, 4 cepas de 2 muestras de agua de ríos franceses, 3 aislados en 2 ríos polacos y 1 aislado en un río portugués (Tabla 23).

Tabla 23. Relación de cepas de *L. garvieae* procedentes de muestras de aguas.

País	Muestra	Provincia	Río	Referencia	Año	NºCepas
España	Entrada Piscifactoría	Granada	Genazar	E2	2004	3
			Frontil	E5	2005	3
		Teruel	Guadalviar	E3	2005	2
		Jaén	Borosa	BA06/02395	2006	2
			Borosa	BA06/02396	2006	1
	Salida Piscifactoría	Granada	Genazar	S1	2004	1
			Genazar	S2	2004	1
			Genazar	S4	2005	2
			Frontil	S5	2005	1
		Teruel	Guadalviar	S3	2005	1
		Jaén	Borosa	BA06/02397	2006	2
	Ríos	Segovia	Malucas	BA06/01773	2006	1
			Duratón	BA06/02137	2006	1
			Moros	BA06/02145	2006	1
			Riaza	BA06/02552	2006	1
		Madrid	Guadarrama	BA06/02135	2006	3
			Jarama	BA06/02147	2006	2
		Ávila	Alberche	BA06/02148	2006	2
		Toledo	Gévalo	BA06/02259	2006	2
		Córdoba	Guadalquivir	BA06/02414	2006	2
Soria		Duero	BA06/02553	2006	2	
		Abión	BA06/02554	2006	2	
		Ucero	BA06/02555	2006	3	
Aguas Residuales		Madrid	Depuradora	DP1	2004	4
	Depuradora		BA06/02260	2006	2	
Francia	Ríos	Landes	Magescq	BA06/02132	2006	2
			Magescq	BA06/02133	2006	2
Portugal	Ríos	Lisboa	Tajo	BA06/02134	2006	1
Italia	Ríos	Treviso	Melma	BA06/02544	2006	1
			Piavedesella	BA06/02545	2006	4
			Meschio	BA06/02546	2006	2
			La Piave	BA06/02547	2006	1
Polonia	Ríos	Elblag	Tyna	BA06/02730	2006	2
			Marozka	BA06/02731	2006	1

Respecto a los muestreos realizados en piscifactorías españolas de trucha arco iris, se consiguieron aislar 11 cepas en 5 muestras del agua de

entrada y 8 cepas en 6 muestras del agua de salida. A este número habría que sumarle las 6 cepas aisladas en dos muestras de aguas residuales (Tabla 23).

3.3.1.4.DETERMINACIÓN DE LA VALIDEZ Y SEGURIDAD DE LA METODOLOGÍA DE AISLAMIENTO.

Una vez obtenidos los resultados de la metodología de aislamiento aplicada en muestras de harinas de pescado, piensos compuestos y aguas, determinamos la validez (sensibilidad y especificidad) y seguridad (valores predictivos positivos y negativos) de la misma comparando los resultados con los obtenidos en la PCR Múltiple de los caldos enriquecidos y considerando ésta como la técnica de referencia o “gold standard”. Para ello, al tratarse de pruebas dicotómicas con resultados positivos y negativos (detección y aislamiento), enfrentamos los resultados en tablas de 2x2 tal y como expresamos en la Tabla 24.

Tabla 24. Relación entre el resultado de la PCR y el aislamiento bacteriano.

AISLAMIENTO	PCR	
	+	-
+	Verdaderos Positivos (VP)	Falsos Positivos (FP)
-	Falsos Negativos (FN)	Verdadero Negativos (VN)

Los valores de sensibilidad, especificidad y valores predictivos de la metodología de aislamiento, fueron calculados en base a las siguientes fórmulas:

- **Sensibilidad (S)** = $VP / VP + FN$.

- **Especificidad (E)** = $VN / VN + FP$.

- **Valor Predictivo Positivo (VPP)** = $VP / VP + FP$.

- **Valor Predictivo Negativo (VPN)** = $VN / FN + VN$.

3.3.2. AISLAMIENTO DE *Lactococcus garvieae* A PARTIR DE DIFERENTES ESPECIES ANIMALES Y HUMANOS.

3.3.2.1. MEDIOS DE CULTIVO Y CONDICIONES DE INCUBACIÓN.

Todas las cepas procedentes de diferentes especies animales fueron aisladas en Columbia Agar Sangre (bioMérieux España, S.A.). Las muestras procedentes de ganado porcino, vacuno, aves y humanos, fueron incubadas a 37°C durante 24 h en condiciones de aerobiosis, realizando posteriormente subcultivos para proceder a su identificación y caracterización. En el caso de las muestras de peces (trucha arco iris y anguilas), los cultivos primarios fueron incubados a 22°C en aerobiosis durante un máximo de 7 días, siendo resembradas las colonias sospechosas e incubadas a 30°C durante 24h.

3.3.2.2. PECES.

Todos los peces se recibían vivos o cadáveres conservados en hielo en contenedores estancos e isotérmicos. Tras el análisis de los órganos externos, se procedía a realizar la necropsia en cabina de flujo laminar. Para ello utilizábamos materiales estériles, con los que accedíamos a los principales órganos internos siguiendo los criterios básicos de necropsia en especies acuícolas (Collins R., 1993). Con asa de platino estéril recogíamos sistemáticamente muestras de cerebro y riñón anterior y en ocasiones, en función de las lesiones, también hígado, humor acuoso, mucosa intestinal, bazo, corazón y heces (Reichenbach-Klinke H.H. 1980; Padrós y col., 1996).

Obtuvimos un total de 127 cepas de peces, que se repartieron de la siguiente manera:

- ✚ 123 cepas procedentes de casos clínicos de lactococosis en truchas arco iris (*Oncorhynchus mykiss*) procedentes de piscifactorías españolas, italianas e israelitas, tal y como se detalla a continuación:
 - 96 cepas procedentes de 14 piscifactorías españolas, repartidas en las provincias de Segovia, Granada, Jaén, Asturias, La Coruña, Valencia, Teruel, Salamanca, Zamora, Lérida y Cuenca.
 - 8 cepas pertenecientes a 3 piscifactorías italianas, aisladas en nuestro laboratorio y procedentes de la provincia de Treviso.
 - 9 cepas procedentes de 5 piscifactorías italianas situadas en la región del Valle del Po y 10 cepas procedentes de 2 piscifactorías israelitas situadas en la región de Alta Galilea (cortesía del Dr. Avi Eldar).

- ✚ 4 cepas aisladas de anguila europea (*Anguilla anguilla*), procedentes de 2 explotaciones de la provincia de Valencia.

3.3.2.3. GANADO PORCINO.

Recibíamos en el laboratorio muestras de distintos órganos remitidos por nuestros veterinarios de campo o bien el hisopo con la muestra que habían recogido in situ en las explotaciones. Los órganos llegaban en contenedores individuales, refrigerados y debidamente identificados. Tras esterilizar la superficie de la muestra, y trabajando siempre en cabina de flujo laminar, realizábamos un corte en la parte esterilizada, accediendo posteriormente al interior del órgano con hisopo de algodón.

El número de cepas aisladas en ganado porcino fue de 37, todas ellas aisladas durante los años 2001-2003. Los animales procedían de 21 explotaciones diferentes, repartidas en 4 empresas y distribuidas en las

provincias de Segovia, Tarragona, Toledo, Zaragoza, Huesca, Guadalajara, Valladolid y Teruel. La distribución de las cepas en base al órgano de aislamiento fue de la siguiente manera: 15 cepas aisladas en pulmón, 14 cepas en corazón, 4 cepas en ganglio mediastínico y 4 cepas en ganglio traqueobronquial (Tabla 25). Los 8 ganglios presentaban hipertrofia nodular, 10 de las 15 muestras de pulmones (66,6%) presentaban lesiones neumónicas y 8 de las muestras de corazón (57,1%) tenían pericarditis. El resto de muestras de pulmón y corazón no presentaban lesiones macroscópicas aparentes.

3.3.2.4. OTRAS ESPECIES ANIMALES Y HUMANOS.

Se analizaron un total 9 cepas *L. garvieae* aisladas de leche de ganado vacuno con mastitis y 4 cepas aisladas de heces de aves silvestres: 2 cepas a partir de herrerillos (*Parus caeruleus*) y 2 cepas de urracas (*Pica pica*). Finalmente, incluimos dos aislados procedentes de hemocultivos en humanos. Ambos fueron aislados en la provincia de Zaragoza durante el año 2006 (cortesía de C. Aspiroz. Hospital Royo Villanova de Zaragoza).

Tabla 25. Relación de cepas de *L. garvieae* procedentes de diferentes especies animales.

Especie	País	Provincia	Muestra	Años	Nº Cepas
Trucha	España	(1)	Cerebro / Riñón	2001-03	96
Arco iris	Italia	Treviso	Cerebro / Riñón	2001-03	8
	Italia	Valle del Po	Placas	1992-03	9
	Israel	Alta Galilea	Placas	2001-04	10
Anguilas	España	Valencia	Cerebro / Riñón	2000-06	4
Cerdos	España	(2)	Pulmón	2002-03	15
			Corazón	2001-03	14
			Gg. Mediastínico	2001-03	4
			Gg. Traqueobronquial	2003	4
Vacas	España	La Coruña	Leche	1999-03	9
Urracas	España	Madrid	Heces	2002	2
Herrerillos	España	Madrid	Heces	2003	2
Humanos	España	Zaragoza	Sangre	2006	2

(1): ver capítulo 3.3.2.2.

(2): ver capítulo 3.3.2.3.

3.3.3. IDENTIFICACIÓN POR PCR.

Todas las colonias sospechosas de ser *L. garvieae* fueron subcultivadas en Columbia Agar Sangre (bioMérieux España, S.A.), para ser identificadas por PCR.

La extracción de ADN sobre los cultivos bacteriano puros en medio sólido (agar) se realizó siguiendo el protocolo de extracción descrito por Casas y col en 1995, partiendo de suspensiones bacterianas en 50µl en agua destilada estéril, y reduciendo a la mitad los volúmenes de los solventes descritos en el protocolo de Casas Modificado (Capítulo 3.1.2.3).

Más adelante, modificamos el protocolo hirviendo una suspensión bacteriana en 100µl de agua destilada estéril y centrifugando levemente antes de incorporar 5µl del sobrenadante al Mix PCR.

La elección de oligonucleótidos y el programa de amplificación siguieron las pautas descritas por Zlotkin y col. (1998a). La composición del Mix de la PCR se detalla a continuación:

- ✚ 5 µl de la extracción de ADN obtenida por hervido.
- ✚ 5 µl de Standard PCR Buffer 10X con Mg₂Cl 2mM (Biotools; B&M Laboratories, S.A.).
- ✚ 1,25 µl de la mezcla de dNTPs 10mM (Biotools; B&M Laboratories, S.A.).
- ✚ 0,5 µl de cada oligonucleótido empleado 150ng/µl (Roche Diagnostic S.L.).
- ✚ 0,75 µl de Taq-DNA Polimerasa 5U/µl (Biotools; B&M Laboratories, S.A.).
- ✚ 37 µl de Agua libre de DNAsas-RNAsas (Sigma-Aldrich).

3.3.4. CONSERVACIÓN DE LOS AISLADOS.

Todos los aislados identificados como *L. garvieae* se conservaron a -20°C en un medio de congelación con la siguiente composición:

Tabla 26. Medio de congelación para la conservación de cepas de *L. garvieae*.

Caldo triptona (Oxoid)	10 g
Leche descremada en polvo	20 g
Glicerina (Panreac)	80 ml
Agua destilada	320 ml

Autoclave 110°C - 10 min

3.4. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.

El análisis estadístico a lo largo de todo el estudio se realizó mediante el Test exacto de Fisher, incluyendo la corrección de Yates, para un nivel de confianza del 95% (con este nivel de confianza, si el valor de p es inferior de 0,05 se considera que la diferencia es significativa). Para el cálculo y la interpretación de estos valores utilizamos el programa informático de epidemiología ChisQ Versión 4.0.

3.5. CARACTERIZACIÓN DE *Lactococcus garvieae* AISLADO A PARTIR DE DIFERENTES ESPECIES ANIMALES, HARINAS DE PESCADO Y AGUAS.

El estudio se efectuó con un total de 260 cepas de *L. garvieae*. Ciento setenta y nueve (179) cepas procedían de diferentes especies animales, tal y como se detalla en la Tabla 25. Además, recopilamos 18 cepas procedentes de harinas de pescado y 63 de aguas de ríos, piscifactorías y depuradoras (Tablas 22 y 23).

En el caso de las muestras clínicas de especies animales cada aislado bacteriano se corresponde con una única muestra y un solo animal mientras que en las muestras de harinas y aguas obtuvimos más de una cepa por muestra en la gran mayoría de los casos (Tablas 22 y 23).

3.5.1. CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA.

La caracterización bioquímica de los aislados se llevó a cabo mediante el sistema comercial de tiras multisustrato API Rapid ID 32 Strep (bioMérieux España S.A.). Las tiras eran incubadas a 30°C durante 4 horas, y para su lectura usamos los reactivos comerciales recomendados por el fabricante. La lectura se realizó en el lector ATB (bioMérieux España S.A.).

3.5.2. CARACTERIZACIÓN MOLECULAR: ELECTROFORESIS DE CAMPO PULSADO (PFGE).

La electroforesis de campo pulsado (PFGE, *Pulsed Field Gel Electrophoresis*) es un sistema de tipado genético que se basa en el análisis del ADN cromosómico. Esta técnica surgió ante la imposibilidad de separar fragmentos de ADN por medio de la electroforesis tradicional (Schwartz y Cantor, 1984) y tiene como objetivo la obtención de patrones de restricción (REDPs) que permitan la comparación de los distintos aislados y la determinación de su relación genética. Se define REDP (*Restriction Endonuclease Digestión Profile*) como el patrón de bandas de ADN característico de cada cepa obtenido tras el uso de una determinada enzima de restricción (endonucleasa) y la realización de la técnica de electroforesis con unos parámetros establecidos. Brevemente, esta técnica consta de los siguientes pasos:

- a) Extracción y purificación del ADN en condiciones que permitan resultados reproducibles.
- b) Digestión del ADN mediante enzimas de restricción que reconocen unas determinadas secuencias diana.
- c) Electroforesis del producto de digestión en condiciones de cambio de la dirección del campo eléctrico.
- d) Interpretación de resultados, obtención de bandas, patrones de restricción y creación de Dendrograma comparativo.

La electroforesis normal es unidireccional y separa fragmentos de ADN de 0,5 a 25 kb. Sin embargo, PFGE es una electroforesis multidireccional con pulsos eléctricos de diferente duración, que permite la separación de moléculas desde 10 a 2000 kb (Finney, 1992). El protocolo utilizado, ya empleado anteriormente en *L. garvieae* (Vela y col., 2000) se describe a continuación.

3.5.2.1. MATERIALES.

Tampones usados:

1M Tris-HCl pH=8	
Tris Base (Merck)	121,1g
HCl 6N (Panreac)	80ml
Volumen Total	1000ml

0.5M EDTA pH=8	
Titriplex (Panreac)	186,1g
Agua Milli-Q	800ml
Volumen Total	1000ml

TE 1X pH=8	
Tris-HCl 1M	10ml
EDTA 0.5M	2ml
Agua Milli-Q	800ml
Volumen Total	1000ml

Stock Proteinasa K	
Proteinasa K (Sigma)	20mg
Agua Milli-estéril	1 ml

Stock Lisozima	
Lisozima (Sigma)	10mg
Agua Milli-Q estéril	1ml

Tampón de Lisis	
Tris-HCl 1M	12,5ml
EDTA 0.5M	25ml
N-Lauril Sarcosina (50%) (Sigma)	25ml
Agua Milli-Q	100ml
Volumen Total	250ml

TBE 10 X	
Tris 0,9M	108g
Acido Bórico 0,9M (Panreac)	55ml
EDTA 0,5M	40ml
Agua Milli-Q	700ml
Volumen Total	1000ml

Enzimas y reactivos:

- ✚ Endonucleasa de restricción: *Bsp* I (MBI Fermentas)
- ✚ Tampón de la Enzima B+ (MBI Fermentas)

Agarosa

- ✚ Agarosa SSP:
 - 2,9ml de Agarosa SKG 1.2% (BMA)
 - 330 µl SDS 10% (Panreac)
 - 33µl Proteinasa K, 20mg/ml (Sigma)
- ✚ Agarosa MP (Roche)

Aparatos:

- ✚ Colorímetro Vitek (bioMérieux S.A.)
- ✚ Centrífuga modelo 5415D (Eppendorf)
- ✚ Baño termostático (Mettler-Nessler)
- ✚ Moldes desechables (Bio Rad)
- ✚ Agitador orbital (Mettler-Nessler)
- ✚ Sistema CHEF-DRIII (Bio-Rad)
- ✚ Cubeta de electroforesis (Bio-Rad)
- ✚ Capturador de imagen Fluor-S Multimalger (Bio-Rad)
- ✚ Programa informático Quantity One® Versión 4.2.3 (Bio-Rad).
- ✚ Programa informático Bionumerics Versión 2.0 (Bio-Rad)

3.5.2.2. PREPARACIÓN DE LOS BLOQUES.

Partimos de placas de Columbia Agar Sangre (bioMérieux España S.A.), que habían sido incubadas durante 24 horas a 30°C. Después de certificar visualmente la pureza del cultivo, recogíamos aproximadamente la mitad de la placa, con hisopo del algodón estéril previamente humedecido en Tampón TE 1X. El cultivo era transferido a un tubo de 3ml (con 2 ml de Tampón TE 1X), y se ajustaba una suspensión a una

absorbancia de 1,3 [610nm de longitud de onda o 20% de transmitancia en el colorímetro (BioMérieux España S.A.)].

Transferíamos 240µl de la suspensión bacteriana a un tubo de 1,5ml y añadíamos 60µl de lisozima (10mg/ml), previamente preparada. La mezcla era incubada a $37^{\circ} \pm 1^{\circ}C$ durante 10 minutos. Transcurrido este tiempo, se añadían 300µl de la mezcla de agarosa SSP (relación 1:1), previamente preparada en el microondas, homogeneizando bien la mezcla. A partir de 250µl se hacían dos bloques por muestra en los moldes específicos de PFGE y se mantenían en refrigeración ($4^{\circ}C$) durante 5 minutos para facilitar la solidificación.

3.5.2.3. LISIS BACTERIANA.

En recipientes estériles de 25ml, se añadían 4ml del tampón de lisis y 30µl de proteinasa K (20mg/ml). Los bloques eran desmoldados en los recipientes con la mezcla anterior y se incubaban en baño de agua a $55^{\circ} \pm 1^{\circ}C$ en agitación, durante 2 horas. Tras esta incubación, se retiraba el tampón de lisis con gasa estéril y se añadían 10ml de agua milli-Q estéril previamente precalentada a $50^{\circ}C$. La mezcla era incubada a $50^{\circ} \pm 1^{\circ}C$ durante 10 minutos. Este lavado era repetido en las mismas condiciones, seguido de otros cuatro lavados con tampón TE 1X igualmente mantenido a $50^{\circ}C$. Tras el cuarto lavado con TE 1X, se añadían los bloques en un microtubo con 1ml de TE 1X, siendo conservados a $4^{\circ}C$ hasta su utilización

3.5.2.4. RESTRICCIÓN ENZIMÁTICA.

Ayudándonos de una espátula y un bisturí, cortábamos aproximadamente la mitad de cada bloque, siendo introducidos en un nuevo tubo de 1,5ml vacío. En este momento se realizaba la predigestión

enzimática, añadiendo al molde 150 μ l de la mezcla expresada en la siguiente Tabla.

Tabla 27. Mezcla de predigestión enzimática de los bloques de PFGE.

Componentes	Volumen por molde
Agua Milli-Q estéril	135 μ l
Tampón de la Enzima (B+)	15 μ l
Volumen Total	150 μ l

El proceso de predigestión se realizaba en baño de agua a 37°C durante 15 minutos. Transcurrido este tiempo, se retiraba la mezcla del tubo, manteniendo en su interior el molde predigerido y listo para la digestión completa. Esta se realizaba añadiendo 150 μ l de la mezcla expresada en la Tabla 28 e incubándose de nuevo en baño de agua a 37°C durante un mínimo de 16 horas.

Tabla 28. Mezcla de digestión enzimática de los bloques de PFGE.

Componentes	Volumen por molde
Agua Milli-Q estéril	134 μ l
Tampón de la Enzima (B+)	15 μ l
Enzima (<i>Bsp I</i>)	1 μ l
Volumen Total	150 μ l

Pasada esta última incubación, se retiraba la mezcla de digestión y se añadían 200 μ l del tampón TBE (Tris-bórico-EDTA) 0,5X, para detener el proceso.

3.5.2.5. SEPARACIÓN DE LOS FRAGMENTOS DE ADN Y CONDICIONES DE LA ELECTROFORESIS.

En primer lugar debíamos preparar un gel de agarosa al 1%. Para ello añadíamos 2g de agarosa MP (Roche) a 200ml de tampón TBE 0,5X (190ml Agua Milli Q + 10 ml Tampón TBE 10X). La mezcla era fundida en un microondas hasta que fuera totalmente líquida y se mantenía en baño de agua a 45°C para su atemperación y hasta el momento de su utilización.

Se preparaban 2.200 ml de tampón TBE 0,5x (2090ml Agua Milli-Q + 110ml TBE 10X) y antes de comenzar la electroforesis se vertían en la cubeta para que recirculara y disminuyera la temperatura en el circuito hasta 14°C.

Tras montar el soporte para el gel, de forma horizontal, introducíamos en la parte superior el peine. A continuación colocábamos con cuidado las porciones de nuestros bloques, sobre los dientes que habíamos secado previamente con papel de filtro para retirar los excesos que de tampón pudieran quedar. Desde el primer diente y cada 8 o 9 cepas introducimos un marcador molecular, siendo este el producto de digestión formado tras la acción de la enzima *XbaI* sobre la cepa de *Salmonella braenderup* H9812. En este caso aplicamos un protocolo de predigestión de 180µl de Agua + 80 µl del tampón de la enzima y una digestión con 175µl de agua, 20µl de Tampón y 5µl de enzima *Xba I*, siendo incubado este último durante un mínimo de 2 horas.

Una vez colocados todos los bloques, se invertía cuidadosamente el peine de manera que quedaba perpendicular al soporte y se cubría con la agarosa fundida que hemos preparado anteriormente, evitando siempre la formación de burbujas. Cuando ésta estaba ya solidificada, retirábamos el peine, recubriendo de nuevo los pocillos con la agarosa restante.

La temperatura del tampón durante todo el proceso de electroforesis, deberá ser mantenida a 14°C. Cuando toda la mezcla estaba perfectamente sólida, se desmoldaba el gel del soporte, se retira el exceso de agarosa y se introducía en la cubeta CHEF DR III System (BIO-RAD Laboratorios, Inc), asegurando el gel en su posición y seleccionando los parámetros y tiempos adecuados para la electroforesis. Estos, que dependen de la enzima utilizada (*BspI*) fueron los siguientes:

- ✚ Tiempo inicial: 0,1 segundos
- ✚ Tiempo final: 25 segundos
- ✚ Voltios / cm.: 6V

✚ Ángulo: 120°

✚ Tiempo de electroforesis: 21h

Una vez finalizado el tiempo de electroforesis, retirábamos el gel y lo depositábamos en una cubeta de plástico para su tinción con bromuro de etidio. Para ello preparábamos una solución de bromuro (1µg/ml) añadiendo 40µl de bromuro de etidio (10mg/ml) a 400µl de agua y cubríamos el gel con la mezcla resultante. De esta manera el bromuro teñía por inmersión los fragmentos de ADN para poder ser observados posteriormente en el transiluminador de luz ultravioleta. Tras aplicar una leve agitación durante 20 o 30 minutos, retirábamos los excesos de bromuro de etidio mediante un baño de desteñido en agua Milli-Q, durante una hora y media, cambiando el agua cada 20 minutos.

3.5.2.6. INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS.

Llegados a este punto, el gel ya estaba listo para ser observado. La imagen era capturada con el software Fluor-S™ Multilmager (BIO-RAD, Laboratorios, Inc). La imagen obtenida se procesaba en busca de las bandas formadas y se configuraban los perfiles tal y como dicta el manual del Software Bionumerics 2.0 (BIO-RAD). Este mismo programa, será el encargado de construir el dendrograma que agrupará las cepas en diferentes pulsotipos en función de los patrones de restricción obtenidos.

Para los estudios de similaridad de los aislados, empleamos el coeficiente de similitud DICE y la comparación de los patrones de restricción y elaboración del dendrograma, se realizó utilizando los programas informáticos Quantity One® Versión 4.2.3 y Bionumerics Versión 2.0 (Bio-Rad).

Se definió un aislado como diferente cuando presentaba distinto REPD. A su vez, se consideraba que dos o más aislados eran la misma cepa

cuando, independientemente del individuo de procedencia, presentan un REPD común.

Igualmente, se calculó la diversidad genética entre los aislados de la misma especie u origen de muestreo siendo esta el número de perfiles obtenidos dividido entre el número de cepas.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN



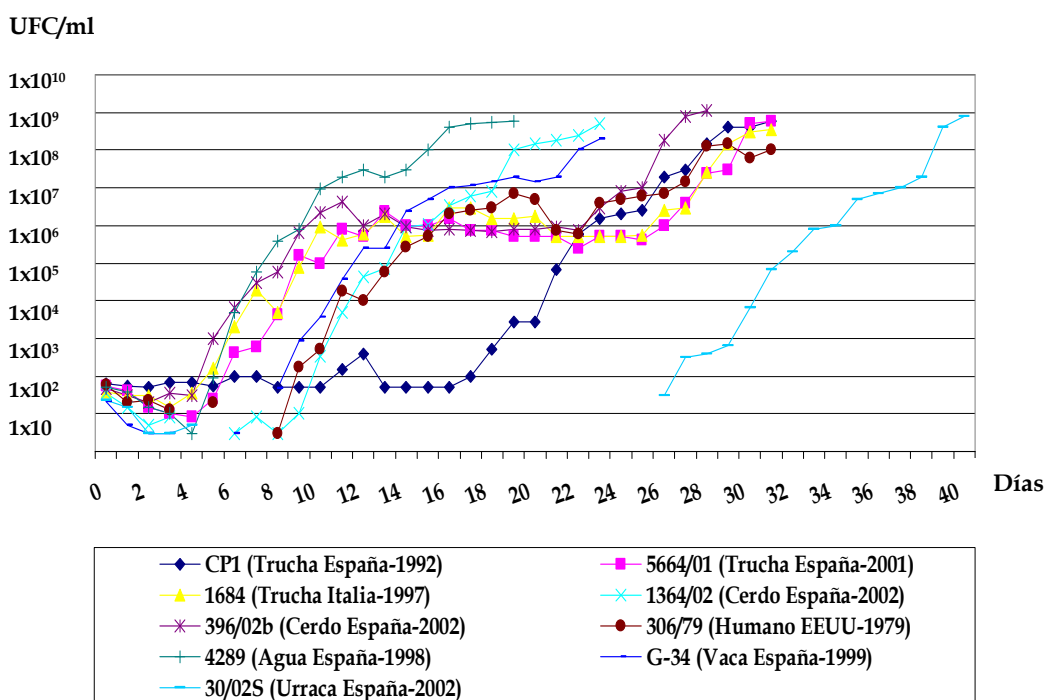
4.1. PUESTA A PUNTO DE UNA METODOLOGÍA PARA LA DETECCIÓN DE *Lactococcus garvieae*, *Streptococcus parauberis* y *Streptococcus iniae* EN MATERIAS PRIMAS, PIENSOS COMPUESTOS Y MUESTRAS MEDIOAMBIENTALES.

4.1.1. DISEÑO Y EVALUACIÓN DE MEDIOS DE ENRIQUECIMIENTO SELECTIVOS.

Una vez realizadas las inoculaciones bacterianas en los medios de enriquecimiento selectivos (MES-4AB y MES-CNA), y tras los recuentos periódicos efectuados, comprobamos que todas las cepas seleccionadas de *L. garvieae* eran capaces de crecer a las 3 temperaturas elegidas (14°C, 24°C y 30°C) en los dos medios diseñados. Sin embargo, se puso de manifiesto como en el medio MES-4AB a 24°C, y especialmente a 14°C, había cepas que mostraban diferencias llamativas en la fase de latencia de la cinética de crecimiento, lo que ocasionó que el tiempo transcurrido hasta alcanzar una concentración final de 10⁹ UFC/ml, fuera diferente entre las distintas cepas (Figuras 9 y 10).

Así por ejemplo, la primera cepa en alcanzar dicha concentración, (fase estacionaria), en la incubación a 14°C, fue la cepa aislada en el agua de una piscifactoría (4289), necesitando 19 días (456 horas). El caso más extremo ocurrió con la cepa aislada de urraca (30/02S), que permaneció en fase de latencia durante 26 días (624 horas), comenzando posteriormente un crecimiento exponencial hasta alcanzar 10⁹ UFC/ml en un total de 40 días. Este comportamiento no fue observado en las incubaciones en el medio MES-CNA, donde si bien todas las cepas necesitaron entre 28 y 32 días en alcanzar la concentración final (10⁹ UFC/ml), no se apreciaron diferencias significativas en las curvas de crecimiento.

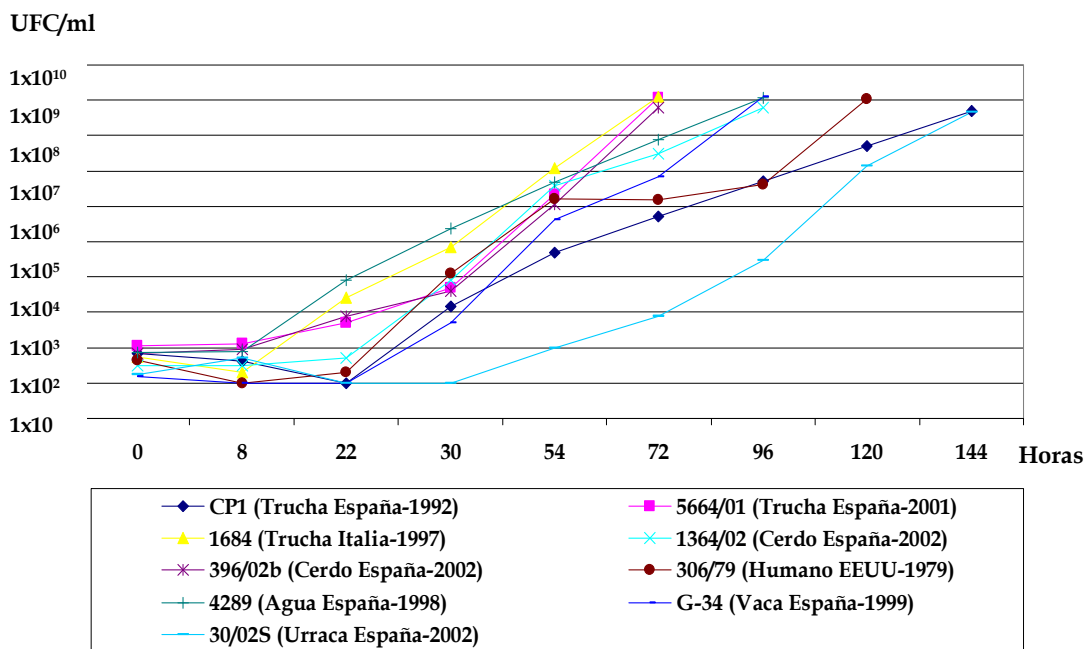
Figura 9. Cinética de crecimiento de diferentes cepas de *L. garvieae* incubadas en el medio MES-4AB a 14°C.



En el caso de las incubaciones realizadas a 24°C, las 9 cepas de *L. garvieae* mostraron comportamientos más homogéneos, comenzando todas ellas la fase exponencial de crecimiento entre las 8 y las 22 horas de incubación. Sin embargo, volvimos a encontrar diferencias en el tiempo requerido en alcanzar una concentración aproximada de 10⁹ UFC/ml o fase estacionaria en las incubaciones en el medio MES-4AB. Así, las cepas de

agua (4289), truchas italianas (1684), la cepa epidémica actual en trucha en España (5664/01), junto con una cepa de ganado porcino con el mismo perfil genético que esta última (396/02b), emplearon 72 horas en alcanzar dicha concentración. Por el contrario, el resto de las cepas, aisladas a partir de animales homeotermos (cerdos, humanos, vacas y urracas) y la primera cepa epidémica de trucha arco iris en España, utilizaron entre 86 y 144 horas (Figura 10). Al igual que ocurrió en la incubación a 14°C, estas diferencias tan marcadas no fueron observadas en las incubaciones en el medio MES-CNA.

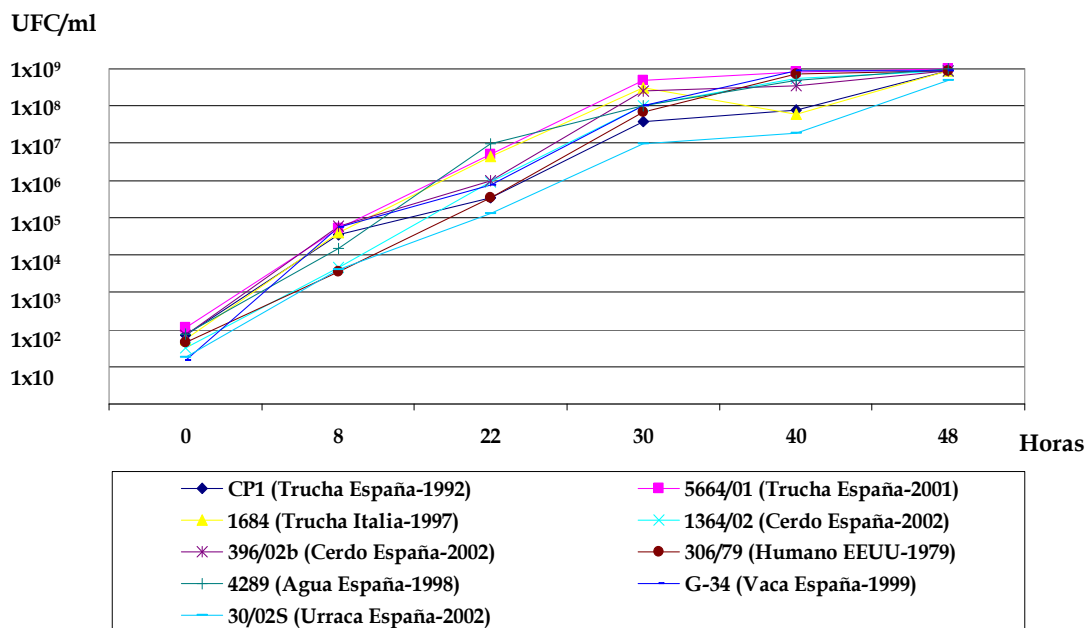
Figura 10. Cinética de crecimiento de diferentes cepas de *L. garvieae* incubadas en el medio MES-4AB a 24°C.



Finalmente, en la incubación a 30°C, la cinética de crecimiento bacteriano fue prácticamente igual en todas las cepas seleccionadas, alcanzando la fase estacionaria entre 40 y 48 horas en todos los casos. A diferencia de las incubaciones a 14°C y 24°C, no apreciamos diferencias llamativas entre los dos medios de enriquecimiento (Figura 11). Por esta razón decidimos utilizar la temperatura de 30°C para el resto de pruebas. A este respecto, estudios parecidos señalan que esta temperatura es la más

apropiada para el crecimiento de *L. garvieae* cuando es incubado en BHI (Cheng y col., 1999) o en medios de enriquecimiento selectivos (Wilson y Carson, 2001).

Figura 11. Cinética de crecimiento de diferentes cepas de *L. garvieae* incubadas en el medio MES-4AB a 30°C.



Por otra parte, respecto al crecimiento de las cepas tipo de *S. iniae* (ATCC 29178^T) y *S. parauberis* (NCDO 2020^T), comprobamos que ambas especies eran capaces de multiplicarse en el medio MES-CNA a 30°C con cinéticas de crecimiento muy similares a las mostradas por *L. garvieae* en la Figura 11. A pesar de que *S. parauberis* y *S. iniae* también son capaces de multiplicarse a temperaturas inferiores (Toranzo y col., 1994; Eldar y col., 1996; Doménech y col., 1996; Roach y col., 2006), mantuvimos los 30°C como temperatura de elección ya que incubaciones a menor temperatura ralentizarían demasiado la velocidad de crecimiento (Prieta y col., 1993), tal y como hemos comprobado con *L. garvieae* (Figura 9).

Sin embargo, se puso de manifiesto una ausencia de crecimiento de estas dos especies bacterianas (*S. iniae* y *S. parauberis*), tras inocular aproximadamente 10²UFC en el medio MES-4AB a 30°C, y aún cuando los

periodos de incubación se prolongaban a 72h. En todos los recuentos obtenidos no apreciamos un aumento de la concentración bacteriana, que fue descendiendo progresivamente hasta la ausencia de crecimiento de colonias en las últimas siembras en Columbia Agar Sangre y cuyas causas serán discutidas al final del presente capítulo.

En los medios de enriquecimiento diseñados, la base nutritiva (BHI y acetato de sodio), nos permitía asegurar el aporte de nutrientes necesario para la multiplicación de *L. garvieae*, *S. parauberis* y *S. iniae*. Pertenecientes a la familia *Streptococcaceae*, estas tres especies bacterianas forman parte de un grupo de microorganismos caracterizados como cocos Gram positivos, catalasa negativos y anaerobios facultativos, con unos requisitos nutritivos poco exigentes que les permite multiplicarse en sencillos medios de cultivo, tales como caldo BHI, TSA o BEA (Vendrell y col., 2006).

Ya en el año 1956, Elliker describió el “Elliker Agar Médium” especialmente diseñado para el aislamiento de *Lactococcus* y bacterias ácido lácticas que incluía acetato de sodio (1,5g/l) en su composición. Sin embargo, éramos conscientes de que el diseño de un medio insuficientemente selectivo, podría favorecer el crecimiento de microbiotas competitivas que pudieran interferir en el crecimiento de las bacterias problema (Fleet, 1999; Sharma y col., 2000). Para evitarlo, en primer lugar seleccionamos la colistina y el ácido nalidíxico como antibióticos específicamente descritos para inhibir el crecimiento de bacterias Gram negativas. A este efecto, Ellner y col., en 1966, describieron un medio que incluía estos dos antibióticos y lo propusieron para el aislamiento de cocos Gram positivos, denominándolo Agar CNA. Por lo tanto, su inclusión en el medio de enriquecimiento selectivo (MES-CNA), nos permitiría eliminar el crecimiento de un amplio rango de bacterias competitivas presentes en las muestras problema.

En segundo lugar, con el fin de diseñar un medio de enriquecimiento específico para *L. garvieae* (MES-4AB), decidimos incluir

además de estos dos antibióticos, la lincomicina y la sulfametazina. La elección de estos dos antibióticos estuvo basada en los estudios de Domínguez y col. (2000), corroborados por Diler y col. (2002), en los que señalaban que las cepas de *L. garvieae* patógenas para peces, mostraban una clara resistencia frente a la actividad de estos dos compuestos antimicrobianos.

Sin embargo, en estudios posteriores realizados en nuestro laboratorio con aislados recientes y/o procedentes de otras especies animales y orígenes de muestreo, hemos comprobado que la actividad de la lincomicina (bloqueo de la síntesis de proteínas) incluida en el medio MES-4AB, puede inhibir el crecimiento de ciertas cepas de *L. garvieae*, siendo este efecto más acusado a bajas temperaturas (datos no mostrados). A este respecto, en experimentos en el laboratorio con medios de cultivo con los cuatro antibióticos por separado, observamos que la sulfametazina, colistina y ácido nalidíxico no tenían ningún efecto inhibitor sobre el crecimiento de *L. garvieae* (independientemente de la temperatura de incubación), no siendo así en los medios que contenían únicamente lincomicina, cuyos efectos sobre la curva de crecimiento a bajas temperaturas se asemejaba a los observados en el medio MES-4AB con los 4 antibióticos conjuntamente (Figuras 9 y 10). Si bien estos hallazgos no fueron considerados como objetivos prioritarios del presente estudio, nos permiten sugerir que las diferencias de tiempo en alcanzar la fase estacionaria de ciertas cepas de *L. garvieae* incubadas en el medio MES-4AB a bajas temperaturas (14°C y 24°C), podrían deberse únicamente a la inclusión de la lincomicina, sin que los otros tres antimicrobianos tuvieran efecto inhibitor alguno.

Como apoyo a esta hipótesis, cabría señalar que cada vez son más las referencias que hacen alusión a la variable susceptibilidad de *L. garvieae* frente a un amplio rango de antimicrobianos. Así, Ooshima y col. (1997) encontraron resultados variables relacionados con la sensibilidad y resistencia frente a la lincomicina en aislados en seriola en Japón incubados

a 24°C; estudios más recientes, muestran casos de sensibilidades intermedias de *L. garvieae* frente a este antibiótico a la vez que ratifican la resistencia a la sulfametazina (Kawanishi y col. 2005). Además, se han descrito casos de sensibilidad intermedia de *L. garvieae* frente a la eritromicina (tratamiento de elección más común para la lactococosis de la trucha arco iris), en aislados de peces enfermos en Italia, España y Japón, sin ser incubados a bajas temperaturas (Ravelo y col., 2001). Si a esto le unimos que la eritromicina presenta resistencia cruzada con la lincomicina (Bryskier y Butzler, 1997), podríamos explicar la variable sensibilidad de ciertas cepas de *L. garvieae* frente a este antibiótico.

