



MASTER OFICIAL EN CULTIVOS MARINOS VI MASTER INTERNACIONAL EN ACUICULTURA

Las Palmas de Gran Canaria, España

2008-2010

PATOGENICIDAD DE *Streptococcus iniae* EN ACUICULTURA

FATIMA EL AAMRI

**TESIS PRESENTADA Y PUBLICAMENTE
DEFENDIDA PARA LA OBTENCION
DEL TITULO DE
MASTER OFICIAL EN CULTIVOS MARINOS**

Las Palmas de Gran Canaria
a 20 de Mayo de 2010



MASTER OFICIAL EN CULTIVOS MARINOS VI MASTER INTERNACIONAL EN ACUICULTURA

Organizado conjuntamente por la Universidad de Las Palmas de Gran Canaria (ULPGC), el Instituto Canario de Ciencias Marinas (Gobierno de Canarias) y el Centro Internacional de Altos Estudios Agronómicos Mediterráneos (CIHEAM), a través del Instituto Agronómico Mediterráneo de Zaragoza (IAMZ)

PATOGENICIDAD DE *Streptococcus iniae* EN ACUICULTURA

FATIMA EL AAMRI

Trabajo realizado en Laboratorio: Enfermedades Infecciosas y Ictiopatología, Instituto Universitario de Sanidad Animal y Seguridad Alimentaria de la Universidad de Las Palmas de Gran Canaria, España, bajo la dirección del Dr. Daniel Padilla Castillo y del Dr. Fernando Real Valcàrcel.

Presentado como requisito parcial para la obtención del Título oficial de Máster Universitario en Cultivos Marinos otorgado por la Universidad de Las Palmas de Gran Canaria y del Diploma de Master of Science en Acuicultura otorgado por el Centro Internacional de Altos Estudios Agronómicos Mediterráneos (CIHEAM).

Director
Daniel Padilla Castillo

Director
Fernando Real Valcàrcel

Fdo: D.....

Fdo: D.....

*Con todo mi corazón
A la memoria de mi Madre
A mi Padre
A mis hermanos por confiar en mí*

Mi mayor agradecimiento a Dr. Daniel Padilla por aceptar el reto de dirigir mi trabajo de investigación, el tiempo que me ha dedicado y enseñarme a disfrutar de él, pero sobre todo, gracias por tu amistad.

Un sincero agradecimiento al Dr. Fernando Real Valcárcel, Este trabajo no hubiera sido posible realizarlo sin su valioso apoyo.

Al Dr. Félix Acosta, por su predisposición permanente en aclarar mis dudas y por sus sustanciales sugerencias durante la redacción de la Tesis, por su amistad.

A Carmen M^a Hernández Cruz por su excelente dirección del Máster

Al Instituto Agronómico Mediterráneo de Zaragoza, por posibilitar mi formación investigadora por la adjudicación de la beca IAMZ.

A Javier Roo por facilitarnos todos los peces que necesitábamos y más.

A todo el personal del ICCM, y en especial a Marisol Izquierdo, la Directora.

A María José Caballero, mi tutora del Máster, gracias por su inestimable ayuda en la parte de Histología, así como por su predisposición permanente e incondicional.

Igualmente agradecer a Dr. José Ramos Vivas por su colaboración en la parte del estudio por inmunofluorescencia.

A todos mis profes, mil gracias porque de alguna manera forman parte de mi elección y de lo que ahora soy.

A mis compañeros del Laboratorio de Enfermedades Infecciosa e Ictiopatología del IUSA, Lita, Judit, Jimena, Valentina, Lorena y Justo por su enorme apoyo, amistad y cariño.

A todos mis amigos, sin excluir a ninguno, pero en especial a María, Islam, Mohamed, Marco, Bruno, Alex y Mauricio, mil gracias por todos los momentos que hemos pasado juntos.

A todos los compañeros del Máster por los buenos momentos que hemos compartido.

Por esto y más... Gracias.

LISTADO DE TABLAS	I
LISTADO DE FIGURAS	II
LISTADO DE ABREVIATURAS	IV
LISTADO DE ESPECIES	VI
RESUMEN	IX
ABSTRACT	X
I.- INTRODUCCIÓN	1
I.1- Importancia de la acuicultura	
I.1.1.- La acuicultura en el mundo	1
I.1.2.- La acuicultura en la Unión Europea	3
I.1.3.- La acuicultura en España	4
I.1.4.- La acuicultura en las Islas Canarias	5
I.2.- Las enfermedades infecciosas en acuicultura	6
I.2.1.- Estreptococias en especies acuáticas.....	7
I.2.2.- El Género <i>Streptococcus</i> como patógeno de peces	9
I.2.3.- <i>Streptococcus iniae</i> en acuicultura.....	12
I.2.4.- Factores de virulencia de <i>Streptococcus iniae</i>	19
I.2.5.- <i>Streptococcus iniae</i> como agente zoonótico	22
I.3.- Técnicas Inmunohistoquímicas frente a infecciones bacterianas en tejidos animales	24
I.4.- Cultivos celulares	25
I.4.1.- Cultivo celular en Ictiopatología.....	27
I.4.2.- La línea celular SAF-1	31
I.4.3.- Invasión y adherencia celular.....	32
I.5.- Objetivos	35
II.- MATERIAL Y MÉTODOS	37
II.1- Métodos microbiológicos generales	37
II.1.1- Identificación del agente causal de la enfermedad	37
II.1.2- Perfil de resistencia antibiótica	37
II.1.3- Mantenimiento y conservación de las cepas.....	38

II.2- Estudios de patogenicidad	38
II.2.1- Animales sometidos a estudio	38
II.2.2- Determinación de la dosis letal 50 (DL ₅₀)	39
II.2.3- Estudio de la infección de curso crónico	40
II.2.4.- Estudio de la experiencia por cohabitación	41
II.2.5- Estudio microbiológico de las experiencias de inoculación	42
II.2.6- Estudio anatomopatológico de las experiencias de inoculación.....	42
II.2.7- Estudio inmunohistoquímico de las experiencias de inoculación	42
II.3.- Experiencias de adherencia e invasión celular	44
II.3.1.-Efecto de la temperatura de crecimiento sobre la adherencia y la internalización/invasión bacteriana	44
II.3.2- Efecto del tiempo de infección en la internalización bacteriana	45
II.3.3- Efecto de la preincubación con antisuero de conejo.....	46
II.3.4- Efecto de la concentración del inóculo en la internalización bacteriana	47
II.3.5- Efecto de la presencia de azúcares en la internalización bacteriana.....	47
II.3.6- Efecto de la incubación a 4°C en la internalización bacteriana	47
II.3.7- Estudio de la tasa de replicación intracelular	48
II.3.8- Controles de invasión	49
II.3.9.- Inmunofluorescencia.....	49
III.- RESULTADOS	52
III.1- Identificación del agente causal del brote natural de enfermedad	52
III.1.1-Descripción del brote natural de enfermedad.....	52
III.1.2-Identificación del agente causal	52
III.1.3-Perfil de resistencia antibiótica.....	54
III.2- Estudios de patogenicidad	57
III.2.1- Determinación de la dosis letal 50 (DL ₅₀)	57
III.2.2- Evaluación de la infección crónica	58
III.2.3- Evaluación de la experiencia por cohabitación	58
III.3.- Estudios histopatológicos e inmunohistoquímicos	59
III.3.1- Estudio histopatológico e inmunohistoquímico de la infección de curso agudo (DL ₅₀)	59
III.3.2- Estudio histopatológico e inmunohistoquímico de la infección de curso crónico	68
III.3.3- Estudio histopatológico e inmunohistoquímico de la experiencia por cohabitación	68