Respecto al efecto de la lincomicina sobre *S. iniae* y *S. parauberis*, desde un punto de vista genérico, este compuesto tiene actividad bactericida sobre el grupo de los *Streptococcus* de importancia veterinaria (Prescott, 1993), mientras que la sulfametazina, tiene una actividad básicamente bacteriostática frente a un amplio rango de bacterias. Tradicionalmente se han buscado asociaciones con otras sustancias antimicrobianas para potenciar la actividad bactericida de la sulfametazina y se ha podido observar que su actividad in vitro está muy influenciada por la dosis utilizada y la composición del medio en el que se incluye (Yao y Moellering, 1999). Apenas existen referencias que versen sobre la sensibilidad de *S. iniae* o *S. parauberis* frente a estos antibióticos. Sin embargo, se ha señalado la sensibilidad de *S. iniae* frente a la clindamicina (derivado semisintético de la lincomicina tras la sustitución de un átomo de cloro por un grupo hidroxilo y la inversión del carbono involucrado en la posición 7), en aislados en humanos (Facklam y col., 2005).

Respecto a las cepas aisladas en peces, todos los estudios señalan una clara sensibilidad a la eritromicina, tanto en *S. parauberis* (Doménech y col., 1996), como en *S. iniae* (Romano y col., 2003). Si a esto le unimos que, tal y como hemos comentado anteriormente, se han descrito resistencias cruzadas entre este antimicrobiano y la lincomicina y clindamicina (Bryskier y Butzler, 1997), y apoyados en el resto citas bibliográficas antes

mencionadas, podríamos sugerir que, al igual que ocurría con *L. garvieae* a bajas temperaturas, la ausencia de crecimiento de *S. parauberis* y *S. iniae* en el medio de enriquecimiento MES-4AB, podría ser debido al efecto inhibidor de la lincomicina.

4.1.2. SELECCIÓN DEL PROTOCOLO DE EXTRACCIÓN, MEDIO DE ENRIQUECIMIENTO Y CONDICIONES DE INCUBACIÓN.

Una vez evaluada la utilidad de los medios de enriquecimiento diseñados para el crecimiento de *L. garvieae* (MES-4AB y MES-CNA), *S. parauberis* y *S. iniae* (MES-CNA), decidimos probar su eficacia para el enriquecimiento selectivo y posterior detección molecular de estos microorganismos a partir de 30 muestras de harinas de pescado comerciales, siendo éste uno de los principales objetivos marcados en el presente estudio.

En este caso, la microbiota naturalmente presente en las muestras utilizadas, unido a la falta de un medio de aislamiento selectivo y diferencial nos impedía realizar recuentos bacterianos específicos y por lo tanto estimar la presencia o ausencia de las tres especies en estudio. Por ello, decidimos poner a punto una metodología de extracción de ADN y PCR múltiple para realizar la detección molecular de estos patógenos tras el enriquecimiento de las muestras seleccionadas y evaluar de este modo su eficacia en la detección bacteriana. De esta manera, podríamos seleccionar la metodología más apropiada para los muestreos posteriores incluidos en este estudio.

4.1.2.1. DISEÑO Y ELECCIÓN DEL PROTOCOLO DE EXTRACCIÓN DE ADN.

Al comienzo de esta experiencia contábamos con dos protocolos de extracción de ADN: protocolo de Casas Modificado y protocolo Fast DNA Modificado. Antes de comenzar con su aplicación sobre las 30 muestras de harinas de pescado (y decidir cual de los dos sería el más apropiado para la posterior detección bacteriana por PCR), realizamos una prueba de contaminación artificial para conocer su eficacia en muestras altamente contaminadas. Para ello inoculamos 25 g de harina de pescado con 10^6 UFC de *L. garvieae*, y tras su enriquecimiento en MES-4AB y MES-CNA durante 48 horas, extrajimos el ADN con los dos protocolos descritos para realizar la PCR. Esta experiencia se repitió 5 veces con cada protocolo de extracción sumando un total de 10 determinaciones en cada uno (5 incubaciones x 2 medios de enriquecimiento).

En primer lugar, utilizando el ADN obtenido con el protocolo de Casas Modificado, tan solo obtuvimos 2 de las 10 determinaciones positivas a *L. garvieae* (20%), lo cual cuestionaba la eficacia de este protocolo, dado que en estudios similares, el límite de detección fue muy inferior a la cantidad inoculada (Mata y col., 2004c).

En segundo lugar, utilizamos los mismos caldos incubados empleando el método Fast DNA Modificado para extraer el ADN. En esta ocasión detectamos *L. garvieae* en las 10 determinaciones (100%), lo que indicaba una menor eficacia del protocolo de Casas Modificado. Además, tras la siembra directa de los caldos incubados en Columbia Agar Sangre, nos cercioramos de la presencia de *L. garvieae*, siendo éste confirmado por identificación bioquímica y por PCR.

Seguidamente, decidimos realizar una prueba de control de inhibición de la PCR para comprobar la posible presencia de inhibidores en las muestras que pudieran estar dificultando la detección de *L. garvieae* en

las harinas contaminadas cuando utilizamos el protocolo de Casas Modificado. Para ello incorporamos en la misma reacción de PCR 5µl de ADN del un control positivo de *L. garvieae* (5664/01), junto a 5µl de ADN extraído con el protocolo de Casas Modificado. Nuestras sospechas se hicieron ciertas, cuando efectivamente comprobamos que las muestras analizadas contenían algún componente con efecto inhibitor sobre la reacción PCR, puesto que los controles positivos que tradicionalmente empleábamos, no presentaban ningún tipo de amplificación cuando se mezclaban con el ADN (Casas Modificado) de harinas de pescado contaminadas con *L. garvieae* y posteriormente enriquecidas (Figura 12).

Figura 12. Control de inhibición de la PCR para la extracción de ADN con el método Casas Modificado.

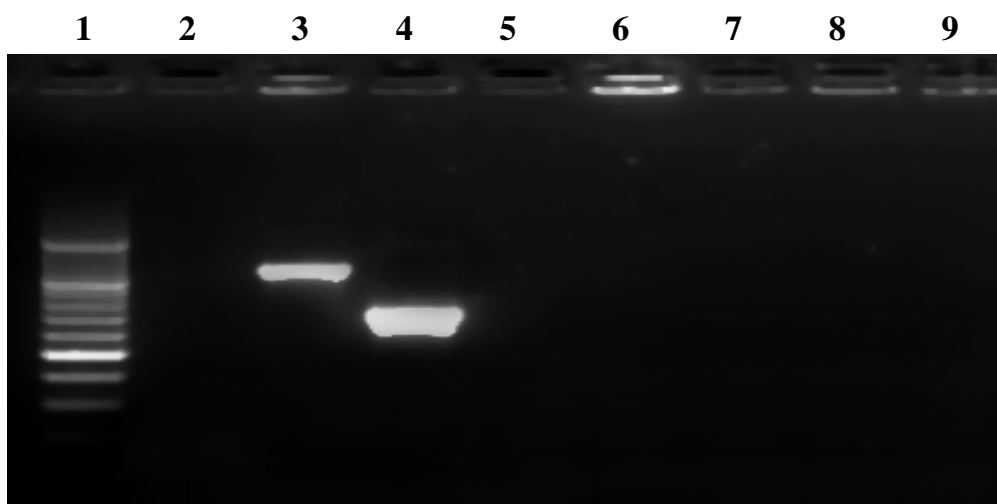


Figura 12. Gel de PCR. Línea 1, marcador de peso molecular 1000pb; línea 2, control negativo; línea 3, *Lactococcus garvieae* (5664/01); línea 4, *Streptococcus parauberis* (NCDO 2020^T); línea 5, 5664/01 + MES-4AB-48h; línea 6, 5664/01 + MES-4AB 48h; línea 7: 5664/01 + MES-4AB 48h, línea 8, 5664/01 + MES-CNA 48h; línea 9, 5664/01 + MES-CNA 48h.

MES-4AB / MES-CNA: medio de enriquecimiento utilizado
48h: tiempo de incubación

Con el fin de comprobar que los resultados obtenidos en condiciones artificiales se reproducían con harinas de pescado comerciales (naturalmente contaminadas) continuamos con la aplicación de ambos protocolos de extracción de ADN para valorar su eficacia en la detección de *L. garvieae*, *S. parauberis* y *S. iniae* (Tabla 29).

Tabla 29. Resultados de detección de *L. garvieae*, *S. parauberis* y *S. iniae* con la metodología diseñada sobre 30 muestras de harinas de pescado comerciales.

REF.	CASAS MODIFICADO						FAST DNA MODIFICADO					
	MES-4AB			MES-CNA			MES-4AB			MES-CNA		
	24h	48h	72h	24h	48h	72h	24h	48h	72h	24h	48h	72h
HP 1												
HP 2												
HP 3												
HP 4												
HP 5												
HP 6												
HP 7												
HP 8												
HP 53												
HP 54												
HP 55												
HP 58												
HP 59												
HP 60		■	■				■	■	■	■	■	
HP 61		■	■				■	■	■	■	■	■
HP 62				■	■	■			■	■	■	
HP 63												
HP 64									■	■	■	
HP 65												
HP 82										■	■	■
HP 83					■	■			■	■	■	
HP 84					■			■	■		■	■
HP 85										■		
HP 99												
HP 100												
HP 101				■	■	■			■	■	■	
HP 102				■	■	■				■	■	
HP 103												
HP 104												
HP 105												

□	PCR Negativa
■	PCR + <i>L. garvieae</i>
■	PCR + <i>S. parauberis</i>
■	PCR + <i>L. garvieae</i> / <i>S. parauberis</i>

En la Tabla 29, mostramos la relación de muestras positivas sobre el total de 30 harinas procesadas, tras la aplicación del enriquecimiento en los medios MES-4AB y MES-CNA y posterior detección por PCR múltiple. En ella se detallan los resultados según el protocolo de extracción de ADN empleado (Casas Modificado o Fast DNA Modificado), así como los tres periodos de incubación (24, 48 y 72h).

En los resultados globales obtenidos sobre las 30 harinas, se puede observar como tan solo fueron detectados los microorganismos *S. parauberis* (26,6% de las muestras) y *L. garvieae* (23,3% de las muestras), siendo la totalidad de las harinas muestreadas negativas a *S. iniae*. Aunque este hecho pudiera estar explicado simplemente por la ausencia de esta bacteria en las muestras analizadas, también debemos considerar los requisitos de multiplicación más exigentes de esta bacteria frente a las otras dos especies bacterianas (Toranzo y col., 1994; Eldar y col., 1996; Doménech y col., 1996; Roach y col., 2006), así como los resultados obtenidos en el capítulo 4.2.3, en el que sugerimos la inhibición del crecimiento de *S. iniae* en presencia de *L. garvieae* o *S. parauberis* y que podrían explicar la ausencia de amplificación de *S. iniae* en aquellas muestras donde también detectamos alguna de las otras dos bacterias.

Respecto a los resultados obtenidos con ambos métodos de extracción, comprobamos que con el método Casas Modificado, éramos capaces de detectar un total de 8 muestras contaminadas (26,6%) [4 positivas a *L. garvieae* (13,3%) y 5 positivas a *S. parauberis* (16,6%)], mientras que con el protocolo Fast DNA Modificado detectábamos un total de 10 harinas contaminadas (33,3%) [7 (23,3%) y 8 (26,7%) muestras positivas a *L. garvieae* y *S. parauberis* respectivamente]. El hecho de haberse analizado un número reducido de muestras, condiciona que las diferencias encontradas no fueran estadísticamente significativas (p (*L. garvieae*) = 0,505; p (*S. parauberis*) = 0,531). La mayor capacidad del protocolo Fast DNA Modificado para detectar contaminaciones mixtas (5 muestras - 16,6%) frente al protocolo

Casas Modificado (1 muestra - 3,3%) (Figura 13), condiciona las diferencias encontradas al analizar los resultados por especie bacteriana (Figura 14).

Figura 13. Comparación entre el número de determinaciones negativas y positivas (individuales y mixtas) en los dos métodos de extracción de ADN.

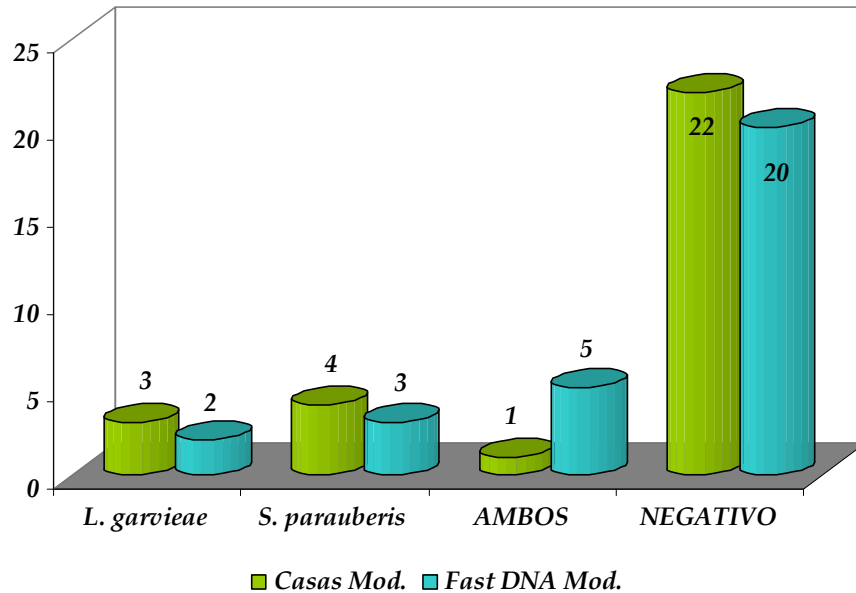
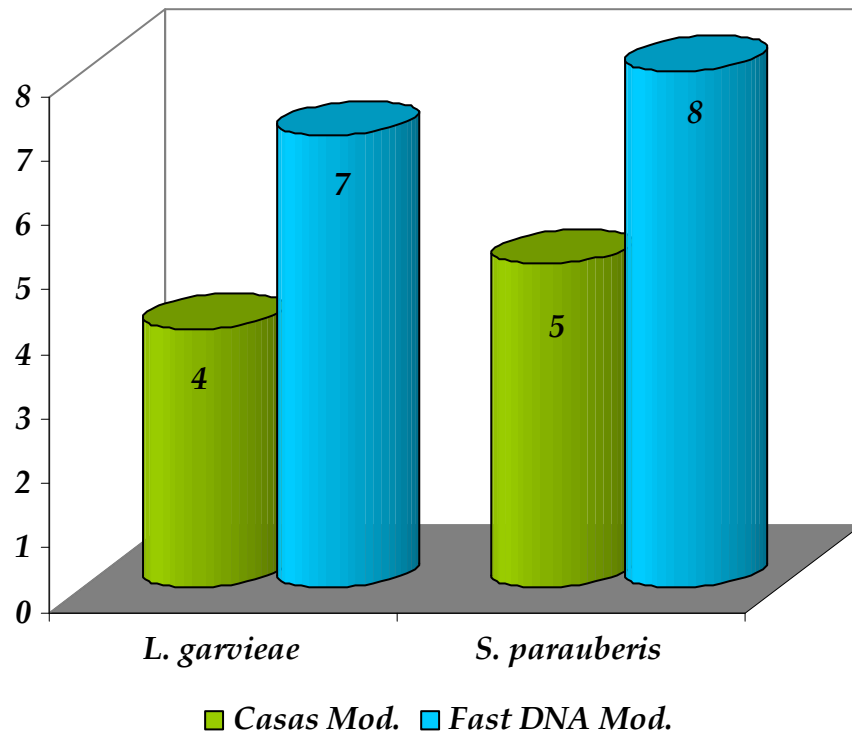


Figura 14. Comparación entre el número total de determinaciones positivas en los dos métodos de extracción de ADN.



Todos estos resultados unidos a la menor eficacia (anteriormente demostrada) del protocolo de Casas modificado para eliminar los potenciales inhibidores de la reacción PCR, nos permiten proponer el uso del protocolo Fast DNA Modificado para la detección de *L. garvieae* y *S. parauberis* en harinas de pescado. Además, se puede señalar otro hecho importante a favor de la selección de este protocolo: todas las muestras positivas a alguna de las dos bacterias en estudio por el método Casas Modificado, lo fueron igualmente por el protocolo Fast DNA Modificado, bien con detecciones individuales o bien con detecciones mixtas.

Las harinas de pescado, así como otras muchas materias primas fabricadas con residuos animales y vegetales, suelen contener en su composición sustancias con efecto inhibitor sobre la PCR, tales como lípidos, sales y proteínas (Wilson, 1997). En nuestro caso, la gran mayoría de las harinas de pescado proceden de peces marinos y contienen un alto porcentaje en sales. La presencia de estos compuestos puede ocasionar un efecto inhibitor sobre la reacción PCR, sin que los protocolos de extracción con lavados con etanol o acetona incluidos eviten la inhibición (Boom y col., 1999; Wilson y Carson, 2001). Resultados similares de inhibición se han demostrado con sustancias como la glucosa, ovoalbúmina o compuestos fenólicos para la detección de *Listeria monocytogenes* en salmón ahumado, teniendo que usar columnas de extracción selectiva para eliminar los efectos inhibidores (Simon y col., 1996). Así mismo, la presencia de hierro en muestras de suelos y aguas es inhibitor de la PCR para la detección de *Escherichia coli*, recurriendo a la dilución de la muestra para su correcta detección (Smalla y col., 1993). Pero además de las sustancias que puedan estar presentes en las muestras, otros productos pueden actuar inhibiendo la PCR. Así, se ha comprobado, que la triptona incluida en el medio de enriquecimiento TSB (Trypticase Soy Broth, Merck), o el ácido aspártico que incorpora el YSE (*Yersinia Selective Enrichment*, Merck), actúan inhibiendo la PCR para la detección de *Yersinia enterocolitica* (Lantz y col., 1998).

Al respecto de nuestra metodología, el método Casas Modificado está basado en el protocolo de extracción de ADN de Casas y col. (1995). Estos autores describieron la técnica original como un método sencillo y rápido para el aislamiento de ARN y ADN, basado en la aplicación de tiocianato de guanidinio como buffer de lisis. Este compuesto posee una gran actividad lítica sobre las células y actividad inhibidora sobre las nucleasas de la muestra (Boom y col., 1990). Sin embargo este protocolo carece de un sistema de filtrado que depure las porciones más groseras de materia orgánica, donde se suelen encontrar los potenciales inhibidores de la reacción PCR. A este respecto, un filtrado físico o químico, podría ayudar a separar el ADN de los restos celulares, proteínas e impurezas (Holm y col., 1986).

Por su parte el protocolo Fast DNA Modificado, se basa en la combinación de reactivos selectivos, filtros y columnas que tradicionalmente se han utilizado para eliminar los inhibidores de la PCR presentes en las muestras (Bej y col., 1990; Walls y col., 1990; Lampel y col., 2000). Este protocolo se fundamenta en el kit comercial *FastDNA*® *SPIN Kit for Soil* [Q-biogene Inc, (BIO101 Systems, Carlsbad, EE.UU.)], centrándose exclusivamente en las fases finales de adsorción selectiva, lavado y purificación de ADN (capítulo 3.1.2.3.). Este método de extracción incorpora un reactivo [Binding Matrix (*DNA Binding Matrix Solution*)] que también contiene tiocianato de guanidinio en su composición, aunque su cualidad más particular e importante la proporciona el gel de sílice que retiene específicamente y purifica el ADN, eliminando los contaminantes e inhibidores de las reacciones posteriores (GENECLEAN®).

El fundamento teórico de este proceso consiste en una unión selectiva del ADN al gel de sílice, debido a que en presencia de altas concentraciones de sales, los cationes de sodio rompen las uniones entre el hidrógeno del agua y los iones oxígeno de sílice. Esto facilita la unión del sodio libre (cargado positivamente) al oxígeno (cargado negativamente) del grupo fosfato de la molécula de ADN. Todo este proceso origina que el

ADN quede unido selectivamente al gel de sílice de la matriz durante los lavados que el protocolo incorpora y en los que se eliminan las moléculas inhibidoras de la PCR. Finalmente, la incorporación de tampones con una baja concentración iónica, liberarán el ADN de la matriz, obteniendo el ADN purificado y listo para ser amplificado (Boom y col., 1990; de Juan, 2005).

Todas estas propiedades han permitido dotar al protocolo Fast DNA Modificado de la capacidad para eliminar la actividad de los inhibidores presentes en los medios incubados con harinas de pescado. Además, su aplicación a lo largo del presente estudio ha confirmado su utilidad, fiabilidad y reproducibilidad para ser utilizado sobre medios enriquecidos con muestras alimentarias y medioambientales. Todo ello, unido a la menor eficacia del protocolo de Casas Modificado para eliminar las sustancias inhibidoras que interfieren en la reacción PCR, puede haber determinado las diferencias encontradas en las 30 muestras de harinas de pescado comerciales. Basado en estos resultados, decidimos abandonar la aplicación del protocolo de Casas Modificado sobre los caldos de cultivo enriquecidos, centrándonos exclusivamente en la técnica de extracción Fast DNA Modificado.

4.1.2.2. ELECCIÓN DEL MEDIO DE ENRIQUECIMIENTO.

La elección del medio de enriquecimiento se realizó en base a los resultados obtenidos sobre las 30 muestras de harinas de pescado incubadas en los medios MES-4AB y MES-CNA. Una vez descartado el protocolo de extracción de Casas Modificado (tal y como detallamos en el capítulo anterior), tan solo analizamos los resultados obtenidos con el protocolo de extracción Fast DNA Modificado (Tabla 29 y Figura 15).

Así, tras las incubaciones de las 30 de harinas de pescado realizadas en el medio MES-4AB obtuvimos un total de 3 muestras contaminadas (10%), todas ellas por *L. garvieae*, mientras que con el medio MES-CNA, detectamos un total de 10 harinas de pescado contaminadas (30%), siendo esta una diferencia significativa ($p = 0,05$).

A este respecto, ya hemos indicado previamente que no detectamos *S. iniae* en ninguna de las determinaciones realizadas en harinas de pescado y tampoco detectamos en esta ocasión *S. parauberis* cuando usamos el medio de enriquecimiento MES-4AB. Esta bacteria sólo fue detectada en el medio MES-CNA, en 8 ocasiones (26,7%) [3 de manera individual y 5 junto a *L. garvieae* (Figura 14)]. De esta manera se confirman en el enriquecimiento de muestras reales la hipótesis de que estas dos especies de *Streptococcus* no son capaces de multiplicarse en presencia de lincomicina o sulfametazina (4.1.1.).

Respecto a la detección de *L. garvieae*, a pesar de que medio MES-4AB fue específicamente diseñado como medio selectivo para esta bacteria, se obtuvieron mejores resultados cuando utilizamos el medio MES-CNA. Así, detectamos un total de 7 muestras positivas a *L. garvieae* (23,3%) cuando incubamos las harinas en el medio MES-CNA, mientras que tan solo obtuvimos 3 determinaciones positivas (10%) con el medio MES-4AB (Tabla 29 y Figuras 15 y 16). De nuevo, el reducido muestreo influyó para que estas diferencias no fueran consideradas estadísticamente significativas ($p = 0,296$).

Además, comprobamos que todas las muestras que fueron positivas a alguna de las dos especies bacterianas en el medio MES-4AB, también lo fueron en el medio MES-CNA, ratificando la mayor eficacia de este último (Tabla 29).

Figura 15. Comparación entre el número de determinaciones negativas y positivas (individuales y mixtas) en los dos medios de enriquecimiento selectivo y utilizando el protocolo de extracción Fast DNA Modificado.

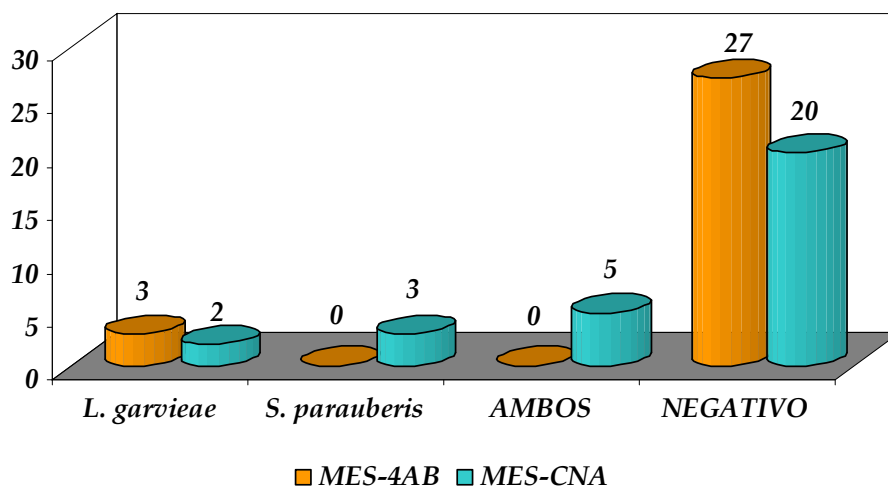
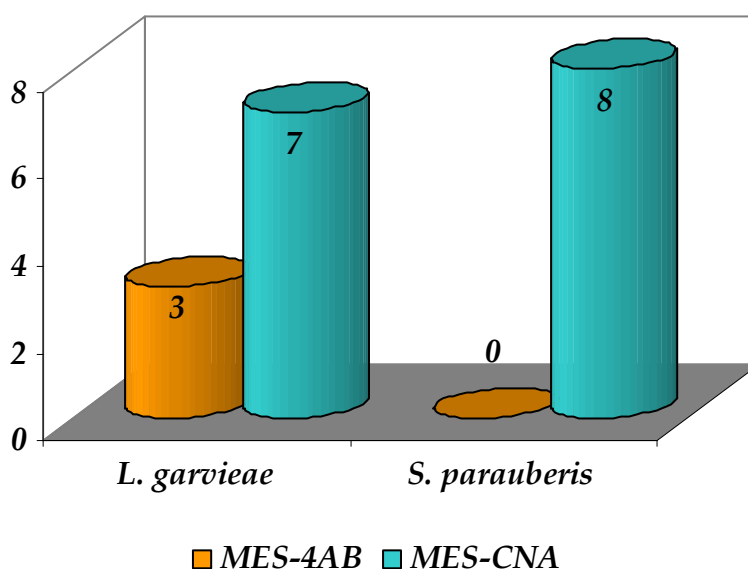


Figura 16. Comparación entre el número total de determinaciones positivas en los dos medios de enriquecimiento selectivo y utilizando el protocolo de extracción Fast DNA Modificado.



Tal y como hemos señalado previamente, los dos medios de enriquecimiento diseñados, fueron apropiados para el crecimiento de una selección de cepas de *L. garvieae* incubadas a 30°C (capítulo 4.1.1., Figura 11). Sin embargo, en base a unos estudios realizados en nuestro laboratorio (datos no mostrados) y apoyados en citas bibliográficas (Ooshima y col., 1997; Ravelo y col., 2001; Kawanishi y col., 2005) podemos sugerir que la

actividad de la lincomicina incluida en el medio MES-4AB, pudiera inhibir parcialmente el crecimiento de ciertas cepas de *L. garvieae*, efecto que se ve incrementado con el descenso de la temperatura (capítulo 4.1.1.).

Los resultados obtenidos en las 30 muestras de harinas de pescado comerciales nos permiten apoyar esta hipótesis y sostener que la actividad de la lincomicina pudiera también inhibir parcialmente el crecimiento de ciertas cepas de *L. garvieae* presentes en las harinas de pescado, impidiendo su total multiplicación y la posterior detección molecular. De esta manera, podríamos explicar las diferencias encontradas en la detección de *L. garvieae* con el medio MES-4AB (3 muestras positivas) y el medio MES-CNA (7 muestras positivas).

Por otra parte, tal y como sugerimos en el capítulo anterior, la actividad de la lincomicina incluida en el MES-4AB, también pudiera ser la causa de la imposibilidad de *S. parauberis* y *S. iniae* para multiplicarse y que en este caso explicaría la ausencia de detección de estas dos especies bacterianas cuando utilizamos este medio de enriquecimiento.

Los resultados obtenidos sobre las 30 muestras de harinas de pescado, unidos a la imposibilidad de detectar *S. parauberis* y *S. iniae* utilizando el MES-4AB nos permite seleccionar el medio MES-CNA, como el más adecuado para el enriquecimiento y posterior detección por PCR múltiple de *L. garvieae* y *S. parauberis* a partir de muestras de harinas de pescado.

4.1.2.3.ELECCIÓN DEL PERIODO DE INCUBACIÓN.

Finalmente, una vez seleccionado el protocolo de extracción de ADN (Fast DNA Modificado) y el medio de enriquecimiento selectivo (MES-CNA), analizamos los resultados obtenidos tras su aplicación en incubaciones de 24, 48 y 72h.

En la Tabla 29 y Figura 17, se puede apreciar como los resultados fueron muy similares en los tres tiempos de incubación y principalmente en las detecciones individuales. Sin embargo, comprobamos que todas las muestras que fueron positivas lo fueron siempre a las 48 horas (tal y como ocurrió en la selección del medio MES-CNA y del protocolo Fast DNA Modificado detallados anteriormente).

Así, el número total de muestras positivas tras la incubación durante 48h, fue de 10 (33,3%), frente a las 6 muestras obtenidas a las 24h (20%) y 8 a la 72h (26,6%). Las diferencias en estos resultados no fueron significativas, con valores de $p \geq 0,5$ en todos los casos.

El número de harinas positivas individualmente a *S. parauberis* en los tres tiempos de incubación fue el mismo (3 harinas positivas a esta bacteria a las 24, 48 y 72 horas). Algo parecido pudo detectarse para *L. garvieae*, con 2 harinas positivas a las 24 y 48 horas y 1 a las 72h. Sin embargo, los resultados obtenidos a partir de contaminaciones mixtas, mostraron un total de 5 harinas positivas en la incubación de las muestras durante 48h, detectándose, en contraste, 4 a las 72 horas y tan solo una a las 24h.

Por lo tanto, al considerar los resultados en números absolutos (Figura 18), se aprecia una mayor eficacia de la metodología si incubamos las harinas durante dos días, al obtener 7 y 8 muestras positivas a *L. garvieae* y *S. parauberis* respectivamente (23,3% y 26,6%), cifras superiores a las obtenidas a las 24h (10% y 13,3%) y 72h (16,6% y 23,3%). Si bien, estas diferencias tampoco fueron estadísticamente significativas, por el reducido número de muestras analizadas, sí nos permitieron elegir las 48 horas de incubación para la aplicación de la metodología en capítulos posteriores.

Figura 17. Comparación entre el número de determinaciones negativas y positivas (individuales y mixtas) en los tres tiempos de incubación, utilizando el medio MES-CNA y el protocolo de extracción Fast DNA Modificado.

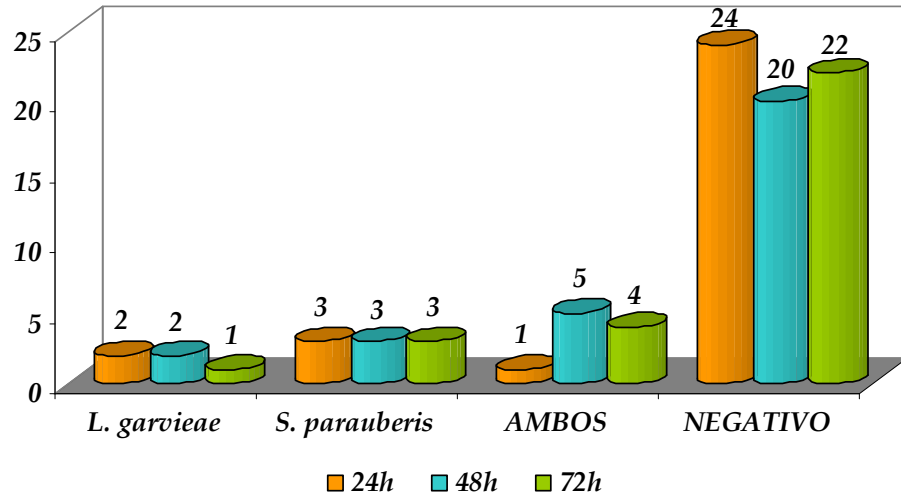
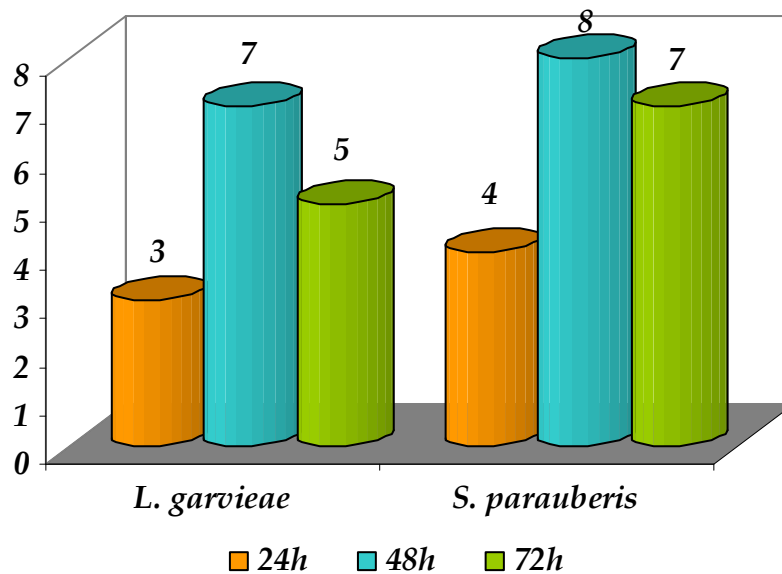


Figura 18. Comparación entre el número total de determinaciones positivas en los tres tiempos de incubación y utilizando el medio MES-CNA y el protocolo de extracción Fast DNA Modificado.



Por todo ello, en este punto del estudio, seleccionamos el medio de enriquecimiento selectivo MES-CNA a 30°C, durante 48 horas y en agitación (150 r.p.m), combinado con el protocolo de extracción de ADN Fast DNA Modificado, para su aplicación en las muestras de harinas de pescado, piensos compuestos y ambientales sucesivas.

4.2.DETERMINACIÓN DEL LÍMITE DE DETECCIÓN DE LA METODOLOGÍA.

En este apartado, planteamos una serie de ensayos de contaminación artificial de una harina de pescado libre de patógenos con distintas concentraciones bacterianas. El fin de esta experiencia era determinar el umbral de detección de la metodología diseñada para los tres microorganismos incluidos en el estudio.

4.2.1. AUSENCIA DE PATÓGENOS DIANA EN LA HARINA PROBLEMA.

La harina de pescado seleccionada para realizar las pruebas de contaminación artificial, resultó negativa a los tres patógenos testados (*L. garvieae*, *S. iniae* y *S. parauberis*). En la Figura 19, se muestra el gel obtenido tras las extracciones de ADN por método Fast DNA Modificado y posterior amplificación por PCR. En él podemos observar la correcta amplificación de los 3 controles positivos y la ausencia en todas las determinaciones realizadas.

Figura 19. Enriquecimiento selectivo y PCR múltiple de la harina problema libre de patógenos.

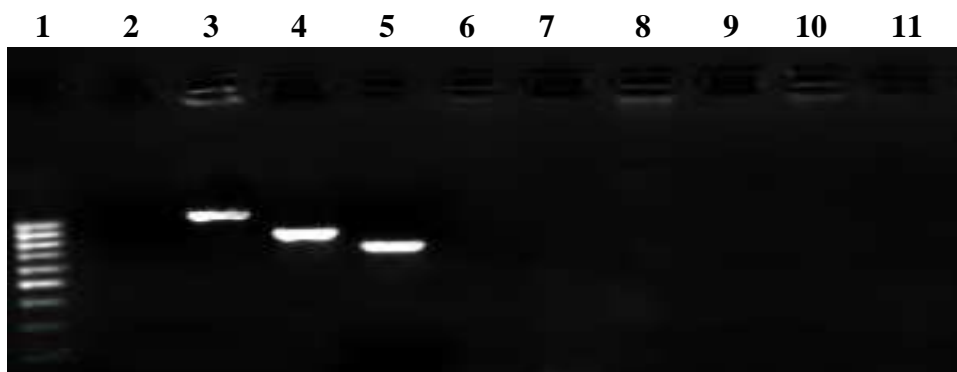


Figura 19. Línea 1, marcador de peso molecular 1000pb; línea 2, control negativo; línea 3, *Lactococcus garvieae* (5664/01); línea 4, *Streptococcus iniae* (ATCC 29178^T); línea 5, *Streptococcus parauberis* (NCDO 2020^T); línea 6 - 11: harina problema incubada en MES-CNA durante 48 horas (6 repeticiones).

Obtuvimos este resultado en las 6 repeticiones realizadas, por lo que la reproducibilidad de estos resultados nos permitía afrontar los ensayos de contaminación con la garantía de que cualquier detección tras la contaminación artificial, era fruto de la contaminación y el posterior enriquecimiento de la muestra.

4.2.2. CONTAMINACIÓN ARTIFICIAL INDIVIDUAL.

Una vez realizados los recuentos de las contaminaciones realizadas para conocer la concentración real del inóculo utilizado y tras la incubación en el medio MES-CNA a 30°C durante 48h, extracción de ADN (Fast DNA Modificado) y PCR múltiple, establecimos los límites de detección de *L. garvieae*, *S. parauberis* y *S. iniae* en 25 gramos de harina de pescado, señalados en la Tabla 30.

En las Figuras 20, 21 y 22, se muestran los geles de PCR de las contaminaciones realizadas con las 4 cepas de *L. garvieae* y las cepas tipo de *S. parauberis* y *S. iniae* respectivamente

Tabla 30. Límites de detección de *L. garvieae*, *S. parauberis* y *S. iniae* tras la contaminación artificial individual.

		MES-CNA - 30°C - 48h
		Límite de detección
<i>L. garvieae</i>	5664/01	1 UFC
	1364/02b	1 UFC
	G-34	1,5 UFC
	306/79	6 UFC
<i>S. iniae</i>	ATCC 29178 ^T	81 UFC
<i>S. parauberis</i>	NCDO 2020	2 UFC

Figura 20. Límite de detección individual de la metodología para *L. garvieae*.

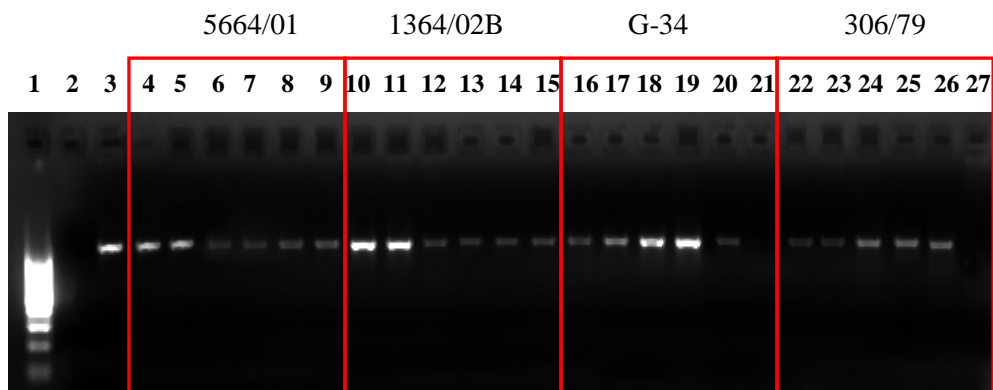


Figura 20. Gel de PCR. Línea 1: marcador de peso molecular 1000pb; línea 2: control negativo; línea 3: control + *Lactococcus garvieae* (5664/01); líneas 4 - 9: 5664/01 (149, 57, 20, 11, 2.5 y 1.5 UFC/25g respectivamente); líneas 10 - 15: 1364/02B (160, 42, 19, 9.5, 4 y 1 UFC/25g respectivamente); líneas 16 - 21: G-34 (152, 43.5, 16, 7, 1.5 y 1 UFC/25g respectivamente); líneas 22 - 27: 306/79 (164, 56, 21.5, 11.5, 6 y 2,5 UFC/25g respectivamente).

Figura 21. Límite de detección individual de la metodología para *S. parauberis*.

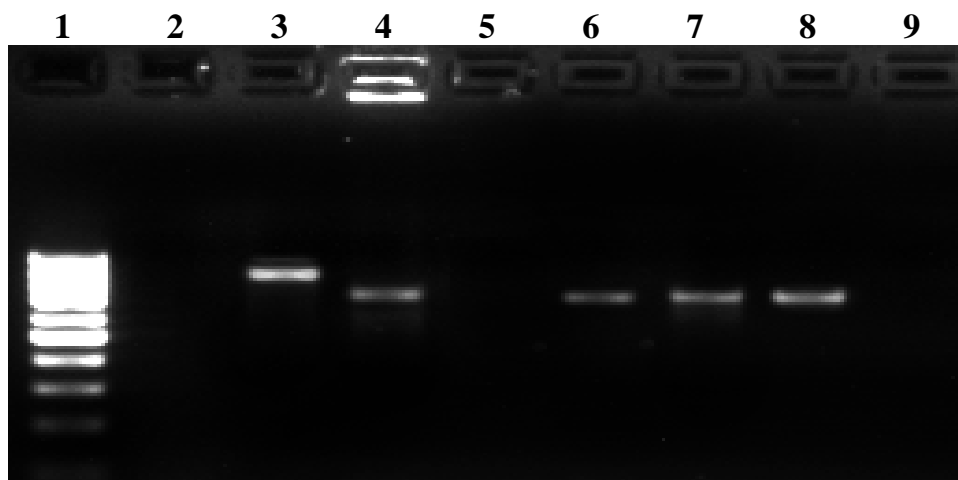


Figura 21. Gel de PCR. Línea 1: marcador de peso molecular 1000pb; línea 2: control negativo PCR; línea 3: control + *Streptococcus iniae* (ATCC 29178^T); línea 4: control + *Streptococcus parauberis* (NCDO 2020^T); línea 5: control negativo de extracción de ADN (100µl agua); línea 6 - 8: *S. parauberis* NCDO 2020^T (2, 2.5 y 19 UFC/25g respectivamente); línea 9: harina de pescado control.

Harina de pescado control: incubación de la harina de pescado problema sin contaminación.

Figura 22. Límite de detección individual de la metodología para *S. iniae*.

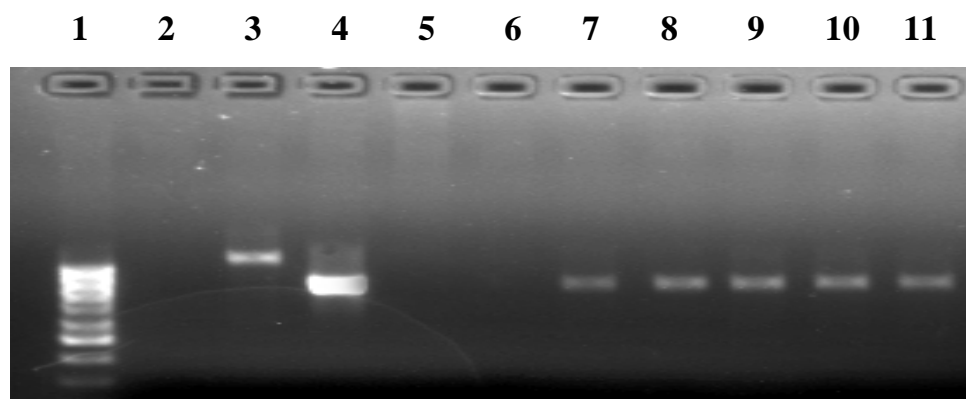


Figura 22. Gel de PCR. Línea 1: marcador de peso molecular 1000pb; línea 2: control negativo PCR; línea 3: control + *Lactococcus garvieae* (5664/01); línea 4: control + *Streptococcus iniae* (ATCC 29178^T); líneas 5 - 11: *S. iniae* ATCC 29178^T, (23.5, 34, 81, 225, 360, 820 y 1846 UFC/25g respectivamente).

Con todos estos datos podemos concluir que aplicando la metodología seleccionada en el capítulo anterior (4.1.2.), sería posible la detección de 1 a 2 UFC de *S. parauberis* y *L. garvieae* en 25 g de harina de pescado. Tan solo en la cepa de *L. garvieae* aislada en humanos (306/79), el umbral de detección fue ligeramente superior (6 UFC/25g) siendo no obstante ésta, una escasa cantidad de bacterias. Esta diferencia podría ser debida a la insuficiente homogeneización de las suspensiones en el proceso de dilución, ya que como se puede apreciar en la Tabla 31, el número real de UFC inoculadas en la dilución correspondiente es ligeramente superior al resto de los aislados utilizados.

Por lo tanto, los límites de detección establecidos para la detección de estas cepas de *L. garvieae* y *S. parauberis* nos permiten ajustarnos al estándar internacional necesario (1 UFC/25g) para validar un técnica de detección de microorganismos patógenos en muestras alimentarias (Malorny y col., 2003).

Tabla 31. Recuentos y resultado de la PCR de los 4 aislados de *L. garvieae* y las cepas tipo de *S. iniae* y *S. parauberis* en la contaminación artificial individual.

Nº	UFC	<i>L. garvieae</i>				<i>S. iniae</i>	<i>S. parauberis</i>
		5664/01	1364/02b	G-34	306/79	ATCC 29178 ^T	NCDO 2020 ^T
9*	1000	1111	1119	1038	1370,9	1846	1363
8*	500	634	580,5	677,5	521	820	579
7	200	279	251	272,5	248	360	233,5
6	100	149	160	152	164	225	161
5	50	57	42	43,5	56	81	58,5
4	20	20	19	16	21,5	34	28
3	10	11	9,5	7	11,5	23,5	19
2	5	2,5	4	1,5	6	9,5	2,5
1	1	1,5	1	1	2,5	1,5	2

 Contaminación PCR +
 Contaminación PCR -

- **UFC:** numero aproximado de colonias que queremos inocular en la harina con la contaminación correspondiente.

- **(*):** contaminación con un número elevado de colonias de difícil cuantificación. En estos casos, el cálculo del número de colonias inoculadas en la harina de pescado se realizó en base a la media ponderada del resto de contaminaciones aplicando su coeficiente de dilución respectivo.

Por otra parte, el límite de detección individual de *S. iniae* fue sensiblemente superior al de las otras dos especies del estudio, quedando establecido en 81 UFC/25g. En siembras de cultivos puros en Agar Sangre, comprobamos que a diferencia de los otros dos microorganismos, *S. iniae* necesita al menos 48h para obtener un claro y diferenciado crecimiento de colonias. Tal y como hemos comentado anteriormente, los requisitos más exigentes para el crecimiento de este microorganismo, unido a los factores intrínsecos que condicionan un proceso de enriquecimiento (micropoblación competitiva, presencia de sustancias inhibidoras...), podrían haber ocasionado el incremento del umbral de detección respecto a las otras dos especies bacterianas tras la incubación en MES-CNA durante 48h (capítulo 4.2.3.).

4.2.3. CONTAMINACIÓN ARTIFICIAL SIMULTÁNEA.

Una vez conocido el límite de detección de nuestra metodología para cada uno de los aislados bacterianos por separado, nos propusimos realizar la misma prueba con las tres especies simultáneamente. Con este ensayo pretendíamos estimar la eficacia y el umbral de detección de nuestra metodología si se diera el caso de una contaminación conjunta. Los límites de detección conseguidos en esta experiencia están señalados en la Tabla 32.

Tabla 32. Recuentos y resultado de la PCR múltiple para la detección de *L. garvieae*, *S. iniae* y *S. parauberis* en la contaminación artificial simultánea.

Ensayo	Aislado	UFC	Contaminación
1	<i>L. garvieae</i> - (5664/01)	1	2,5
	<i>S. iniae</i> - (ATCC 29178 ^T)	50	23
	<i>S. parauberis</i> - (NCDO 2020 ^T)	1	2
2	<i>L. garvieae</i> - (5664/01)	10	20
	<i>S. iniae</i> - (ATCC 29178 ^T)	5x10 ²	315
	<i>S. parauberis</i> - (NCDO 2020 ^T)	10	5,5
3	<i>L. garvieae</i> - (5664/01)	10 ²	158,5
	<i>S. iniae</i> - (ATCC 29178 ^T)	5x10 ³	2,8x10 ³
	<i>S. parauberis</i> - (NCDO 2020 ^T)	10 ²	130,5
	Contaminación PCR +		
	Contaminación PCR -		

- **UFC:** número aproximado de colonias que queremos inocular en la harina con la contaminación y el aislado bacteriano correspondiente.

Los límites de detección de *L. garvieae* y *S. parauberis*, se correspondieron de nuevo con las contaminaciones mínimas realizadas, siendo en este caso de 2,5 UFC y 2 UFC/25g antes de enriquecer para *L. garvieae* y *S. parauberis* respectivamente (Tabla 32 y Figura 23). Sin embargo, no se cumplió el mismo patrón con las contaminaciones de *S. iniae*, y no obtuvimos amplificación en ninguno de los tres ensayos de contaminación,

ni en ninguna de las 3 repeticiones. Ni siquiera en el ensayo 3 (Tabla 32), con una contaminación estimada de $2,8 \times 10^3$ UFC/25g de harina de pescado antes de enriquecerla. Esta experiencia se repitió en 3 ocasiones, obteniendo siempre recuentos aproximados y el mismo resultado tras la PCR múltiple para las 3 especies bacterianas. Las causas de esta ausencia de amplificación y detección de *S. iniae* tras la contaminación artificial simultánea, serán expuestas en el capítulo siguiente (4.2.3.).

Figura 23. Límite de detección simultánea de la metodología para *L. garvieae*, *S. iniae* y *S. parauberis*.

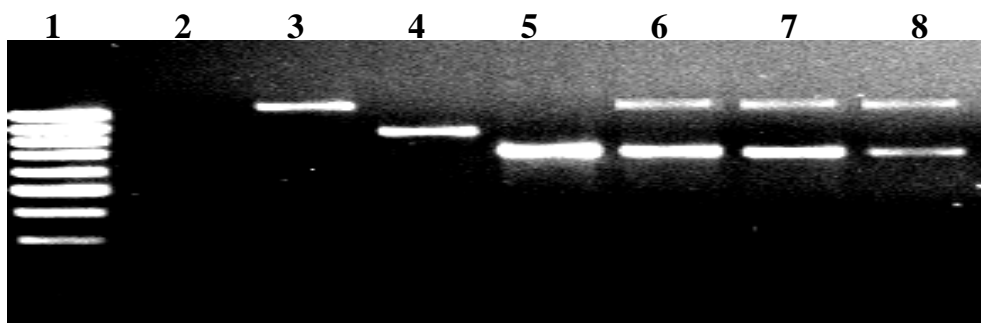


Figura 23. Gel de PCR. Línea 1: marcador de peso molecular 1000pb; línea 2: control negativo PCR; línea 3: control + *Lactococcus garvieae* (5664/01); línea 4: control + *Streptococcus iniae* (ATCC 29178^T); línea 5: control + *Streptococcus parauberis* (NCDO 2020^T); línea 6: 158.5, $2,8 \times 10^3$ y 130,5 /25g de *L. garvieae* (5664/01), *S. iniae* (ATCC 29178^T) y *S. parauberis* (NCDO 2020^T) respectivamente; línea 7: 20, 315 y 5.5 UFC/25g de *L. garvieae* (5664/01), *S. iniae* (ATCC 29178^T) y *S. parauberis* (NCDO 2020^T) respectivamente; línea 8: 2.5, 23 y 2 UFC UFC/25g de *L. garvieae* (5664/01), *S. iniae* (ATCC 29178^T) y *S. parauberis* (NCDO 2020^T) respectivamente.

Para poder comparar y discutir nuestros resultados con otros estudios similares necesitamos centrarnos en trabajos actuales, puesto que los límites de detección han ido disminuyendo a medida que se desarrollaban nuevas tecnologías (Maciorowski y col., 2005). Hasta la fecha, sólo se ha publicado una experiencia relativa a la detección de *L. garvieae* por PCR tras un proceso de enriquecimiento (Wilson y Carson, 2001). En este caso, no contaminaron ningún sustrato, sino que incubaron en el medio selectivo, diluciones seriadas de *L. garvieae* a las que añadieron varias concentraciones de *Providencia* spp. simulando el efecto de

micropoblaciones competitivas. El límite de detección fue de 16 UFC en 200 μ l de caldo enriquecido.

Por otra parte, la descripción de la PCR múltiple que utilizamos en nuestras experiencias (Mata y col, 2004a), fue puesta a punto con inoculaciones experimentales en cerebro, hígado y riñón de truchas arco iris (*Oncorhynchus mykiss*) y doradas (*Sparus aurata*) sin ningún proceso de enriquecimiento previo. Tras realizar inoculaciones seriadas se establecieron los límites de detección de $2,5 \times 10^3$, 1×10^4 y 5×10^3 UFC/g para *L. garvieae*, *S. parauberis* y *S. iniae* respectivamente.

Son mucho más numerosos los trabajos que hacen referencia a la combinación del enriquecimiento y la PCR para la detección de bacterias causantes de toxiinfecciones alimentarias. Así por ejemplo, Rossmannith y col. (2006), gracias al enriquecimiento selectivo sobre muestras de salmón, paté y queso, fueron capaces de detectar contaminaciones con 9, 1 y 1 UFC/ 15g de *L. monocytogenes*, así como 7,5 UFC/25ml en leche antes de enriquecer. En esta ocasión, gracias al uso de medios de aislamiento selectivo, calcularon también el número total de bacterias tras la incubación durante 24 horas, siendo de 10^8 , 10^4 y 10^3 UFC/g en salmón, paté y queso respectivamente. En nuestro caso, la gran densidad de micropoblación competitiva (principalmente del género *Enterococcus*, tal y como veremos en capítulo 4.4.1.2), unido a la falta de un medio de aislamiento selectivo y diferencial para cada una de las tres bacterias del estudio, nos impedía cuantificar la concentración bacteriana post-enriquecimiento y por lo tanto estimar el número real de bacterias presentes en la alícuota de 100 μ l utilizada para la extracción de ADN. No obstante, los resultados obtenidos en nuestros ensayos de contaminación en 25g de harina de pescado, en los que los límites de detección de *L. garvieae* y *S. parauberis* antes de enriquecer fueron entre 1 y 2 UFC, hacen suponer que éstas son muy similares, incluso inferiores a los conseguidos por los citados autores, excepto los referentes a *S. iniae* (81 UFC/25g).

Kim y col. (2006), evaluaron la detección conjunta de *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* y *Salmonella typhimurium* tras la contaminación de 25g de trigo y concluyeron que los límites de detección tras el enriquecimiento selectivo (225 ml) de la muestra, fueron $5,6 \times 10^1$, $1,8 \times 10^3$ y $< 5,4 \times 10^1$ UFC/ml respectivamente. En esta ocasión estas concentraciones corresponden a recuentos realizados sobre la mezcla del medio y el trigo contaminado artificialmente antes de enriquecer. Como ya hemos indicado, en nuestro caso no pudimos realizar este tipo de determinaciones por la falta de medios de aislamiento selectivos y diferenciales. Sin embargo, de acuerdo con los recuentos realizados en nuestra prueba, la cantidad total en la mezcla antes de enriquecer era como máximo de 1-2 UFC en los 225 ml, y por ello muy inferior al límite de detección conseguido por estos autores. Además, en este mismo estudio se describe que los límites de detección en la contaminación simultánea, se incrementan respecto a los obtenidos en contaminaciones de forma individual. En nuestro caso, excepto para *S. iniae*, los límites de detección se mantuvieron en ambas experiencias.

Los resultados obtenidos indican que la metodología desarrollada es altamente sensible para la detección molecular de patógenos de gran importancia en ictiopatología a partir de harinas de pescado. En resumen, fuimos capaces de detectar contaminaciones de 1 y 2 UFC/25g de *L. garvieae* y *S. parauberis*, en este tipo de materias primas. Ello sugeriría la posibilidad de proponer la aplicación de la metodología diseñada para el control de calidad de las harinas de pescado y otras materias primas utilizadas de forma rutinaria en la fabricación de piensos compuestos.

4.2.4. ENSAYOS ADICIONALES CON *Streptococcus iniae*.

Se efectuaron diferentes pruebas con el fin de conocer las causas de la falta de amplificación de *S. iniae* en la contaminación artificial simultánea con los otros dos patógenos piscícolas (capítulo 4.2.1.3.).

En primer lugar, repetimos la extracción de ADN en los 3 ensayos de contaminación a partir de los caldos de enriquecimiento de una de las tres repeticiones de la experiencia, obteniéndose los mismos resultados que en los ensayos originales.

En segundo lugar, se realizó una PCR simple para la detección de *S. iniae* (Mata y col., 2004b) sobre esos mismos caldos de enriquecimiento. Sin embargo, de nuevo obtuvimos ausencia de amplificación en todas las muestras analizadas.

En tercer lugar, nos planteamos la posibilidad de que existiera una inhibición de crecimiento de *S. iniae* cuando éste es enriquecido en presencia de alguno de los otros dos patógenos incluidos en el estudio. Las bacterias ácido lácticas (*L. garvieae* y *S. parauberis* entre ellas) pueden producir durante su multiplicación o fase vegetativa, sustancias peptídicas con actividad bactericida o bacteriostática frente a especies bacterianas que suelen estar estrechamente relacionadas. Estas sustancias, conocidas como *bacteriocinas*, no tienen actividad frente a la cepa productora (Jack y col., 1995) y se clasifican según su peso molecular, espectro de acción antimicrobiano y la secuencia aminoacídica del péptido (Klaenhammer, 1988).

La producción de bacteriocinas es extremadamente importante en la industria alimentaria, utilizándose como conservantes de alimentos (Nettles y Barefoot, 1993; Holzapfel y col., 1995). Especialmente estudiada, es la producción de bacteriocinas por parte del género *Lactococcus* (Morgan y col., 1995) principalmente la especie *L. lactis subsp. lactis*. Estas sustancias poseen una gran actividad antimicrobiana sobre otros microorganismos Gram positivos, incluidas otras bacterias ácido lácticas, clostridios y otras bacterias patógenas (Delves-Broughton, 1990). Recientemente se han publicado las primeras descripciones referentes a la producción de bacteriocinas por parte de *L. garvieae*. Villani y col. (2001) señalan la actividad antimicrobiana frente a bacterias del género *Enterococcus*, *Listeria*, *Lactococcus*, y *Clostridium* de una sustancia denominada *garviecin L1-5*,

producida por *L. garvieae* aislado en leche cruda de vaca. Además, Dávila y col. (2005) describieron en *L. garvieae* (aislado en sangre de ganado porcino de mataderos industriales), una fuerte inhibición del crecimiento de *Staphylococcus aureus* y *Bacillus* spp y moderada de *E. coli* y *Pseudomonas fluorescens*. Finalmente Saubusse y col. (2007), demostraron la inhibición del crecimiento de *L. monocytogenes* en quesos, por un conjunto de bacterias entre las que se encuentra *L. garvieae*.

Con todos estos antecedentes decidimos plantear una pequeña experiencia, consistente en la recontaminación de los caldos ya incubados en los ensayos 1, 2 y 3 del capítulo 4.2.3, con las tres concentraciones bacterianas de *S. iniae* utilizadas en la misma prueba. Acto seguido extrajimos el ADN sin ningún proceso de enriquecimiento previo; de esta manera queríamos comprobar si la falta de amplificación de *S. iniae*, pudiera tener origen durante el proceso de enriquecimiento simultáneo de las tres especies y por la producción de alguna sustancia inhibidora por parte de los alguno de los otros dos patógenos.

Tras la PCR múltiple, obtuvimos PCR positiva en las contaminaciones correspondientes a 622 y $5,7 \times 10^3$ UFC. Como en otras ocasiones esta última valoración se realizó con la media ponderada de los recuentos cuantificables aplicando su factor de dilución correspondiente. No obtuvimos amplificación en la contaminación inferior, correspondiente a 51 UFC, aunque en esta ocasión estaba por debajo del límite de detección de la contaminación individual (capítulo 4.2.2.). Estos resultados podrían sugerir la posibilidad, de que durante el enriquecimiento simultáneo de *L. garvieae* y *S. parauberis* con *S. iniae*, alguno de los dos primeros fuera capaz de producir alguna sustancia con efecto inhibidor sobre el crecimiento de *S. iniae* que impidiera su detección por PCR en el capítulo anterior. No se trataría de un caso aislado, vista la bibliografía referente a la producción de bacteriocinas por bacterias ácido lácticas, y en especial las bacterias pertenecientes al género *Lactococcus* tal y como hemos descrito en párrafos anteriores. La detección y caracterización de la potencial bacteriocina no ha sido determinada y será objeto de próximos estudios.

4.3. DETECCIÓN DE *Lactococcus garvieae* y *Streptococcus parauberis* EN HARINAS DE PESCADO, PIENSOS COMPUESTOS Y AGUAS.

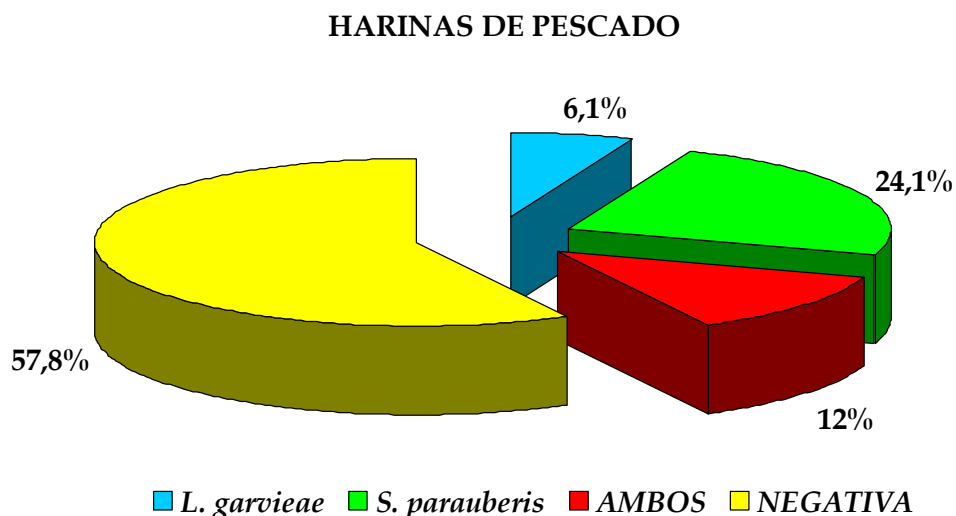
Tras poner a punto una metodología eficaz para la detección de *L. garvieae* y *S. parauberis* (incubación en MES-CNA a 30°C de temperatura durante 48h y extracción de ADN por el método FAST-DNA Modificado), quisimos aplicar ésta para la detección de estos microorganismos en harinas de pescado y piensos compuestos, utilizados de forma rutinaria en la actividad de las empresas de nutrición animal, así como en un amplio estudio efectuado con aguas procedentes del curso natural de los ríos, piscifactorías y depuradoras.

La escasa o nula importancia del *S. iniae* en la acuicultura española actual (Eldar y col., 1994; Colorni y col., 2002), así como la ausencia de muestras positivas a esta bacteria en el estudio inicial en harinas de pescado (4.1.2.), nos decidieron a descartar este microorganismo en estas experiencias.

4.3.1. MUESTREO DE HARINAS DE PESCADO.

De las 83 muestras de harinas de pescado procesadas, y aplicando las condiciones más adecuadas anteriormente descritas (capítulo 4.1), obtuvimos un total de 35 muestras contaminadas (42,2%), repartidas en 5 harinas positivas a *L. garvieae*, 20 positivas a *S. parauberis* y 10 harinas contaminadas con las dos especies bacterianas. En números absolutos, 15 harinas estaban contaminadas con *L. garvieae* (18,1%) y justo el doble, 30, con *S. parauberis* (36,2%), quedando 48 harinas (57,8%) libres de estos dos patógenos bacterianos (Figura 24).

Figura 24. Distribución de los resultados obtenidos en el total de muestras de harinas de pescado procesadas tras la PCR múltiple.



En la Figura 25, se muestra el ejemplo de un gel de PCR con muestras de harinas de pescado y piensos reales contaminados con *L. garvieae* (líneas 14 y 15) y *S. parauberis* (líneas 4, 5, 7, 11 y 16) y contaminaciones mixtas de ambos patógenos (líneas 8 y 17).

Figura 25. PCR múltiple sobre muestras reales de harinas de pescado.

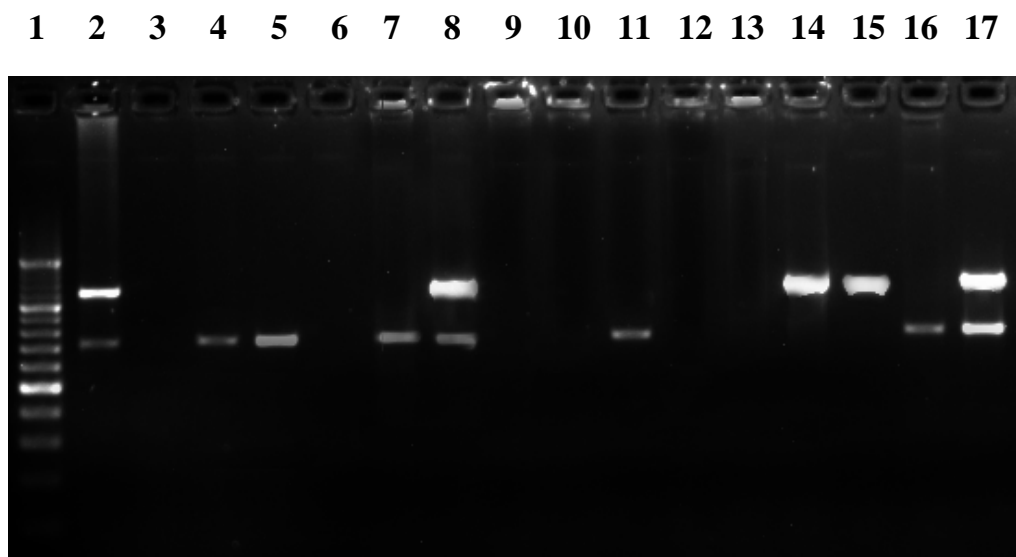


Figura 25. Gel de PCR. Línea 1: marcador de peso molecular 1000pb; línea 2: control positivo *L. garvieae* (5664/01) / *S. parauberis* (NCDO 2020); línea 3: control negativo; línea 4: BA06/02001; línea 5: BA06/02002; línea 6: BA06/02003; línea 7: BA06/02004; línea 8: BA06/02005; línea 9: BA06/02006; línea 10: BA06/02007; línea 11: BA06/02008; línea 12: BA06/02009; línea 13: BA06/02010; línea 14: BA06/02011; línea 15: BA06/02012; línea 16: BA06/02013; línea 17: BA06/02014.

Gracias a su digestibilidad proteica, la harina de pescado es todavía el ingrediente fundamental en la formulación de piensos compuestos para peces de crianza, representando en ocasiones más del 50% de la fórmula. Con el fin de preservar las características nutricionales de esta materia prima, las fábricas de procesado no someten al producto a elevadas temperaturas mantenidas en el tiempo. No obstante, la tecnología actual de fabricación de harinas de pescado, permite alcanzar en algunas fases los 90°C (Sandbol, 1993). Esta temperatura pudiera ser suficiente para la eliminación de los agentes bacterianos de los pescados capturados. Sin embargo, durante el almacenamiento y transporte de las harinas, tanto en las fábricas de origen como las de destino, también existe el riesgo de producirse contaminaciones cruzadas sobre el producto acabado (Morris y col., 1970).

Hasta la fecha no existen estudios que describan la presencia de *L. garvieae* o *S. parauberis* en harinas de pescado. Tan solo se ha conseguido aislar *L. garvieae* en pescados sin moler que iban a servir de alimentación para peces de crianza (Minami, 1979; Yasunaga, 1982). Esto unido a que se ha demostrado en condiciones experimentales la infección oral e intragástrica mediante bacterias vehiculadas en piensos o heces (Taniguchi, 1982; Romalde y col., 1996), permite sugerir la alimentación como una posible vía de infección que explicara la propagación de estas enfermedades bacterianas en diferentes especies animales y zonas geográficas (Toranzo y col., 1994; Doménech y col., 1996; Romalde y col., 1996; Eldar y col., 1999; Vendrell y col., 2006). Por todo ello decidimos realizar el presente estudio, con el fin de conocer la implicación de la alimentación, y en especial de las harinas de pescado, en la epidemiología de estas especies bacterianas.

Se han descrito numerosos casos de contaminación por bacterias del género *Salmonella* en harinas de pescado (Hauge, 1969), en plantas de procesado de esta materia prima (Nesse y col., 2005), así como en fábricas de pienso para peces (Nesse y col., 2003). En los años 70, Morris y col.

(1970), detectaron prevalencias de esta bacteria por encima del 25% en harinas de pescado recién procesadas. Estas cifras han ido disminuyendo con la aplicación de correctas medidas de higiene y tratamientos adecuados. Aún así, según el último informe de *European Food Safety Authority* de marzo de 2006, el 2,4% de las harinas de pescado procedentes de España en 2004 estaban contaminadas con *Salmonella* spp.

En nuestro caso, hemos detectado *L. garvieae* y *S. parauberis* en proporciones muy superiores, hasta el punto que casi la mitad de las harinas procesadas (42,2%) estaban contaminadas por alguno de estos dos patógenos piscícolas. La aplicación de la metodología diseñada ha permitido detectar estos niveles en muestras donde la presencia de micropoblaciones competitivas, respecto a las bacterias diana, se estima mayoritaria, y con una distribución irregular en la muestra de las bacterias problema (Löfstrom y col., 2004), que a su vez intentamos solventar con muestreos de 25 gramos.

Por lo tanto, independientemente de la causa de la contaminación (desde los peces capturados o contaminaciones cruzadas en las fábricas de harinas o piensos), estas materias primas representan un potencial factor de riesgo a la hora de ser incorporadas en dietas animales y especialmente para especies piscícolas. En este sentido, el porcentaje de detección dos veces superior de *S. parauberis* (36,2%) sobre *L. garvieae* (18,1%) en las mismas muestras, le hace adquirir una mayor importancia, aunque la clínica que produce resulta menos trascendente desde el punto de vista de incidencia y pérdidas económicas. No obstante, resulta necesario remarcar que las nuevas tecnologías y la implantación de los procesos de extrusión en la fabricación de piensos compuestos, prácticamente garantizan la eliminación de cualquier agente patógeno que las materias primas pudieran contener antes del proceso de fabricación.

4.3.1.1. ESTUDIO COMPARATIVO POR TIPO DE HARINAS DE PESCADO.

Las 83 harinas recibidas se clasificaron en 5 tipos, en función del porcentaje aproximado de proteína bruta que contenían: 57%, 60%, 65%, 70% y harinas LT (con porcentajes superiores al 70%). Una gran mayoría de las harinas recibidas (67,5%) pertenecían a la categoría del 60% de proteína (harina-60). Es por esto que los resultados obtenidos en este grupo condicionaron de manera importante el total del muestreo. Así el 5,3% fueron positivas a *L. garvieae*, 32,2% a *S. parauberis* y un 10,7% a las dos especies bacterianas, porcentajes muy similares a los obtenidos en la totalidad de las harinas, 6,1%, 24,1% y 12% respectivamente.

Algo parecido sucedió con la clasificación de las harinas con un 65% de proteína (harina-65), en la que los porcentajes no variaron ostensiblemente respecto a los comentados en el párrafo anterior. Sobre un total de 10 harinas de esta categoría, obtuvimos 1 muestra positiva a *L. garvieae*, 2 a *S. parauberis* y otras dos contaminadas conjuntamente.

Menos representativo resultó el muestreo realizado sobre harinas con un 57% (harina-57) y 70% (harina-70) de proteína bruta, recopilando tan solo dos muestras de cada una. A pesar del reducido número, las dos harinas del 70% resultaron positivas a las dos especies bacterianas y una de las dos harinas-57 fue positiva a *L. garvieae* (Tabla 33 y Figura 26).

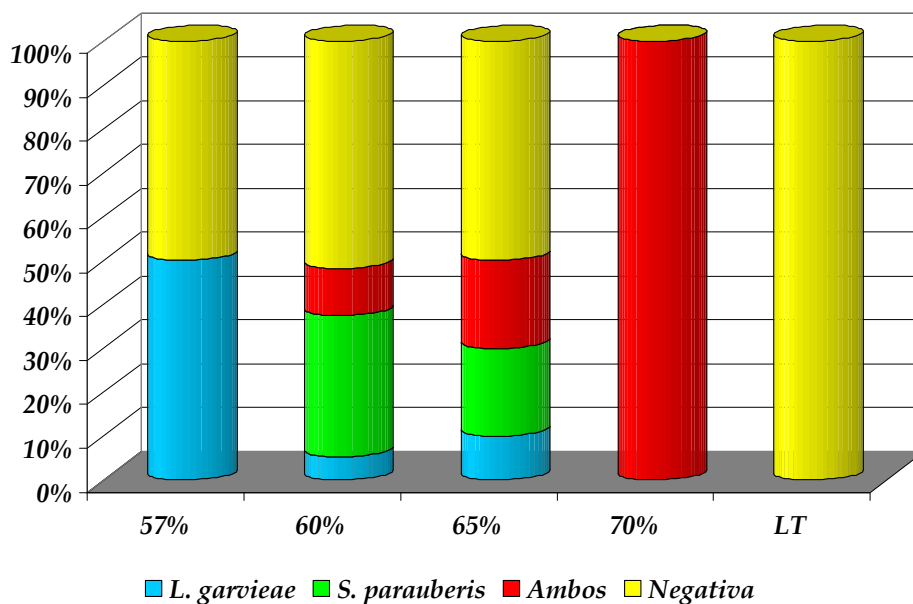
Finalmente y especialmente llamativo resultó el muestreo realizado sobre harinas LT. A pesar de representar el 15,7% del total de las harinas muestreadas, con un total de 13 muestras, todas las determinaciones en esta categoría fueron negativas a las dos especies bacterianas en estudio, resultando la diferencia significativa comparada con el total de harinas en el caso de *S. parauberis* ($p = 0,022$) y no siendo así con *L. garvieae* ($p = 0,208$).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Tabla 33. Resultados de la PCR múltiple y comparación del número total de muestras positivas a cada especie bacteriana según el tipo de harina de pescado.

	57%		60%		65%		70%		LT		TOTAL	
	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%
Negativa	1	50%	29	51,8%	5	50%	0	0%	13	100%	48	57,8%
<i>L. garvieae</i>	1	50%	3	5,3%	1	10%	0	0%	0	0%	5	6,1%
<i>S. parauberis</i>	0	0%	18	32,2%	2	20%	0	0%	0	0%	20	24,1%
Ambos	0	0%	6	10,7%	2	20%	2	100%	0	0%	10	12%
TOTAL	2	2,4%	56	67,5%	10	12%	2	2,4%	13	15,7%	83	100%
<i>L. garvieae</i>	1	50%	9	16,1%	3	30%	2	100%	0	0%	15	18,1%
<i>S. parauberis</i>	0	0%	24	42,9%	4	40%	2	100%	0	0%	30	36,2%

Figura 26. Distribución de los resultados porcentuales en harinas de pescado según el tipo de muestra.



El hecho de no haber encontrado ninguna harina LT contaminada con esos dos patógenos piscícolas, nos permite sugerir que este tipo de harinas, de mayor calidad nutritiva, son también las harinas con menor riesgo de contener *L. garvieae* y *S. parauberis*. La principal diferencia respecto al resto de harinas de pescado tradicionales, radica en la selección

rigurosa de pescado fresco y bien conservado y el proceso de fabricación, que en este caso no supera la temperatura de 70°C, siendo acompañado de un secado al vacío (Sandbol, 1993). El producto final es un molido mucho más fino, con unos porcentajes de proteína bruta superiores al 70% (<http://www.etsia.upm.es>). Todos estos requisitos y características, podrían influir para la fabricación de harinas de pescado libres de patógenos bacterianos.

Por otra parte, a pesar de ser positivas a *L. garvieae* y *S. parauberis* las dos muestras de harinas del 70% de proteína bruta, el escaso número de muestras dificulta su interpretación, siendo necesaria una ampliación del muestreo para obtener resultados concluyentes. En el resto de tipos de harinas no se aprecian diferencias significativas, aproximándome a los patrones normales del total del muestreo realizado.

4.3.1.2. ESTUDIO COMPARATIVO POR PROCEDENCIA DE LAS MUESTRAS.

Sobre el total de 83 harinas procesadas, 54 tenían su origen en la industria conservera española (65,1%) y 29 procedían de excedentes de la pesca de Perú, Alemania y Noruega (34,9%). Hemos querido establecer una comparación entre las harinas según su procedencia, y para ello las hemos dividido en dos grupos: harinas españolas y harinas de importación.

Todas las harinas españolas (excepto una del 57% y positiva a *L. garvieae*), pertenecían a la categoría del 60% de proteína bruta. Esto representa un 94,6% de las muestras de esta clasificación proteica (53 harinas sobre las 56 totales muestreadas del 60% de proteína). Por lo tanto, los resultados y distribución del muestreo en harinas españolas serán prácticamente los mismos que los detectados para este grupo de harinas en el apartado anterior (4.3.1.1.). Por otra parte, las harinas de importación, se

distribuyeron en un grupo más diverso, con muestras de las cinco clases estudiadas, incluyendo las 13 harinas LT, negativas a la PCR múltiple.

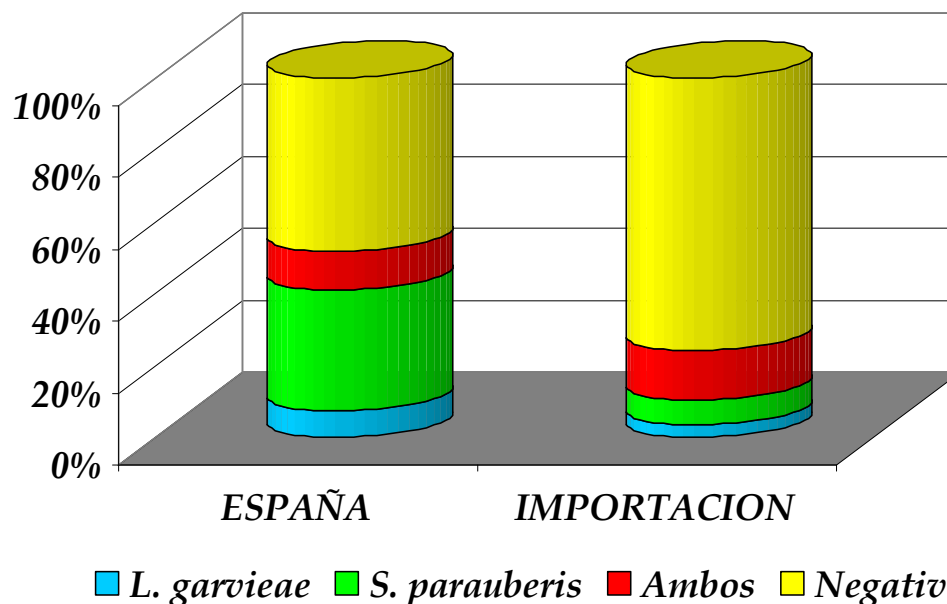
El 51,9% de las muestras de las harinas de origen español, resultaron contaminadas con alguna de las dos especies bacterianas, porcentaje sensiblemente superior al encontrado en las harinas de importación (24,1%), siendo esta diferencia estadísticamente significativa ($p = 0,027$). El 18,5% de las harinas españolas contenían *L. garvieae* y el 44,4% *S. parauberis* (Tabla 34). De nuevo en este caso, observamos las mayores diferencias en los resultados de *S. parauberis* (Figura 27), habiendo disminuido su presencia en las harinas de importación al 20,7%, igualando el umbral de significación para un nivel de confianza del 95 % ($p = 0,05$). Tan solo un punto diferenció el porcentaje detectado de *L. garvieae* en harinas de importación, 17,2% respecto a las harinas españolas, 18,5%, siendo por ello una diferencia no significativa ($p = 1$).

Todas las harinas positivas del grupo de importación, procedían de Perú (que con 22 muestras sobre el total de 29, representaba el 75,9% de este grupo). Esto significa que no tuvimos detección molecular en ninguna de las 6 muestras alemanas ni en la harina de procedencia noruega, aunque los muestreos en estos orígenes fueron escasos y por lo tanto estos resultados no son concluyentes.

Tabla 34. Resultados de la PCR múltiple y comparación del número total de muestras positivas a cada especie bacteriana según la procedencia de las harinas de pescado.

	ESPAÑA		IMPORTACION		TOTAL	
	Nº	%	Nº	%	Nº	%
Negativa	26	48,1%	22	75,9%	48	57,8%
<i>L. garvieae</i>	4	7,4%	1	3,5%	5	6,1%
<i>S. parauberis</i>	18	33,3%	2	6,9%	20	24,1%
Ambos	6	11,1%	4	13,8%	10	12%
TOTAL	54	65,1%	29	34,9%	83	100%
<i>L. garvieae</i>	10	18,5%	5	17,2%	15	18,1%
<i>S. parauberis</i>	24	44,4%	6	20,7%	30	36,2%

Figura 27. Distribución de los resultados porcentuales en harinas de pescado según la procedencia de las muestras.



Las diferencias encontradas en las harinas de pescado según su procedencia, tal y como se aprecia en la Tabla 34, están fundamentadamente ocasionadas por los porcentajes de contaminación de *S. parauberis* en las harinas nacionales (44,4%) respecto a las de importación (20,7%), ya que la detección de *L. garvieae* en ambos muestreos permanece prácticamente invariable. Si bien discutiremos esta circunstancia posteriormente (capítulo 4.3.1.4), una de las razones que podrían explicar este hallazgo sería el hecho que *S. parauberis* es un patógeno piscícola cuya incidencia prácticamente se centra en explotaciones del norte de España donde hace unos años significó un grave problema para el sector del rodaballo (Doménech y col., 1996; Padrós y Furones, 2002). Aunque la aparición de brotes clínicos hoy en día se pueden prevenir mediante la vacunación, esto no garantiza la ausencia de peces criados enfermos y/o portadores que pudieran igualmente transmitir la enfermedad a los peces de libre y estos ser utilizados para la fabricación de harinas de pescado, quedando éstas contaminadas con *S. parauberis*.

4.3.1.3. ESTUDIO COMPARATIVO POR AÑO DE MUESTREO.

Si analizamos los resultados por años de muestreo, podemos dividirlos en función de los dos lotes de harinas recibidos: 30 harinas en 2003 (21 procedentes de la pesca extractiva de Perú y 9 de la industria conservera española) y 53 harinas en 2006, siendo en este caso la gran mayoría de origen español (45), y el resto de origen alemán (6), peruano (1) y noruego (1) (Tabla 35).

Un 33,3% de las harinas de pescado resultaron contaminadas en 2003 frente al 47,2% en 2006. La presencia de *L. garvieae* en las harinas procesadas en 2003 fue del 23,3%, mientras que en el año 2006, la frecuencia de detección descendió al 15,1%, sin considerarse esta diferencia estadísticamente significativa ($p = 0,522$). Respecto a *S. parauberis*, obtuvimos resultados contrarios, puesto que el porcentaje total de harinas positivas en 2006 (41,5%) fue considerablemente superior al detectado en las harinas de 2003 (26,7%), sin embargo tampoco fue una diferencia estadísticamente significativa ($p=0,265$), al tratarse de un muestreo reducido (Figura 28).