III.4.- Experiencias de adherencia e internalización celular	72
III.4.1.- Efecto de la temperatura de crecimiento sobre la adherencia y la internalización.....	72
III.4.2- Efecto del tiempo de infección en la internalización bacteriana	74
III.4.3- Implicación de la incubación celular a 4°C en la internalización de <i>Streptococcus iniae</i> en la línea celular SAF-1	75
III.4.4- Efecto de la preincubación con antisuero de conejo	76
III.4.5- Efecto de la concentración del inóculo en la internalización bacteriana.....	77
III.4.6- Efecto de la presencia de azúcares en la internalización bacteriana	78
III.4.7- Estudio de la tasa de supervivencia/replicación intracelular.....	79
III.5.- Análisis de la adherencia e internalización intracelular por inmunofluorescencia	80
IV.- DISCUSIÓN	83
IV.1- Identificación del agente causal del brote natural de enfermedad	83
IV.2- Perfil de resistencia antibiótica	86
IV.3- Estudios de patogenicidad	86
IV.2.1- Patogenicidad en el curso agudo de la infección	86
IV.2.2- Patogenicidad en el curso crónico de la infección	88
IV.2.3- Patogenicidad en los ensayos de cohabitación.....	89
IV.4.- Estudios histopatológicos e inmunohistoquímicos	89
IV.4.1- Estudio histopatológico e inmunohistoquímico de la infección de curso agudo (DL ₅₀)	89
IV.4.2- Estudio histopatológico e inmunohistoquímico de la infección de curso crónico	90
IV.4.3- Estudio histopatológico e inmunohistoquímico de la experiencia por cohabitación.....	91
IV.5- Experiencias de adherencia e invasión celular	92
IV.6- Líneas futuras de trabajo	96
V.- CONCLUSIONES	99
VI.- BIBLIOGRAFÍA	100
VI.- PUBLICACIÓN	117

LISTADO DE TABLAS

Tabla 1.- Especies acuáticas donde se ha descrito la infección por <i>Streptococcus iniae</i> ...	14
Tabla 2.- Casos descritos de infección por <i>Streptococcus iniae</i> en humanos y su relación con la especie de pez con la que estuvo en contacto.	23
Tabla 3.- Listado de las principales líneas celulares existentes de peces	28
Tabla 4.-Caracterización fenotípica de la cepa de <i>Streptococcus iniae</i> aislada en bocinegro (<i>Pagrus pagrus</i>) y dorada (<i>Sparus aurata</i>) comparada con la cepa de referencia CIP 102508 de la Colección del Instituto Pasteur mediante bioquímica convencional (conv) y sistema Api 20 Strep (Api)..	54
Tabla 5.- Perfil de resistencia antibiótica de la cepa <i>Streptococcus iniae</i> IUSA-1, comparada con 3 cepas de referencia del Instituto Pasteur.	55
Tabla 6.- Cálculo de la DL ₅₀ en bocinegro (<i>Pagrus pagrus</i>)	56
Tabla 7.- Cálculo de la DL ₅₀ en dorada (<i>Sparus aurata</i>)	57
Tabla 8.- Peces muertos en experiencia de cohabitación	58

LISTADO DE FIGURAS

Figura 1.- Producción acuícola mundial: principales grupos de especies en 2006	2
Figura 2.- Evolución de la producción acuícola de peces en España (2004-2008) y previsión para 2009	4
Figura 3.- Factores de virulencia descritos en <i>Streptococcus iniae</i>	22
Figura 4.- Evolución de la meningitis en bocinegro en función de la dosis inoculada de <i>Streptococcus iniae</i> en la experiencia de DL ₅₀	60
Figura 5.- Múltiples focos de infiltración con macrófagos observados en el riñón anterior y el bazo de bocinegro inoculado con la cepa <i>Streptococcus iniae</i> IUSA-1 en la experiencia de DL ₅₀ (H-E).	61
Figura 6.- Reacción positiva a la técnica de la inmunohistoquímica en sistema nervioso de dorada (x40) inoculada con <i>Streptococcus iniae</i> con una dosis de 10 ⁶ ufc/pez en experiencia de DL ₅₀	62
Figura 7.- Reacción positiva a la técnica de la inmunohistoquímica en el hígado de bocinegro (x40) inoculado con <i>Streptococcus iniae</i> en experiencia de DL ₅₀	63
Figura 8.- Inmunohistoquímica del bazo de bocinegro inoculado con <i>Streptococcus iniae</i> (x40)..	64
Figura 9.- Inmunohistoquímica del riñón anterior de bocinegro inoculado con un dosis 10 ⁶ ufc/pez de <i>Streptococcus iniae</i>	65
Figura 10.- Inmunoreactividad positiva en el corazón de bocinegro inoculado con <i>Streptococcus iniae</i> (x 40)	66
Figura 11.- Histología e inmunohistoquímica de bazo de dorada inoculada en tres ocasiones con 10 ⁵ ufc/pez por <i>Streptococcus iniae</i> en la experiencia de evaluación de la infección en curso crónico 90 días post- inoculación(x100).....	68
Figura 12.- Histología e inmunohistoquímica de bazo de bocinegro en la experiencia de cohabitación con dorada inoculada.....	69

Figura 13.- Inmunoreactividad positiva en bocinegro en cohabitación con bocinegro inoculado con <i>Streptococcus iniae</i> a una dosis de 10^5 ufc/pez.	70
Figura 14.- Efecto de la temperatura de crecimiento bacteriano sobre la adherencia de <i>Streptococcus iniae</i> en la línea celular SAF-1 tras 2 horas de incubación. ..	72
Figura 15.- Efecto de la temperatura de crecimiento bacteriano sobre la internalización de <i>Streptococcus iniae</i> en la línea celular SAF-1 tras 2 horas de incubación	72
Figura 16.- Efecto del tiempo de incubación en la invasión de <i>Streptococcus iniae</i> en la línea celular SAF-1	73
Figura 17.- Tasas de internalización de <i>Streptococcus iniae</i> en SAF-1 incubada a 4°C	74
Figura 18.- Efecto de la preincubación con suero anti- <i>Streptococcus iniae</i> en la internalización en la línea celular SAF-1	75
Figura 19.- Efecto de la concentración del inóculo inicial de <i>Streptococcus iniae</i> en la internalización en la línea celular SAF-1	76
Figura 20.- Efecto del cultivo de <i>Streptococcus iniae</i> con glucosa y manosa en la internalización en la línea celular SAF-1	77
Figura 21.- Replicación intracelular de <i>Streptococcus iniae</i> en línea celular SAF-1	78
Figura 22.- Internalización y adherencia de <i>Streptococcus iniae</i> en SAF-1 por inmunofluorescencia	80