Resulta necesario remarcar que el 40% de las harinas de pescado del lote 2003, estaban clasificadas como harinas LT que como hemos comentado en el capítulo 4.3.1.1., resultaron todas ellas negativas. De no haber sido por esta alta representación sobre el total del muestreo, seguramente estaríamos hablando de un porcentaje de contaminación en el año 2003 muy superior al 23,3% de *L. garvieae* y 26,7% de *S. parauberis* encontrado.

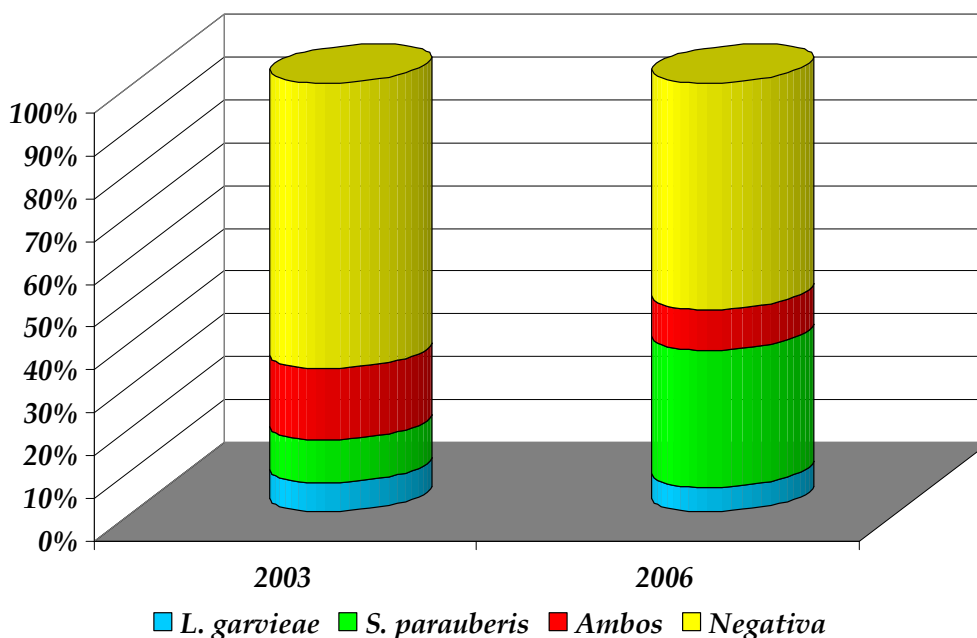
Las diferencias encontradas entre las harinas españolas y las harinas de importación (capítulo 4.3.1.2), también son aplicables a los años de muestreo. Esto es debido a que, como hemos comentado anteriormente, todas las harinas de importación que resultaron positivas a la PCR

procedían de Perú, y todas ellas menos una fueron procesadas en 2003, mientras que 45 de las 54 harinas de pescado españolas (84%) se procesaron en 2006.

Tabla 35. Resultados de la PCR múltiple y comparación del número total de muestras positivas a cada especie bacteriana según el año de muestreo.

	2003		2006		TOTAL	
	N°	%	N°	%	N°	%
Negativa	20	66,7%	28	52,8%	48	57,8%
<i>L. garvieae</i>	2	6,7%	3	5,6%	5	6,1%
<i>S. parauberis</i>	3	10%	17	32%	20	24,1%
Ambos	5	16,7%	5	9,4%	10	12%
TOTAL	30	36%	53	64%	83	100%
<i>L. garvieae</i>	7	23,3%	8	15,1%	15	18,1%
<i>S. parauberis</i>	8	26,7%	22	41,5%	30	36,2%

Figura 28. Distribución de los resultados porcentuales en harinas de pescado por año de muestreo.



4.3.1.4. SUPERVIVENCIA BACTERIANA EN HARINAS DE PESCADO.

Un total de 19 harinas de pescado recibidas en el año 2003 y que no fueron procesadas tras su recepción, se analizaron 3 años más tarde (2006), resultando todas ellas negativas a la PCR múltiple de *L. garvieae* y *S. parauberis*. Esta detección nula de estos dos patógenos piscícolas, contrasta con los porcentajes de detección del 23,3% y 26,7% de *L. garvieae* y *S. parauberis* respectivamente, obtenidos en las harinas del mismo año (2003) y procesadas tras su recepción sin ningún tipo de almacenamiento previo (capítulo 4.3.1.3). En ambos casos, las diferencias resultaron significativas (p (*L. garvieae*) = 0,049 y p (*S. parauberis*) = 0,039).

Tan solo una de estas muestras estaba encuadrada en la categoría LT (que en los muestreos anteriores sobre muestras reales no mostraron ningún tipo de amplificación a la PCR múltiple), por lo que no resta importancia a los resultados obtenidos en esta experiencia. El resto fueron 10 muestras de origen peruano (con un 65% de proteína) y 8 harinas españolas del 60%. Ambos grupos, en los muestreos originales mostraron un porcentaje de negatividad del 50%, que contrasta con la totalidad encontrada en las muestras procesadas 3 años después.

De la misma manera, las 5 harinas almacenadas, que tres años antes fueron positivas, mostraron en 2006 unos resultados dispares a los obtenidos en 2003. Sobre los caldos de las muestras HP 60, HP 84 y HP 102, obtuvimos en 2003 amplificación a *L. garvieae* y *S. parauberis*, mientras que HP 61 y HP 85 fueron positivas únicamente a *L. garvieae*. La señal de la banda de amplificación fue intensa y se consiguió aislar *L. garvieae* en los 5 casos (en más de una ocasión por muestra), corroborando así los resultados obtenidos tras la PCR. Sin embargo, tras la repetición de la incubación y PCR sobre estas mismas muestras, almacenadas durante 3 años en nuestro laboratorio, tan solo la harina HP 60 mostró una leve banda de amplificación a *L. garvieae*, con una intensidad mucho menor que la

observada en 2003. Las otras cuatro muestras fueron negativas a las dos especies bacterianas testadas (Tabla 36). El cálculo estadístico considera significativo las diferencias encontradas en los resultados de detección de *L. garvieae* ($p = 0,031$), no siendo así en *S. parauberis* ($p = 0,102$), por la comparación de tan solo 3 muestras.

Tabla 36. Comparación de los resultados de PCR múltiple obtenidos sobre cinco harinas de pescado procesadas en los años 2003 y 2006.

Harina Pescado	2003		2006	
	<i>L. garvieae</i>	<i>S. parauberis</i>	<i>L. garvieae</i>	<i>S. parauberis</i>
HP 60	+	+	+ (*)	-
HP 61	+	-	-	-
HP 84	+	+	-	-
HP 85	+	-	-	-
HP 102	+	+	-	-

(*). Banda de amplificación muy débil.

Los resultados significativos referentes a la ausencia de detección bacteriana en el procesado de harinas almacenadas durante 3 años, nos permiten sugerir que la viabilidad de *L. garvieae* y *S. parauberis* disminuye con el tiempo. El hecho de haberse observado en un total de 24 harinas reafirma estos resultados. En estudios similares Romalde y col. (1996) fijaron la supervivencia de *L. garvieae* mayor de 3 meses, pero se trataba de pescados sin moler y congelados.

Si bien no podemos fijar el tiempo de supervivencia de estas bacterias en harinas de pescado almacenadas, si podemos aproximarlo. Las harinas procesadas en 2003, llevaban almacenadas entre 8 meses (españolas) y 12 meses (peruanas), y sin embargo obtuvimos un 23,3% y 26,7% de muestras positivas a *L. garvieae* y *S. parauberis* respectivamente. Posteriormente el 100% de las harinas de este lote (2003) resultaron negativas tras procesarse 3 años después de estar almacenadas. Por lo tanto, podríamos sugerir que el almacenamiento durante periodos inferiores a 1 año, no garantiza la disminución de la viabilidad de estas dos bacterias en la harina de pescado. Sin embargo, transcurridos los tres años

de almacenamiento en un lugar fresco, seco y protegido de la luz, la viabilidad de estas bacterias se podría ver reducida a niveles tan bajos que no fuera posible detectarlos tras el enriquecimiento selectivo y la PCR múltiple que hemos desarrollado.

Las harinas procedentes de la pesca extractiva de Perú, necesitan entre 5 y 7 meses desde que son fabricadas hasta que llegan a la industria de piensos en España. Si además consideramos que en el caso de este lote, recibimos todas las muestras transcurridos 6-8 meses desde su recepción en la fábrica de piensos, podemos afirmar que estas harinas fueron enriquecidas transcurridos entre 12-15 meses desde su fabricación. Por el contrario, la gran mayoría (84%) de las harinas españolas, pertenecían al año 2006 y se procesaron transcurrido un tiempo entre 10 y 20 días desde su fabricación. Con estos datos y tras comprobar que la viabilidad de *L. garvieae* y *S. parauberis* se reduce con el tiempo podríamos sugerir que una de las causas del menor porcentaje de muestras positivas en las harinas de importación (por extensión del 2003) respecto a las harinas nacionales (por extensión del 2006), pudiera estar en la diferencia del tiempo transcurrido entre la fabricación de la harina de pescado y su procesado en el laboratorio. A este respecto, como hemos comentado en los 4.3.1.2 y 4.3.1.3, la causa fundamental de este descenso, radica en las diferencias encontradas en los porcentajes de detección de *S. parauberis*, no de *L. garvieae*.

L. garvieae esta considerada como una bacteria emergente, muy ubicua, capaz de adaptarse a un amplio rango de condiciones y ambientes y con una gran resistencia y distribución medioambiental (Vendrell y col., 2006). Además de afectar a una gran diversidad de especies acuáticas cada vez son más los estudios que describen aislamientos de *L. garvieae* en diferentes especies animales o muestras medioambientales. Así por ejemplo se han descrito aislados en muestras de vaca con mastitis subclínicas (Devriese y col., 1999; Vela y col., 2000), búfalos (Carvalho y col., 1997), ganado porcino, anguilas y aves silvestres (Tejedor y col., 2004), carne de

aves (Barakat y col., 2000), leche cruda (Villani y col., 2001), subproductos cárnicos (Rantsiou y col., 2005), quesos y subproductos lácticos (Klijn y col., 1995; Fortina y col., 2007), aguas (Vela y col., 2000), vegetales (Kawanishi y col., 2007), muestras de suelos y superficies (Klijn y col., 1995), tonsilas de perros, gatos y caballos (Pot y col., 1996) o en humanos en diversas ocasiones con diferentes cuadros clínicos (Elliot y col., 1991; Fefer y col., 1998; Mofredj y col., 2000; James y col., 2000 y Fihman y col., 2006; Wang y col., 2007).

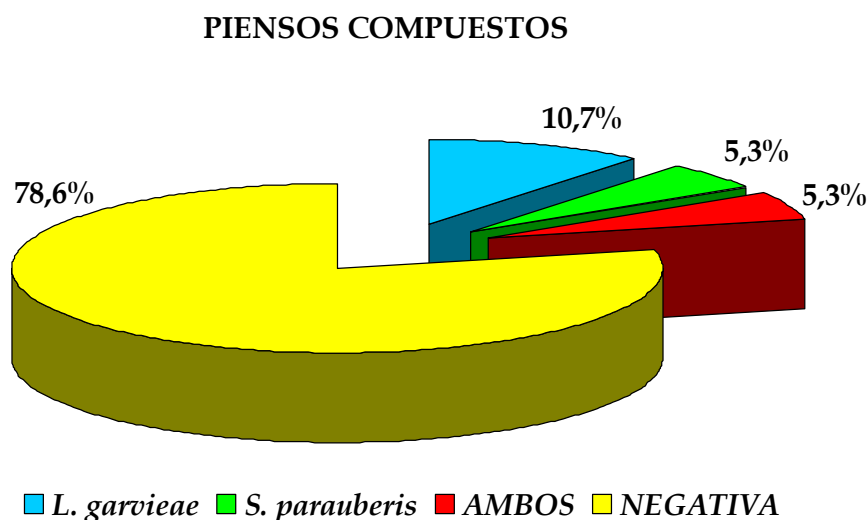
Por el contrario, la distribución ambiental de *S. parauberis* se cree más reducida que la presentada por *L. garvieae*, pudiendo ser debido a una menor resistencia a las condiciones ambientales. Así, existen pocas referencias bibliográficas que señalen la implicación o aislamiento de *S. parauberis* en otras especies diferentes al rodaballo (Toranzo y col., 1994; Doménech y col., 1996) y tan solo tenemos constancia de dos descripciones recientes en ganado bovino (McDonald y col., 2005) y en productos cárnicos (Koort y col., 2006).

Toda esta información nos permite sugerir que además de la importancia de *S. parauberis* en explotaciones piscícolas españolas, otras causas podrían ayudar a explicar el descenso en el porcentaje de harinas de importación contaminadas con este microorganismo, y por extrapolación las diferencias de contaminación encontradas en el total de ambos muestreos. Una posible menor ubicuidad y resistencia ambiental (y por tanto en la harina almacenada) de *S. parauberis* respecto a *L. garvieae* unido a las diferencias en el tiempo transcurrido desde la fabricación hasta el procesado de las harinas españolas (10-20 días) respecto a las harinas de importación (12-15 meses), podrían completar la explicación de estos hallazgos. Por su parte, también podríamos sugerir, que la posible mayor resistencia medioambiental de *L. garvieae*, podría haber motivado los casi invariables porcentajes de detección entre ambos muestreos.

4.3.2. MUESTREO DE PIENSOS COMPUESTOS.

Sobre el total de 56 piensos compuestos procesados, un total de 44 (78,6%) no contenían ninguna de las bacterias del estudio, resultando la reacción de PCR negativa (Figura 29). El resto, 12 piensos (21,4%), fueron positivos a la reacción de PCR y repartidos en 6 muestras contaminadas individualmente con *L. garvieae* (10,7%), 3 con *S. parauberis* (5,3%) y 3 piensos que fueron positivos a las dos especies bacterianas (5,3%). En números absolutos los porcentajes aumentarían al 16,1% y 10,7% de *L. garvieae* y *S. parauberis* respectivamente.

Figura 29. Distribución de los resultados obtenidos en el total de muestras de piensos compuestos procesados tras la PCR múltiple.



La transmisión de las estreptococosis en los peces criados (entre las que se encuentran las enfermedades producidas por *L. garvieae* y *S. parauberis*), se produce de manera horizontal, desde peces infectados (principalmente por vía fecal-oral) o dietas contaminadas (Kitao, 1993a). Además se ha comprobado que *L. garvieae* es capaz de sobrevivir en piensos compuestos y heces contaminadas artificialmente después de ser estos inoculados experimentalmente por vía intragástrica y oral, soportando las condiciones de la acidez estomacal (Romalde y col., 1996).

Sin embargo, la infección experimental no tuvo éxito cuando se producía con las suspensiones bacterianas sin asociarse a ningún sustrato (Kusuda y Kimura, 1978).

Resulta necesario indicar que la nutrición piscícola actual presenta un alto grado de innovación y tecnología si los comparamos con la producción de piensos de otras especies animales. No solo por la particularidad de las materias primas que incorpora, sino también porque los modernos procesos de extrusión (que por regla general se emplean hoy en día en la fabricación de piensos para peces), garantizan la obtención de productos de gran calidad nutritiva y digestibilidad. Si además tenemos en cuenta los tratamientos térmicos alcanzados durante este tipo de fabricación (175°C durante 6 minutos en algunas fases) cabría pensar, que los piensos compuestos recién fabricados mediante extrusión carecen de cualquier tipo de contaminación bacteriana, siendo considerados microbiológicamente estériles. Sin embargo, como sugerimos en capítulos posteriores, la obtención de piensos compuestos contaminados con *L. garvieae* (16,1%) o *S. parauberis* (10,7%) pudiera deberse a contaminaciones ambientales producidas en la planta de fabricación de piensos tras el procesado.

Por el contrario, las temperaturas alcanzadas durante el proceso de granulación o aglomeración (55-75°C durante 3-5 minutos) pueden ser insuficientes para la eliminación de la totalidad de las bacterias presentes en las materias primas que componen los piensos compuestos. A este respecto, Rokey (1995), indicó que en estudios comparativos con piensos extrusionados y granulados sospechosos de contener *Salmonella* spp., no se detectó esta bacteria en 775 muestras de piensos tras un proceso de extrusión, mientras que el 60% de los piensos granulados (sobre un total de 35), sí resultaron positivas a este microorganismo. Igualmente se refiere a que tras contaminar artificialmente diversas materias primas con 10⁴ UFC/g de *Salmonella* spp. y ser sometidas posteriormente a un proceso de

extrusión, ninguna de las muestras inoculadas resultó positiva a este microorganismo.

En el presente estudio, al pertenecer todas las muestras de piensos compuestos a empresas españolas, no fue posible establecer una comparación del país de procedencia, como ya lo hicimos con las harinas de pescado. Todos ellos fueron fabricados y procesados en el año 2006 y la gran mayoría iba a servir de alimento para peces de crianza, por lo que tampoco pudimos establecer una comparación al respecto. No obstante, sí creímos conveniente comparar los resultados obtenidos atendiendo al (1) modo de fabricación del pienso (extrusión o granulado), a (2) la presencia o ausencia de harina de pescado en la composición del mismo, así como (3) un estudio pareado junto con las harinas de pescado que contienen en su composición.

4.3.2.1. ESTUDIO COMPARATIVO SEGÚN EL MODO DE FABRICACIÓN DEL PIENSO.

Sobre el total de 56 piensos compuestos procesados, 38 (67,9%), fueron fabricados mediante un proceso de extrusión y el resto, 18 (32,1%), fueron granulados. Todos los piensos fabricados mediante extrusión, contenían harina de pescado en su composición y fueron destinados a la alimentación de peces de crianza. Esto es así, debido a que mediante la granulación no se garantiza la estabilidad del pellet en el agua, a la vez que resulta muy difícil controlar los parámetros de flotabilidad y hundimiento del pienso (Lázaro, 2001).

Los 18 piensos granulados tuvieron un destino más variado, siendo en este caso la alimentación de ganado porcino (12), vacuno (2), ovino (1) y conejos (3). Además, 11 de ellos (61,1%) incluían harina de pescado en su formulación.

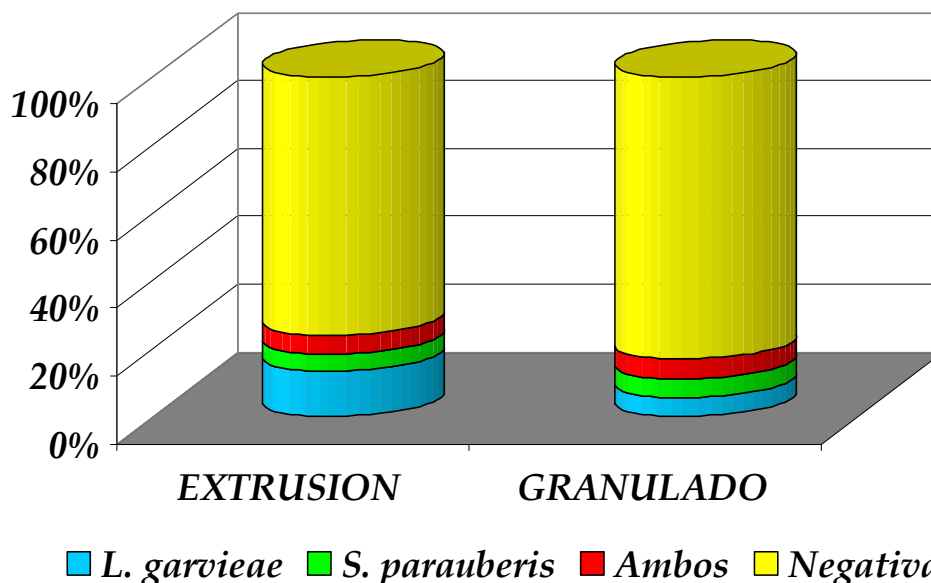
Tal y como se aprecia en la Tabla 37 y Figura 30, a diferencia de los resultados observados en las harinas de pescado, predominan los piensos compuestos con ausencia de estos dos importantes patógenos piscícolas en los dos tipos de fabricación y ninguna de las diferencias encontradas resultó estadísticamente significativa (obteniendo valores de $p > 0,05$ en todos los casos).

El porcentaje total de piensos extrusionados contaminados fue del 23,8%, sensiblemente superior si se compara con los piensos granulados, 16,8%. Estas diferencias, tal y como explicaremos más adelante, podrían deberse a las contaminaciones cruzadas ambientales que se pueden producirse en el interior de las industrias de fabricación de piensos compuestos. Por especie bacteriana y tal y como se aprecia en la Tabla 37, el porcentaje de piensos extrusionados positivos a *L. garvieae* (18,4%), fue ligeramente superior a los granulados (11,1%), mientras que la frecuencia de detección de muestras positivas a *S. parauberis* resultó muy parecida entre ambos tipos de fabricación (10,5 y 11,1% respectivamente), hecho que discutiremos en el capítulo 4.3.2.4.

Tabla 37. Resultados de la PCR múltiple y comparación del número total de muestras positivas a cada especie bacteriana según el modo de fabricación de los piensos compuestos.

	EXTRUSION		GRANULADO		TOTAL	
	Nº	%	Nº	%	Nº	%
Negativa	29	76,3%	15	83,3%	44	78,6%
<i>L. garvieae</i>	5	13,2%	1	5,6%	6	10,7%
<i>S. parauberis</i>	2	5,3%	1	5,6%	3	5,3%
Ambos	2	5,3%	1	5,6%	3	5,3%
TOTAL	38	67,9%	18	32,1%	56	100%
<i>L. garvieae</i>	7	18,4%	2	11,1%	9	16,1%
<i>S. parauberis</i>	4	10,5%	2	11,1%	6	10,7%

Figura 30. Distribución de los resultados porcentuales en piensos compuestos según el modo de fabricación.



4.3.2.2. ESTUDIO COMPARATIVO SEGÚN LA PRESENCIA DE HARINA DE PESCADO EN LA COMPOSICIÓN.

El porcentaje de piensos con harina de pescado en su composición incluidos en este estudio (87,5%), fue superior al número de piensos que no la contenían (12,5%). Tan solo 6 piensos de ganado porcino y uno de vacuno, no incluían esta materia prima en su formulación.

A pesar de esta descompensación, los resultados obtenidos fueron muy similares en los dos grupos, y así resultaron contaminados el 28,6% de los piensos compuestos sin harinas de pescado en su composición frente al 20,4% de contaminación en los piensos que contenían esta materia prima (Tabla 38 y Figura 31).

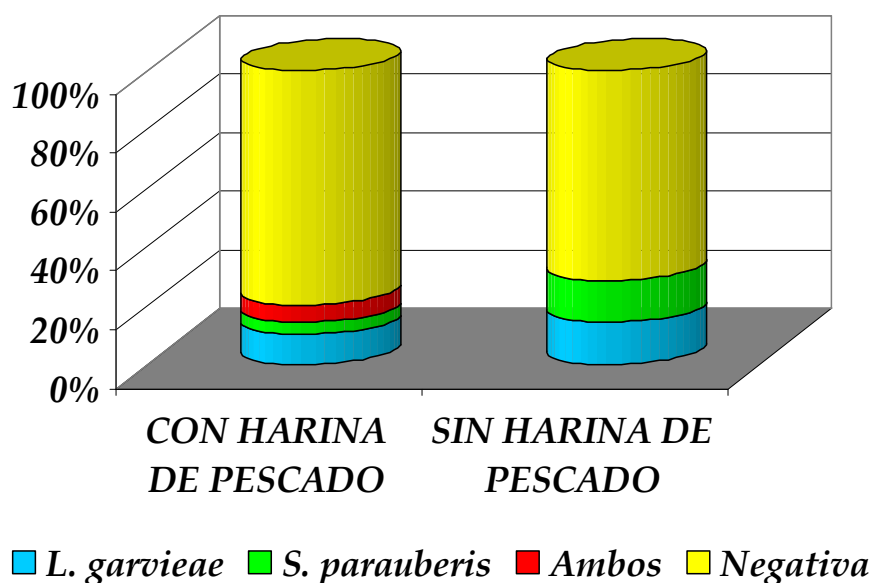
Al respecto de los resultados comparados por especie bacteriana, detectamos *L. garvieae* en el 16,3% y 14,2% de los piensos compuestos con y

sin harina de pescado respectivamente y en un 10,2% y 14,2% en lo que a la detección de *S. parauberis* se refiere. Estas frecuencias de detección tan parecidas provocaron que las diferencias no fueran estadísticamente significativas ($p > 0,05$), y serán debidamente discutidas en el capítulo 4.3.2.4.

Tabla 38. Resultados de la PCR múltiple y comparación del número total de muestras positivas a cada especie bacteriana según la presencia o ausencia de harina de pescado en la composición.

	CON HARINA DE PESCADO		SIN HARINA DE PESCADO		TOTAL	
	Nº	%	Nº	%	Nº	%
Negativa	39	79,6%	5	71,4%	44	78,6%
<i>L. garvieae</i>	5	10,2%	1	14,2%	6	10,7%
<i>S. parauberis</i>	2	4,1%	1	14,2%	3	5,3%
Ambos	3	6,1%	0	0%	3	5,3%
TOTAL	49	87,5%	7	12,5%	56	100%
<i>L. garvieae</i>	8	16,3%	1	14,2%	9	16,1%
<i>S. parauberis</i>	5	10,2%	1	14,2%	6	10,7%

Figura 31. Distribución de los resultados porcentuales en piensos compuestos según la presencia o ausencia de harina de pescado en la composición.



4.3.2.3. ESTUDIO COMPARATIVOS DE HARINAS DE PESCADO Y PIENSOS COMPUESTOS.

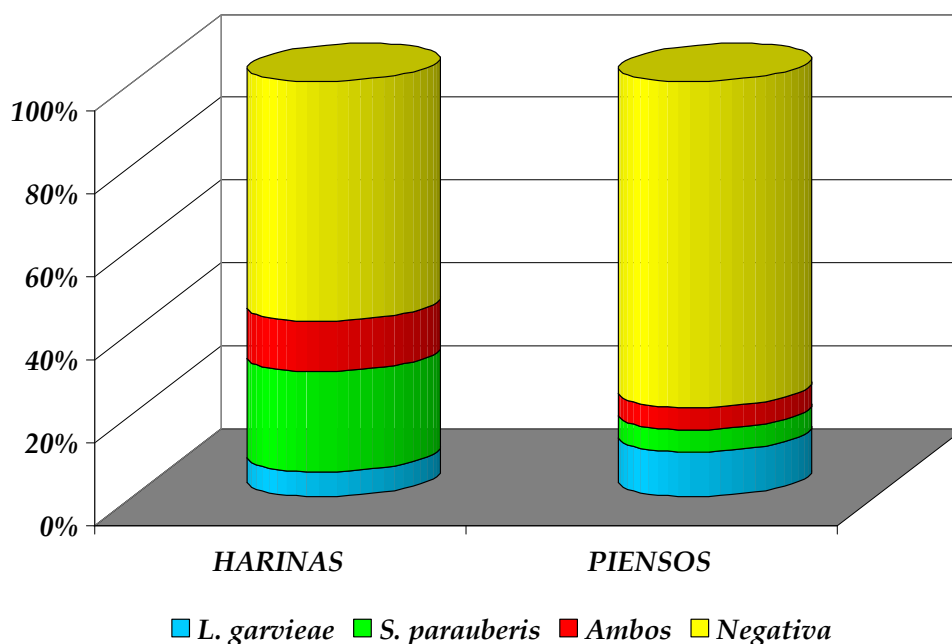
Con esta comparación, pretendíamos poner de manifiesto las diferencias de detección de estos dos microorganismos entre el total de harinas de pescado (83 muestras) y piensos compuestos (56 muestras) analizados en capítulos anteriores.

En primer lugar observamos que el porcentaje de muestras contaminadas fue sensiblemente inferior en los piensos compuestos (21,4%), siendo éste prácticamente la mitad que el observado en las harinas de pescado (42,2%), y considerándose ésta una diferencia estadísticamente significativa ($p = 0,019$). Tal y como muestra en la Tabla 39 y Figura 32, esta diferencia se debe en gran medida al descenso en la detección de *S. parauberis* en los piensos compuestos. Mientras que un 36,2% de las harinas de pescado estaban contaminadas con este agente, este porcentaje disminuye hasta el 10,7% en los piensos compuestos, resultando igualmente una diferencia estadísticamente significativa ($p = 0,002$). Por el contrario, el porcentaje total de muestras positivas a *L. garvieae*, apenas varió en ambos muestreos, detectando un 18,1% de harinas de pescado contaminadas, frente al 16,1% de los piensos compuestos, resultando por lo tanto una diferencia estadísticamente no significativa ($p = 0,938$) y que igualmente será discutida en el siguiente capítulo (4.2.3.4).

Tabla 39. Resultados de la PCR múltiple y comparación del número total de muestras positivas a cada especie bacteriana en harinas de pescado y pienso compuestos.

	HARINAS		PIENSOS		TOTAL	
	Nº	%	Nº	%	Nº	%
Negativa	48	57,8%	44	78,6%	92	66,2%
<i>L. garvieae</i>	5	6,1%	6	10,7%	11	7,9%
<i>S. parauberis</i>	20	24,1%	3	5,3%	23	16,5%
Ambos	10	12%	3	5,3%	13	9,4%
TOTAL	83	100%	56	100%	139	100%
<i>L. garvieae</i>	15	18,1%	9	16,1%	24	17,3%
<i>S. parauberis</i>	30	36,2%	6	10,7%	36	25,9%

Figura 32. Distribución de los resultados porcentuales en el total de harinas de pescado y piensos compuestos.



4.3.2.4. MUESTREO PAREADO HARINAS DE PESCADO - PIENSOS COMPUESTOS.

Con esta experiencia tratamos de estudiar la viabilidad de las bacterias existentes en la harina de pescado cuando son incorporadas en la formulación y fabricación de los piensos compuestos y con ello evaluar los procesos de extrusión y granulación del pienso para eliminar las bacterias presentes en las materias primas. Para ello utilizamos un total de 29 piensos compuestos y las 29 harinas de pescado correspondientes que contenían en su composición respectivamente. Estas 29 muestras de harinas y piensos ya están incluidas en el total del muestreo referenciado en los capítulos anteriores y se procesaron una sola vez.

Veintisiete de los 29 piensos seleccionados (93,1%), fueron fabricados mediante un proceso de extrusión (destinados todos ellos a los peces de crianza), conteniendo todos en su composición harinas de pescado

de origen español, con el 60% de proteína bruta. Los otros dos piensos compuestos incluidos en este capítulo, fueron fabricados mediante un proceso de granulación (puesto que iban a ser destinados al ganado porcino), y contenían harinas de pescado procedentes de Perú (70%) y Noruega (LT).

En la Tabla 40, detallamos los resultados obtenidos tras el análisis de las 29 muestras de piensos compuestos, con las 29 harinas que contenían en su composición. Veinte de las 29 muestras de piensos compuestos extrusionados (69%), resultaron negativas a la PCR múltiple, siendo éste un resultado acorde con la capacidad del proceso de extrusión para eliminar bacterias presentes en los piensos compuestos gracias a los elevados tratamientos térmicos que incorpora. Así, detectamos piensos compuestos negativos con harinas de pescado contaminadas con *S. parauberis* en las muestras 2, 3, 4, 5, 7, 17 y 29 o con harinas contaminadas con ambas especies bacterianas en las muestras 1 y 15. Además, en las muestras 6, 9, 12, 16, 18, 19, 20, 21, 22, 24 y 25, obtuvimos harinas de pescado negativas incluidas en la formulación de piensos compuestos que también resultaron negativos tras la PCR.

Por otra parte, en un escaso número de muestras, obtuvimos resultados discordantes con las hipótesis de (1) la harina de pescado como fuente fundamental de transmisión de *L. garvieae* y *S. parauberis* o con (2) la eficacia del proceso de extrusión para la eliminación de agentes bacterianos presentes en los piensos compuestos. De esta manera, detectamos 4 harinas contaminadas con *L. garvieae* y/o *S. parauberis* que también fueron detectados en los piensos compuestos de los que formaron parte respectivamente (par de muestras 11, 23, 27 y 28), 3 piensos que contenían harinas de pescado libres de estos dos patógenos piscícolas, y que estaban contaminados con *L. garvieae* o *S. parauberis* (par de muestras 8, 10 y 13) y finalmente 2 piensos compuestos contaminados tan solo con *L. garvieae* que contenían harinas de pescado contaminadas tan solo con *S. parauberis* (14 y 26).

Tabla 40. Resultados de la PCR múltiple obtenidos en el muestreo pareado de piensos compuestos y harinas de pescado.

Par de Muestras		HARINAS		PIENSOS	
		<i>L. garvieae</i>	<i>S. parauberis</i>	<i>L. garvieae</i>	<i>S. parauberis</i>
1	E	+	+	-	-
2	E	-	+	-	-
3	E	-	+	-	-
4	E	-	+	-	-
5	E	-	+	-	-
6	E	-	-	-	-
7	E	-	+	-	-
8	E	-	-	+	+
9	E	-	-	-	-
10	E	-	-	+	+
11	E	+	-	+	-
12	E	-	-	-	-
13	E	-	-	+	-
14	E	-	+	+	-
15	E	+	+	-	-
16	E	-	-	-	-
17	G	-	+	-	-
18	G	-	-	-	-
19	E	-	-	-	-
20	E	-	-	-	-
21	E	-	-	-	-
22	E	-	-	-	-
23	E	-	+	-	+
24	E	-	-	-	-
25	E	-	-	-	-
26	E	-	+	+	-
27	E	+	+	+	-
28	E	-	+	-	+
29	E	-	+	-	-
TOTAL		13,8%	48,3%	24,1%	13,8%

E: pienso extrusionado. G: pienso granulado

A pesar de la información anteriormente mencionada al respecto de los tratamientos de extrusión, los resultados obtenidos en los piensos extrusionados y granulados en nuestro estudio, no indican un descenso en la contaminación de los primeros (23,7%) respecto a los segundos (16,7%) tal y como cabría esperar, aunque no es una diferencia estadísticamente significativa ($p = 0,803$). Si bien los porcentajes de detección de *S. parauberis*, se mantiene en ambos tipos de procesado (10,5% y 11,1%), la proporción de piensos extrusionados contaminados con *L. garvieae* es incluso superior (18,4%) a los granulados (11,1%), sin ser de nuevo significativo ($p = 0,760$).

Por otra parte, en la comparación establecida entre los muestreos totales de piensos y harinas, es evidente la reducción en el porcentaje de detección de piensos positivos a alguno de los dos patógenos piscícolas (21,4%), respecto a las harinas de pescado (42,2%). Esto significa una reducción de detección de casi la mitad con un valor significativo de $p = 0,019$. Al igual que observamos en la comparaciones realizadas en harinas de pescado por origen y año de la muestra (capítulos 4.3.1.2. y 4.3.1.3.), esta diferencia se debe en gran medida a la disminución significativa en la detección de *S. parauberis* ($p = 0,002$), entre piensos (10,7%) y harinas (36,2%).

Se ha comprobado en otros estudios, que los patógenos bacterianos que pudieran ir vehiculados en las materias primas y diversos ingredientes que componen el pienso pueden quedar acantonados en las estructuras y almacenes de la fábrica, así como en diferentes ambientes (suelo, superficies, polvo, operarios, utensilios...). Si no se realizan estrictos protocolos de limpieza y desinfección, existe el riesgo de producirse contaminaciones del pienso una vez fabricado (Nesse y col., 2003). Estas medidas de higiene son factibles y controlables en los silos de fabricación y almacenamiento. Pero sin embargo, resulta muy complicado eliminar las contaminaciones ambientales, especialmente presentes en el polvo que se genera tras las descargas de mercancías en este tipo de instalaciones. Así se han descrito diversos casos de contaminaciones cruzadas en fábricas de procesado de harinas de pescado y piensos para peces, principalmente en el caso de patógenos alimentarios como *L. monocytogenes* (Ivanek y col., 2004; Miettinen y col., 2006) o *Salmonella* spp. (Nesse y col., 2005).

Toda esta información, así como el hecho (comentado en el capítulo anterior) de que *L. garvieae* es un bacteria muy ubicua y con una gran distribución y resistencia medioambiental, nos permite sugerir que los porcentajes de contaminación encontrados en los piensos extrusionados pudieran deberse en gran medida a las contaminaciones cruzadas que se producen en el interior de las fábricas de producción de piensos

compuestos durante el almacenamiento o transporte. Las bacterias contaminantes pueden proceder de las materias primas u otros ingredientes, así como del medioambiente (Nesse y col., 2003). Sin embargo, la detección de piensos granulados contaminados, no podemos atribuirla completamente a este tipo de contaminación cruzada, puesto que (aunque no existen datos sobre la termorresistencia de estas especies bacterianas), al contrario que los piensos extrusionados, es asumible que los tratamientos térmicos de la granulación (55-75°C - 3-5 minutos) no garanticen la eliminación total de los microorganismos. Por lo tanto la presencia de *L. garvieae* y *S. parauberis* en este tipo de piensos pudiera deberse indistintamente a la fabricación con materias primas u otros ingredientes contaminados que a su vez contaminan el producto final, o bien a los mecanismos de contaminación cruzada antes mencionados.

A su vez, la posible menor resistencia medioambiental y ubicuidad estimada de *S. parauberis* respecto a *L. garvieae* (capítulo 4.3.1.) supondría una disminución del riesgo de contaminación cruzada por esta bacteria en los piensos fabricados y por lo tanto podría ser la causa del marcado descenso en su detección en los piensos (10,7%) respecto a las harinas de pescado (36,2%). Precisamente la gran ubicuidad y resistencia ambiental de *L. garvieae*, causaría los resultados de detección casi invariables ($p = 0,938$) de esta bacteria entre harinas de pescado (18,1%) y piensos compuestos (16,1%), siendo por ello las mayores diferencias en la detección de *S. parauberis* la causa del contraste en el porcentaje de muestras contaminadas entre ambos muestreos.

Al inicio del presente estudio planteamos la harina de pescado como fuente fundamental de transmisión de *L. garvieae* y *S. parauberis* a los piensos compuestos. Los resultados obtenidos en el capítulo anterior en harinas de pescado (con un porcentaje de contaminación del 42,2%), unido a las referencias bibliográficas de contaminación esta materia prima con otros microorganismos, apoyaban nuestras teorías iniciales (Hauge, 1969; Morris y col., 1970; Nesse y col., 2003). Sin embargo, los resultados

obtenidos en este capítulo (donde sugerimos la contaminación cruzada de los piensos compuestos en el transporte y almacenamiento), junto a la eficacia manifiesta del proceso de extrusión para la eliminación de patógenos (Rokey, 1995), dificulta la interpretación de los resultados obtenidos en el estudio comparado de piensos con y sin harina de pescado. Esto es debido a que, aunque hemos obtenido porcentajes de contaminación incluso superiores en los piensos sin harina de pescado (28,6%) que en los piensos con esta materia prima (20,4%), desconocemos la fuente original de las bacterias detectadas. Estas, presentes en el ambiente, pudieran haber llegado a los piensos compuestos procedentes una amplia gama de ingredientes y materias primas animales (diferentes a la harina de pescado) y vegetales (trigo, avena, soja, girasol...), susceptibles de ser contaminadas por *L. garvieae* en el medio ambiente (capítulo 4.3.3).

De la misma manera los resultados obtenidos en el estudio pareado de piensos y harinas contribuyen a afianzar las hipótesis planteadas. El hallazgo de piensos extrusionados positivos sin harinas de pescado contaminadas, así como la detección en piensos de especies bacterianas que no portaban las harinas, refuerzan la posibilidad de otras muchas fuentes de contaminación ambiental diferentes a la harina de pescado.

Finalmente es necesario remarcar la gran importancia de establecer controles de calidad en las diferentes fases fabricación de piensos, desde la recepción de materias primas e ingredientes, hasta el producto final acabado, haciendo especial hincapié en las contaminaciones ambientales que pudieran existir en el interior de las fábricas y durante el transporte. De esta manera se podrían reducir la contaminación de materias primas y piensos con *L. garvieae* y *S. parauberis*, patógenos de especial importancia en acuicultura. A pesar de todo, el 78,6% del total de piensos compuestos analizados no estaban contaminados con estos dos patógenos piscícolas y hemos sugerido la contaminación ambiental como causa más probable del porcentaje de piensos extrusionados contaminados (23,8%), asumiendo por

tanto que el tratamiento térmico de la extrusión es eficaz para la eliminación de agentes bacterianos.

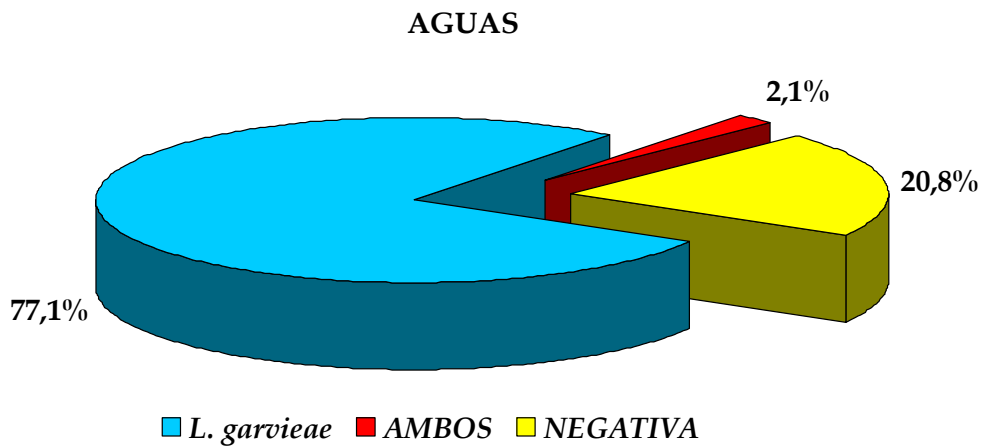
Además, el hecho de que nuestra metodología tenga un muy bajo umbral de detección (1 UFC en 25 gramos) y la dificultad de multiplicación bacteriana en productos deshidratados como los piensos o harinas, nos permite sugerir que la cantidad de bacterias presentes en los piensos tras las contaminaciones cruzadas que sobre ellos se producen, sea muy baja. Si también tenemos en cuenta que la dosis letal 50 (DL₅₀) de *L. garvieae* cuando es inoculado intraperitonealmente es superior a 10⁵ en todos los estudios realizados (Romalde y col., 1996; Múzquiz y col., 1999; Chen y col., 2002; Kawanishi y col., 2006), y que se ha demostrado en estudios similares con otras bacterias que dicha DL₅₀ en peces por vía digestiva es más elevada que en cualquier otra vía (Itano y col., 2006), podemos sugerir que el papel de este tipo de piensos en la transmisión de estos dos agentes bacterianos es prácticamente nulo.

4.3.3. MUESTREO DE AGUAS.

El procesado de las 48 muestras de aguas incluidas en el estudio (siguiendo el protocolo de extracción Fast DNA Modificado), permitió determinar una alta prevalencia de *L. garvieae*, siendo detectado en 38 muestras y significando una frecuencia 79,2% (Tabla 41). Por el contrario, tan solo detectamos una muestra positiva a *S. parauberis*, siendo ésta también positiva a *L. garvieae* (Figura 33). Se trató de una muestra del río Pirón, a su paso por la localidad de Pinarnegrillo en la provincia de Segovia.

Con estos resultados, a diferencia de lo que ocurre con las harinas de pescado y piensos compuestos, la presencia de *S. parauberis* supone tan solo un caso aislado (2,1%), por lo que únicamente nos centraremos en los resultados de *L. garvieae* en el resto de las aguas.

Figura 33. Distribución de los resultados obtenidos en el total de muestras de aguas procesadas tras la PCR múltiple.



En la Figura 34, se muestra un ejemplo de un gel de PCR con muestras reales de aguas del curso natural de ríos, piscifactorías y depuradoras, procesadas a lo largo del estudio y donde se puede apreciar el alto porcentaje de muestras positivas.

Figura 34. PCR múltiple sobre muestras reales de aguas.

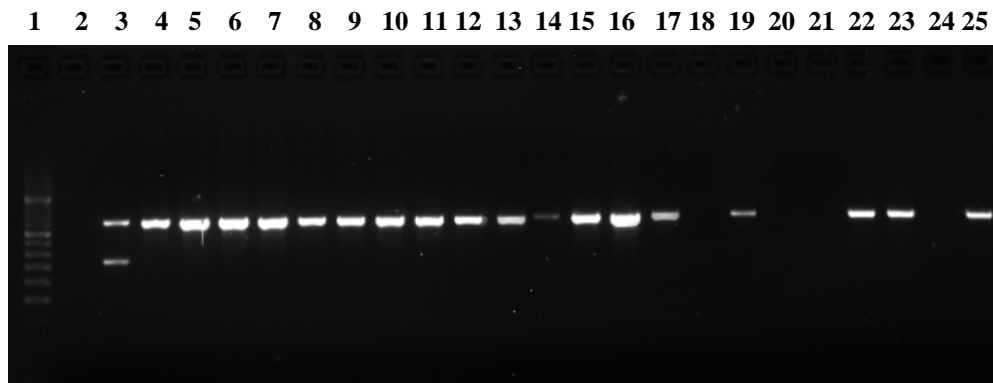


Figura 34. Gel de PCR. Línea 1: marcador de peso molecular 1000pb; línea 2: control negativo; línea 3: control positivo *L. garvieae* (5664/01) / *S. parauberis* (NCDO 2020); Línea 4 y líneas 10-13: muestras de agua del curso natural de ríos españoles. Líneas 5-9: muestras de agua del curso natural de ríos italianos. Línea 14: muestra de agua de depuradora. Líneas 15 y 16: muestras de agua del curso natural de ríos polacos. Líneas 17-21: muestras de agua de entrada de piscifactorías. Líneas 22-25: muestras de agua de salida de piscifactorías.

Tabla 41. Relación del número de muestras de agua positivas a *L. garvieae* con respecto al total en cada tipo de muestreo tras la PCR múltiple.

	Origen	PCR	
		N° +/ N°Total	%
Piscifactorías	Entrada	5/10	50%
	Salida	6/6	100%
	TOTAL	11/16	68,7%
Ríos	España	14/16	87,5%
	Italia	5/5	100%
	R. Checa	0/3	0%
	Polonia	2/2	100%
	Francia	2/2	100%
	Portugal	1/1	100%
	TOTAL	24/29	82,8%
Aguas Residuales	Depuradora	3/3	100%
TOTAL		38/48	79,2%

En primer lugar, la aplicación de la metodología permitió detectar *L. garvieae* en todas las aguas de salida de las piscifactorías de trucha arco iris, mientras que en las aguas de entrada se detectó este patógeno en la mitad de las procesadas (50%). En los cinco casos positivos del agua de entrada, el agua de salida de la misma explotación también resultó positiva (Tablas 41 y 43).

En segundo lugar, detectamos *L. garvieae* en 24 de las 29 muestras del curso natural de los ríos, suponiendo un porcentaje de muestras positivas del 82,8%. Respecto a las aguas de ríos españoles, tan solo 2 de las 16 muestras (río Clamores y río Gudillos, ambos muestreados en la provincia de Segovia), resultaron negativas a la PCR. Las 14 muestras positivas, que suponen un 87,5%, se distribuyeron en 6 provincias españolas (Tabla 43). Por otra parte, obtuvimos un 100% de positivos en las muestras de Italia (5 ríos), Polonia (2 ríos), Francia (2 ríos) y Portugal (1 río). Por el contrario, ninguna de las 3 muestras procesadas de la República Checa resultó positiva a la PCR múltiple. En este caso y ante la obtención de resultados dispares, comparados con el resto de los países y ríos,

enriquecimiento previo. En la mayoría de los casos se utiliza la detección directa por PCR como diagnóstico rápido cuando no es necesario obtener el aislamiento bacteriano, a pesar de contar con problemas de inhibición de la PCR o dificultad para discriminar ADN de bacterias viables o inviables (Löfström y col., 2004). Existe un amplio rango de bacterias oportunistas o patógenas que pueden ser encontradas en el agua (Toze, 1999). Generalmente, los estudios realizados al respecto analizan patógenos entéricos en humanos, como *Salmonella* (Way y col., 1993), *E. coli* (Tamanai-Shacoori y col., 1996) o *Campylobacter* (Abulreesh y col., 2006), aunque también existen casos diferentes a las bacterias entéricas como *Mycobacterium* (Ross y col., 1997) o *Legionella* (Palmer y col., 1995). Todos ellos, son causantes de importantes patologías, especialmente en zonas costeras o países subdesarrollados (Baudart y col., 2000).

Todos los estudios referentes al aislamientos de *L. garvieae* en agua, hablan de cepas aisladas en las instalaciones de piscifactorías con procesos de lactococosis (Kusuda y Komatsu, 1978a; Kitao col., 1979; Vela y col., 2000), y en estanques con ensayos de infecciones experimentales (Múzquiz y col., 1999).

Tras analizar nuestros resultados comprobamos unos porcentajes de detección de *L. garvieae* muy elevados en todos los tipos de aguas analizadas. Todas las piscifactorías muestreadas presentaban o habían presentado problemas de lactococosis en el pasado. Por lo tanto, el hecho de detectar todas las muestras positivas en el agua de salida de las explotaciones piscícolas, puede ser explicado por la liberación de *L. garvieae* (a través de las heces de los animales enfermos o portadores) al agua de los estanques y de ésta al curso natural del río (Domínguez y col., 2000; Vendrell y col., 2006). De hecho, como ampliaremos en el capítulo de caracterización molecular (4.5), 4 de las 6 cepas aisladas del agua de salida, tuvieron el mismo perfil genético que la cepa epidémica actual de trucha arco iris en España.

Por su parte, las aguas de entrada fueron recogidas entre 20 y 40 metros antes de la balsa de decantación de la piscifactoría, por lo que su muestreo podría equipararse al curso natural de los ríos. Se detectaron resultados positivos y negativos en muestreos de una misma piscifactoría separados en el tiempo (muestras E2, E4 y E7, Tabla 43), lo cual podría sugerir que la contaminación de los ríos por esta bacteria pudiera ser estacional o al menos no de una manera permanente, como ya demostraron Kitao y col. (1979). Por otra parte, la escasa concentración bacteriana estimada en estas muestras, podría haber también condicionado estos resultados.

Tal y como hemos comentado, la explotación de peces en el curso de los ríos, puede suponer la liberación de *L. garvieae* al curso natural de los mismos. Esto podría explicar la existencia de aguas negativas a la entrada y positivas a la salida de la misma piscifactoría, o que todos los muestreos positivos en la entrada a la planta, lo fueran también a la salida (Tabla 43). Las características genéticas de estas cepas serán detalladas en el capítulo 4.5.

La elevada presencia de *L. garvieae*, con una extensa distribución geográfica (6 provincias en España y 5 países europeos) en el curso natural de los ríos y aguas residuales confirmaría la gran ubicuidad y distribución ambiental de esta especie bacteriana. Todo ello, nos permite sugerir que la fuente ambiental de esta bacteria puede ser muy diversa, no solo procedente de las harinas de pescado como inicialmente planteábamos en el capítulo 4.3.1, sino que otro grupo de materias primas vegetales (trigo, cebada, soja, avena, girasol...), y muestras medioambientales podrían también vehicularlo. Por todo ello, *L. garvieae* debería ser un microorganismo a tener en cuenta en los controles de calidad de muestras medioambientales y alimentarias, especialmente en aquellos sustratos directamente relacionados con la Salud Pública y Sanidad Animal.

4.4. AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE *Lactococcus garvieae*

4.4.1. AISLAMIENTO DE *Lactococcus garvieae* A PARTIR DE HARINAS DE PESCADO, PIENSOS COMPUESTOS Y AGUAS.

A partir de las muestras positivas por PCR, se intentó el aislamiento de *L. garvieae*. Las harinas de pescado y piensos compuestos, son muestras orgánicas altamente contaminadas con micropoblaciones competitivas que podían dificultar el aislamiento de *L. garvieae*. Por ello, tratamos de diseñar un medio de aislamiento específico que nos permitiera diferenciar *L. garvieae* frente a otras especies bacterianas mayoritarias en las muestras utilizadas.

4.4.1.1. SELECCIÓN DEL MEDIO DE CULTIVO.

En este capítulo, tratamos de buscar medios de aislamiento selectivos que inhibieran el crecimiento de bacterias Gram negativas y otras Gram positivas, especialmente del género *Enterococcus*. Todo ello lo realizamos conociendo las características nutricionales, bioquímicas y de crecimiento de *L. garvieae*. Los resultados obtenidos en los medios utilizados fueron por este orden:

Columbia Agar Sangre (BioMérieux España, S.A.).

Fue el primer medio de aislamiento utilizado y a pesar de detectar tras las siembras una predominancia de bacterias Gram positivas, apreciamos también leves crecimientos de bacterias Gram negativas que pudieran haberse multiplicado en el medio de enriquecimiento selectivo.

Esto, unido a la gran similitud de las colonias sospechosas, especialmente en lo que a la hemólisis y morfología se refiere, nos hizo descartar este medio comercial.

“Medio de Agar Peptona Sangre”.

Buscábamos potenciar el efecto hemolítico para diferenciar *Lactococcus* y *Enterococcus*. *L. garvieae* fue descrito inicialmente sin actividad hemolítica (Collins y col., 1983). Más adelante, se rechazó esta clasificación, encuadrándolo dentro del grupo de bacterias con hemólisis completa o β -hemólisis (Doménech y col., 1993). Sin embargo, los últimos trabajos publicados parecen coincidir en la actividad α -hemolítica de *L. garvieae* (Kusuda y col., 1991; Ravelo y col., 2001; Vendrell y col., 2006). Nosotros hemos observado una hemólisis claramente incompleta, cuando los tiempos de incubación son cortos (18-24h), que se va tornando completa (β -hemólisis) cuando se prolonga en el tiempo (+ 48h). A pesar de ello, tampoco este medio nos permitió establecer un criterio claro de diferenciación.

“Medio de cultivo diferencial”.

Tras revisar la bibliografía existente al respecto, tratamos de encontrar alguna prueba bioquímica que claramente nos diferenciara *L. garvieae* de dos especies bacterianas que como veremos más adelante en el capítulo 4.4.1.2, fueron muy prevalentes en las muestras analizadas: *E. faecalis* y *E. faecium*. A pesar de existir diferencias en la acidificación de algunos azúcares entre los géneros *Lactococcus* y *Enterococcus* (por ejemplo ribosa, manitol, sorbitol y sacarosa), no hallamos ninguna prueba válida de diferenciación que nos cubriera por completo el espectro de las tres especies, tal y como señalan Ravelo y col. (2001). Pese a todo, decidimos diseñar un nuevo medio sólido de aislamiento selectivo con agua de

peptona como base nutritiva, incluyendo lactulosa como azúcar de control. La lactulosa (4-O-β-galactopiranosil-D-fructosa) es un disacárido que se origina por isomerización de la lactosa en medios básicos, y a pesar de no ser un azúcar incluido en la tablas de identificación bioquímica tradicional, si tenemos constancia de la utilización lenta de la lactosa por parte de *L. garvieae*, en contraposición de la completa acidificación por parte de *E. faecalis* y *E. faecium* (Doménech y col., 1993; Prieta y col., 1993; Ravelo y col., 2001).

Buscábamos una utilización rápida del azúcar en tiempos cortos de incubación (18-24h) por parte de los *Enterococcus*, que nos permitiera seleccionar las colonias no reactivas como *L. garvieae*. Sobre siembras directas a partir de cultivos puros incubadas a 30°C durante 24 horas, apreciamos una mayor acidificación del medio diseñado y un color amarillento en los cultivos con *E. faecalis* y *E. faecium* comparado con un color más rojizo en las siembras con *L. garvieae*. Sin embargo, estas diferencias no fueron tan claras cuando sembrábamos los caldos contaminados de las muestras iniciales, para que ello facilitara la selección de *L. garvieae*.

✚ **Medio de cultivo selectivo - 1** (*Elliker Agar Médium*. Scharlau Microbiology. Chemie S.A., Barcelona.).

En un principio el crecimiento cuantitativo de colonias en este medio fue mucho menor que en todos los utilizados anteriormente. Sin embargo, a pesar de ser un medio de aislamiento específicamente diseñado para el crecimiento de *Lactococcus* spp., la presencia de colonias de *Enterococcus* en mayores proporciones unido a la gran similitud morfológica de todas ellas en este medio, nos hizo también descartar su uso de forma rutinaria.

✚ **Medio de cultivo selectivo - 2**, (Columbia CNA. bioMérieux España, S.A.).

Finalmente con este medio comercial (con colistina y ácido nalidíxico), conseguimos eliminar completamente el crecimiento de las pocas bacterias Gram negativas que hubieran sido capaces de multiplicarse en el medio de enriquecimiento y que junto a la gran cantidad de *Enterococcus* entorpecían el aislamiento de *L. garvieae*. Si bien los *Enterococcus* continuaban creciendo en este medio de aislamiento, apreciamos una mayor facilidad para seleccionar *L. garvieae* que en el resto de los utilizados, especialmente por la morfología de las colonias en este medio. Paradójicamente, al igual que en la selección del medio de enriquecimiento selectivo de *L. garvieae* (capítulo 4.1.2.2.), también en esta ocasión la asociación de los antibióticos colistina y ácido nalidíxico parecía reunir las características más adecuadas para la incubación y selección de colonias de este microorganismo en los medios de enriquecimiento de harinas, piensos y aguas. Por ello, seleccionamos el Columbia CNA (bioMérieux España, S.A.), para el aislamiento de *L. garvieae* a partir de los medios enriquecidos positivos a la PCR.

Tal y como acabamos de comentar, en los diferentes medios de cultivo utilizados comprobamos la presencia mayoritaria de bacterias del género *Enterococcus*, siendo ésta la causa fundamental de la dificultad encontrada en el aislamiento de *L. garvieae*. Estos microorganismos, de enorme ubicuidad en el medio ambiente (Dutka y col., 1978; Kibbey y col., 1978), fueron capaces de multiplicarse con facilidad en el medio de enriquecimiento diseñado gracias a su condición de bacterias ácido lácticas, sus requisitos nutricionales y su amplio rango de condiciones de multiplicación (Facklam y col. 1995) que les confiere una gran ubicuidad y resistencia en diferentes sustratos (Eliopoulos, 2002). Dentro del este género, resultaron especialmente frecuentes las especies *E. faecium* y *E. faecalis*, de gran similitud fenotípica (Ravelo y col., 2001,) y genética con *L. garvieae* (Goh y col., 2000).

Tal y como se ha detallado en el capítulo de introducción, *L. garvieae* fue inicialmente clasificado como *E. seriolicida* y posteriormente reclasificado en el taxón actual (Doménech y col., 1993; Eldar y col., 1996; Teixeira y col., 1996). De ahí, que el gran parecido morfológico y fenotípico entre especies pertenecientes a géneros distintos nos dificultara obtener un patrón diferencial entre *L. garvieae* y especies del género *Enterococcus* (Fotos 11 y 12).

Una vez seleccionado el medio de aislamiento más apropiado (Columbia CNA), también utilizamos diferentes temperaturas de incubación para tratar de diferenciar *L. garvieae* y *Enterococcus* spp. Sin embargo, ambos géneros poseen un amplio rango de crecimiento (10-45°C) que impidió utilizar la temperatura como factor diferencial en el aislamiento (Facklam y Sahm, 1995; Vendrell y col., 2006). La temperatura final elegida fue de 30°C y realizamos la incubación y selección de colonias transcurridas 24 horas, puesto que la morfología entre *L. garvieae* y *E. faecalis*, se asemejaba mucho más cuando el tiempo de incubación era superior.

Tal y como detallamos en la Tabla 44, seleccionamos entre 2 y 7 colonias por muestra dependiendo del número de colonias sospechosas diferentes y el aislamiento del cultivo. Todas ellas fueron sembradas en Columbia Agar Sangre e incubadas a 30°C durante 24 horas para su posterior identificación por PCR (capítulo 4.4.3).

En dichas resiembras en cultivo puro apreciamos ligeras variaciones de la morfología y atenuación de la hemólisis de las colonias seleccionadas con respecto a la observada en Columbia CNA (bioMérieux España, S.A.). Si bien todas ellas fueron debidamente identificadas, este hecho posiblemente fuera debido a la diferente composición de los dos medios de cultivo (Columbia CNA y Columbia Agar Sangre) así como a la interacción del resto de bacterias presentes en la muestra inicial.

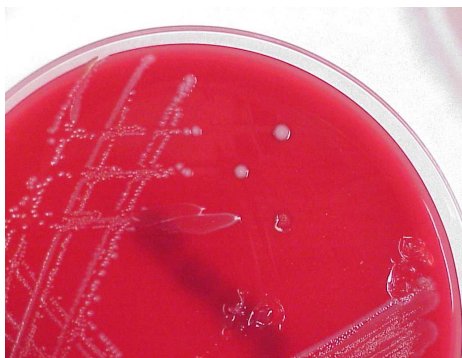


Foto 11. Cultivo de *L. garvieae* en Columbia Agar Sangre tras 24 h de incubación a 30°C.

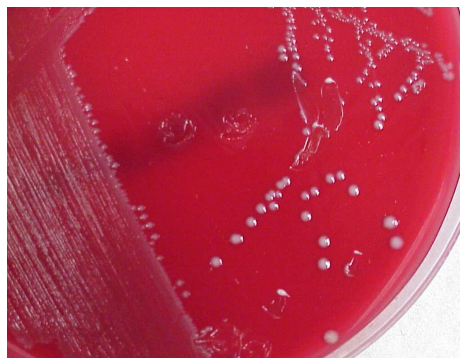


Foto 12. Cultivo de *L. garvieae* en Columbia Agar Sangre tras 24 h de incubación a 30°C.

4.4.1.2. AISLAMIENTO BACTERIANO.

Una vez seleccionado el medio de aislamiento y las condiciones de incubación más apropiadas para las muestras de harinas de pescado, piensos compuestos y aguas previamente enriquecidas, procedimos a sembrar todas las muestras que habían resultado positivas a la PCR.

Harinas de pescado.

Intentamos el aislamiento de *L. garvieae* a partir de 15 muestras de harina de pescado positivas y conseguimos aislar esta bacteria en 7 de ellas (46,6%). El número total de colonias seleccionadas en las 15 muestras fue de 93 (una media de 6,2 colonias por muestra), obteniendo un total de 18 cepas de *L. garvieae* y significando un 19,3% del total de colonias seleccionadas y analizadas (Tablas 42 y 44).

Si clasificamos las 18 cepas de *L. garvieae* aisladas por años de muestreo, obtenemos una diferencia llamativa, ya que conseguimos aislar el 71,4% de las harinas positivas y procesadas en 2003 y tan solo el 25% del 2006 (Tabla 42). Sin embargo, el escaso número de muestras, impide considerar esta diferencia estadísticamente significativa ($p = 0,201$).

Tabla 42. Relación de muestras de harinas de pescado positivas a la PCR y resultados de aislamiento de *L. garvieae*.

Procedencia	Año	Tipo	Referencia	PCR	ASL
España	2003	57%	HP61	+	3
		60%	HP60	+	1
			HP102	+	5
	2006	60%	BA06/00720	+	3
			BA06/01458	+	0
			BA06/02000	+	0
			BA06/02005	+	0
			BA06/02011	+	0
			BA06/02012	+	0
			BA06/02014	+	0
Perú	2003	65%	HP84	+	4
			HP82	+	0
			HP85	+	1
			70%	HP64	+
	2006	70%	BA06/01681	+	1

ASL: aislamiento (0 = aislamiento negativo; n = número de cepas aisladas)

Piensos Compuestos.

Respecto a las 9 muestras de piensos compuestos positivos a la PCR, se seleccionaron 41 colonias (4,5 por muestra) con morfologías similares a las que mostraría *L. garvieae*. Sin embargo, ninguna de estas colonias fue identificada como *L. garvieae* mediante la PCR específica de especie. De nuevo la gran proporción de micropoblaciones competitivas dificultó la selección de *L. garvieae*.

Aguas.

Finalmente, en las muestras de agua fue posible el aislamiento de *L. garvieae* en 34 de las 38 muestras positivas (89,5%), con un total de 95 cepas seleccionadas (2,5 por muestra), de las que 63 fueron confirmadas como *L. garvieae* por la PCR específica de especie (66,3% de acierto y casi dos cepas de esta especie bacteriana por muestra, Tablas 43 y 44).

Tabla 43. PCR y aislamiento de *L. garvieae* en las muestra de aguas.

País	Referencia	Río	Provincia	PCR	ASL	
España	(E)	E2	Genazar	Granada	+	3
		E4	Genazar	Granada	-	0
		E7	Genazar	Granada	-	0
		E5	Frontil	Granada	+	3
		E3	Guadalviar	Teruel	+	2
		E6	Tormes	Salamanca	-	0
		BA06/02136	Cister	Segovia	-	0
		BA06/02265	Ribagorzana	Lérida	-	0
		BA06/02395	Borosa	Jaén	+	1
	BA06/02396	Borosa	Jaén	+	2	
	(S)	S1	Genazar	Granada	+	1
		S4	Genazar	Granada	+	2
		S2	Genazar	Granada	+	1
		S5	Frontil	Granada	+	1
		S3	Guadalviar	Teruel	+	1
		BA06/02397	Borosa	Jaén	+	2
	(R)	BA06/01771	Pirón	Segovia	+	0
		BA06/01772	Clamores	Segovia	-	0
		BA06/01773	Malucas	Segovia	+	1
		BA06/01774	Pozo Prado	Segovia	+	0
		BA06/02137	Duratón	Segovia	+	1
		BA06/02145	Moros	Segovia	+	1
		BA06/02146	Gudillos	Segovia	-	0
		BA06/02552	Riaza	Segovia	+	1
		BA06/02135	Guadarrama	Madrid	+	3
		BA06/02147	Jarama	Madrid	+	2
		BA06/02148	Alberche	Ávila	+	2
		BA06/002259	Gévalo	Toledo	+	2
		BA06/02414	Guadalquivir	Córdoba	+	2
		BA06/02553	Duero	Soria	+	2
		BA06/02554	Abión	Soria	+	2
	BA06/02555	Ucero	Soria	+	3	
	(B)	DP1	Depuradora	Madrid	+	4
		BA06/02260	Depuradora	Madrid	+	2
		BA06/02556	Depuradora	Madrid	+	0
	Francia	(R)	BA06/02132	Magescq	Landes	+
BA06/02133			Magescq	Landes	+	2
Portugal	(R)	BA06/02134	Tajo	Lisboa	+	1
Italia	(R)	BA06/02543	Ledra	Udine	+	0
		BA06/02544	Melma	Treviso	+	1
		BA06/02545	Piavedesella	Treviso	+	4
		BA06/02546	Meschio	Treviso	+	2
		BA06/02547	La Piave	Treviso	+	1
Polonia	(R)	BA06/02730	Tyna	Elblag	+	2
		BA06/02731	Marozka	Elblag	+	1
R.Checa	(R)	BA06/02792	DivokáOrlice	Liberec	-	0
		BA06/02794	TicháOrlice	Liberec	-	0
		BA06/02793	Morava	Plzen	-	0

(E): agua de entrada de piscifactoría. (S): agua de salida de piscifactoría. (R): curso natural de los ríos. (B): balsa de decantación de depuradora.

ASL: aislamiento (0 = aislamiento negativo; n = número de cepas aisladas)

Se aisló *L. garvieae* en todas las muestras positivas de aguas de piscifactoría (5 de entrada y 6 de salida). En el caso de las aguas del curso natural de los ríos, conseguimos aislar 12 de las 14 muestras (85,7%) de ríos españoles positivos (no siendo posible en las muestras del río Pirón y del Pozo Prado en la provincia de Segovia) y en 4 de los 5 (80%) ríos italianos (siendo la muestra del río Ledra en la provincia de Udine en la que no conseguimos aislar *L. garvieae*). En el resto de países, se aisló *L. garvieae* en todas las muestras positivas: los dos ríos de Polonia, los dos de Francia, así como en la muestra de Portugal (Tabla 43). Respecto a las aguas residuales, conseguimos el aislamiento en 2 de las 3 muestras (66%).

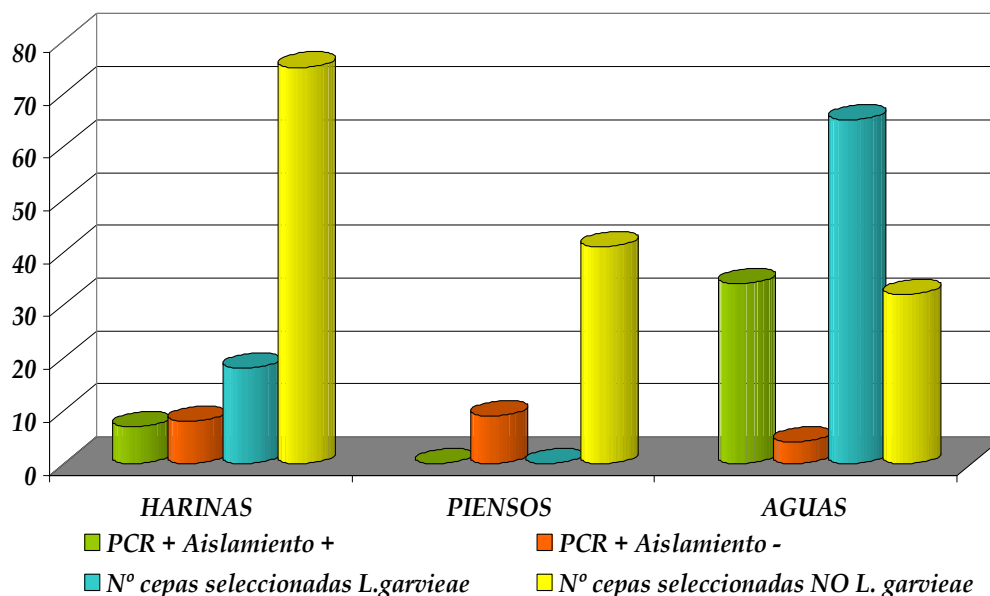
Tabla 44. Eficacia de aislamiento de *L. garvieae* sobre muestras positivas a la PCR.

TIPO MUESTRAS	Muestras Positivas	Muestras Aisladas	%	Colonias Seleccionadas	Media	Nº <i>L.garvieae</i>	%
Harinas Pescado	15	7	46,6%	93	6,2	18	19,3%
Piensos Compuestos	9	0	0%	41	4,5	0	0%
Aguas	38	34	89,5%	95	2,5	63	66,3%
TOTAL	62	41	66,1%	229	3,7	81	35,4%

Uno de los inconvenientes existentes tras el enriquecimiento de muestras altamente contaminadas, radica en el posterior aislamiento de determinadas especies bacterianas cuando no existen medios de aislamiento diferenciales y/o selectivos. Este tipo de medios, se han diseñado especialmente para el aislamiento de bacterias causantes de toxiinfecciones alimentarias e implicadas en Salud Pública como los son *Salmonella* spp., *L. monocytogenes* o *E. coli* (Kim y col., 2006). Sin embargo, hasta la fecha no se han descrito medios eficaces para el aislamiento de otras muchas especies bacterianas de interés veterinario como es el caso de *L. garvieae*.

El no disponer de una metodología de aislamiento selectiva y estandarizada, que principalmente permitiera discriminar *L. garvieae* de bacterias del género *Enterococcus*, unido al extraordinario polimorfismo presentado por los diferentes aislados de *L. garvieae* detectados en las muestras, nos limitó a la hora de aislar este patógeno en la totalidad de las muestras positivas a la PCR. El diseño de una metodología de aislamiento sensible y específica (Dot-Blot, marcaje de sondas...) para combinar con la PCR de muestras alimentarias y medioambientales, y que no requiera la selección manual y subjetiva de las colonias, será el objetivo prioritario de las próximas investigaciones. Tal y como hemos comentado en el capítulo 4.2.2, las muestras positivas sin aislamiento de *L. garvieae*, también podrían hacernos sospechar de una baja especificidad de la PCR múltiple realizada sobre el medio MES-CNA enriquecido con las muestras analizadas. Sin embargo, como comentaremos a continuación (capítulo 4.4.1.5.), la eficacia y la especificidad comprobada de esta técnica en nuestro laboratorio a lo largo de los años (Mata y col., 2004a, c), unido a los problemas comentados sobre la elevada presencia de *Enterococcus* y la falta de un medio de aislamiento específico, permitan descartar esta posibilidad.

Figura 36. Comparación en la eficacia de selección e identificación de *L. garvieae* en harinas de pescado, piensos y aguas.



Por otra parte, es necesario considerar que la obtención de resultados positivos a través de la amplificación de ADN no aporta información acerca de la viabilidad de las bacterias en la muestra (Paul y col., 1991). En nuestro caso, realizamos un proceso de enriquecimiento selectivo previo a la PCR, sin embargo, no podemos asegurar que el ADN detectado en las muestras positivas proceda de bacterias vivas. Lo que si pudimos comprobar fue la supervivencia y viabilidad de *L. garvieae* en el medio MES-CNA enriquecido durante 48 horas y almacenado a -20°C, habiendo sido posible su aislamiento (incluso con mayor eficacia) en medios congelados durante 2 y 3 años. Estas mismas muestras, también mostraron amplificaciones positivas tras la PCR (capítulo 4.3.). Por ello es estimable que las muestras positivas a la PCR tras la aplicación de nuestra metodología, contengan realmente bacterias vivas y/o viables.

Tal y como se aprecia en la Tabla 44 y Figura 36, la eficacia de aislamiento de *L. garvieae* en muestras positivas a la PCR fue baja en harinas de pescado (46,6%) y nula en piensos compuestos (0%), existiendo significación estadística entre ambos muestreos ($p = 0,049$). Se necesitaron analizar 93 colonias de 15 muestras de harinas para obtener un total de 18 aislados (19,3%), cifras casi cuatro veces menores que las obtenidas en las aguas (63) en el mismo número de intentos, siendo también una diferencia claramente significativa ($p = 2,1 \times 10^{-10}$).

Las siembras de los medios enriquecidos procedentes de harinas y piensos, presentaban colonias con gran variabilidad morfológica, pertenecientes la gran mayoría al género *Enterococcus* spp y resultando por tanto muy complicado seleccionar las colonias de *L. garvieae*. El número de colonias seleccionadas, variaba por muestra y dependía de la contaminación inicial del cultivo. Obviamente, no todas las muestras presentaban las mismas características, y esto ocasionó que en algunos casos consiguiéramos aislar hasta 5 colonias de *L. garvieae* dentro de la misma muestra (HP102) y en otras no fuera posible el aislamiento positivo tras 8 o 10 selecciones.

Todas aquellas colonias de morfología compatible con *L. garvieae*, que resultaron negativas a la PCR confirmatoria, posteriormente fueron identificadas bioquímicamente mediante el sistema comercial API Rapid ID 32 Strep (bioMérieux España, S.A.). En el caso de las muestras de harinas y piensos, identificamos un total de 37 y 14 bacterias respectivamente. Todos estos microorganismos fueron identificados como bacterias del género *Enterococcus*, predominando por encima de todos *E. faecalis* con un 65% y 85,7% del total de las determinaciones realizadas en harinas de pescado y piensos compuestos respectivamente. El resto, de bacterias identificadas fueron minoritarias, siendo por orden de detección *E. faecium*, *E. durans* y *E. hirae*.

Por otra parte, la eficacia obtenida en el aislamiento de las muestras de aguas fue mucho mayor, llegándose a aislar *L. garvieae* en el 89,5% de las muestras positivas a la PCR (Tabla 44), diferencia significativa con los resultados en harinas de pescado ($p = 0,003$). El crecimiento de colonias en Columbia CNA a partir de estas muestras, fue mucho más uniforme presentando en algunas ocasiones cultivos puros de *L. garvieae*. Esto facilitó la selección de esta bacteria en placa y ocasionó que el número de colonias seleccionadas fuera mucho menor, si las comparamos con las muestras de harinas. En esta ocasión nos bastó con seleccionar una media de 2,5 colonias por muestra, por las 6,5 en las muestras de harinas (Tabla 44). No obstante, también obtuvimos casos con 3 y 4 aislados de *L. garvieae* en la misma muestra (Tabla 43).

La eficacia en el aislamiento de *L. garvieae* depende directamente del nivel inicial de micropoblaciones competitivas presentes en las muestras. Las diferencias encontradas en el aislamiento de las muestras de aguas con las harinas de pescado y piensos compuestos podrían ser debidas a la menor contaminación inicial de las primeras que facilitaría su selección y discriminación frente a las bacterias contaminantes. Además, resulta necesario indicar que tres de las cuatro muestras donde no se consiguió el aislamiento, procedían de aguas muy sucias y contaminadas (una de

depuradora y de los ríos Guadalquivir y Pirón después de vertidos residuales). Por esta razón, el crecimiento bacteriano tras la siembra en Columbia CNA, fue mucho más heterogéneo, resultando francamente difícil discernir morfologías compatibles con *L. garvieae* (al igual que ocurría en las harinas y piensos). En estos casos, tuvimos que seleccionar un mayor número de colonias (6-8), sin que resultara útil a la hora de aislar *L. garvieae*.

Por otra parte, en el muestreo de aguas, gracias a la mayor eficacia en el aislamiento, el número de identificaciones bioquímicas sobre colonias sospechosas y PCR negativas fue menor (16 identificaciones). Sin embargo, al igual que ocurría con las muestras de harinas y piensos, *E. faecalis* volvió a prevalecer sobre el resto de colonias seleccionadas, con un 93,8%. Con estos resultados, comprobamos la gran similitud morfológica existente entre estas dos especies bacterianas, siendo prácticamente indistinguibles cuando forman parte de la misma muestra y por tanto la gran dificultad de identificar colonias de *L. garvieae* cuando aparece en cultivo mixto con *E. faecalis*.

Todos estos resultados confirman la necesidad de desarrollar un medio de aislamiento diferencial que ayude a al menos a discriminar entre *L. garvieae* y *E. faecalis*. Tras estudiar los resultados de la identificación bioquímica, podríamos sugerir que el medio diferencial para facilitar el reconocimiento y aislamiento de colonias de *L. garvieae* en este tipo de muestras, podría estar basado en la utilización de la enzima Alanil-Fenilalanil-Prolina Arilamidasa (APPA). Ello es debido a que todos los aislados de *E. faecalis*, utilizan esta enzima, no siendo así en el 99% de los casos de *L. garvieae* (bioMerieux España, S.A.). Otras pruebas diferenciales, aunque menos específicas, serían la acidificación de la ribosa, el sorbitol y la melibiosa.

4.4.1.3.DETERMINACIÓN DE LA VALIDEZ Y SEGURIDAD DE LA METODOLOGÍA DE AISLAMIENTO.

Una vez determinado el límite de detección de la metodología de enriquecimiento selectivo y PCR múltiple, así como su reproducibilidad en las diferentes repeticiones realizadas sobre harinas de pescado (capítulos 4.2.2 y 4.2.3.), nos restaba conocer los parámetros de validez (sensibilidad y especificidad) y seguridad (valores predictivos), de la metodología de aislamiento, necesarios para evaluar la eficacia de cualquier prueba diagnóstica (Fletcher y col., 1996).

Tal y como detallan Mata y col. (2004a) en la descripción de la PCR múltiple que hemos utilizado, esta técnica resulta muy específica para la detección de *L. garvieae*, *S. parauberis* y *S. iniae*, no solo en determinaciones a partir de cultivos bacterianos puros, sino también a partir de diferentes órganos de peces artificial y naturalmente infectados. Esto unido a los resultados obtenidos tras el enriquecimiento selectivo y PCR a partir muestras artificialmente contaminadas (capítulos 4.2.2. y 4.2.3.), con niveles de detección entre 1 y 2 UFC/25 gramos de muestra, nos permite validar la metodología diseñada como la técnica de referencia o “gold standard”, (estimando un 100% de especificidad y sensibilidad). A este respecto, podemos sugerir que el umbral de detección en piensos compuestos y aguas podría ser al menos igual que el observado en las harinas de pescado (1 UFC/25g), puesto que la contaminación inicial de estas últimas con micropoblaciones competitivas se estima mayor que en los piensos y aguas.

Por todo ello y asumiendo que la metodología utilizada para el aislamiento de *L. garvieae* presenta graves deficiencias (capítulo 4.4.1.2), hemos optado por considerar que las muestras PCR negativas tras el enriquecimiento, deberían considerarse realmente negativas, sin proceder a su comprobación mediante siembras en medios de cultivo sólido y a la espera de poder mejorar la metodología de aislamiento utilizada.

Respecto a los resultados PCR positivos, vamos a estimar la validez (sensibilidad y especificidad) y seguridad (valores predictivos positivos y negativos) de la metodología de aislamiento comparando los resultados obtenidos en la PCR múltiple (“gold standard”) con el aislamiento en placa de *L. garvieae* a partir de los caldos incubados y positivos a la PCR para cada uno de los muestreos realizados (capítulo 4.3. y Tablas 45, 46 y 47).

✚ Harinas de Pescado.

Se procesaron un total de 83 muestras, resultando 68 harinas negativas y 15 positivas a *L. garvieae* tras la PCR múltiple, consiguiéndose aislar este microorganismos en un total de 7 muestras y no siendo posible en el resto (8).

Tabla 45. Relación de resultados entre la detección de *L. garvieae* por PCR y su aislamiento en medio sólido a partir de harinas de pescado.

Aislamiento	PCR		Total
	+	-	
+	7	0	7
-	8	68	76
Total	15	68	83

- **Sensibilidad (S)** = $7 / 15 = 46,6\%$

- **Especificidad (E)** = $68 / 68 = 100\%$

- **Valor Predictivo Positivo (VPP)** = $7 / 7 = 100\%$

- **Valor Predictivo Negativo (VPN)** = $68 / 76 = 89,5\%$

✚ Piensos Compuestos.

El total de piensos procesados fue de 56, con 47 determinaciones negativas y 9 positivas a *L. garvieae* sin que en ninguna de ellas se lograra el aislamiento bacteriano en placa.

Tabla 46. Relación de resultados entre la detección de *L. garvieae* por PCR y su aislamiento en medio sólido a partir de piensos compuestos.

Aislamiento	PCR		Total
	+	-	
+	0	0	0
-	9	47	56
Total	9	47	56

- Sensibilidad (S) = $0 / 9 = 0\%$

- Especificidad (E) = $47 / 47 = 100\%$

- Valor Predictivo Positivo (VPP) = $0 / 0 = 0\%$

- Valor Predictivo Negativo (VPN) = $47 / 56 = 83,9\%$

 Aguas.

Se procesaron 48 muestras de aguas sin obtener amplificación en 10 de ellas. El resto (38) resultaron positivas tras la PCR, aislándose *L. garvieae* en 34, no siendo posible en el resto (4).