LISTADO DE ABREVIATURAS

ADH: Arginina dihidrolasa

ASK: Línea celular de células defensivas de salmón

BF2: Línea celular de fibroblastos de mojarra de oreja azul

BFP: Proteínas azules fluorescentes

BHIA: Agar infusión cerebro corazón

ufc: Unidades formadoras de colonias

CHSE-214: Línea celular a partir de células embrionarias de salmón real

CIP: Colección del Instituto Pasteur

DL₅₀: Dosis letal 50

DP: Distancia proporcional

ECPs: Productos extracelulares

EPC: Línea celular de epiteloma papuloso de carpa

FHM: Línea celular de células epiteliales de carpita cabezona

g: Gramos

GF: Línea celular de aleta de ronco catire

GFP: Proteínas verdes fluorescentes

GLYG: Glucógeno

G/M: Glucosa/Mannosa

HE: Hematoxilina-Eosina

IHNV: Virus de la necrosis hematopoyética infecciosa

IPRO: Tasa de replicación intracelular

L15: Medio de Leibovitz

LAP: Leucina aminopeptidasa

MAN: Manitol

MEM: Medio mínimo esencial de Eagle

ml: Mililitros

MOI: Multiplicidad de infección

NIP: no incluidos en otra parte

PAL: Fosfatasa alcalina

PBS: Buffer fosfato salino

PBST: Buffer fosfato salino *Tween 20*

RIB: Ribosa

rpm: Revoluciones por minuto
RTG-2: Línea celular de gónada de trucha arcoíris
RTS-11: Línea celular macrofágica
SAF-1: Línea celular de aleta de dorada
SFB: Suero fetal bovino
SH₂: Sulhídrico
SHK: Línea celular de células de riñón anterior de salmón
SNC: Sistema nervioso ventral
Tm: Toneladas métricas
TRE: Trehalosa
TSB: Caldo Triptona de Soja
UI: Unidades Internacionales
VP: *Voges-Proskauer* (piruvato de sodio)
β-GUR: β-glucuronidasa
μg: Microgramos
μl: Microlitros

LISTADO DE ESPECIES

Anguila (*Anguilla anguilla*)

Anjoba (*Pomatomus saltatrix*)

Atún rojo (*Tunnus thynnus thynnus*)

Ayu (*Plecoglossus altivelis*)

Bagre marino (*Arius felis*)

Ballena beluga (*Delphinapterus leucas*)

Ballenas piloto del atlántico norte (*Globicephala melaena*)

Barramundi (*Lates calcarifer*)

Besugo (*Pagellus bogaraveo*)

Bocinegro (*Pagrus pagrus*)

Botete pintado (*Arothron ispidus*)

Brema (*Acanthopagrus australis*)

Carpa (*Cyprinus carpio*)

Carpita dorada (*Crysoleucas Notemigonus*)

Chopa espina (*Lagodon rhomboides*)

Chubb (*Scaridae spp.*)

Corvina (*Argyrosomus regius*)

Corvinata regal (*Cynoscion regalis*)

Corvinón ocelado (*Sciaenops ocellatus*)

Crocka del atlántico (*Micropogonias undulatus*)

Delfin Amazónico (*Inia geoffrensis*)

Dorada (*Sparus aurata*)

Foca común (*Phoca vitulina*)

Foca gris (*Halichoerus grypus*)

Gruñidos (*Haemulidae spp.*)

Híbrido de Tilapia (*T. nilotica x T. aurea*)

Híbridos de lubina estriada (*Morone chrysops x Morone saxatilis*)

Lacha amarilla (*Brevoortia patronus*)

Lebranchos (*Mugil cephalus*)

Lenguado (*Solea senegalensis*)

Lenguado japonés (*Paralichthys olivaceus*)

Lisa escamuda (*Liza klunzingeri*)

Lobo marino (*Arctocephalus pusillus*)

Lubina (*Dicentrarchus labrax*)

Lubina estriada (*Morone saxatilis*)

Marget Negro (*Anisotremus spp.*)

Marsopa común (*Phocoena phocoena*)

Mero jorobado (*Cromileptes altivelis*)

Mero luna creciente (*Variola louti*)

Mero lutria (*Epinephelus tauvina*)

Mojarra de oreja azul (*Leponis macrochirus*)

Pastinaca (Dasyatis sp.)

Pez cola amarilla (*Ocyurus Chrysurus*)

Pez conejo (*Siganus spp.*)

Pez gato (*Ictalurus punctatus*)

Pez lagarto jaspeado (*Synodus variegatus*)

Pez limón (*Seriola dumerili*)

Pez loro (*Sparisoma aurofrenatum*)

Pez ronco de tres bandas (*Pomadasystridens*)

Pez sol verde (*Lepomis cyanellus*)

Pulpo (*Octopus vulgaris*)

Rabirrubia (*Ocyurus chrysurus*)

Rodaballo (*Scophthalmus maximus*)

Ronco catire (*Haemulon sciurus*)

Ronco de tres bandas (*Pomadasys stridens*)

Salmón amago (*Oncorhynchus rhodurus*)

Salmón del atlántico (*Salmo salar*)

Salmón del pacífico (*Oncorhynchus kisutch*)

Salmón real (*Oncorhynchus tshawytscha*)

Salmonete (*Mullus spp.*)

Sardinilla del pánuco (*Fundulus grandis*)

Seriola (*Seriola quinquerodiata*)

Siguro (*Siganus rivulatus*)

Tamboril de manchas blancas (*Arothron hispidus*)

Tilapia del Nilo (*Oreochromis niloticus*)

Trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*)

Trucha común (*Salmo trutta*)

Trucha plateada (*Cynoscion nothus*)

Verrugato croca (*Leiostomus xanthurus*)

RESUMEN

En este trabajo, describimos el primer aislamiento de *Streptococcus iniae* en bocinegro (*Pagrus pagrus*), así como el primer aislamiento de este patógeno en Europa afectando a dorada (*Sparus aurata*). En ambas especies, la enfermedad produjo letargia, anorexia, natación errática, exoftalmia y muerte súbita, con tasas de mortalidad del 25% en bocinegro y del 10% en dorada. A partir de órganos internos, aislamos en cultivo puro cocos gram positivos, β -hemolíticos, catalasa y oxidasa negativo. En la identificación del agente causal de la enfermedad usamos diferentes sistemas de identificación bioquímica, así como la secuenciación parcial del gen 16S ARNr. También llevamos a cabo ensayos de DL₅₀ en bocinegro y dorada para determinar la virulencia de esta cepa, mostrando valores de $1,7 \times 10^4$ ufc/pez y $1,32 \times 10^5$ ufc/pez respectivamente, así como experiencias para la determinación de los efectos del curso crónico de la infección y ensayos de cohabitación. La lesión observada más importante se correspondió con meningoencefalitis e infiltraciones multifocales de macrófagos en el riñón y bazo.