Tabla 47. Relación de resultados entre la detección de *L. garvieae* por PCR y su aislamiento en medio sólido a partir de muestras de agua.

Aislamiento	PCR		Total
	+	-	
+	34	0	34
-	4	10	14
Total	38	10	48

- Sensibilidad (S) = $34 / 38 = 89,5\%$

- Especificidad (E) = $10 / 10 = 100\%$

- Valor Predictivo Positivo (VPP) = $34 / 34 = 100\%$

- Valor Predictivo Negativo (VPN) = $10 / 14 = 71,4\%$

La validez de una prueba diagnóstica viene determinada por los valores de especificidad y sensibilidad, puesto que determinan la

probabilidad de obtener un resultado verdadero (Morrison, 1992). Tal y como se aprecia en los resultados obtenidos, el hecho de haber considerado la PCR como la técnica de referencia en la que asumimos que cualquier resultado negativo a la PCR realmente lo es, permite obtener valores de especificidad del 100% en los tres tipos de muestreo.

Sin embargo, los resultados de sensibilidad son más variables, puesto que obtuvimos resultados diferentes a la hora de intentar aislar *L. garvieae* a partir de las muestras positivas (capítulo 4.4.1.2). La sensibilidad de una prueba diagnóstica se define como la probabilidad de detectar correctamente una muestra positiva. Tal y como hemos comentado en el capítulo anterior, las diferencias encontradas entre las muestras de aguas ($S = 89,5\%$) con respecto a las harinas de pescado ($S = 46,6\%$) y piensos ($S = 0\%$), pudieran deberse a la mayor contaminación inicial de estas últimas por micropoblaciones competitivas, que dificultaron en gran medida el aislamiento de *L. garvieae* (capítulo 4.4.1.2), hasta el punto de no ser capaces de aislar este microorganismo a partir de ninguna de las 9 muestras de piensos compuestos positivos a la PCR. Una vez más, la falta de un medio de aislamiento específico y diferencial que nos permitiera diferenciar *L. garvieae* del resto de especies bacterianas presentes en la muestras (especialmente del género *Enterococcus*), ocasiona que los resultados obtenidos no deban considerarse de forma estricta para el cálculo de la sensibilidad de metodología y que por tanto estemos hablando de una "sensibilidad aparente". No obstante, en el caso de las muestras de aguas, gracias a su menor contaminación inicial, obtuvimos una sensibilidad muy elevada (89,5%), demostrando la gran validez de la metodología diseñada.

Finalmente, la seguridad de una prueba diagnóstica viene determinada por el valor predictivo de un resultado positivo o negativo (Morrison, 1992). Así el valor predictivo positivo, se define como la probabilidad de tener una muestra positiva si se obtiene un resultado positivo. En esta ocasión, gracias a la especificidad del 100% asumida en la PCR utilizada, obtuvimos un valor predictivo positivo del 100% en los

muestreos de harinas de pescado y aguas, lo cual significa que en la placa de cultivo realmente está el microorganismo que hemos enriquecido. No fue así en el caso de los piensos compuestos (VPP = 0%) por la ausencia total de aislamientos en muestras positivas anteriormente comentados.

De la misma manera, el valor predictivo negativo es la probabilidad de que una muestra negativa a la prueba diagnóstica, sea realmente negativa. En esta ocasión, los valores fueron también muy elevados, demostrando la seguridad de la técnica utilizada. Tan solo en las muestras de aguas obtuvimos un valor por debajo del 80%, principalmente motivado por el escaso número de muestras negativas en un muestreo reducido (capítulo 4.4.1.2).

Por lo tanto, podemos concluir, que el límite de detección, la reproducibilidad comprobada y la eficacia de la PCR Múltiple utilizada (Mata y col., 2004a) nos permiten validar la metodología de detección descrita (capítulo 4.1.) y proponerla para el control microbiológico de muestras alimentarias y ambientales, especialmente en el caso de *L. garvieae* y *S. parauberis*, a la espera de optimizar la sensibilidad de la metodología de aislamiento en el caso de ser requerido para pruebas bacterianas adicionales o complementarias

4.4.2. AISLAMIENTO DE *Lactococcus garvieae* A PARTIR DE DIFERENTES ESPECIES ANIMALES Y HUMANOS.

Tal y como se detalla en la tabla 25 del capítulo 3.3.2.4 de Material y Métodos, se recopilaron un total de 179 cepas procedentes de trucha arco iris, anguilas, ganado vacuno, ganado porcino, urracas, herrerillo y humanos. Todas ellas fueron aisladas en Columbia Agar Sangre (BioMérieux España, S.A.).

4.4.3. IDENTIFICACIÓN POR PCR.

Todas las cepas de *L. garvieae* aisladas, fueron debidamente identificadas mediante la PCR específica amplificando un único fragmento de 1.100 pb definido para *L. garvieae* (Zlotkin y col, 1998a). En la Figura 37, se muestra un ejemplo de un gel de PCR con muestras de aislados de ganado porcino tras la amplificación molecular que fueron procesadas durante el presente estudio

La aplicación del hervido bacteriano como alternativa al protocolo largo de extracción de ADN de Casas y col. (1995), resultó de gran utilidad en la fase final del estudio, por su mayor sencillez y rapidez. Tan solo encontramos 3 colonias de *L. garvieae* (1,3%), cuya extracción mediante hervido no produjo amplificación, siendo confirmadas gracias a la aplicación del protocolo de Casas.

Figura 37. Identificación por PCR de cepas aisladas en ganado porcino.

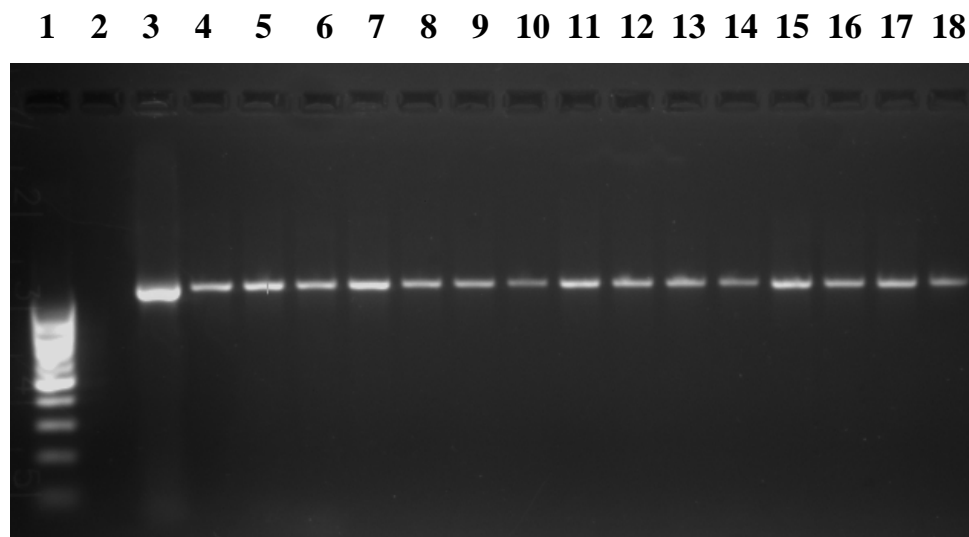


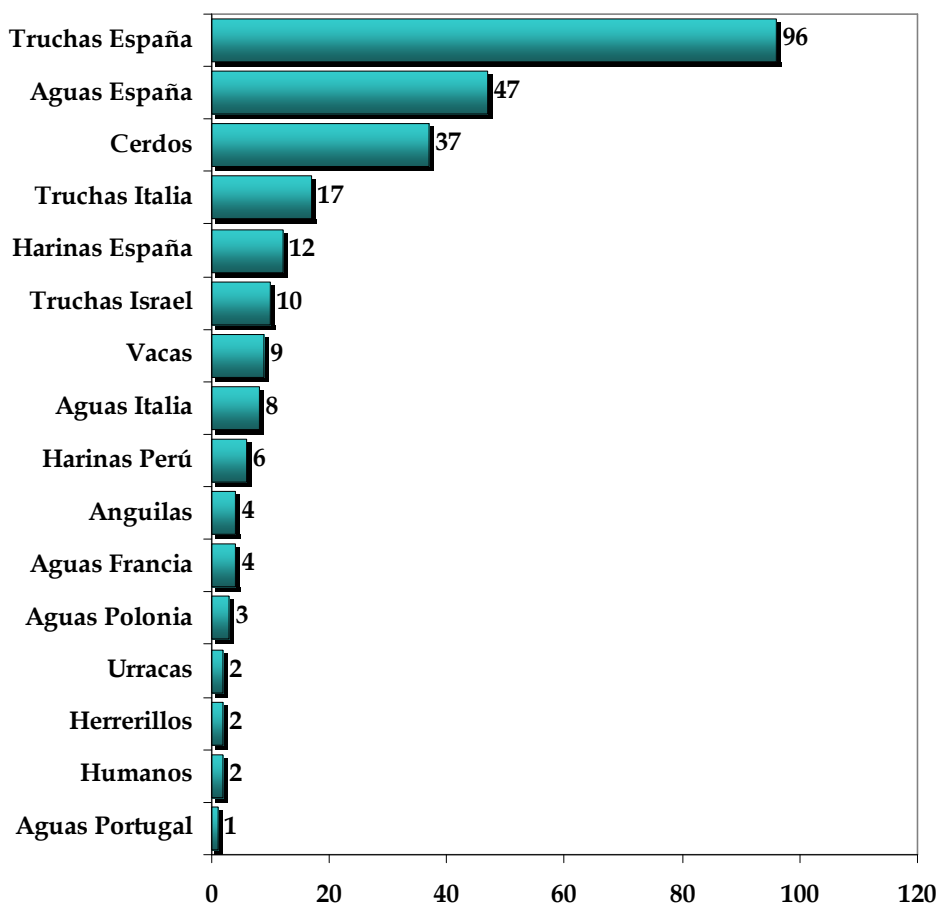
Figura 37. Gel de PCR. Línea 1: marcador de peso molecular 1000pb; línea 2: control negativo; línea 3: control + *Lactococcus garvieae* (5664/01); línea 4: 396/02b; línea 5: 416/03; línea 6: 1481/03; línea 7: 527/03a; línea 8: 1073/03; línea 9: 1067/03; línea 10: 1072/03; línea 11: 2668/03; línea 12: 2682/03 ; línea 13: 1971/03; línea 14: 2497/03; línea 15: 2487/03; línea 16: 2517/03; línea 17: 2525/03; línea 18: 2610/03.

4.5. CARACTERIZACIÓN DE *Lactococcus garvieae* AISLADO A PARTIR DE DIFERENTES ESPECIES ANIMALES, HARINAS DE PESCADO Y AGUAS.

4.5.1. RECOPIACIÓN DE CEPAS.

En este apartado, fueron caracterizadas bioquímica y molecularmente un total de 260 cepas de *L. garvieae*, repartidas según la distribución mostrada en la Figura 38 y en las Tablas 22, 23 y 25 del capítulo 3.3 de Material y Métodos.

Figura 38. Distribución de las cepas de *L. garvieae* según su procedencia.



4.5.2. CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA.

Todas las cepas fueron caracterizadas bioquímicamente utilizando el sistema comercial de tiras multisustrato Rapid ID 32 Strep (bioMérieux España, S.A.). Este mismo sistema identificó el 100% de los aislados como *L. garvieae*, demostrando ser un método fiable para la identificación de esta bacteria.

Obtuvimos una gran diversidad fenotípica entre los aislados caracterizados, como lo demuestra el hecho de haber encontrado 44 perfiles bioquímicos diferentes, siendo la acidificación de la ribosa, manitol, sacarosa, metil- β -glucopiranosida, tagatosa y ciclodextrina y la presencia de la enzima piroglutámico arilaminidasa (*Pyra*) las que presentaron en mayor o menor medida resultados variables. Estos resultados permitieron encontrar diferencias en función del origen de las cepas que detallaremos a continuación.

Así, el conjunto de aislados de *L. garvieae* a partir de truchas españolas con lactococosis formaron un grupo independiente, bastante homogéneo, el cual fue perfectamente diferenciable del formado por las cepas italianas e israelitas. Esto fue así, principalmente debido la acidificación de la sacarosa, tagatosa y la utilización de la enzima *Pyra*, pruebas que fueron positivas en todas las cepas españolas y negativas en el 95% y 100% de las procedentes de Italia e Israel respectivamente. Estos resultados nos permiten sugerir el uso de algunos de estos azúcares o enzimas como marcadores epidemiológicos de especie u origen geográfico (Vela y col., 2000; Tejedor y col, 2004).

El grupo de cepas de ganado porcino, presentó mayor variabilidad bioquímica en todas las pruebas analizadas, lo cual nos impidió observar diferencias respecto al conjunto de aislados de truchas. Tan solo podríamos sugerir la acidificación de la ciclodextrina (13,5% positivos), para

diferenciar estos aislados de las cepas de truchas españolas e israelitas (100% positivos) e incluso italianas (76,4% positivos).

El hecho de no haber reunido un mayor número de cepas en el resto de especies animales (vacas, anguilas, aves silvestres y humanos) dificulta la valoración de los resultados bioquímicos obtenidos. Los patrones observados tras su análisis, presentan una gran diversidad y no parecen ser los suficientemente estables como para poder establecer biotipos diferentes que pudieran ser utilizados como marcadores epidemiológicos.

Por otra parte, el grupo de aislados de harinas de pescado y muestras de aguas (31,2% del total de los aislados), tampoco mostró uniformidad bioquímica. Si bien podemos agrupar su variabilidad en las pruebas mencionadas anteriormente, no siguieron sin embargo algún tipo de distribución estable, como demuestra el haber obtenido un total de 35 perfiles bioquímicos diferentes en las 81 cepas aisladas. Tan solo en la acidificación de la ciclodextrina (80% negativos) y tagatosa (72% positivos), se obtuvieron valores mayoritarios aunque sin poder asignarles ningún valor epidemiológico.

4.5.3. CARACTERIZACIÓN MOLECULAR: ELECTROFORESIS DE CAMPO PULSADO (PFGE).

La finalidad de la técnica de PFGE es permitir la comparación de los distintos aislados y la determinación de su relación genética. El dendrograma se realizó a partir de los perfiles genéticos obtenidos con la enzima *BspI*, que es la que permitía una mayor discriminación frente a *SmaI*, utilizada en trabajos similares con *L. garvieae* (Domínguez y col., 2000; Vela y col., 2000). Los perfiles de restricción de los diferentes aislados tras la digestión con *BspI* produjeron entre 11 y 18 bandas con un tamaño aproximado de entre 20 y 500 kilobases (Kb) (Figura 39).

Las 260 cepas de *L. garvieae* se agruparon en un total de 86 patrones de restricción (pulsotipos), reflejando una diversidad genética del 0,33 (Tabla 48). Este dato resulta sesgado y la diversidad genética podría haber sido mucho mayor si fuera por la amplia representación de aislados de truchas españolas (n = 96), ya que como veremos a continuación, 95 de ellos (36,5% del total), se agruparon en un único pulsotipo. Las cepas aisladas a partir del resto de especies animales, harinas de pescado y aguas, mostraron una diversidad genética mucho mayor tal y como se puede observar en la tabla 48. Así, el 70,9% de los pulsotipos (61), incluían un único aislado bacteriano, demostrando la gran variabilidad genética de esta especie bacteriana tal y como ha sido señalado previamente (Vela y col., 2000). El resto de perfiles (n = 25), agruparon al menos dos cepas de *L. garvieae* diferentes, y con la excepción del pulsotipo nº 6 (Figura 40), todas las cepas que compartían pulsotipo fueron aisladas del mismo grupo de especies animales, o a partir de la misma muestra de agua o harina de pescado.

En términos generales, y desde el punto de vista epidemiológico, las cepas de trucha arco iris españolas y las cepas de Italia e Israel formaron dos grupos perfectamente diferenciables. Tal y como acabamos de comentar, los 96 aislados españoles se agruparon en dos pulsotipos con una diversidad genética de 0,02, siendo el nº6 el mayoritario con 95 aislados (Figura 40). La cepa epidémica causante de la lactococosis en España ha permanecido invariable desde 1994 (Vela y col., 2000) y los resultados obtenidos en este estudio corroboran dicha información, ya que el pulsotipo nº6 que agrupó los 95 aislados antes comentados (99% del total), es genéticamente indistinguible al descrito por Vela y col. (2000). Tan solo una cepa aislada en la provincia de Valencia en el año 2002 (8053/02), mostró un perfil genético diferente, considerándose un caso aislado y agrupándose ella sola en el pulsotipo nº 75, (completamente distinto al nº 6 de la cepa epidémica con un porcentaje de similaridad del 65%). Junto a la cepa epidémica española de trucha arco iris (pulsotipo 6), también se agrupó una cepa de trucha italiana, 2 aislados de una harina de pescado de

origen español (HP102), 3 aislados de ganado porcino de 3 explotaciones diferentes y un total de 6 aislados a partir de 5 muestras de agua de entrada (E3, E2) y salida de piscifactorías (S3, S4 y S5). En este último caso, los muestreos sobre el río Guadalquivir antes y después de la explotación piscícola (E3 y S3) se realizaron al mismo tiempo, no siendo así en las otras tres muestras de aguas (río Genazar, E2 y S4, y río Frontil S5, Tabla 43).

Por otra parte, 16 de las 17 cepas de truchas italianas (94,1%) mostraron perfiles genéticos parecidos al distribuirse en 5 patrones de restricción (52, 53, 54, 55 y 56) estrechamente relacionados entre sí, con porcentajes de similitud entre el 88 y 95% independientemente de su ubicación geográfica. Tan solo una cepa, que como hemos visto anteriormente se agrupó en el pulsotipo nº 6 con las cepas de truchas españolas, se alejó de estos perfiles con un porcentaje de similitud del 65%. La diversidad genética en este grupo, fue de 0,35. Además las 10 cepas de *L. garoieae* aisladas de truchas en Israel, compartieron el pulsotipo nº 54 con otros 7 aislados italianos, con una diversidad genética de 0,1.

A diferencia de la escasa variabilidad observada en las cepas de truchas españolas (0,02), el amplio grupo de aislados de ganado porcino en España mostró mayor variabilidad, con una diversidad genética de 0,38. Los 37 aislados recopilados se agruparon en un total de 14 patrones de restricción diferentes. Seis de ellos (pulsotipos 57, 58, 59, 60, 62 y 63), mostraron una estrecha relación genética, agrupando un total de 24 aislados (64,9%) y mostrando un porcentaje de similitud mínimo entre ellos del 84%. Dentro de este grupo, el pulsotipo nº 57 fue el más frecuente, agrupando un total de 16 cepas (43,2%), aisladas en 7 explotaciones diferentes durante los años 2002 y 2003 y distribuidas por 4 provincias españolas. Además en los pulsotipos 62, 37 y 48, se agruparon 4, 3 y 2 cepas respectivamente, tratándose en los dos últimos casos de aislados de animales en la misma granja. El resto de aislados se agruparon de forma individual excepto las tres cepas que comparten las mismas características

genéticas que la cepa epidémica de truchas españolas comentadas anteriormente (pulsotipo 6).

El resto de cepas pertenecientes a especies animales y el hombre, mostraron de nuevo una gran variabilidad genética. Las cepas de ganado vacuno se agruparon en 5 pulsotipos diferentes, tan solo encontrando cierta similitud entre los grupos 74, 76 y 77, que agruparon 7 de las 9 cepas totales con un porcentaje de similaridad del 88%. Dos de las 4 cepas de anguilas aisladas en la misma explotación, mostraron el mismo perfil genético (pulsotipo 83). El resto de cepas de anguilas, aves silvestres (urracas y herrerillos) y humanos, conformaron pulsotipos con un único aislado (diversidad genética = 1) y sin relaciones genéticas con cualquiera de los otros aislados incluidos en el estudio.

Las 18 cepas aisladas en las 7 muestras de harinas de pescado (Tabla 42), fueron caracterizadas en 10 patrones de restricción independientes, sin existir una relación genética entre muestras de harinas diferentes y con una diversidad genética de 0,55. Los pulsotipos 22, 31, 68, 71 y 73, agruparon todas las cepas aisladas en las harinas con referencia BA06/01681 (1 cepa), HP84 (4 cepas), HP60 (1 cepa), HP61 (3 cepas) y HP85 (1 cepa) respectivamente (Figura 40). Sin embargo, las 3 cepas aisladas en la harina de origen español con referencia BA06/00720, mostraron 3 patrones de restricción diferentes (14, 28, y 50) sin relación genética entre ellos. Además, tal y como hemos comentado anteriormente, 2 de las 5 cepas aisladas en la harina de pescado española con referencia HP102, mostraron idénticos patrones de restricción que el grupo de cepas epidémicas de truchas españolas (nº 6). Las otras 3 cepas aisladas en esta misma muestra (Tabla 42), fueron caracterizadas en un mismo pulsotipo (nº 4), tan solo diferenciado en dos fragmentos de restricción adicionales. Esto les confería un porcentaje de similaridad del 86% con el resto de aislados de la misma muestra que unido a que todas ellas presentaron el mismo perfil bioquímico, nos permite considerarla a este perfil como variante o subtipo del pulsotipo 6.

Finalmente, las 63 cepas aisladas en las 34 muestras de aguas (Tabla 43), mostraron una extraordinaria variabilidad distribuyéndose a lo largo de todo el dendrograma en un total de 44 patrones de restricción diferentes y correspondiéndose con una diversidad genética de 0,69. A excepción de las cepas de aguas incluidas en el pulsotipo nº 6 (junto a aislados de otros orígenes), no encontramos relaciones genéticas con los otros tipos de aislados, estando formados el resto de pulsotipos por cepas aisladas a partir de una misma muestra de agua. Por tanto, no encontramos coincidencias genéticas entre muestras de aguas diferentes ni agrupaciones según la procedencia geográfica, incluso en aislados obtenidos en el mismo lugar pero en muestreos separados en el tiempo. Durante el aislamiento de *L. garvieae* en las 34 muestras de aguas, conseguimos aislar más de una cepa en un total de 20 muestras (58,8%, Tabla 43). Los aislados de 11 de ellas (55%), se distribuyeron en pulsotipos diferentes, como ocurre por ejemplo en la cepa de agua de depuradora, DP1, con 4 aislados bacterianos en 4 perfiles genéticamente diferentes (25, 33, 38 y 70).

Tabla 48. Distribución de cepas, pulsotipos y diversidad genética.

ORIGEN	CEPAS	%	PULSOTIPOS	%	D. G.
Truchas España	96	36,9%	2	2,3%	0,02
Aguas	63	24,2%	44	51,2%	0,69
Cerdos	37	14,2%	14	16,2%	0,38
Harinas Pescado	18	6,9%	10	11,6%	0,55
Truchas Italia	17	6,5%	6	7%	0,35
Truchas Israel	10	3,8%	1	1,1%	0,1
Vacas	9	3,4%	5	5,8%	0,55
Anguilas	4	1,5%	3	3,5%	0,75
Humanos	2	0,77%	2	2,3%	1
Urracas	2	0,77%	2	2,3%	1
Herrerillos	2	0,77%	2	2,3%	1
TOTAL	260		86		0,33

D.G. : diversidad genética (nº pulsotipos / nº cepas).

En la Figura 39 se muestra un ejemplo de un gel de PFGE donde se puede apreciar la igualdad y homogeneidad en los patrones obtenidos en las cepas aisladas a partir de truchas españolas y la disparidad encontrada con otros aislados. En este caso, dichos aislados se comparan con otros

procedentes de ganado vacuno con mastitis, así como muestras de harinas de pescado que comparten el mismo perfil genético que la cepa epidémica de truchas españolas (línea 10) y harinas de pescado con patrones diferentes a ella.

Figura 39. Gel de caracterización molecular por PFGE de diferentes aislados de *L. garvieae*.

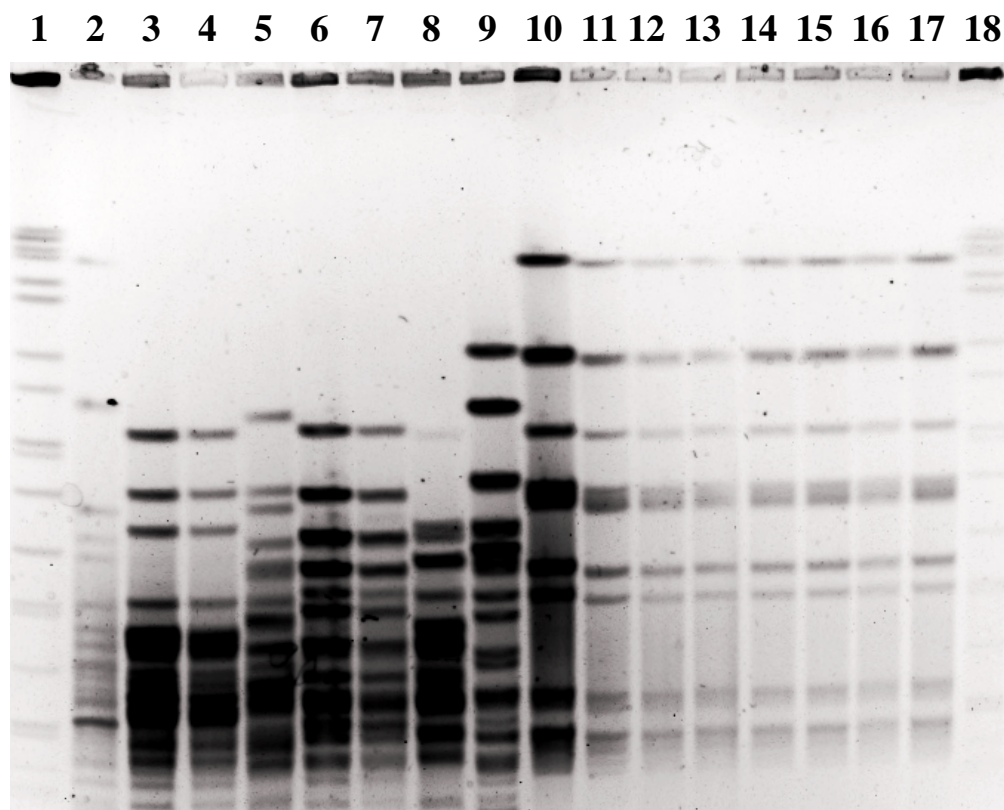
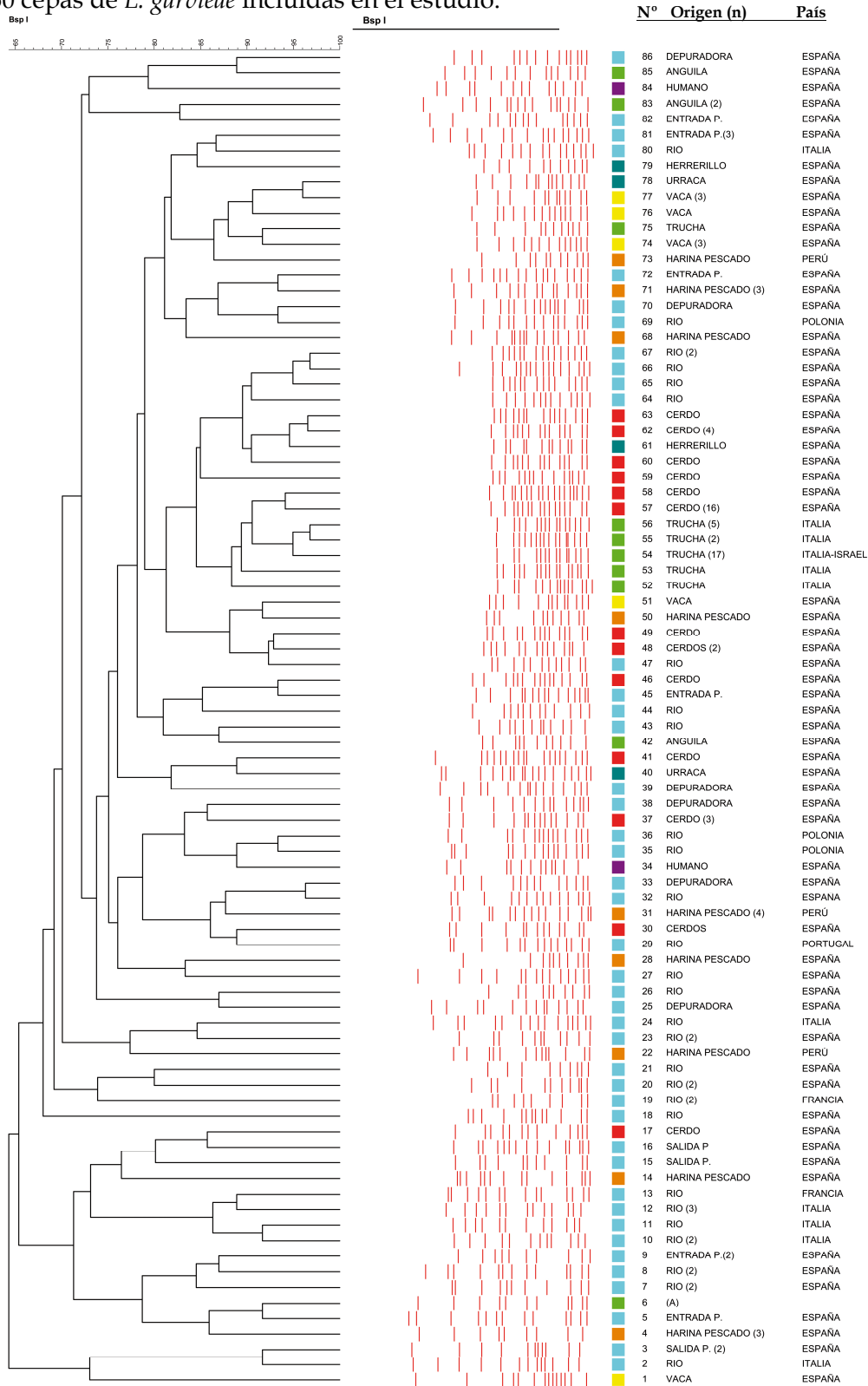


Figura 39. Gel de PFGE. Línea 1: Marcador molecular - Control (*Salmonella braenderup* H9812); línea 2: G-14 (vaca); línea 3: G-41 (vaca); línea 4: G-42 (vaca); línea 5: G-44 (vaca); línea 6: G-45 (vaca); línea 7: G-46 (vaca); ; línea 8: HP60 (harina de pescado); línea 9: HP61 (harina de pescado); línea 10: HP102 (harina de pescado); línea 11: 8709/04 (trucha de España); línea 12: 8710 (trucha de España); línea 13: 8731/04 (trucha de España); línea 14: 8831/04 (trucha de España); línea 15: 8864/04 (Trucha de España); línea 16: 8878/04 (trucha de España); línea 17: 8886/04 (trucha de España); línea 18: Marcador molecular - Control (*Salmonella braenderup* H9812).

Figura 40. Dendrograma mostrando la relación genética por PFGE entre las 260 cepas de *L. garvieae* incluidas en el estudio.



■ Peces ■ Cerdos ■ Vacas ■ Aves ■ Humanos ■ Harinas de Pescado ■ Aguas

(Nº): número de pulsotipo. (n): pulsotipos con más de 1 aislado. (A): 95 cepas de truchas españolas, 1 cepa de trucha italiana, 3 cepas de ganado porcino, 2 cepas de una harina de pescado española y 6 cepas de entrada y salida del agua de 3 piscifactorías españolas.

La gran variabilidad existente en las bacterias ácido lácticas, dificulta en ocasiones una correcta identificación por técnicas bioquímicas, siendo necesario en la gran mayoría de los casos, recurrir a la identificación molecular (Zlotkin y col., 1998a; Eldar y col., 1999; Aoki y col., 2000; Ravelo y col., 2003). Estas circunstancias resultan especialmente importantes en las especies bacterianas ácido lácticas asociadas a enfermedades piscícolas y ambientes acuáticos como *L. garvieae* (Michel y col., 2007).

Los resultados obtenidos en la caracterización bioquímica y molecular de *L. garvieae*, indican una gran heterogeneidad fenotípica y variabilidad genética de esta especie bacteriana, hecho señalado previamente por otros autores (Vela y col., 2000; Kawanishi y col., 2006). Además esta bacteria ha sido aislada previamente en un amplio rango de especies piscícolas y animales homeotermos (Tejedor y col., 2004; Vendrell y col., 2006), que junto con las cepas aisladas en harinas y aguas recogidas en este estudio, demuestra la gran ubicuidad y distribución ambiental de este microorganismo, siendo capaz de adaptarse a diferentes condiciones, sustratos y ambientes. Si bien se ha demostrado su capacidad patógena para las truchas arco iris (Prieta y col., 1993) y el ganado vacuno (Devriese y col., 1999), su implicación en procesos clínicos en ganado porcino no ha podido ser aclarado y los aislamientos en anguilas y aves silvestres deben considerarse esporádicos, actuando estos animales como reservorios de esta bacteria.

Los resultados obtenidos en la caracterización de cepas de *L. garvieae* aisladas en truchas arco iris, concuerdan con los ya descritos anteriormente por otros autores (Vela y col., 2000). En términos generales, existió una gran correlación entre los resultados de caracterización molecular y los obtenidos mediante caracterización bioquímica. En el caso de las cepas aisladas a partir de truchas españolas, sigue prevaleciendo un único clon que ha permanecido invariable desde 1994 (Vela y col., 2000). Como ya hemos comentado anteriormente, en el presente estudio, dicho clon agrupó al 99% de estas cepas en el pulsotipo 6 (junto a 1 cepa de

trucha italiana, 3 aislados de cerdos, 2 de harinas de pescado y 6 de aguas de entrada y salida de piscifactorías), y todas ellas mostraron a su vez resultados positivos en la acidificación de la sacarosa, tagatosa, ciclodextrina y la utilización de la enzima *Pyra* independientemente de su origen. Por su parte, la única cepa de truchas españolas no encuadrada en el pulsotipo 6 (8053/02), no acidificó la sacarosa y quedó encuadrada en el pulsotipo 75 (el origen de esta cepa podría ser la colonización desde el medioambiente, especialmente desde el agua del río, ya que el resto de truchas procesadas en el mismo lote de la misma piscifactoría sí estaban infectadas por la cepa epidémica). De la misma manera ocurrió con el resto de cepas de truchas italianas, o todas las israelitas, que no utilizaron la sacarosa, la tagatosa ni la enzima *Pyra* y fueron agrupadas en otros pulsotipos sin relación genética con el pulsotipo 6.

Por lo tanto, los resultados obtenidos en las cepas de *L. garvieae* de truchas nos permiten corroborar la hipótesis de la posible utilidad de la acidificación de la tagatosa, sacarosa y la utilización de la enzima *Pyra* como marcadores epidemiológicos en función del origen y/o localización geográfica. Resultados parecidos fueron descritos con cepas de peces procedentes de Europa, Asia y Australia y búfalos de Brasil (Eldar y col., 1999; Vela y col., 2000) y se han encontrado correlaciones similares mediante estudios de ribotipado y serotipado (Eyngor y col., 2004).

A pesar de la importancia clínica creciente de la lactococosis, especialmente en la crianza de trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*) en Europa y de seriola (*Seriola quinqueradiata*) en Japón, la epidemiología de esta enfermedad no está a día de hoy aclarada. Los primeros brotes de lactococosis en trucha arco iris registrados en España fueron a finales de los años 80 y comienzos de los 90 (Palacios y col., 1993; Doménech y col., 1993; Prieta y col., 1993). Desde el año 1991 a 1994, la cepa epidémica causante de la lactococosis en España, era diferente a la cepa epidémica actual, que tal y como hemos observado en nuestros resultados, prevalece invariable desde el año 1994 (Vela y col., 2000; Tejedor y col., 2004). Estudios similares

mediante PFGE, RAPD y RFLP también han demostrado que el clon epidémico que afecta a las piscifactorías españolas, no tiene ninguna relación genética con los principales países afectados como Japón (Kawanishi y col., 2006), Italia, Israel o Australia (Eldar y col., 1999; Vela y col., 2000; Ravelo y col., 2003; Eyngor y col., 2004). Además, en la mayoría de los casos, las cepas patógenas en cada uno de estos países se agrupan de forma homogénea dentro de la misma región geográfica, no encontrando generalmente esta relación genética respecto al resto de países afectados.

Por otra parte, al igual que lo observado en nuestros resultados, Eyngor y col. (2004) describieron que las cepas de Italia e Israel estaban muy relacionadas genéticamente. Sin embargo, existen discrepancias respecto a la caracterización y comparación de los aislados japoneses. Así, Eldar y col. (1999), describieron perfiles bioquímicos y genéticos (RFLP) idénticos con las cepas de *L. garvieae* italianas estimando una fuente de infección común a través de los alimentos o a través de la compra de alevines desde Japón a Italia. Por ello, estos mismos autores, sugirieron éstas como las posibles causas que explicara la propagación de la enfermedad al continente europeo. Sin embargo, posteriormente, Ravelo y col. (2003) mediante RAPD y Kawanishi y col. (2006), por PFGE, no obtuvieron los mismos resultados y demostraron que los clones existentes en ambos países no presentaban tal similitud.

En el caso de las cepas españolas, a pesar de la gran diversidad genética y amplia distribución ambiental observada en diferentes especies animales, harinas y aguas, no hemos encontrado ninguna cepa distinta a la epidémica capaz de producir enfermedad en truchas arco iris en España. Esto sugeriría que las cepas ambientales no parecen tener la capacidad de desplazar a la cepa epidémica actual (pulsotipo nº 6) y por tanto, así poder explicar su persistencia en el tiempo. De la misma manera, algo parecido podría estar ocurriendo en el resto de países con clones epidémicos establecidos (Eldar y col., 1999; Eyngor y col., 2004.)

Los resultados obtenidos en la caracterización molecular de *L. garvieae*, demuestran que no existe ninguna relación genética entre las cepas aisladas en diferentes especies animales y especialmente entre animales homeotermos y poiquilotermos y que, salvo 3 cepas aisladas en ganado porcino (Figura 40), la cepa epidémica causante de brotes en las truchas españolas, tan solo está relacionada con peces enfermos y su entorno. Hasta la fecha tan solo se ha realizado un estudio de patogenicidad en seriola (*Seriola quinqueradiata*) y ratones en el que se utilizó algunas de las cepas de ganado porcino, vacas y truchas arco iris españolas e italianas aisladas en nuestro laboratorio e incluidas en esta tesis doctoral, así como otras cepas de *L. garvieae* aisladas en perros, gatos y caballos (Kawanishi y col., 2006). Ninguna de las cepas utilizadas produjo efectos patógenos o mortalidad en los ratones infectados artificialmente. Respecto a la seriola, las cepas propias aisladas en esta especie produjeron una mortalidad del 100% en los peces mientras que la mortalidad producida por las cepas aisladas a partir de truchas arco iris osciló entre el 20 y el 80%. Sin embargo, el resto de las cepas utilizadas, aisladas a partir de animales homeotermos no produjeron mortalidad alguna tras ser inoculadas en seriola. Estos resultados sugieren que también la virulencia y patogenicidad de *L. garvieae* depende de su adaptación a la especie hospedadora concreta y a su entorno, especialmente entre animales homeotermos y poiquilotermos. Todo ello unido a los procesos de evolución genética asentados en cada región geográfica en particular (Ridley, 1996) podrían ser las causas que permitan la persistencia de clones específicos a lo largo de los años

A este respecto, la presión inmunológica y selectiva motivada por los intensos programas de vacunación que se realizan para controlar esta enfermedad, y la dinámica de poblaciones bacterianas, podrían producir en un futuro cambios de los clones prevalentes en los distintos países (Dale y col., 2002; Eyngor y col., 2004), como ya ha ocurrido con *S. iniae* en la crianza de truchas arco iris en Israel (Bachrach y col., 2001).

Por otra parte, resulta complicado valorar el papel patógeno de *L. garvieae* en ganado porcino puesto que en un 19% de los casos, este microorganismo fue aislado junto a patógenos clásicos de esta especie animal como *Pasteurella multocida*, *Haemophilus parasuis* o *Streptococcus suis*. Además, la frecuencia de aislamiento de esta bacteria en los muestreos realizados en nuestro laboratorio no superó el 1%, porcentaje muy inferior si se compara con la incidencia de los otros tres patógenos porcinos antes mencionados (MacInnes y Desrriers, 1999; Davies y col., 2003). Un dato a favor de su importancia clínica en cerdos, está en que en el 40,5% de las muestras con lesiones, *L. garvieae* fue aislado en cultivo puro, sin embargo también obtuvimos este mismo resultado en muestras sin lesiones aparentes. Todo ello nos impide confirmar el papel patógeno de *L. garvieae* en ganado porcino o su implicación en la transmisión de bacterias patógenas para los peces.

Los resultados obtenidos en la caracterización bioquímica y molecular de las cepas de ganado porcino, nos muestran una gran diversidad y distribución de *L. garvieae* a lo largo de toda la geografía española no siendo posible obtener relaciones genéticas concluyentes entre animales de la misma empresa, provincia o explotación. Tan solo la presencia de aislados con el mismo pulstipo en animales diferentes dentro de la misma granja (pulstipos 37 y 48) podría sugerir la posibilidad de contagio entre animales de la misma explotación. Así mismo, las tres cepas ubicadas en el pulstipo nº6 junto al amplio grupo de aislados de truchas españolas (con las que además compartían el mismo perfil bioquímico), podría suponer una fuente de contagio común entre ambas especies animales. La reciente descripción de estos aislamientos (Tejedor y col., 2004), unido a la consolidación de la cepa epidémica de truchas españolas durante más de 14 años, nos permite insinuar que el modo de transmisión en este caso hubiera sido desde los peces al ganado porcino, aunque por el momento no haya sido demostrado. Así mismo, desconocemos las posibles vías de transmisión de esta bacteria al ganado porcino, si bien no deben

descartarse las fuentes ambientales y alimentarias, así como sugerir el papel de estos animales como reservorio de *L. garvieae*.

Las 2 cepas humanas, se agruparon en dos perfiles únicos (34 y 84) sin relación genética alguna, confirmando los resultados obtenidos en trabajos previos que incluían cepas humanas (Teixeira y col., 1996; Vela y col., 2000) y afianzando los resultados de diversidad genética y variabilidad inter e intraespecie antes comentados. A pesar de haberse aislado *L. garvieae* en humanos en diferentes ocasiones y procesos clínicos (Fefer y col., 1998; James y col., 2000), su capacidad zoonótica todavía no ha sido demostrada (Vela y col., 2000; Vendrell y col., 2006). Un estudio reciente sugiere la infección por *L. garvieae* de 4 pacientes a través del consumo de pescado en Taiwan (Wang y col., 2007). Sin embargo, los autores establecen la relación epidemiológica mediante secuenciación del 16S rRNA sin la caracterización genética de las cepas implicadas y por tanto restando validez al experimento. En lo que respecta a España, con una producción anual de trucha arco iris cercana a las 25.000 toneladas y después de casi dos décadas con elevadas incidencias de lactococosis, tan solo tenemos constancia de estos dos aislados en humanos (sin estar ninguno de ellos relacionados con el consumo de pescado ni actividades piscícolas), que como se puede observar en el dendrograma (Figura 40), y aunque supongan un número escaso de aislados, no guardan ningún tipo de relación genética con las cepas de peces de diferentes orígenes. A este respecto y resultando un caso similar, *S. iniae* ha sido recientemente asociado a infecciones en humanos con heridas cutáneas y manipulación de peces enfermos, demostrando convenientemente su potencial zoonótico oportunista (Lau y col., 2003; Romano y Mejía, 2003; Agnew y col., 2007). Por lo tanto, todos estos datos nos impiden demostrar el carácter zoonótico de *L. garvieae*, ni siquiera en países afectados con lactococosis, donde es frecuente el manejo de animales enfermos en piscifactorías o incluso tras la ingestión de pescado crudo como ocurre en los países orientales (Kawanishi y col., 2006).

Por su parte, el elevado porcentaje de muestras de aguas de ríos, piscifactorías y depuradoras positivas a *L. garvieae* por PCR (79,2%) y la diversidad genética encontrada (0,69), confirman la amplia distribución ambiental de esta bacteria como demuestra el hecho de haber obtenido cepas genéticamente diferentes a partir de una misma muestra (esto fue así en el 55% de las aguas con más de un aislado de *L. garvieae*).

Tan solo en el agua del entorno (entrada y/o salida) de 3 piscifactorías afectadas con problemas de lactococosis, aislamos cepas de *L. garvieae* (un total de 6) genéticamente idénticas a la cepa epidémica de truchas españolas. Podríamos asumir que los animales portadores (enfermos o asintomáticos) que eliminan *L. garvieae* al medio ambiente a través de las heces fueran el origen de estas cepas en el agua de salida. Este hecho concuerda con la transmisión fecal-oral demostrada en infecciones experimentales producidas en truchas (Romalde y col., 1996). Por su parte, el hallazgo de cepas con el mismo pulsotipo que la cepa patógena de los peces a la entrada de la instalación, pudiera justificarse con los sistemas de recirculación del agua que poseen en las plantas muestreadas, así como con la presencia de peces de la piscifactoría que hayan conseguido escapar en la cabecera de la instalación.

Por el contrario, el resto de aislados procedentes del agua (57 cepas, 90,5% del total), no tuvieron ningún tipo de relación genética con los aislados de truchas españolas, italianas o israelitas. El origen de estas cepas podría ser el propio agua de los ríos, ya que se ha demostrado que este microorganismo se encuentra presente en el lodo de los ríos y en aguas con fuerte contenido en materia orgánica (Kusuda y Salati, 1999), especies de peces de vida libre que podrían actuar como portadores y reservorios del patógeno (Romalde y col., 1996) o residuos fecales ganaderos procedentes de especies domésticas que, como hemos comentado, pueden actuar de reservorio de esta bacteria. A este respecto, Romalde y col. (1996), demostraron la infección experimental a través del agua en peces con lesiones cutáneas, pero la concentración utilizada ($2,5 \times 10^7$ UFC/ml) era

presumiblemente superior de la que pueda encontrarse en los ríos de forma natural. Sin embargo, analizando los resultados obtenidos en nuestro estudio, no parecen existir evidencias que el agua de los ríos suponga una fuente de contagio de *L. garvieae*, causante de la lactococosis de la trucha arco iris.

Finalmente, en las cepas aisladas a partir de harinas de pescado, volvió a prevalecer una amplia variabilidad genética (incluso en las cepas aisladas en la misma muestra). La ausencia de aislados de diferentes muestras compartiendo un mismo perfil genético, nos impidió establecer relaciones entre las harinas españolas y peruanas así como con las muestras de peces. En nuestros resultados, tan solo en una de las 7 muestras (14,8%) de harinas de pescado con aislamiento positivo, obtuvimos cepas con el mismo perfil genético que la cepa epidémica actual (HP102). Al tratarse de una harina de origen español, podríamos sugerir que pudo ser fabricada con pescados enfermos o portadores de la cepa epidémica para las truchas arco iris españolas demostrando que existen harinas contaminadas con cepas patógenas para los peces.

Sin embargo, tal y como detallamos en el apartado 4.3.1.5., gracias a los procesos de extrusión a los que son sometidas las harinas de pescado durante la fabricación de piensos compuestos para peces, es asumible la eliminación de cualquier agente patógeno que pudieran contener (Rokey, 1995) y con ello el riesgo de transmisión de *L. garvieae*. No obstante, el proceso de extrusión es una tecnología relativamente moderna que se instauró en las fábricas de pienso para peces entre 1994 y 1995 (Raquel Lázaro, conversación personal). Antes de esta fecha, los piensos destinados a peces de crianza se fabricaban mediante granulación, sin que ello asegurara la eliminación de las bacterias que pudieran vehicular y por lo tanto aumentara el riesgo de contagio de los peces por la vía de la alimentación. Según describimos en la introducción de este estudio, las primeras descripciones de casos de lactococosis, fueron a finales de los años 50 en criaderos japoneses (Hoshina y col., 1958; Kusuda y col., 1991).

Treinta años más tarde (comienzos de los años 90), cuando la fabricación de piensos compuestos todavía se realizaba por granulación, esta enfermedad se instauró de manera epidémica en España (Doménech y col., 1993) e Italia (Ghittino y Prearo, 1992), siendo distribuida posteriormente a los principales países productores de trucha arco iris de la Europa Mediterránea (Eyngor y col., 2004). Es por esta razón, que la difusión de esta enfermedad a principios de los años 90 en el continente europeo a través de la alimentación, es todavía hoy por hoy una hipótesis vigente (Minami, 1979; Toranzo, 1994; Doménech, 1996; Eldar y col., 1996, Teixeira y col., 1996; Romalde y col., 1996; Vendrell y col., 2006). La falta de muestras de piensos granulados de aquella época nos ha impedido confirmar su implicación en la implantación de esta enfermedad bacteriana. Posteriormente, una vez fueron instaurados los procesos de extrusión en la fabricación de piensos compuestos, la enfermedad se mantiene de manera epidémica gracias a transmisión de *L. garvieae* a través de los animales enfermos o portadores y por la ausencia de sistemas todo dentro - todo fuera en las piscifactorías.

En el caso de los piensos compuestos, tal y como sugerimos en el capítulo 4.3.2., pensamos que la detección de *L. garvieae* es principalmente causada por contaminaciones cruzadas en las fábricas de piensos después del proceso de fabricación, con bajas concentraciones bacterianas y estimando prácticamente nulo el riesgo de contagio por la ingestión de este tipo de piensos extrusionados. Por lo tanto, la producción actual de piensos y alimentación piscícola puede considerarse segura desde el punto de vista de la transmisión de patógenos bacterianos.



5. CONCLUSIONES

1. La metodología desarrollada en este trabajo, con un umbral de detección de 1 UFC para *Lactococcus garvieae* y *Streptococcus parauberis* en 25 gramos de matrices tan complejas como los piensos de acuicultura, cumple con los estándares internacionales para la validación de técnicas de detección de patógenos bacterianos en muestras alimentarias y ambientales.

2. El periodo de latencia de *Lactococcus garvieae* a 14°C en presencia de lincomicina varía dependiendo de la cepa y el origen de aislamiento. Estas diferencias no existen cuando la incubación se realiza a 30°C.

3. La probabilidad de aislar *Lactococcus garvieae* en muestras en las que se detectó este patógeno por PCR tras el enriquecimiento selectivo, es inversamente proporcional a la carga microbiana inicial de la muestra, especialmente con otros cocos Gram positivos que puedan crecer en el medio de aislamiento interfiriendo en su detección. Resulta por ello necesario el diseño de un método de aislamiento sensible y específico para su aplicación en matrices muy contaminadas.

4. Las harinas de pescado utilizadas en la producción de piensos compuestos para acuicultura están frecuentemente contaminadas con *Lactococcus garvieae* y *Streptococcus parauberis*. Por tanto resulta aconsejable la implantación de controles para evaluar la calidad sanitaria de estas materias primas.

5. Aunque *Lactococcus garvieae* fue también detectado en piensos compuestos, la frecuencia de muestras positivas fue inferior a la de las harinas de pescado y en ningún caso fue posible aislar este patógeno en las muestras analizadas.

6. La elevada frecuencia de aislamiento de *Lactococcus garvieae* a partir de aguas continentales confirman el carácter ubicuo de este patógeno y su amplia difusión ambiental cuya presencia debe ser vigilada.

7. *Lactococcus garvieae* presenta una elevada variabilidad bioquímica y genética, sin embargo las cepas responsables de brotes epidémicos en truchas presentan perfiles bioquímicos y genéticos concretos que se mantienen en el tiempo y que están circunscritos exclusivamente a peces enfermos y su entorno.

8. Los resultados del presente estudio, si bien no permiten confirmar el carácter patógeno de *Lactococcus garvieae* para el ganado porcino, ponen de manifiesto que estos animales puedan representar un reservorio de esta bacteria no descrito previamente.

6. RESUMEN



Las enfermedades producidas por cocos Gram positivos en peces cultivados industrialmente, han aumentado considerablemente en los últimos años en todo el mundo. Entre las 6 especies bacterianas incluidas dentro de este grupo, destacan por la incidencia y la gravedad de los brotes que producen, *Streptococcus iniae* en tilapias, *Streptococcus parauberis* en rodaballos y especialmente *Lactococcus garvieae*, como agente productor de la lactococosis de la trucha arco iris.

A pesar de la importancia clínica y económica de las enfermedades causadas por estos patógenos, todavía se desconocen muchos aspectos de su epidemiología y de los mecanismos de transmisión que facilitaron su difusión a finales de los años 80 y principios de los 90. La comprensión de estos aspectos puede permitir disminuir la incidencia de estas enfermedades, al incrementar el conocimiento de la epidemiología de las infecciones causadas por estos microorganismos, hecho que contribuirá al establecimiento de medidas de prevención y control más eficaces.

Se ha indicado que la transmisión de estos patógenos a los peces se produce de forma horizontal, y se ha especulado con la posibilidad de que la vía de entrada en las explotaciones piscícolas pudiera ser a través del agua de entrada de la piscifactoría, a través de diversos vehículos animales

o a través de la alimentación (piensos fabricados con tratamientos térmicos deficientes y que contengan materias primas contaminadas en su formulación). Así por ejemplo, las harinas de pescado, por su origen y composición, podrían suponer un riesgo de transmisión de patógenos bacterianos si hubieran sido fabricadas con peces enfermos o portadores. Sin embargo, hasta el momento, ninguna de estas hipótesis ha sido confirmada.

Por ello, en el presente estudio hemos desarrollado una metodología para la detección de estas bacterias en materias primas, piensos compuestos y muestras ambientales (principalmente aguas de ríos, piscifactorías y depuradoras), consistente en el enriquecimiento selectivo, extracción de ADN y posterior detección molecular mediante una PCR Múltiple puesta a punto en nuestro departamento, que nos permitió detectar conjuntamente *L. garvieae*, *S. parauberis* y *S. iniae*.

Esta metodología ha presentado suficiente sensibilidad y especificidad para la detección de *L. garvieae* y *S. parauberis* a partir de las distintas muestras ambientales. Su aplicación sobre harinas de pescado contaminadas artificialmente de forma individual, ha permitido establecer los límites de detección en torno a 1-2 UFC de *L. garvieae* y *S. parauberis* y 81 UFC de *S. iniae* en 25 gramos de muestra. Los límites de detección de *L. garvieae* y *S. parauberis* fueron en torno a las 2 UFC/25 gramos de harina de pescado cuando realizamos la inoculación simultánea de las tres especies bacterianas en la harina de pescado. Sin embargo, fuimos incapaces de detectar *S. iniae* incluso cuando el inóculo de contaminación superaba las 2×10^3 UFC antes de enriquecer.

La metodología diseñada aplicada sobre muestras de harinas de pescado, piensos compuestos y aguas naturalmente contaminadas, permitió la detección de *L. garvieae* en el 18,1%, 16,1% y 79,1% de las muestras respectivamente. Además de *L. garvieae*, detectamos *S. parauberis* en el 36,2%, 10,7% y 2% de las harinas de pescado, piensos compuestos y

aguas respectivamente. Sin embargo, la falta de un medio de aislamiento selectivo y diferencial impidió el aislamiento de *L. garvieae* en algunas de las muestras en las que sí se detectó este patógeno por PCR.

Finalmente, hemos realizado en este estudio la caracterización genética, mediante electroforesis de campo pulsado (PFGE), de un total de 260 aislados de *L. garvieae*, obtenidos en nuestro laboratorio entre los años 2000 y 2006. Estos aislamientos procedían de peces (trucha arco iris y anguilas), ganado doméstico (porcino y bovino), aves silvestres y humanos. En este grupo además incluimos aislamientos obtenidos a partir de las muestras de harinas de pescado y aguas procedentes de diferentes orígenes geográficos. Obtuvimos un total de 86 perfiles diferentes que presentaban una diversidad genética de 0,33. Este dato podría estar sesgado, y la diversidad genética ser mucho mayor, ya que la amplia representación de aislados a partir de truchas españolas, 96 (36,5% sobre el total), se clasificaron en dos perfiles genéticos determinados (diversidad genética del 0,02). Los aislamientos obtenidos a partir del resto de especies animales, harinas de pescado y aguas, mostraron una diversidad genética mucho mayor por encima del 0,5 en todos los casos.

Los resultados obtenidos confirman la gran variabilidad genética de *L. garvieae*, hecho acorde con su extraordinaria ubicuidad en el medioambiente. Esta gran variabilidad ha impedido establecer relaciones epidemiológicas entre diferentes especies animales. Tan solo 3 cepas aisladas a partir de ganado porcino, mostraron el mismo perfil genético que la cepa epidémica de truchas arco iris en España. En el resto de especies de animales homeotermos y el hombre no se ha podido encontrar ningún tipo de relación, ni entre ellas, ni con las cepas epidémicas de los peces.

Las cepas de *L. garvieae* responsables de procesos clínicos en peces, aparecen mayoritariamente en muestras relacionadas con truchas enfermas y su entorno, y se distribuyen de forma epidémica y clónica en las diferentes zonas geográficas. Así en España, desde el año 1994 hasta la

actualidad, la lactococosis de la trucha arco iris ha sido producida por una misma cepa epidémica, que no ha podido ser desplazada por el amplio rango de cepas presentes en el medio ambiente y en otras especies animales. Esta misma cepa, ha sido detectada en muestras de aguas, aunque tan solo en el entorno de piscifactorías afectadas por la lactococosis de la trucha arco iris.

Tanto *L. garvieae* como *S. parauberis* fueron detectados en harinas de pescado. Además la cepa epidémica de *L. garvieae* (causante de la lactococosis de la trucha arco iris en España) fue también aislada a partir de una de las muestras. A pesar de estos hallazgos, la temperatura que se consigue durante la extrusión a la que se someten actualmente los piensos destinados a dieta para peces de crianza y en cuya formulación se incluye estas harinas de pescado, minimiza el riesgo de transmisión de estos microorganismos a estos animales. Sin embargo, tal y como hemos indicado en el presente estudio, el producto final acabado puede contaminarse durante los procesos de almacenamiento y transporte. Para evitar este riesgo, las plantas de fabricación de piensos compuestos deberían incorporar controles que aseguren la ausencia de estos patógenos en el producto final, garantizando, por tanto, su calidad microbiológica. A este respecto, la metodología diseñada en este estudio pudiera ser utilizada a tal efecto.

En resumen, hemos desarrollado una herramienta que puede ser útil para la prevención y control de estas importantes enfermedades piscícolas, permitiendo la detección de *L. garvieae* en materias primas, piensos compuestos y en el medio ambiente.



7. SUMMARY

In recent years there has been a considerable increase worldwide in diseases produced by Gram-positive cocci in industrially cultivated fish. From the six bacteria species included in this group the most important in terms of their incidence and the seriousness of the outbreaks caused are *Streptococcus iniae* in tilapia, *Streptococcus parauberis* in turbot and especially *Lactococcus garvieae*, as causal agent of lactococcosis in rainbow trout.

In spite of the clinical and financial importance of the diseases caused by these pathogens, many aspects are still not known of its epidemiology and the transmission mechanisms which facilitated its spread at the end of the 80s and early 90s. A better understanding of these aspects may allow the incidence of these diseases to be reduced, by increasing the knowledge of the epidemiology of the infections caused by these microorganisms, which in turn would contribute to establishing more effective prevention and control measures.

It has been indicated that the transmission of these bacteria to the fish is produced horizontally and the possibility has been considered that the invasion route into the fish farms may be through the water entering the farm, through different animal vehicles or through the feed (compound feeds produced with inadequate thermal processing or which contain

contaminated raw materials in their formulation). This means that for instance, the origin and composition of the fish meal may imply the risk of transmitting bacterial pathogens if they have been produced with infected fish or carriers. However, to date, none of these hypotheses have been proved.

In this study, therefore, we have developed a methodology for detecting these bacteria in raw materials, compound feed and environmental samples (mainly water from rivers, fish farms and wastewater treatment plants) consisting of selective enrichment, DNA extraction and then molecular detection by a Multiple PCR developed in our department, to be able to detect together *L. garvieae*, *S. parauberis* and *S. iniae*.

This methodology has proved to be sensitive and specific enough for the detection of *L. garvieae* and *S. parauberis* in the different environmental samples. Its application to individually and artificially contaminated fish meal has allowed the detection limits to be set at around 1-2 UFC for *L. garvieae* and *S. parauberis* and 81 UFC for *S. iniae* in 25 gram samples. The detection limits for *L. garvieae* and *S. parauberis* were around 2 UFC/25 grams of fish meal when we carried out the simultaneous inoculation of the three bacterial species in the fish meal. However we were unable to detect *S. iniae* even when the contamination inoculant exceeded 2×10^3 UFC before enrichment.

The designed methodology applied to samples of fishmeal, compound feed and naturally contaminated water, allowed *L. garvieae* to be detected in 18.1%, 16.1% and 79.1% of the samples respectively. As well as *L. garvieae*, we also detected *S. parauberis* in 36.2%, 10.7% and 2% of the fishmeal, compound feed and water, respectively. However, the lack of a selective and differential isolation medium prevented the isolation of *L. garvieae* in some of the samples in which this pathogen was detected by PCR.

Finally, in this study we carried out the genetic characterization through Pulsed Field Gel Electrophoresis (PFGE), of a total 260 *L. garvieae*, isolates obtained in our laboratory between 2000 and 2006. These isolates came from fish (rainbow trout and eel), domestic cattle (pig and cow), wild fowl and humans. In this group we also included isolates obtained from samples of fish meal and water of different geographic provenance. We obtained a total of 86 different profiles which presented a genetic diversity of 0.33. This data item may be skewed and the genetic diversity may be much higher, since the wide representation of isolates from Spanish trout , 96 (36.5% of the total), were classified in two specific genetic profiles (genetic diversity 0.02). The isolates obtained from the other animal species, the fish meal and the water, showed a much greater diversity, over 0.5 in all cases.

The results obtained confirm the high genetic variability of *L. garvieae*, which reflects the fact that it has an extraordinarily widespread environmental incidence. This high variability has prevented the establishing of epidemiological relationships between different animal species. Only 3 strains isolated from pigs showed the same genetic profile as the epidemic strain of rainbow trout in Spain. In the other homeothermal species and in humans, no relationship at all was found, either between them , or with the epidemic fish strains.

The strains of *L. garvieae* responsible for clinical processes in fish generally appear in samples related with diseased trouts and their surroundings and are distributed epidemically and clonally in different geographical areas. This has meant that in Spain, from 1994 to the present , the lactococcosis in rainbow trout has been caused by the same epidemic strain, which has not been displaced by the wide range of strains present in the environment and in other animal species. This same strain has been detected in water samples, although only in the immediate surroundings of the fish farms affected by the lactococcosis in rainbow trout.

Both *L. garvieae* and *S. parauberis* were detected in fish meal. In addition, the epidemic strain of *L. garvieae* (causing lactococcosis in rainbow trout in Spain) was also isolated from one of the samples. In spite of these findings, the temperature reached during extrusion which include these fish meals in their formulation, minimizes the risk of transmission of these microorganisms to the fish. However, as we have suggested in this present study, the end product may become contaminated during storage and transport processes. To reduce the risk of this happening, the compound feed factories should include controls to ensure the absence of these pathogens in the end product, so guaranteeing their microbiological quality. The methodology designed in this study may be used to this end.

To sum up, we have developed a tool which may be useful in the prevention and control of these important fish diseases, allowing the detection of *L. garvieae* in raw materials, in compound feed and in the environment .

8. BIBLIOGRAFÍA



- ✚ **Abulreesh, H.H.,** Paget, T.A., Goulder, R. 2006. *Campylobacter* in waterfowl and aquatic environments: incidence and methods of detection. *Environ. Sci. Tech.* 40: 7122-7131.
- ✚ **Afonso, A.,** Silva, J., Gomes, S. 2003. *Lactococcus garvieae* trout infections in Portugal: a new challenge on fish vaccinology. *IBMC News*, pp 4-6.
- ✚ **Agnew, W.,** Barnes, A.C. 2007. *Streptococcus iniae*: An aquatic pathogen of global veterinary significance and a challenging candidate for reliable vaccination. *Vet. Microbiol.* 122: 1-15.
- ✚ **Aguirre, M.,** Collins, M.D. 1993. Lactic acid bacteria and human clinical infection: a review. *J. Appl. Bacteriol.* 75: 95-107.
- ✚ **Akhlaghi, M.,** Munday, B.L., Whittington, R.J. 1996. Comparison of passive and active immunization of fish against streptococcosis (enterococcosis). *J. Fish. Dis.* 19: 251-258.
- ✚ **Alim, S.R.,** Kawai, K., Kusuda, R. 1996. Comparative pathogenicity study on antigenically variant strains of *Enterococcus seriolicida*. *J. Fish Dis.* 19: 39-46.
- ✚ **American Pharmaceutical Association.** 1950. The national formulary. 9th APA. Washington DC. EE.UU.
- ✚ **An, Y.,** Adachi, Y., Ogawa, Y. 2004. Classification of lactic acid bacteria isolated from chigee and mare milk collected in Inner Mongolia. *Anim. Sci. J.* 75: 245-252.

- ✚ **Annon.** 2004. El estado mundial de la pesca y la acuicultura. 2004. FAO, Roma.
- ✚ **Antolín, A.,** Cigüenza, R., Saluela, I., Vázquez, E., Hernández, J., Espinós, D. 2004. Liver abscess caused by *Lactococcus lactis cremoris*: a new pathogen. *Scand. J. Infect. Dis.* 26: 490-491.
- ✚ **Aoki, T.,** Park, C.L., Yamashita, B., Hirono, I. 2000. Species-specific polymerase chain reaction primers for *Lactococcus garvieae*. *J. Fish. Dis.* 23: 1-6.
- ✚ **APROMAR** (Asociación Empresarial de Productores de Cultivos Marinos). Informes 2006 y 2007. La Acuicultura marina de peces en España. Publicado en <http://www.apromar.es/Informes>.
- ✚ **Aquilanti, L.,** Garofalo, C., Osimani, A., Silvestre, G., Vignaroli, C., Clementi, F. 2007. Isolation and molecular characterization of antibiotic-resistant lactic acid bacteria from poultry and swine products. *J. Food. Protection.* 70: 557-565.
- ✚ **Austin, B.,** Austin, D.A. 1993. Bacterial fish pathogens: diseases in farmed and wild fish. 2ª ed. p. 208-216. Ellis Horwood Limited, Chichester, UK.
- ✚ **Bachrach, G.,** Zlotkin, A., Hurvitz, D., Evans, L., Eldar, A. 2001. Recovery of *Streptococcus iniae* from diseased previously vaccinated with a *Streptococcus* vaccine. *Appl. Environ. Microbiol.* 67: 3756-3758.
- ✚ **Baeck, G. W.,** Kim J. H., Gomez D. K., Park S. C. 2006. Isolation and characterization of *Streptococcus* sp. from diseased flounder (*Paralichthys olivaceus*) in Jeju Island. *J. Vet. Sci.* 7: 53-58.
- ✚ **Barakat, R.K.,** Griffiths, M.W., Harris, L.J. 2000. Isolation and characterization of *Carnobacterium*, *Lactococcus* and *Enterococcus* spp. from cooked, modified atmosphere packaged, refrigerated poultry meat. *Int. J. Food. Microbiol.* 62:83-94.
- ✚ **Bark, S.,** Mc Gregor, D. 2001. The first occurrence of lactococcosis in farmed trout in England. *Trout News.* 31: 9-11.
- ✚ **Barnabé, G.,** Lecoq, C. 1987. Large scale cage rearing of the european sea bass, *Dicentrarchus labrax* (L.), in tropical waters. *Aquaculture.* 66: 209-221.
- ✚ **Barnabé, G.** 1996. Bases biológicas y ecológicas de la acuicultura. Ed. Acribia.

- ✚ **Barnes, A.C.,** Guyot, C., Hansen, B.G., Mackenzie, K., Horne, M.T., Ellis, A.E. 2002. Resistance to serum killing may contribute to differences in the abilities of capsule and non-capsulated isolates of *Lactococcus garvieae* to cause disease in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* L.). *Fish Shell Immunol.* 12: 155-168.
- ✚ **Baudart, J.,** Lemarchand, K., Brisabois, A., Lebaron, P. 2000. Diversity of *Salmonella* strains isolated from the aquatic environment as determined by serotyping and amplification of the ribosomal DNA spacer regions. *Appl. Environ. Microbiol.* 66: 1544-1552.
- ✚ **Baya, A.M.,** Lupiani, B., Hetrick, F.M., Roberson, B.S., Lukacovic, R., May, E. y Poukish, C. 1990. Association of *Streptococcus* sp. with fish mortalities in Chesapeake Bay and its tributaries. *J. Fish Dis.* 13:251-253.
- ✚ **Bej, A.K.,** Mahbubani, M.H., Miller, R., DiCesare, J.L., Haff, L., Atlas, R.M. 1990. Multiplex PCR amplification and immobilized capture probes for detection of bacterial pathogens and indicators in water. *Mol. Cell. Probes.* 4: 353-365.
- ✚ **Bercovier, H.,** Ghittino, C. y Eldar, A. 1997. Immunization with bacterial antigens: infections with streptococci and related organisms. *Dev. Biol. Stand.* 90:153-160.
- ✚ **Blanco, M.M.,** Liébana, P., Gibello., A., Alcalá., C., Fernández-Garayzabal, J.F., Domínguez, L. 2004. Principales patologías bacterianas en las piscicultura española. Publicado en: <http://www.comunidad.veterinaria.org/articulos/>
- ✚ **Bohnert M,** Dilasser F, Dalet C, Mengaud J, Cossart P. *Res Microbiol.* 1992. Use of specific oligonucleotides for direct enumeration of *Listeria monocytogenes* in food samples by colony hybridization and rapid detection by PCR. *Res. Microbiol.* 143: 271-80.
- ✚ **Boom, R.,** Sol, C.J., Salimans, M.M., Jansen, C.L., Wertheim-van Dillen, P.M., van der Noordaa, J. 1990. Rapid and simple method for purification of nucleic acids. *J. Clin. Microbiol.* 28: 495-503.
- ✚ **Boom, R.,** Sol, C.J.A., Beld, M., Weel, J., Goudsmit, J., Wertheim-van Dillen, P.M.E. 1999. Improved silica-guanidiniumthiocyanate DNA isolation procedure based on selective binding of bovine alphacasein to silica particles. *J. Clin. Microbiol.* 37: 615-619.

- ✚ **Bromage, E.S.,** Thomas, A., Owens, E.L. 1999. *Streptococcus iniae*, a bacterial infection in barramundi *Lates calcarifer*. Dis. Aquat. Organ. 36: 177- 181.
- ✚ **Brown, L.** 1993. Aquaculture for veterinarians: fish husbandry and medicine. Oxford: Pergamon Press, Ltd.
- ✚ **Brunt, J.,** Austin, B. 2005. Use of a probiotic to control lactococcosis and streptococcosis in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum.). J. Fish. Dis. 28: 693-701.
- ✚ **Bryskier, A.,** Butzler, J.P. 1997. Macrolides. Antibiotic and Chemotherapy. Antiinfective agents and their use in therapy. 7th Edition.
- ✚ **Carson, J.,** Gudkovs, N. y Austin, B. 1993a. Characteristics of an *Enterococcus*-like bacterium from Australia and South Africa, pathogenic for rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). J. Fish Dis. 16:381-388.
- ✚ **Carson, J.,** Statham, P. 1993b. The inhibition by ionophores in vitro of an *Enterococcus* - like pathogen of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. Vet. Microbiol. 36: 253-259.
- ✚ **Carvalho, M.G.,** Vianni, M.C., Elliot, J.A., Reeves, M., Facklam, R.R., Teixeira, L.M. 1997. Molecular analysis of *Lactococcus garvieae* and *Enterococcus gallinarum* isolated from water buffalos with subclinical mastitis. Adv. Exp. Med. Biol. 418: 401-404.
- ✚ **Casas, I.,** Tenorio, A., Echevarria, J.M., Klapper, P.E., Cleator, G.M. 1995. Detection of enteroviral RNA and specific DNA of herpesviruses by multiplex genome amplification. J. Virol. Methods. 66: 39-50.
- ✚ **Ceschia, G.,** Giorgetti, G., Giavenni, R. y Sarti, M. 1992. A new problem for italian trout farms: streptococcosis in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Bull. Eur. Ass. Fish Pathol. 12:71-72.
- ✚ **Chang, P.H.,** Lin, C.W., Lee, Y.C. 2002. *Lactococcus garvieae* infection of cultured rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, in Taiwan and associated biophysical characteristics and histopathology. Bull. Eur. Ass. Fish. Pathol. 22: 319-327.
- ✚ **Chapela, A.,** González, A.F., Dawe, E.G., Rocha, F.J., Guerra, A. 2006. Growth of common octopus (*Octopus vulgaris*) in cages suspended from rafts. Scientia Marina. 70: 121-129.

- ✚ **Chen, S.C.**, Lee, J.L., Lai, C.C., Gu, C.C., Gu, Y.W., Wang, C.T., Chang, H.Y. 2000. Nocardiosis in seabass, *Lateolabrax japonicus*, in Taiwan. J. Fish Dis. 23: 299-308.
- ✚ **Chen, S.C.**, Lin, Y.D., Liaw, L.L., Wang, P.C. 2001. *Lactococcus garvieae* infection in the giant freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii* confirmed by polymerase chain reaction and 16S rDNA sequencing. Dis. Aquat. Org. 45: 45-52.
- ✚ **Chen, S.C.**, Liaw, L.L., Su, H.Y., Ko, S.C., Wu, C.Y., Chaung, H.C., Tsai, Y.H., Yand, K.L., Chen, Y.C., Chen, T.H., Lin, G.R., Cheng, S.Y., Lin, Y.D., Lee, J.L., Lai, C.C., Weng, Y.J., Chu, S.Y. 2002. *Lactococcus garvieae*, a cause of disease in grey mullet *Mugil cephalus* L., in Taiwan. J. Fish. Dis. 25: 727-732.
- ✚ **Cheng, W.**, Liu, C.H., Chen, J.C. 2002. Effect of nitrite on interaction between the giant freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii* and its pathogen *Lactococcus garvieae*. Dis. Aquat. Org. 36: 233-237.
- ✚ **Collins, M.D.**, Farrow, J.A.E., Phillips, B.A., Kandler, O. 1983. *Streptococcus garvieae* and *Streptococcus plantarum* sp. nov. J. Gen. Microbiol. 129: 3427-3431
- ✚ **Collins, R.** 1993. Aquaculture for Veterinarians: Fish husbandry and medicine. Chapter 5. Pergamon Press.
- ✚ **Colorni, A.**, Diamant, A., Eldar, A., Kvitt, H., Zlotkin, A. 2002. *Streptococcus iniae* infections in Red Sea cage-cultured and wild fishes. Dis. Aquat. Organ. 49: 165-170.
- ✚ **Colorni, A.**, Ravelo, C., Romalde, J.L., Toranzo, A.E., Diamant, A. 2003. *Lactococcus garvieae* in Red Sea wrasse, *Coris aygula*, (Labridae). Dis. Aquat. Org. 56: 275-278.
- ✚ **Cowey, C.B.** 1994. Aminoacid requirements of fish: a critical appraisal of present values. Aquaculture. 124: 1-11.
- ✚ **Crump, J.A.**, Griffin, P.M., Angulo, F.J. 2002. Bacterial contamination of animal feed and its relationship to human foodborne illness. Food Safety. 35:859-865.
- ✚ **Dale, J.B.**, Shulman, S.T. 2002. Dynamic epidemiology of group A streptococcal infections. Lancet. 359: 889-890.
- ✚ **Dávila, E.**, Zamora, L.M., Pla, M., Carretero, C., Parés, D. 2005. Identification and antagonistic activity of lactic acid bacteria occurring in porcine blood from industrial slaughterhouses - a preliminary study. Int. J. Food. Microbiol. 107: 207-11.

- ✚ **Delves-Broughton, J.** 1990. Nisin and its uses as a food preservative. *Food. Technology.* 44: 100-117.
- ✚ **Devriese, L.A.,** Hommeez, J., Laevens, H., Bañadme, P., Haesebrouck, F. 1999. Identification of aesculin-hydrolyzing streptococci and enterococci from subclinical intramammary infections in dairy cows. *Vet. Microbiol.* 70: 87-94.
- ✚ **de Juan Ferre, Lucía.** 2005. Paratuberculosis Caprina. Aportaciones a su Diagnóstico, Epidemiología Molecular y Control. Tesis Doctoral. Facultad de Veterinaria. Universidad Complutense de Madrid.
- ✚ **de la Gándara, F.** 2006. Situación actual de la acuicultura. *Acuicultura III: cultivo y alimentación de peces.* Universidad de Murcia. 1: 17-38.
- ✚ **Diler, O.,** Altun, S., Adiloglu, A.K., Kubilay, A., Isikli, B. 2002. First occurrence of Streptococcosis affecting farmed rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) in Turkey. *Bull. Eur. Assoc. Fish. Pathol.* 22: 21-25.
- ✚ **Doménech, A.,** Prieta, J., Fernández-Garayzábal, J.F., Collins, M.D., Jones, D., Domínguez, L. 1993. Phenotypic and phylogenetic evidence for a close relationship between *Lactococcus garvieae* and *Enterococcus seriolicida*. *Microbiología.* 9:63-68.
- ✚ **Doménech, A.,** Fernández-Garayzábal, J.F., Pascual, F., García, J.A., Cutuli, M.T., Moreno, M.A., Collins, M.D., Domínguez, L. 1996. Streptococcosis in cultured turbot (*Scophthalmus maximus*) associated with *Streptococcus parauberis*. *J. Fish. Dis.* 19: 33-38.
- ✚ **Domínguez, L.,** Fernández-Garayzábal, J.F., Moreno M.A., Blanco M.M., Doménech A., García J.A., Gibello A., Vela A.I., Albendea C., Liébana P. 2000. Caracterización epidemiológica y molecular, y diseño de vacunas frente a *Lactococcus garvieae*, agente productor de la lactococosis en trucha. I Premio "Jacumar" de investigación en Acuicultura. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. Madrid.
- ✚ **Dutka, B.J.,** Kwan, K.K., 1978. Comparison of eight media procedures for recovering faecal streptococci from water under winter conditions. *J. Appl. Bacteriol.* 45:333-340.
- ✚ **EFSA Journal.** 2006. Trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and antimicrobial resistance in the European Union in 2004. European Food Safety Authority.

- ✚ Eldar, A., Ghittino, C. 1999. *Lactococcus garvieae* and *Streptococcus iniae* infection in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): similar but different diseases. Dis. Aquat. Org. 36: 227-231.
- ✚ Eldar, A., Bejerano, Y., Bercovier, H. 1994. *Streptococcus shiloi* and *Streptococcus difficile*: two new streptococcal species causing a meningoencephalitis in fish. Current Microbiol. 28: 139-143.
- ✚ Eldar, A., Bejerano, Y., Livoff, A., Horovitz, A., Bercovier, H. 1995. Experimental streptococcal meningoencephalitis in cultured fish. Vet. Microbiol. 43: 33-40.
- ✚ Eldar, A., Ghittino, C., Asanta, L., Bozzeta, E., Gloria, M., Prearo, M., Bercovier, H. 1996. *Enterococcus seriolicida* is a junior synonym of *Lactococcus garvieae*, a causative agent of septicaemia and meningo-encephalitis in fish. Current Microbiol. 32: 85-88.
- ✚ Eldar, A., Gloria, M., Ghittino, C., Zlotkin, A., Bercovier, H. 1999. Biodiversity of *Lactococcus garvieae* strains isolated from fish in Europe, Asia and Australia. Appl. Environ. Microbiol. 65: 1005-1008.
- ✚ Eliopoulos, G.M. 2002. Resistance problems associated with the *Enterococcus*. Bacterial resistance to antimicrobials. Ed. Marcel Dekker, Inc. New York.
- ✚ Elliker, P.R., Anderson, A.W., Hanneson, G. 1956. An agar medium for lactic acid streptococci and lactobacilli. J. Dairy. Sci. 39:1611-1612.
- ✚ Elliot, J.A., Facklam, R.R. 1996. Antimicrobial susceptibilities of *Lactococcus lactis* and *Lactococcus garvieae* and a proposed method to discriminate between them. J. Clin. Microbiol. 34: 1296-1298.
- ✚ Elliot, J.A., Collins, M.D., Pigott, N.E., Facklam, R.R. 1991. Differentiation of *Lactococcus lactis* and *Lactococcus garvieae* from humans by comparison of whole-cell protein patterns. J. Clin. Microbiol. 20: 2731-2734.
- ✚ Ellner, P.D., Stoessel, C.J., Drakford, E., Vasi, F. 1966. A new culture medium for medical bacteriology. Am. J. Clin. Pathol. 45:502-504.
- ✚ Endo, H., Nakayama, J., Ushio, H., Hayashi, T., Watanabe, E. 1998. Application of flow cytometry for rapid detection of *Lactococcus garvieae*. Appl. Biochem. Biotechnol. 75: 295-306.

- ✚ **Finney M.** 1992. Preparation and analysis of DNA. Current Protocols in molecular biology. Molecular biology-Technique. Ed. Ausubel F.H., Brent R., Kingston R.E., Seidman J.G., Smith J.A., Struhl K., Vol. 1 p. 2.5.1.- 2.5.17. Greene Publishing associates and Wiley-Interscience, John Wiley and sons, New York.
- ✚ **Fitter, C.,** Heuzenroeder, M., Thomas, C.J. 1992. A combined PCR and selective enrichment method for rapid detection of *Listeria monocytogenes*. J. Appl. Bacteriol. 73: 53-59.
- ✚ **Fleet, G.H.** 1999. Microorganisms in food ecosystems. Int. J. Food. Microbiol. 50: 101-117.
- ✚ **Fletcher, R.H.,** Fletcher, S.W., Wagner, E.H. 1996. Clinical epidemiology: the essentials. 3^a ed. Baltimore: Williams and Wilkins.
- ✚ **Fortina, M.G.,** Ricci, G., Foschino, R., Picozzi, C., Dolci, P., Zeppa, G., Cocolin, L., Manachini, P.L. 2007. Phenotypic typing, technological properties and safety aspects of *Lactococcus garvieae* strains from dairy environments. J. Appl. Microbiol. 103: 445-453.
- ✚ **Fukuda, Y.,** Maita, M., Satoh, K., Yamamoto, H., Okamoto, N., Ikeda, Y. 1997a. Effects of dissolved oxygen concentration on experimental horizontal transmission of induced by artificial infection with *Enterococcus seriolicida* in yellowtail. Fish Pathol. 32: 43-49.
- ✚ **Fukuda, Y.,** Maita, M., Satoh, K., Yamamoto, H., Okamoto, N. 1997b. Influence of dissolved oxygen concentration for the mortality of yellowtail experimentally infected with *Enterococcus seriolicida*. Fish Pathol. 32: 129-130.
- ✚ **Furones, M.D.,** Rodgers, C.J., Munn, C.B. 1993. *Yersinia ruckeri*, the causal agent of enteric red-mouth disease (ERM) in fish. Ann. Rev. Fish Dis. 3:105-125.
- ✚ **Furuta, K.,** Morimoto, S., Sato, S. 1980. Bacterial contamination in feed ingredients, formulated chicken feed and reduction of viable bacteria by pelleting. Lab. Anim. 14: 221-224.
- ✚ **Gangarosa,E.J.,** Barker, W.H. Jr., Baine, W.B., Morris, G.K., Rice, P.A., Man, V.S. 1973. Animal feeds as the source of human salmonellosis. Lancet. 1:878-879.