Además, también analizamos la capacidad de esta especie para adherirse e invadir células no fagocíticas de peces mediante ensayos de protección con gentamicina y microscopía de fluorescencia. *Streptococcus iniae* se mostró como una especie con capacidad de invadir este tipo de células, aunque los niveles de internalización variaban entre las diferentes cepas analizadas. Los ensayos de invasión llevados a cabo a 4°C demostraron que el metabolismo celular participa de manera activa en la internalización. A su vez, detectamos bacterias intracelulares viables 3 días postinoculación. Nuestros hallazgos *in vitro* indican que *Streptococcus iniae* es una especie con capacidad de adherirse, invadir y sobrevivir en el interior de la línea celular no fagocítica SAF-1, hecho importante para el posible establecimiento de un estado portador en especies marinas de peces.

ABSTRACT

In this work, we described the first isolation of *Streptococcus iniae* in red porgy, (*Pagrus pagrus*), as well as, the first isolation of this pathogen in Europe affecting gilthead seabream (*Sparus aurata*). In both farmed fish species, the disease showed lethargy, anorexia, abnormal swimming, exophthalmia and sudden death, with mortality rates over 25% in red porgy, and 10% in gilthead seabream. β -hemolytic grampositive cocci, catalase negative and oxidase negative, was isolated in pure culture from internal organs. Conventional and rapid identification systems, and 16S rRNA gene partial sequencing were used to identify the causative agent of the natural disease death. LD₅₀ trials were carried out to show the virulence of this isolated strain in these species, red porgy and gilthead seabream, showing values from 1.7×10^4 cfu/fish and 1.32×10^5 cfu/fish respectively, as well as chronic infection and cohabitation trials. Most prominent lesions were meningoencephalitis and multi focal infiltration of macrophages cells in kidney and spleen.

Gentamicin protection assays and fluorescence microscopy were used to investigate the ability of *Streptococcus iniae* strains to adhere and invade the fish fibroblastic cell line SAF-1 derived from *Sparus aurata*. All strains tested were detected intracellularly, though internalisation levels varied among strains. Experiments carried out at 4°C demonstrated that active cell metabolism are necessary for bacterial internalisation. Intracellular bacteria were detected up to 3 days indicating the possibility that some bacterial cells remain viable inside SAF-1 cells. Our *in vitro* findings indicate that *Streptococcus iniae* are capable of adhering, entering and surviving within the nonphagocytic fibroblastic cell line SAF-1 which may be important for persistence and establishment of a carrier state in marine fish species.

INTRODUCCIÓN



I.- Introducción

I.1- Importancia de la acuicultura

I.1.1.- La acuicultura en el mundo

La producción de alimentos alcanzará un nuevo hito en los próximos años. La acuicultura va a contribuir con la mitad de los productos acuáticos consumidos por la humanidad. Este hecho se alcanzará tras cuatro décadas de continuo crecimiento de la acuicultura, y revela, no sólo la vitalidad de la producción en acuicultura, sino también el desarrollo económico global y los continuos avances en la comercialización y transformación de pescado.

En 2007, año más reciente del que se disponen datos de la FAO, la acuicultura mundial produjo 65,2 millones de Toneladas métricas (Tm) de productos acuáticos, frente a 67,2 millones de Tm de la pesca extractiva. En los dos años que han transcurrido desde 2007 hasta 2009 la producción de acuicultura habrá superado los 67 millones de Tm (APROMAR, 2009).

La producción global de la acuicultura ha crecido de manera muy importante, pasando de 0,6 millones de Tm en 1950 (con un valor de menos de 400.000 euros) a 65,2 millones de Tm en 2007 (con un valor global de 75,6 mil millones de euros).

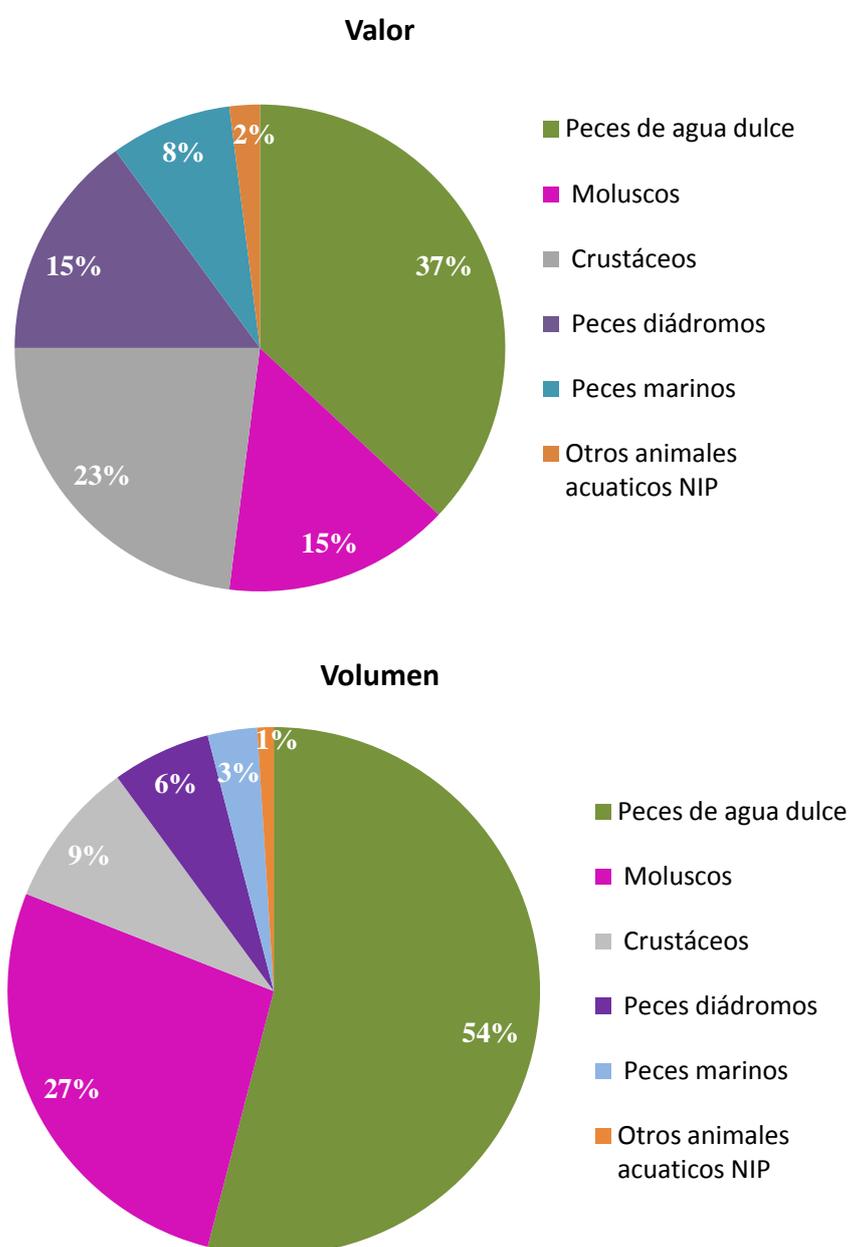
Hasta el pasado año, las producciones de la pesca y de la acuicultura avanzaban sobre las tendencias marcadas a finales del siglo XX, donde la pesca contribuía entre 90 y 95 millones de toneladas al año y la producción acuícola crecía rápidamente (APROMAR, 2009).