- ✚ **Ghittino, C.,** Prearo, M. 1992. Report of Streptococcosis in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) in Italy: a preliminary note. Boll. Soc. It. Patol. Ittica. 8: 4-11.
- ✚ **Ghittino, C.** 1999. Las Estreptococosis en los peces. Revista AquaTIC. nº 6. Publicado en : <http://www.revistaaquatic.com>
- ✚ **Gibello, A.,** Blanco, M.M., Domínguez, L., Fernández-Garayzábal, J.F. 2001. Utilización de la PCR para el diagnóstico en ictiopatología. Revista Aquatic nº15. Publicado en: <http://www.revistaaquatic.com>
- ✚ **Giesendorf, B.A.J.,** Quint, W.G.V., Henkens, M.H.C., Stegeman, H., Huf, F.A., Niesters, H.G.M. 1992. Rapid and sensitive detection of *Campylobacter* spp. in chicken products by using the polymerase chain reaction. Appl. Environ. Microbiol. 58: 3804-3808.
- ✚ **Goh, S.H.,** Facklam, R.R., Chang, M., Hill, J.E., Tyrrel, J. G.J., Burns, E.C., Chan, D., He, C., Rahim, T., Shaw, C., Hemmingsen, S.M. 2000. Identification of *Enterococcus* species and phenotypically similar *Lactococcus* and *Vagococcus* species by reverse checkerboard hybridization to chaperonin 60 gene sequences. J. Clin. Microbiol. 38: 3953-3954.
- ✚ **Goyache, J.,** Vela, A.I., Gibello, A., Blanco, M.M., Briones, V., González, S., Téllez, S., Ballesteros, C., Domínguez, L., Fernández-Garayzábal, J.F. 2001. *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* infection in waterfowl: first confirmation in animals. Emerg. Infect. Dis. 7: 884-886.
- ✚ **Hancock, J.D.** 1992. Contribution nº 92-316A. Kansas Agriculture Expansion Station. Published in Proceedings of the Distillers Feed Conference. Cincinnati, Ohio. Vol 47, pp 33-49.
- ✚ **Hardie, J.M.,** Whiley, R.A. 1997. Classification and overview of the genera *Streptococcus* and *Enterococcus*. J. Appl. Microbiol. Symp. Suppl. 83:1-11.
- ✚ **Hatzikamari, M.,** Litopoulou-Tzanetaki, E., Tzanetakis, N. 1999. Microbial characteristics of Anevato: a traditional Greek cheese. J. Appl. Microbiol. 87: 595-601.
- ✚ **Hauge, S.** 1969. Fish meal and bacteriological problems in that product. Nord. Vet. Med. 21: 46-48.

- ✚ **Hernández, J.**, Alonso, J.L., Fayos, A., Amoros, I., Owen, R.J. 1995. Development of a PCR assay combined with a short enrichment culture for detection of *Campylobacter jejuni* in estuarine surface waters. FEMS Microbiology Letters. 127: 201-206.
- ✚ **Holm, C.**, Meeks-Wagner, D.W., Fangman, W.L., Botstein, D. 1986. A rapid, efficient method for isolating DNA from yeast. Gene. 42:169-173.
- ✚ **Holzapfel, W.H.**, Geisen, R., Schillinger, U. 1995. Biological preservation of foods with reference to protective cultures, bacteriocins and food-grade enzymes. Int. J. Food. Microbiol. 24: 343-362.
- ✚ **Hoshina, T.**, Sano, T., Morimoto, Y. 1958. An epidemic disease affecting rainbow trout in Japan. J. Tokyo Univ. Fish. 42: 35-46.
- ✚ **Hurvitz, A.**, Bercovier, H., Van Rijn, J. 1997. Effect of ammonia on the survival and the immune response of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) vaccinated against *Streptococcus iniae*. Fish Shellfish Immunol. 7: 45-53.
- ✚ **IFFO.** 2005. (International Fish Meal and Fish Oil Organization). <http://www.iffonet.net>.
- ✚ **Iglesias, J.**, Sánchez, F.J., Otero, J.J., Moxica, C. 2000. Culture of Octopus (*Octopus vulgaris*, Cuvier): present knowledge, problems and perspectives. Cah. Options. Mediterr. 47: 313-321.
- ✚ **Itami, T.**, Kondo, M., Sukanuma, A., Abe, T., Nakagawa, A., Suzuki, N., Takahashi, Y. 1996. Enhancement of resistance against *Enterococcus seriolicida* infection in yellowtail, *Seriola quinqueradiata* by oral administration of peptidoglycan derived from *Bifidobacterium termophilum*. J. Fish Dis. 19: 185-187.
- ✚ **Itano, T.**, Kawakami, H., Kono, T., Sakai, M. 2006. Experimental induction of nocardiosis in yellowtail, *Seriola quinqueradiata* Temminck and Schlegel by artificial challenge. J. Fish. Dis. 29: 529-34.
- ✚ **Ivanek, R.**, Grohm, Y.T., Wiedmann, M., Wells, M.T. 2004. Mathematical model of *Listeria monocytogenes* cross-contamination in a fish processing plant. J. Food. Prot. 67: 2688-2697.
- ✚ **Jack, R.W.**, Tagg, J.R., Ray, B. 1995. Bacteriocins of Gram positive bacteria. Microbiological rev. 59: 171-200.

- ✚ **JACUMAR.** 2007. (Junta Asesora de Cultivos Marinos)
<http://www.mapa.es/es/pesca/pags/jacumar/jacumar.htm>
- ✚ **James, P.R.,** Hardman, S., Patterson, D. 2000. Osteomyelitis and possible endocarditis secondary to *Lactococcus garvieae*: a first case report. Postgrad. Med. J. 76: 301-303.
- ✚ **Kang, S.H.,** Shin, G.W., Shin, Y., Palaksha, K.J., Kim, Y., Yang, H.H., Lee, E.Y., Suh, E.H., Huh, N.E., Ju, O.M., Jung, T.S. 2004. Experimental evaluation of pathogenicity of *Lactococcus garvieae* in black rockfish (*Sebastes schlegeli*). J. Vet. Sci. 5: 387-390.
- ✚ **Katao, H.** 1982. Erithromycin: the application to streptococcal infections in yellowtails. Fish Pathol. 17: 77-82.
- ✚ **Kawahara, E.,** Kusuda, R. 1987. Direct fluorescent antibody technique for diagnosis of bacterial diseases in eel. Nippon Suisan Gakkaishi. 53: 395-399.
- ✚ **Kawamura, Y.,** Itoh, Y., Mishima, N., Ohkusu, K., Kasai, H., Ezaki, T. 2005. High genetic similarity of *Streptococcus agalactiae* and *Streptococcus difficilis*: *S. difficilis* Eldar et al. 1995 is a later synonym of *S. agalactiae* Lehman and Neumann 1896 (Approved lists 1980). Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 55: 961-965.
- ✚ **Kawanishi, M.,** Kojima, A., Ishihara, H., Kijima, M., Takahashi, T., Suzuki, S., Yamura. 2005. Drug resistance and pulsed-field gel electrophoresis patterns of *Lactococcus garvieae* isolates from culture *Seriola* (yellowtail, amberjack and Kingfish) in Japan. Lett. Appl. Microbiol., 40: 322-328.
- ✚ **Kawanishi, M.,** Yoshida, T., Yagashiro, S., Kijima, M., Yagyu, K., Nakai, T., Murakami, M., Morita, H., Suzuki, S. 2006. Differences between *Lactococcus garvieae* isolated from the genus *Seriola* in Japan and those isolated from other animals (trout, terrestrial animals from Europe) with regard to pathogenicity, phage susceptibility and genetic characterization. J. Appl. Microbiol. 101: 496-504.
- ✚ **Kawanishi, M.,** Yoshida, T., Kijima, M., Yagyu, K., Nakai, T., Okada, S., Endo, A., Murakami, M., Suzuki, S., Morita, H. 2007. Characterization of *Lactococcus garvieae* isolated from radish and broccoli sprouts that exhibited a KG (+) phenotype, lack of virulence and absence of a capsule. Lett. Appl. Microbiol. 44: 481-487.

- ✚ **Kibbey, H.J.,** Hagedorn, C., Mc Coy, E.L. 1978. Use of fecal streptococci as indicators of pollution in soil. *Appl. Environ. Microbiol.* 35: 711-717.
- ✚ **Kim, J.,** Demeke, T., Clear, R.M., Patrick, S.K. 2006. Simultaneous detection by PCR of *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* and *Salmonella typhimurium* in artificially inoculated wheat grain. *Int. J. Food. Microbiol.* 111: 21-25.
- ✚ **Kitao, T.,** Aoki, T., Iwata, K. 1979. Epidemiological study on streptococcosis of cultured yellowtail. Distribution of *Streptococcus* spp. in sea water and muds around yellowtails farms. *Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish.* 45: 567-572.
- ✚ **Kitao, T.** 1982. The methods for detection of *Streptococcus* sp. causative bacteria of streptococcal disease of cultured yellowtail (*Seriola quinqueradiata*). *Fish Pathol.* 17: 17-26.
- ✚ **Kitao, T.** 1993a. Pasteurellosis. Publicado en Inglis, V., Roberts, R.J., Bromage, N.R. (ed.), *Bacterial diseases of fish.* Blackwell Scientific Publication. Oxford, pp 159-165.
- ✚ **Kitao, T.** 1993b. Streptococcal infection. Publicado en Inglis, V., Roberts, R.J., Bromage, N.R. (ed), *Bacterial diseases of fish.* Blackwell Scientific Publication. Oxford, pp 196-210.
- ✚ **Klaenhammer, T.R.** 1988. Bacteriocins of lactic acid bacteria. *Biochimie.* 70: 337-49.
- ✚ **Klijin, N.,** Weerkamp, A.H., de Vos, W.M. 1995. Detection and characterization of lactose-utilizing *Lactococcus* spp. in natural ecosystems. *Appl. Environ. Microbiol.* 61: 788-792.
- ✚ **Koort, J.,** Coenye, T., Bañadme, P., Björkroth, J. 2006. *Streptococcus parauberis* associated with modified atmosphere packaged broiler meat products and air samples from a poultry meat processing plant. *Int. J. Food. Microbiol.* 106: 318-323.
- ✚ **Kusuda, R.,** Komatsu, I. 1978a. A comparative study of fish pathogenic *Streptococcus* isolated from saltwater and freshwater fishes. *Bull. Jap. Soc. Scientific. Fisheries.* 44: 1073-1078.
- ✚ **Kusuda, R.,** Kimura, H. 1978b. Studies on the pathogenesis of streptococcal infection in cultured yellowtail *Seriola* spp: the fate of *Streptococcus* sp. *Bacteria after inoculation.* *J. Fish. Dis.* 1: 109-114.

- ✚ **Kusuda, R.** y Kawai, K. 1982. Characteristics of *Streptococcus* sp. pathogenic to yellowtail. *Fish Pathol.* 17:11-16.
- ✚ **Kusuda, R.**, Hamaguchi, M. 1989. Determination of the median lethal dose of cell-associated toxins from *Streptococcus* sp. In the yellowtail. *Bull. Eur. Ass. Fish Pathol.* 9: 117-118.
- ✚ **Kusuda, R.**, Salati, F. 1999. *Enterococcus seriolicida* and *Streptococcus iniae*. *Fish diseases and disorders. Vol 3. Viral, Bacterial and Fungal Infections.* Woo, P.T.K. y Bruno, D.W. (eds). CAB International Publishing, Wallingford, U.K.
- ✚ **Kusuda, R.**, Kawai, T., Toyoshima, T., Komatsu, I. 1976. A new pathogenic bacterium belonging to the genus *Streptococcus*, isolated from an epizootic of cultured yellowtail. *Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish.* 42: 1345-1352.
- ✚ **Kusuda, K.**, Kawai, K., Salati, F., Banner, C.R., Fryer, J.L. 1991. *Enterococcus seriolicida* sp. nov., a fish pathogen. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 41: 406-409.
- ✚ **Lampel, K.**, Orlandi, P., Korneagy, L. 2000. Improved template preparation for PCR-based assays for detection of food-borne bacterial pathogens. *Appl. Environ. Microbiol.* 66:4539-4542.
- ✚ **Lantz, P.G.**, Knutsson, R., Blixt, Y., Al-Soud, W.A., Borch, E., Radström, P. 1998. Detection of pathogenic *Yersinia enterocolitica* in enrichment media and pork by a multiplex PCR: a study of simple preparation and PCR-inhibitory components. *Int. J. Food. Microbiol.* 45: 93-105.
- ✚ **Lantz, P.G.**, Abu Al-Soud, W., Knutsson, R., Halm-Hägerdal, B., Rådström, P. 2000. Biotechnical use of polymerase chain reaction for microbiological analysis of biological samples. *Biotechnol. Annu. Rev.* 5: 87-130.
- ✚ **Lau, S.K.**, Woo, P.C., Tse, H., Leung, K.W., Wong, S.S., Yuen, K.Y. 2003. Invasive *Streptococcus iniae* infections outside North America. *J. Clin. Microbiol.* 41: 1004-1009.
- ✚ **Lázaro Cantalejo, Carlos.** 2001. Línea de producción de piensos extrusionados para acuicultura. Proyecto fin de Carrera. Ingeniería Química. Universidad de Valladolid.
- ✚ **Lázaro Cantalejo, Raquel.** 2007. Dibaq Diproteg S.A. Comunicación personal.
- ✚ **Lee, D.C.**, Jee, J.I., Park, C.I., Park, S.I. 2001. The study on the causal agent of streptococcosis (*Lactococcus garvieae*), isolated from cultured marine fish. *J. Fish. Pathol.* 14: 71-80.

- # **Lehane, L.,** Rawlin, G.T. 2000. Topically acquired bacterial zoonoses from fish: a review. *Med. J. Aust.* 173: 256-259.
- # **Löfström, C.,** Knuttson, R., Axelsson, C.E., Radström, P. 2004. Rapid and specific detection of *Salmonella* spp. in animal feed samples by PCR after culture enrichment. *Appl. Environ. Microbiol.* 70: 69-75.
- # **Maciorowski, K.G.,** Pillai, S.D., Jones, F.T., Ricke, S.C. 2005. Polymerase chain reaction detection of foodborne *Salmonella* spp. in animal feeds. *Crit. Rev. Microbiol.* 31: 45-53.
- # **Malorny, B.,** Tassios, P.T., Radström, P., Cook, N., Wagner, M., Hoorfar, J. 2003. Standarization of diagnostic PCR for the detection of foodborne pathogens. *Int. J. Food. Microbiol.* 83: 39-48.
- # **Mas Álvarez, Blanca.** 2007. Comunicación personal y apuntes de la asignatura troncal *Producción Animal e Higiene Veterinaria* (3º de Licenciatura en Veterinaria). Curso Académico 2006/07.
- # **Mata, A.I.,** Gibello, A., Casamayor, A., Blanco, M.M., Domínguez, L., Fernández-Garayzábal, J.F. 2004a. Multiplex PCR assay for detection of bacterial pathogens associated with warm-water Streptococcosis in Fish. *Appl. Environ. Microbiol.* 70: 3183-3187.
- # **Mata, A.I.,** Blanco, M.M., Domínguez, L., Fernandez-Garayzabal, J.F., Gibello, A. 2004b. Development of a PCR assay for *Streptococcus iniae* based on the lactate oxidase (*lctO*) gene with potential diagnostic value. *Vet. Microbiol.* 101: 109-16.
- # **Mata, A.I.,** Gibello, A., Tejedor, J.L., Blanco, M.M., Domínguez, L., Fernández Garayzábal, J.F. 2004c. Effectiveness of a Multiplex PCR assay for the detection in fish meal of bacteria involved in warm-water streptococcosis. *Aquaculture Europe. Biotechnologies for Quality.* Barcelona.
- # **Maura i Rayó, S.** 1990. Los piensos en acuicultura. *Mundo Ganadero- 3:* 58-60.
- # **McDonald, W.L.,** Fry, B.N., Deighton, M.A. 2005. Identification of *Streptococcus* spp. causing bovine mastitis by PCR-RFLP of 16S-23S ribosomal DNA. *Vet. Microbiol.* 111: 241-246.
- # **McIntosh, D.,** Austin, B. 1990. Recovery of cell wall deficient forms (L-forms) of the fish pathogens *Aeromonas salmonicida* and *Yersinia ruckeri*. *Syst. Appl. Microbio.* 13: 378-381.

- ✚ **McIntosh, D.,** Austin, B. 1991. The role of cell-wall deficient bacteria (L-forms; sphaeroplasts) in fish diseases. J. Appl. Bacteriol. Symposium Supplement. 70: 1-7.

- ✚ **McIntosh, D.,** Meaden, G., Austin, B. 1996. A simplified PCR-based method for the detection of *Renibacterium salmoninarum* utilising preparations of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum) lymphocytes. Appl. Environ. Microbiol. 62: 3929-2932.

- ✚ **Mead PS y Griffin PM.** 1998. *Escherichia coli* O157:H7. Lancet, 352: 1207-12

- ✚ **Michel, C.,** Pelletier, C., Boussaha, M., Douet, D.G., Lautraite, A., Tailliez, P. 2007. Diversity of lactic acid bacteria associated with fish and the fish farm environment, established by amplified rRNA gene restriction analysis. Appl. Environ Microbiol. 73: 2947-55.

- ✚ **Miettinen, H.,** Wirtanem, G., 2006. Ecology of *Listeria* spp. in fish farm and molecular typing of *Listeria monocytogenes* from fish farming and processing companies. Int. J. Food. Microbiol. 112: 138-146.

- ✚ **Minami, T.** 1979. *Streptococcus* sp. pathogenic to cultured yellowtail, isolated from fishes for diets. Fish. Pathol. 14: 15-19.

- ✚ **Mofredj, A.,** Baraka, D., Cadranel, J.F., LeMaitre, P., Kloeti, G., Dumont, J.L. 2000. *Lactococcus garvieae* septicaemia with liver abscess in an immunosupressed patient. Am. J. Med. 109: 513-514.

- ✚ **Moreno, M.A.,** Fernández-Garayzábal, J.F., Doménech, A., Pascual, C., García, J.A., Cutuli, M.T., Collins, M.D. y Domínguez, L. 1995. Utilidad de la técnica de secuenciación del ARN ribosomal para el diagnóstico de enfermedades bacterianas de peces. XV Congreso de la Sociedad Española de Microbiología. Madrid. pp. 103.

- ✚ **Morgan, S.,** Rossand, R.P., Hill, C. 1995. Bacteriolytic activity caused by the presence of a novel lactococcal plasmid encoding lactococcin A, B and M. Appl. Environ. Microbiol. 61: 2995-3001.

- ✚ **Morris, G.K.,** Martin, W.T., Shelton, W.H., Wells, J.G., Brachman, P.S. 1970. *Salmonella* in fish meal plants: relative amounts of contamination at various stages of processing and a method of control. Appl. Microbiol. 19: 401-408.

- ✚ **Morrison, A.S.** 1992. Screening in chronic disease. Second edition. New York: Oxford University Press.
- ✚ **Murray, B.B.** 1990. The life and times of the *Enterococcus*. Clin. Microbiol. Rev. 3: 46-65.
- ✚ **Múzquiz, J.L.,** Royo, F.M., Ortega, C., de Blas, I., Ruiz, I., Alonso, J.L. 1999. Pathogenicity of Streptococcosis in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): dependence on age of diseased fish. Bull. Eur. Ass. Fish. Pathol. 19: 114-119.
- ✚ **Nakai, T.,** Sugimoto, R., Park, K.H., Matsuoka, S., Mori, K, Nishioka, T, Maruyama, K. 1999. Protective effects of bacteriophage on experimental *Lactococcus garvieae* infection in yellowtail. Dis. Aquat. Org. 37: 33-41.
- ✚ **Naylor, R.L.,** Goldberg, R.J., Primavera, J.H., Kautsky, N., Beveridge, M.C., Clay, J., Folke, C., Lubchenco, J., Mooney, H., Troell, M. 2000. Effect of aquaculture on world fish supplies. Nature. 405: 1017-1024.
- ✚ **Nesse, L.L.,** Nordby, K., Heir, E., Bergsjoe, B., Vardund, T., Nygaard, H., Holstad, G. 2003. Molecular analyses of *Salmonella enterica* isolates from fish feed factories and fish feed ingredients. Appl. Environ. Microbiol. 69: 1075-1081.
- ✚ **Nesse, L.L.,** Refsum, T., Heir, E., Nordby, K., Vardund, T., Holstad, G. 2005. Molecular epidemiology of *Salmonella* spp. isolates from gulls, fish meal factories, feed factories, animals and humans in Norway based on pulsed field gel electrophoresis. Epidemiol. Infect. 133: 53-58.
- ✚ **Nettles, C.G.,** Barefoot, S.F. 1993. Biochemical and genetic characteristics of bacteriocins of food-associated lactic acid bacteria. J. Food. Protection. 56: 338-356.
- ✚ **New, M.B.,** 1987. Aquaculture diets of post larval marine fish of the superfamily *Percoïdae*, with special references to sea bass, sea breams, groupers and yellowtail: a review. Kuwait Bull. Marine Sci. 7: 75:151.
- ✚ **Newman S.G.** 1993. Bacterial vaccines for fish. Annual Rev. of Fish Dis.3: 145-185.
- ✚ **Nieto, J.M.,** Devesa, S., Quiroga, I. y Toranzo, A.E. 1995. Pathology of *Enterococcus* sp. infection in farmed turbot, *Scophthalmus maximus* L. J. Fish Dis. 18:21-30.

- ✚ **Normativa Europea** UNE-EN ISO 6579 de Microbiología de los alimentos para consumo humano y alimentación animal. Método horizontal para la detección de *Salmonella* spp. (ISO 6579:2002).
- ✚ **Ooshima, T.,** Kaneda, S., Ise, N., Okada, M., Tagaki, H. 1997. Studies on tobicillin, a new antibiotic drug for enterococcosis in yellowtail, *Seriola quinqueradiata*. Fish. Sci. 63: 741-745.
- ✚ **Ooyama T.,** Kera, A., Okada, T., Inglis, V., Yoshida, T. 1999. The protective immune response of yellowtail *Seriola quinqueradiata* to the bacterial fish pathogen *Lactococcus garvieae*. Dis. Aquat. Org. 37: 121-126.
- ✚ **Padrós, F.,** Marín de Mateo, M., Crespo, S. 1996. I Curso sobre técnicas básicas de diagnóstico patológico en peces. Bellaterra, 13 y 14 de junio. Universidad Autónoma de Barcelona.
- ✚ **Padrós, F.,** Furones, M.D. 2002. Patología bacteriana en piscicultura. Actualidad SEM. 34: 13-21.
- ✚ **Palacios, M.A.,** Zamora, M.J., Vázquez, J., Zamora, E., Duran, A. 1993. Streptococcosis in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) in Spain. Boll. Soc. It. Patol. Ittica. 13: 11-16.
- ✚ **Palmer, C.J.,** Bonilla, G.F., Roll, B., Paszko-Kolva, C., Sangermano, L.R., Fujioka, R.S. 1995. Detection of *Legionella* species in reclaimed water and air with the EnviroAmp *Legionella* kit and direct antibody staining. Appl. Environ. Microbiol. 61: 407-412.
- ✚ **Parente, E.,** Rota, M.A., Riciardi, A., Clementi, F. 1997. Characterization of natural starter cultures used in the manufacture of Pasta Filata cheese in Basilicata (Southern Italy). Int. Dairy J. 7: 775-783.
- ✚ **Park, K.H.,** Kato, H., Nakai, T., Muroga, K. 1998. Phage typing of *Lactococcus garvieae* (formerly *Enterococcus seriolicida*) a pathogen of cultured yellowtail. Fish Sci. 64: 62-64.
- ✚ **Paul, J.H.,** Jiang, S.Y., Rose, J.B. 1991. Concentration of viruses and dissolved DNA from aquatic environments by vortex flow filtration. Appl. Environ. Microbiol. 57: 2197-2204.
- ✚ **Pereira, F.,** Ravelo, C., Toranzo, A.E., Romalde, J.L. 2004. *Lactococcus garvieae*, an emerging pathogen for the Portuguese trout culture. Bull. Eur. Ass. Fish. Pathol. 24: 174-279.
- ✚ **Pike, I.H.** 1998. Future supplies of fish meal and fish oil: quality requirements for aquaculture. International Aquafeed Directory. pp 39-49.

- ✚ **Pita, S.,** Pértegas, S. 2003. Metodología de la Investigación. Pruebas diagnósticas. Cad. Aten. Primaria. 10:120-124.
- ✚ **Pot, B.,** Devriese, L.A., Ursi, D., Vandamme, P., Haesebrouck, F., Kersters, K. 1996. Phenotypic identification and differentiation of *Lactococcus* strains isolated from animals. Syst. Appl. Microbiol. 19: 213-222.
- ✚ **Prescot JF.** 1993. Lincosamides, Macrolides and Pleuromutilins. Antimicrobial therapy in Veterinary medicine. 2nd Edition.
- ✚ **Prieta, J.,** Doménech, A.M., Fernández-Garayzábal, J.F., Collins, M.D., Rodrigues, U.M., Jones, D., Rodríguez, A., Domínguez, L. 1993. Lactococosis de la trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*). Med. Vet. 10: -367-373.
- ✚ **Promodrou, K.,** Thasitou, P., Haritonidou, E., Tzanetakis, N., Litopoulo-Tzanetaki, E. 2001. Microbiology of "Orinotyri", a ewe's milk cheese from the Greek mountains. Food Microbiol. 18: 319-328.
- ✚ **Pu, Z.Y.,** Dobos, M., Limsowtin, G.K.Y., Powell, I.B. 2002. Integrated polymerase chain reaction-based procedures for the detection and identification of species and subspecies of the Gram-positive bacterial genus *Lactococcus*. J. Appl. Microbiol. 93: 353-361.
- ✚ **Rantsiou, K.,** Urso, R., Iacumin, L., Cantonni, C., Cattaneo, P., Gomi, G., Cocolin, L. 2005. Culture - dependent and independent methods to investigate the microbial ecology of Italian fermented sausages. Appl. Environ. Microbiol. 71: 1977-1986.
- ✚ **Ravelo, C.,** Magariños, B., Toranzo, A.E., Romalde, J.L. 2001. Conventional versus miniaturized systems for the phenotypic characterization of *Lactococcus garvieae* strains. Bull. Eur. Ass. Fish. Pathol. 21: 136-143.
- ✚ **Ravelo, C.,** Magariños, B., López Romalde, S., Toranzo, A.E., Romalde, J.L. 2003. Molecular fingerprinting of fish pathogenic *Lactococcus garvieae* strains by Random Amplified Polymorphic DNA Analysis. 2003. J. Clin. Microbiol. 41: 751-756.
- ✚ **Ravelo, C.,** Magariños, B., Herrero, M.C., Costa, L., Toranzo, A.E., Romalde, J.L. 2005. Use of adjuvanted vaccines to lengthen the protection against lactococosis in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Aquaculture. 251: 153-158.

- ✚ **Reglamento Europeo (CE) N° 1774/2002.** Parlamento Europeo y de Consejo de 3 de octubre de 2002, por el que se establecen normas sanitarias aplicables a los subproductos animales no destinados al consumo humano.
- ✚ **Reichenbach-Klinke H.H.** 1980. Enfermedades de los peces. Editorial Acribia.
- ✚ **Ridley, M.** 1996. Evolution. Blackwell Science Inc. Cambridge, Mass. 719 pp.
- ✚ **Roach, J.C., Levett, P.N., Lavoie, M.C.** 2006. Identification of *Streptococcus iniae* by commercial bacterial identification systems. J. Microbiol Methods. 67: 20-6
- ✚ **Robinson, J.A., Meyer, F.P.** 1966. Streptococcal fish pathogen. J. Bacterial. 92: 512
- ✚ **Rokey, G.** 1995. Tecnología de la extrusión e implicaciones nutricionales. XI Curso de especialización FEDNA. Barcelona.
- ✚ **Romalde, J.L., Magariños, B., Nuñez, S., Barja, J.L., Toranzo, A.E.** 1996. Host range susceptibility of *Enterococcus sp.* strains isolated from diseased turbot: possible routes of infection. Appl. Environ. Microbiol. 62: 607-611
- ✚ **Romalde, J.L., Luzardo-Alvarez, A., Ravelo, C., Toranzo, A.E., Blanco-Méndez, J.** 2004. Oral immunization using alginate microparticles as a useful strategy for booster vaccination against fish lacococcosis. Aquaculture. 236: 119:129.
- ✚ **Romano, L.A., Mejía, J.** 2003. Infección por *Streptococcus iniae*: una enfermedad emergente que afecta a peces de cultivo y a humanos. Revista AquaTIC. 18: 25-32
- ✚ **Ross, B.C., Marino, L., Opendiaso, F., Edwards, R., Robins-Browne, R.M.** 1997. Development of a PCR for the rapid diagnosis of infections with *Mycobacterium ulcerans*. J. Clin. Microbiol. 35: 1696-1700.
- ✚ **Rossmannith, P., Krassnig, M., Wagner, M., Hein, I.** 2006. Detection of *Listeria monocytogenes* in food using a combined enrichment /real-time PCR method targeting the prfA gene. Res. Microbiol. 157: 763-771.
- ✚ **Sandbol, P.** 1993. FEDNA Nuevas tecnologías en la producción de harina de pescado para piensos. Implicaciones sobre la evaluación de la calidad. IX Curso de especialización FEDNA. Barcelona, 8 y 9 de Noviembre.

- ✚ **Saubusse, M.,** Millet, L., Delbes, C., Callon, C., Montel, M.C. 2007. Application of Single Strand Conformation Polymorphism - PCR method for distinguishing cheese bacterial communities that inhibit *Listeria monocytogenes*. *Int. J. Food. Microbiol.* 116: 126-135.
- ✚ **Sayer, G.,** Layton, A. 1990. Environmental application of nucleic acid hybridisation. *Annu. Rev. Microbiol.* 44: 625-648.
- ✚ **Schäperclaus, W.** 1992. Diseases caused by pathogens. En *Fish Diseases*, vol 1. Schäperclaus, W., Kulow, H. y Schreckenbach, K. (ed.). A.A. Balkema, Rotterdam, Holanda. pp, 578-584.
- ✚ **Scheideler, S.E.** 1995. *Feed Management* 46 1: 26.
- ✚ **Schleifer, K.H.,** Kraus, J., Dvorak, C., Kilpper-Bälz, R., Collins, M.D. y Fischer, W. 1985. Transfer of *Streptococcus lactis* and related streptococci to the genus *Lactococcus* gen. nov. *Syst. Appl. Microbiol.* 6: 183-195.
- ✚ **Schmidtke, L.M.,** Carson, J. 1999. Induction, characterization and pathogenicity in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum) of *Lactococcus garvieae* L-forms. *Vet. Microbiol.* 69: 287-300.
- ✚ **Schwartz, D. C.,** Cantor, C. R. 1984. Separation of yeast chromosome-sized DNAs by pulsed field gradient gel electrophoresis. *Cell* 37 : 67-75.
- ✚ **Sharma, V.K.,** Carlson, S.A. 2000. Simultaneous detection of *Salmonella* strains and *Escherichia coli* 0157:H7 with fluorogenic PCR and single enrichment broth culture. *Appl. Environ. Microbiol.* 66: 5472-5476.
- ✚ **Shiomitsu, K.** 1982. Isolation of *Streptococcus* sp. from the brain of cultured yellowtail. *Fish Pathol.* 17: 27-31.
- ✚ **Shoemaker, C.A.,** Klesius, P.H., Evans, J.J. 2001. Prevalence of *Streptococcus iniae* in tilapia, hybrid striped bass and channel catfish on commercial fish farms in the United States. *AJVR.* 62: 174-177.
- ✚ **Simon, M.C,** Gray, D.I., Cook, N. 1996. DNA extraction and PCR methods for the detection of *Listeria monocytogenes* in cold-smoked salmon. *Appl. Environ. Microbiol.* 62: 822-824.
- ✚ **Skirrow, M.B.** 1990. *Campylobacter*. *Lancet.* 336: 921-3.

- ✚ **Smalla, K.,** Cresswell, N., Mendoca-Hagler, L.C., Wolters, A., van Elsas, J.D. 1993. Rapid DNA extraction protocol from soil for polymerase chain reaction-mediated amplification. *J. Appl. Bacteriol.* 74: 78-85.

- ✚ **Swaminathan, B.,** Feng, P. 1994. Rapid detection of food-borne pathogenic bacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* 48: 625-648.

- ✚ **Tamanai-Shacoori, Z.,** Jolivet-Gougeon, A., Cormier, M. 1996. Comparison of direct PCR and PCR amplification after DNA extraction for the detection of viable enterotoxigenic *Escherichia coli* in laboratory microcosms. *J. Microbiol. Methods.* 26: 21-26.

- ✚ **Taniguchi, M.** 1982. Influence of food condition on artificial perioral infection of yellowtail streptococcosis. *Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish.* 48: 1721-1723.

- ✚ **Teixeira, L.M.,** Merquior, V.L.C. Vianni, M.C.V. Carvalho, M.G.S., Fracalanza, S.E.L., Steigerwalt, A.G. Brenner, D.J. y Facklam, R.R. 1996. Phenotypic and genotypic characterization of atypical *Lactococcus garvieae* strains isolated from water buffalos with subclinical mastitis and confirmation of *L. garvieae* as a senior subjective synonym of *Enterococcus seriolicida*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 46: 664-668.

- ✚ **Tejedor, J.L.,** Vela, A.I., Gibello, A., Fernández-Garayzabal, J.F., Domínguez, L. 2004. Molecular characterization of new isolates of *Lactococcus garvieae* from different animal sources. *Aquaculture Europe. Biotechnologies for Quality.* Barcelona. pp 221-222.

- ✚ **Tejedor, J.L.,** Gibello, A., Vela, A.I., Fernández-Garayzabal, J.F., Domínguez, L. 2005. Detection of zoonotic bacteria in feedstuff by Multiplex PCR assay. *MedVetNet. Internacional Meeting.* Winchester. (Reino Unido).

- ✚ **Thisted Lambertz, S.,** Ballagi-Pordany, A., Nilsson, A., Norberg, P., Danielsson-Tham, M.L. 1996. A comparison between a PCR method and a conventional culture method for detecting pathogenic *Yersinia enterocolitica* in food. *J. Appl. Bacteriol.* 81: 303-308.

- ✚ **Toranzo, A. E.,** Devesa, S., Heinen, P., Riaza, A., Nuñez, S., Barja, J.L. 1994. Streptococcosis in cultured turbot caused by an *Enterococcus*-like bacterium. *Bull. Eur. Assn. Fish Pathol.* 14: 19-23.

- ✚ **Toze, S.** 1999. PCR and the detection of microbial pathogens in water and wastewater. *Wat. Res.* 33: 3545-3556.

- ✚ **Usui, A.**, 1979. Eel culture. Fishing news books (Ed), Farnham, pp 188.
- ✚ **Vela, A.I.**, Vázquez, J., Gibello, A., Blanco, M.M., Moreno, M.A., Liébana, P., Albendea, C., Alcalá, B., Mendez, A., Domínguez, L., Fernández-Garayzábal, J.F. 2000. Phenotypic and genetic characterization of *Lactococcus garvieae* isolated in Spain from lactococcosis outbreaks and comparison with isolates of the other countries and sources. J. Clin. Microbiol. 38: 3791-3795.
- ✚ **Vendrell, D.**, Balcázar, J.L., Ruiz-Zarzuela, I., de Blas, I., Gironés, O., Múzquiz, J.L. 2006. *Lactococcus garvieae* in fish: A review. Comp. Immun. Microbiol. Infect. Dis. 29: 177-198.
- ✚ **Villani, F.**, Aponte, M., Blaiotta, G., Mauriello, G., Pepe, O., Moschetti, G. 2001. Detection and characterization of a bacteriocin, garviecin L1-5, produced by *Lactococcus garvieae* isolated from raw cow's milk. J. Appl. Microbiol. 90: 430-439.
- ✚ **Vinh, D.C.**, Nichol, K.A., Rand, F., Embil, J.M. 2006. Native-valve bacterial endocarditis caused by *Lactococcus garvieae*. Diagn. Microbiol. Infect. Dis. 56: 91-94.
- ✚ **Walls, I.**, Sheridan, J.J., Welsh, R.W., McDowell, D.A. 1990. Separation of microorganisms from meat and their rapid enumeration using a membrane filtration-epifluorescent microscopy technique. Lett. Appl. Microbiol. 10: 23-26.
- ✚ **Wang, C.Y.**, Shie, H.S., Chen, S.C., Huang, J.P, Hsieh, I.C., Wen, M.S., Lin, F.C., Wu, D. 2007. *Lactococcus garvieae* infections in humans: possible association with aquaculture outbreaks. Int. J. Clin. Pract. 61: 68-73.
- ✚ **Way, J.S.**, Josephson, K.L., Pillai, S.D., Abbaszadegan, M., Gerba, C.P., Pepper, I.L. 1993. Specific detection of *Salmonella* spp. by multiplex polymerase chain reaction. Appl. Environ. Microbiol. 59: 1479-1479.
- ✚ **Welti, J.**, Vergara, F., López-Malo, A. 2000. Minimally processed foods: state of the art and future. En Fito, P., Ortega, E., Barbosa, G. (eds). Food Engineering, Ed. Chapman & Hall. (EU).
- ✚ **Whitehead, T.R.**, Cotta, M.A. 2004. Isolation and identification of hyperammonia producing bacteria from swine manure store pits. Current. Microbiol. 48: 20-26.
- ✚ **Wilson, I.G.** 1997. Inhibition and facilitation of nucleic acid amplification. Appl. Environ. Microbiol. 63: 3741-3751.

- ✚ **Wilson, T., Carson, J.** 2001. Rapid, high-throughput extraction of bacterial genomic DNA from selective - enrichment culture media. *Lett. Appl. Microbiol.* 32: 326-330.
- ✚ **Witham, P.K., Yamashiro, C.T., Livak, K.J., Batt, C.A.** 1996. A PCR-based assay for the detection of *Escherichia coli* Shiga-like toxin genes in ground beef. *Appl. Environ. Microbiol.* 62: 1347-1353.
- ✚ **Wood, H.F., Jacobs, K., McVarty, M.** 1985. *Streptococcus lactis* isolated from a patient with subacute bacterial endocarditis. *Am. J. Med.* 18:245-347.
- ✚ **Yao, J.D.C., Moellering, R.C. Jr.** 1999. Bacterial Agents. Antimicrobial agents and susceptibility testing. *Manual of Clinical Microbiology*. 7th edition. ASM Press. Washington DC.
- ✚ **Yasunaga, N.** 1982. Occurrence of *Streptococcus sp.*, a pathogen of cultured yellowtail, in muscle of sardine for diets. *Fish Pathol.* 17: 195-198.
- ✚ **Yiu, K.H., Siu, C.W., To, K.K.W., Jim, M.H., Lee, K.L.F., Lau, C.P., Tse, H.F.** 2007. A rare cause of infective endocarditis; *Lactococcus garvieae*. *Int. J. Cardiol.* 114: 286-287.
- ✚ **Yoshida, T., Eshima, T., Wada, Y., Yamada, Y., Kakizaki, E., Sakai, M., Kitao, T., Inglis, V.** 1996. Phenotypic variation associated with an anti-phagocytic factor in the bacterial fish pathogen *Enterococcus seriolicida*. *Dis. Aquat. Org.* 25: 81-86.
- ✚ **Zamora, L.M.** 2005. Aislamiento, identificación y conservación de cultivos de bacterias lácticas antagonistas de microbiota contaminante en sangre de matadero. Tesis Doctoral. Universidad de Girona, España.
- ✚ **Zlotkin, A., Eldar, A., Ghittino, C., Bercovier, H.** 1998a. Identification of *Lactococcus garvieae* by PCR. *J. Clin. Microbiol.* 36: 983-985.
- ✚ **Zlotkin, A., Hershko, H., Eldar A.** 1998b. Possible transmission of *Streptococcus iniae* from wild fish to cultured marine fish. *Appl. Environ. Microbiol.* 64: 4065-4067.



José Luis Tejedor nació en Segovia en 1979, ciudad donde terminó sus estudios de bachillerato antes de desplazarse a Madrid. Allí se licenció en Veterinaria, empujado por una fuerte vocación de origen familiar, siendo posteriormente becado por la Universidad Complutense de Madrid para realizar la Tesis Doctoral en los laboratorios VISAVET del Departamento de Sanidad Animal de la Facultad de Veterinaria. Durante esta etapa realizó estancias en el *Center for Fish Diseases* en Corvallis, Oregon (EE.UU.) y en el *Department of Primary Industries Water and Environment* en Launceston, Tasmania (Australia). Su formación predoctoral ha estado orientada principalmente al mundo de la acuicultura, con la puesta a punto de metodologías de control microbiológico en muestras alimentarias, animales y ambientales, así como a la ictiopatología, especialmente referida al estudio de la lactococosis de la trucha arco iris, causada por *Lactococcus garvieae* y que ahora refleja en el presente estudio. Actualmente está integrado en la división de Acuicultura de Dibaq Diproteg S.A., empresa segoviana dedicada a la nutrición y bienestar animal, profesión que compagina con su gran afición al baloncesto y a la música.