La FAO considera que la acuicultura contribuye de manera efectiva a la seguridad alimentaria, a la reducción de la pobreza y al desarrollo económico con mínimo impacto sobre el medio ambiente y con máximos beneficios para la sociedad. El éxito de la acuicultura

moderna se basa en el control sobre la reproducción de las especies, en el mejor conocimiento de su biología, en las innovaciones tecnológicas y en el desarrollo de alimentos específicos.

Casi la mitad (49%) de toda la producción mundial de la acuicultura en 2006, consistió en peces (Figura 1), pero el incremento de la producción ha tenido lugar en todos los grupos de especies.

Figura 1.- Producción acuícola mundial: principales grupos de especies en 2006 (FAO, 2008)



I.1.2.- La acuicultura en la Unión Europea

La acuicultura es una fuente importante de pescado de calidad en Europa. En la Unión Europea, en 2007, la acuicultura representó el 16,3% del volumen de su producción acuática total, lo que supone una reducción en su importancia relativa desde años anteriores en los que llegó a suponer el 18%. La producción total de productos acuáticos (productos de acuicultura+pesca extractiva) en la Unión Europea alcanzó un máximo de 12,1 millones de Tm en 1988. Desde entonces no ha parado de decrecer a un ritmo en torno a un 2% anual, y en 2007 esa cifra global se situó en 7,7 millones de Tm. La producción de acuicultura, aunque creciente, ha sido insuficiente para compensar la caída de la pesca extractiva.

Sin embargo, su importancia no es igual en todos los países de la UE. En algunos, su relevancia económica y social supera ya a la de la pesca extractiva, como también ocurre en España en algunas Comunidades Autónomas. Esta actividad desempeña un papel muy significativo en el desarrollo social y económico de determinadas zonas costeras, además de la preservación de la cultura marítima y pesquera de estas zonas (APROMAR, 2009).

España es el Estado Miembro de la UE con una mayor producción en acuicultura, con 281.266 Tm en 2007 (21,6% del total de la UE), seguido por Francia con 237.653 Tm (18,2%) e Italia con 178.992 Tm (13,7%). En relación con el valor de su producción acuícola, el Reino Unido es el principal estado Miembro con 742 millones de Euros (20,9% del valor total), seguido por Italia y Francia con 605 millones de euros (17,0%) cada uno. El valor de la producción en España fue de 307 millones de euros (8,6% del valor total) (FAO, 2007).

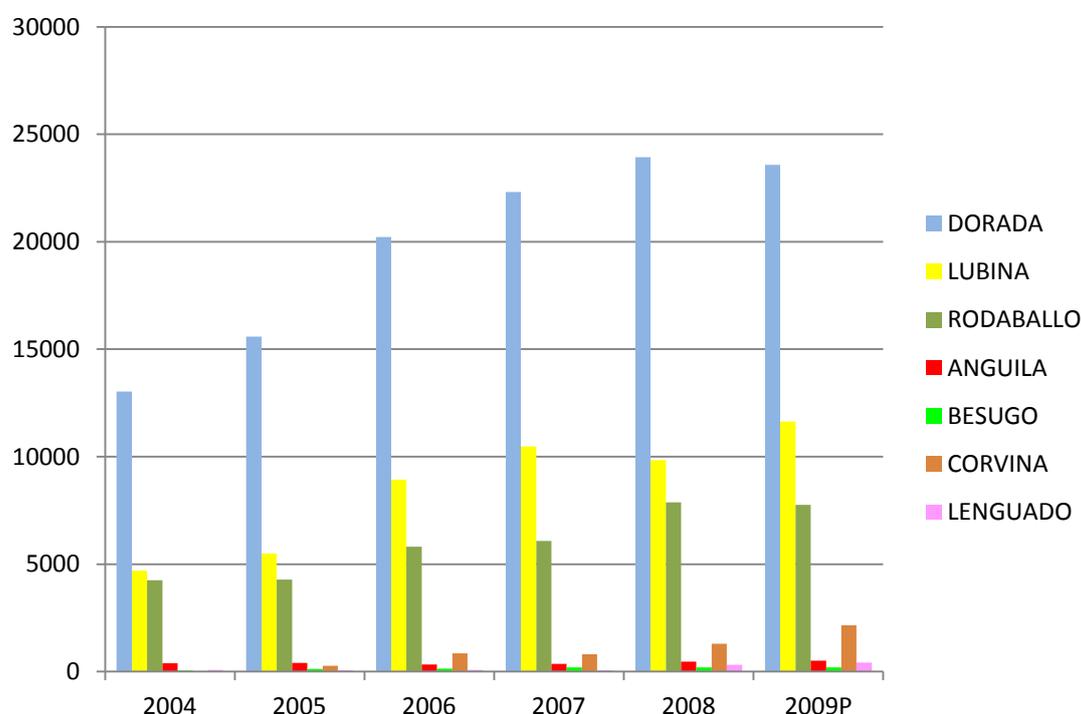
En Europa los principales productos de la acuicultura son los pescados de alto valor comercial y los moluscos. La producción de peces supuso el 48,8% en volumen y el 70,7% en valor de esa producción total, mientras que los moluscos supusieron el 51,2% y 29,3% respectivamente (APROMAR, 2009).

I.1.3.- La acuicultura en España

La acuicultura en España es una de las más importantes de toda la Unión Europea con una producción de 250-300 mil Tm/año, lo que representa el 3% de la producción mundial y el 21,6% de la producción europea (APROMAR, 2009).

Las especies marinas de pescado cultivadas actualmente en España (Figura 2) son: dorada (*Sparus aurata*), rodaballo (*Scophthalmus maximus*), lubina (*Dicentrarchus labrax*), anguila (*Anguilla anguilla*), besugo (*Pagellus bogaraveo*), corvina (*Argyrosomus regius*) y lenguado (*Solea senegalensis*). Otras especies que se encuentran en fase de investigación avanzada son el bocinegro (*Pagrus pagrus*), salmonete (*Mullus spp.*), pulpo (*Octopus vulgaris*) y atún rojo (*Tunnus thynnus*).

Figura 2.- Evolución de la producción acuícola de peces en España (2004-2008) y previsión para 2009 (Tm) (APROMAR, 2009)



I.1.4.- La acuicultura en las Islas Canarias

Las Islas Canarias tienen muy buenas perspectivas de expansión de la acuicultura, debido a las excepcionales condiciones climáticas y la alta calidad de sus aguas costeras. Así, los valores de producción de los últimos años han mostrado un crecimiento continuado de esta actividad, incrementándose de 456 toneladas en 1998 a más de 8.000 toneladas en 2006 (APROMAR, 2007). Las especies más importantes cultivadas en Canarias son la dorada (*Sparus aurata*) y la lubina (*Dicentrarchus labrax*), siendo Canarias el tercer productor español de dorada, con el 20% de la producción nacional, tras Valencia (40%) y Murcia (23%). Con respecto al cultivo de la lubina, Canarias es la Comunidad Autónoma con mayor producción, con el 41% de la producción nacional, presentando Andalucía un 23%, Valencia un 16%, Murcia un 15% y Cataluña un 5% (APROMAR, 2009).

Sin embargo, esta actividad se basa en un número reducido de especies, que está cambiando lentamente con la introducción de pequeñas cantidades de alevines de corvina, lenguado y bocinegro con diferentes resultados (Roo, 2009). Como contrapunto, cabe mencionar que la acuicultura marina en las Islas Canarias sigue dependiendo de la importación de alevines. En 2005, alrededor de 25 millones de alevines fueron importados, y sólo una pequeña cantidad fueron producidos localmente por la incubadora experimental del ICCM (Instituto Canario de Ciencias Marinas). Estas instalaciones producen anualmente alrededor de 250.000 alevines de dorada, 50.000 alevines de bocinegro, y ha comenzado la producción de alevines de corvina (*Argyrosomus regius*) (150.000) y lenguado (*Solea senegalensis*) (28.000) en 2008 (Roo, 2009).

I.2.- Las enfermedades infecciosas en acuicultura

La acuicultura de peces es uno de los sectores de producción de alimentos que tiene un crecimiento anual de casi el 10% desde 1984, en comparación con la producción ganadera (3%) y la pesca extractiva (1,6%). El rápido desarrollo de la acuicultura ha conllevado la aparición de un gran número de enfermedades infectocontagiosas de muy diverso origen, ya que el régimen intensivo del cultivo, unido en muchas ocasiones a unas condiciones higiénico-sanitarias deficitarias, junto al estrés de los animales, favorece la penetración y desarrollo de agentes patógenos, y como secuencia, la aparición de enfermedades infectocontagiosas, que son un freno muy significativo en la producción acuícola, afectando en muchos países al desarrollo económico del sector.

Dentro de las enfermedades infectocontagiosas que afectan a especies marinas de peces, las infecciones bacterianas son las más importantes, ya que pueden persistir durante largos periodos de tiempo, propagándose con gran rapidez y provocando mortalidades en masa. A menudo, aparecen infecciones bacterianas secundarias como consecuencia de infestaciones parasitarias por *Cryptocarion irritans* o *Amyloodinium ocellatum*. Son muchas las infecciones bacterianas que puede afectar a las granjas de acuicultura marina, entre las que destacamos las producidas por los Géneros *Vibrio*, *Aeromonas*, *Photobacterium*, *Tenacibaculum*, *Pseudomonas* y *Listonella*. La mayoría de estos organismos forman parte del medio marino, y sólo, en determinadas circunstancias se desarrollan las enfermedades, como cuando se produce una disminución de los mecanismos defensivos del pez debido al estrés, por un aumento de la densidad poblacional, manipulaciones, factores medioambientales desfavorables, etc.

I.2.1.- Estreptococias en especies acuáticas

Durante la última década, los cocos gram positivos se han convertido en importantes agentes patógenos de especies acuáticas. Brotes de enfermedad epidémicas y esporádicas se han registrado en diferentes partes del mundo, principalmente en Japón (Kitao, 1993), Singapur (Foo y cols., 1985), Australia (Carson y cols., 1993), Israel (Eldar y cols., 1995-a), Italia (Ghittino y Prearo, 1992), España (Toranzo y cols., 1995, Doménech y cols., 1996), Francia (Michel y cols., 1997), Sudáfrica (Braag y Broere, 1986) y los Estados Unidos (Perera y cols., 1994).

La taxonomía modificada desveló que al menos 4 Géneros bacterianos gram positivos, como son los Géneros *Streptococcus*, *Lactococcus*, *Vagococcus* y *Enterococcus*, son los responsables de tales condiciones (Pier y Madin, 1976; Wallbanks y cols., 1990; Doménech y cols., 1996). A pesar del progreso en la taxonomía y el diagnóstico, la base patológica de este grupo de enfermedades no se ha abordado en profundidad, debido a que las infecciones por cocos gram positivos producen lesiones no específicas, tales como hemorragias, congestión y oftalmitis (Kusuda y cols., 1991; Doménech y cols., 1996; Zlotkin y cols., 1998-a y b), y a que existe una difícil diferenciación entre estos cuatro Géneros bacterianos mediante pruebas bioquímicas convencionales clásicas como producción de acetoina (Voges-Proskauer), crecimiento a 10°C y 45°C, producción de SH₂, hidrólisis de hipurato, presencia de la enzima arginina dihidrolasa y pirrolidonil arilamidasa (Toranzo y cols., 1995).

Debido a esto, actualmente el término estreptococia se considera como un complejo de enfermedades similares causadas por diferentes géneros y especies capaces de inducir daño nervioso central, con exoftalmia supurativa "*pop-eye*" y meningoencefalitis, por lo que engloba a las enfermedades producidas por los Géneros *Streptococcus*, *Lactococcus*, *Vagococcus* y *Enterococcus*.

Lactococcus garvieae es un importante patógeno en acuicultura capaz de infectar tanto a especies de peces continentales como marinos (Austin y Austin, 1999), causando importantes brotes de enfermedad en Italia, España y Francia, y en menor medida, Reino Unido y Australia. Por otro lado, *Vagococcus salmoninarum* es otro importante agente patógeno que afecta principalmente a salmónidos (Wallbanks y cols., 1990).

Sin embargo, gracias al avance de las técnicas taxonómicas y a la aplicación de procedimientos genético-moleculares como la hibridación y la secuenciación del gen 16S RNA, se logró clarificar en cierta medida la posición taxonómica de los diferentes agentes etiológicos de las estreptococias en especies acuáticas (Romalde y Toranzo, 1999).

Infecciones por especies del Género *Streptococcus* se han descrito como causa de morbilidad significativa y mortalidad en mamíferos marinos, como las producidas por *Streptococcus equis* en ballenas piloto del atlántico norte (*Globicephala melaena*) (Higgins y cols., 1980), *Streptococcus mitis* en ballenas beluga (*Delphinapterus leucas*) (Buck y cols., 1989), *Streptococcus phocae* en foca común (*Phoca vitulina*) (Sindermann y cols., 1994), foca gris (*Halichoerus grypus*) (Skaar y cols., 1994) y lobos marinos (*Arctocephalus pusillus*) (Henton y cols., 1999), *Streptococcus dysgalactiae* subsp. *dysgalactiae* en marsopa común (*Phocoena phocoena*) (Swenshon y cols., 1998), *Streptococcus zooepidemicus* y varias especies de estreptococos β -hemolíticos en delfines del Género *Tursiops* (Dunn y cols., 2001), *Streptococcus halichoeri* y *Streptococcus marimammalium* en focas grises (Lawson y cols., 2004 y 2005), así como *Streptococcus iniae* en delfines en cautividad del río Amazonas (*Inia geoffrensis*) (Pier y Madin, 1976; Bonar y Wagner, 2003).

I.2.2.- El Género *Streptococcus* como patógeno de peces

Tradicionalmente, la clasificación de las diferentes especies integrantes del Género *Streptococcus* se ha realizado por criterios hemolíticos y serológicos. Este último está determinado por el tipo de polisacárido C presente en la pared celular del microorganismo, denominado antígeno de Lancefield. Estos antígenos, permiten la clasificación de las diferentes especies del Género *Streptococcus* en los grupos A, B, C, D, F, G y otros grupos aislados con menor frecuencia. Algunos de los grupos tienen una sola especie, como por ejemplo el grupo A que incluye únicamente la especie *Streptococcus pyogenes*, y por lo tanto, el término *Streptococcus* grupo A y *S. pyogenes* se refiere al mismo microorganismo y en general estos nombres se usan en forma intercambiable.

Lo mismo ocurre con el grupo B el cuál contiene sólo la especie *S. agalactiae*. Los otros grupos serológicos incluyen un número variable de especies. Se han descubierto especies de *Streptococcus* que no producen hemólisis, pero sí poseen polisacárido C, y además, que cepas α hemolíticas de diferentes especies de estreptococos pueden compartir el mismo grupo antigénico.

Los estreptococos han experimentado varios cambios taxonómicos en las dos últimas décadas, y así, por ejemplo, los *Enterococcus* que habían sido considerados estreptococos del grupo D, son ahora considerados un género aparte, y los estreptococos del grupo C y G aislados de humanos, están clasificados en una misma subespecie, *S. dysgalactiae* subsp. *equisimilis*.

La industria de la acuicultura, tanto marina como continental, ha sufrido enormes pérdidas económicas por diversos brotes de enfermedad causados por diversas especies de *Streptococcus*, como *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus dysgalactiae*, *Streptococcus parauberis*, *Streptococcus phocae* y *Streptococcus iniae*.

La primera estreptococia en peces se registró en 1957, afectando a trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*) cultivada en Japón (Hoshina y cols., 1958). Desde entonces, muchas otras especies de peces se han mostrado susceptibles a la infección por estreptococos. La estreptococia se considera una enfermedad re-emergente que afecta a una gran variedad de especies de peces, tanto cultivados como salvajes en todo el mundo (Kitao, 1993; Bercovier y cols., 1997; Romalde y Toranzo, 1999 y 2002). Las especies del Género *Streptococcus* más importantes descritas en peces son las siguientes:

- *Streptococcus agalactiae*: Se ha aislado de numerosas especies de peces en brotes naturales de enfermedad, y ha demostrado su patogenicidad en muchas otras de manera experimental. Una de las primeras descripciones de este agente patógeno en peces se remonta a 1966, cuando se describe un brote natural de enfermedad en carpita dorada (*Crysoleucas Notemigonus*) (Robinson y Meyer, 1966). Años más tarde, se describieron sucesivas epizootias a lo largo de la costa Este de Estados Unidos afectando a lacha amarilla (*Brevoortia patronus*), bagre marino (*Arius felis*), lebranco (*Mugil cephalus*), chopo espina (*Lagodon rhomboides*), crocka del atlántico (*Micropogonias undulatus*), verrugato croca (*Leiostomus xanthurus*), pastinaca (*Dasyatis* sp.) y trucha plateada (*Cynoscion nothus*) (Plumb y cols., 1974). También se ha descrito la infección por *Streptococcus agalactiae* en sardinilla del pánuco (*Fundulus grandis*) (Rasheed y Plumb, 1984), lubina estriada (*Morone saxatilis*), anjoba (*Pomatomus saltatrix*) y corvinata regal (*Cynoscion regalis*) (Baya y cols., 1990), así como híbridos de tilapia (*Oreochromis aureus* x *Oreochromis niloticus*) con graves episodios de meningoencefalitis mortal (Eldar y cols., 1994 y 1995-a) con tasas de mortalidad del 30-50% del colectivo afectado. Este patógeno, también se ha descrito en trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) provocando meningoencefalitis mortal. En dorada cultivada (*Sparus aurata*), se han descrito sucesivos brotes epizoóticos en el Golfo Árabe (Evans y cols., 2002), relacionándose estos brotes,

con mortalidades observadas en especies salvajes de la zona como lisa escamuda (*Liza klunzingeri*). A nivel experimental, especies como mojarra de oreja azul (*Leponis macrochirus*), pez sol verde (*Lepomis cyanellus*) y pez gato (*Ictalurus punctatus*) se han mostrado enormemente susceptibles a la infección (Robinson y Meyer, 1966; Plumb y cols., 1974).

- *Streptococcus dysgalactiae*: Se ha descrito provocando lesiones necróticas en pedúnculo caudal de pez limón (*Seriola dumerili*) y pez cola amarilla (*Seriola quinqueradiata*) (Nomoto y cols., 2006).
- *Streptococcus phocae*: Este patógeno ha causado enormes pérdidas económicas en la industria del salmón en Chile durante los meses de verano desde 1999 (Romalde y cols., 2008).
- *Streptococcus parauberis*: Este patógeno se presenta de forma endémica en el cultivo del rodaballo (Toranzo y cols., 1994; Doménech y cols., 1996), significando hace unos años un gravísimo problema para el sector en España. Gracias al desarrollo de una vacuna específica, se consiguió minimizar el impacto de esta enfermedad (Padrós y Furones, 2002). En lenguado japonés (*Paralichthys olivaceus*), es considerado como uno de los patógenos más importantes existentes que afecta a su cultivo (Wook Baeck y cols., 2006).
- *Streptococcus milleri*: Este patógeno se ha aislado en riñones de koi (*Cyprinus carpio*) con presencia de ulceraciones externas (Austin y Robertson, 1993).
- *Streptococcus ictaluri*: Nueva cepa descrita recientemente en pez gato (*Ictalurus punctatus*), provocando osteolisis, miositis, y meningitis (Shewmaker y cols., 2007).

I.2.3.- *Streptococcus iniae* en acuicultura

En 1976, una nueva especie de estreptococo fue identificada como el agente causal de la enfermedad "golf ball", un trastorno caracterizado por múltiples abscesos cutáneos en un delfín del Amazonas en cautividad de agua dulce (*Inia geoffrensis*) en San Francisco, siendo denominado *Streptococcus iniae* (Pier y Madin, 1976). Un segundo aislamiento fue obtenido de lesiones en piel en otro delfín de agua dulce situado en el Acuario de las cataratas del Niágara en Nueva York en 1978 (Pier y cols., 1978). El tercer aislamiento se produjo en otro delfín (Ohio en 1987), aunque los resultados no se publicaron hasta 2003 (Bonar y Wagner, 2003).

Las primeras descripciones de la infección en los peces por *Streptococcus iniae* aparecen en Japón y Singapur en la década de los años 80', aunque no fueron identificados como *Streptococcus iniae* hasta años más tarde (Kitao y cols., 1981; Nakatsugawa, 1983; Foo y cols., 1985; Inglis y cols., 1993; Stoffregen y cols., 1996; Nguyen y cols., 2002). A partir de importantes brotes de enfermedad en tilapia (*Tilapia nilotica* x *T. aurea*) (Perera y cols., 1994), es cuando la comunidad científica toma conciencia de la importancia de *Streptococcus iniae* como patógeno en acuicultura, ya que antes de este hecho, se limitaban a brotes esporádicos y puntuales. *Streptococcus iniae* afecta a multitud de especies (Tabla 1) tanto continentales como marinas, pero sin lugar a duda, la tilapia es la especie más afectada, produciendo una mortalidad que oscila entre el 30% y el 50% de la población afectada.

Infecciones por *Streptococcus iniae* también se describen en Israel y Taiwán en 1986, aunque, inicialmente se pensó que el agente etiológico era una nueva especie, *Streptococcus shiloi* (Eldar y cols., 1994). Análisis posteriores confirmarían que el agente causal era el mismo que el aislado a partir de los delfines de San Francisco en 1976 (Eldar y cols., 1994 y 1995-b). En Israel, la infección se extendió rápidamente por todo el país, causando una considerable mortalidad en poblaciones de tilapia y trucha arcoíris con importantes pérdidas económicas

(Eldar y cols., 1994). Para luchar contra estas pérdidas, en Israel se inició el primer programa de vacunación frente a *Streptococcus iniae* (Eldar y cols., 1997) con excelentes resultados, ya que produjo la disminución de la mortalidad del 50% al 5% en granjas de trucha arcoíris (Bachrach y cols., 2001) entre los años 1995 y 1997.

La infección por estreptococos en los peces se produce por varias vías, que incluyen, la ingestión de piensos contaminados (Minami y col., 1979), la cohabitación y la ingestión de peces moribundos (Robinson y Meyer, 1966). Los peces salvajes que merodean las jaulas de cultivo también pueden transmitir la enfermedad, hecho descrito por Zlotkin y colaboradores (1998-a), tras la observación de mortalidad en doradas (*Sparus aurata*) y lubina (*Dicentrarchus labrax*) cultivadas en Israel, posterior a una mortalidad en pez conejo salvajes (*Siganus rivulatus*).

La estreptococosis afecta a peces de cualquier tamaño o edad. Los principales reservorios de la bacteria son el agua y los sedimentos alrededor de las granjas. Además, los pescados congelados que se utilizan para el consumo pueden ser otra fuente de infección, ya que se ha confirmado que las especies de este Género, pueden sobrevivir al menos 6 meses en productos congelados. Se ha demostrado la transmisión horizontal, pudiéndose producir a través del agua, especialmente si los peces poseen pequeñas abrasiones, o por la vía fecal-oral. Además, el estado de portador se ha descrito tanto en especies sensibles como no sensibles, siendo un importante factor en la propagación de la enfermedad (Romalde y Toranzo, 1999).

Tabla 1.- Especies acuáticas donde se ha descrito la infección por *Streptococcus iniae*

Especie	Origen	Fuente
Delfín amazónico (<i>Inia geoffrensis</i>)	EEUU EEUU EEUU	Pier y Madin (1976) Pier y cols. (1978) Bonar y Wagner (2003)
Seriola cola amarilla (<i>Seriola quinqueradiata</i>)	Japón	Kaige y cols. (1984), Inglis y cols. (1993)
Salmón amago (<i>Oncorhynchus rhodurus</i>)	Japón	Kitao y cols. (1981), Ohnishi y Jo (1981)
Ayu (<i>Plecoglossus altivelis</i>)	japón	Inglis y cols. (1993), Nguyen y cols. (2002), kitao y cols. (1981), Ohnishi y Jo (1981)
Lenguado japonés (<i>Paralichthys olivaceus</i>)	Japón	Miyazaki (1982), Nakatsugawa (1983), Nguyen y cols. (2002)
Trucha arcoiris (<i>Oncorhynchus mykiss</i>)	Israel	Eldar y cols. (1995-a), Eldar y Ghittino (1999)
Pez conejo (<i>Siganus spp.</i>)	Singapur Bahrain Israel Australia	Foo y cols. (1985), Stoffregen y cols. (1996) Yuasa y cols. (1999) Zlotkin y cols. (1998-a) Bromage y Owens (2002)
Salmón del pacífico (<i>Oncorhynchus kisutch</i>)	Israel	Eldar y cols. (1995-a)
Tilapia (<i>Oreochromis niloticus</i>)	EEUU Taiwan Israel Japón	Kitao y cols. (1981) Bowser y cols. (1998), Shoemaker y cols. (2001) Eldar y cols. (1994) Eldar y cols. (1995-b), Kvitt y Colorni (2004)
Salmón del atlántico (<i>Salmo salar</i>)	Chile	Karaseva y cols. (1991)
Híbrido de Tilapia (<i>T. nilotica x T. aurea</i>)	EEUU	Perera y cols. (1994)
Barramundi (<i>Lates calcarifer</i>)	Australia	Bromage y cols. (1999), Bromage y Owens (2002)
Mero jorobado (<i>Cromileptes altivelis</i>)	Australia	Bromage y Owens (2002)
Híbrido lubina estriada (<i>M. chrysops x M. saxatilis</i>)	EEUU	Stoffregen y cols. (1996)
Lebranco (<i>Mugil cephalus</i>)	Israel	Eldar y cols. (1995-a)
Dorada (<i>Sparus aurata</i>)	Israel	Zlotkin y cols. (1998-a)
Lubina (<i>Dicentrarchus labrax</i>)	Israel	Zlotkin y cols. (1998-a), Kvitt y Colorni (2004)
Pez loro (<i>Sparisoma aurofrenatum</i>)	Mar Caribe	Ferguson y cols. (2000)
Pez cola amarilla (<i>Ocyurus Chrysurus</i>)	Barbados	Ferguson y cols. (2000)
Marget Negro (<i>Anisotremus spp.</i>)	Granadinas	Ferguson y cols. (2000)
Chubb (<i>Scaridae spp.</i>)	Barbados	Ferguson y cols. (2000)
Tamboril de manchas blancas (<i>Arothron hispidus</i>)	Australia	Bromage y Owens (2002), Yuniarti (2005)
Corvinón ocelado (<i>Sciaenops ocellatus</i>)	Israel China	Zlotkin y cols. (1998-a), Eldar y cols. (1999) Shen y cols. (2005)
Gruñidos (<i>Haemulidae spp.</i>)	Barbados	Ferguson y cols. (2000)
Pez ronco de tres bandas (<i>Pomadasys stridens</i>)	Israel	Colorni y cols. (2002), Kvitt y Colorni (2004)
Pez lagarto jaspeado (<i>Synodus variegatus</i>)	Israel	Kvitt y Colorni (2004)
Brema (<i>Acanthopagrus australis</i>)	Australia	Bromage y Owens (2002)
Mero lutria (<i>Epinephelus tauvina</i>)	Australia	Bromage y Owens (2002)
Mero luna creciente (<i>Variola louti</i>)	Israel	Kvitt y Colorni (2004)
Botete pintado (<i>Arothron ispidus</i>)	Australia	Bromage y Owens (2002)
Rabirrubia (<i>Ocyurus chrysurus</i>)	Barbados	Ferguson y cols. (2000)
Ronco de tres bandas (<i>Pomadasys stridens</i>)	Israel	Colorni y cols. (2002), Kvitt y Colorni (2004)

Clínica de la enfermedad

En cuanto a la clínica producida en la infección por *Streptococcus iniae*, los peces afectados pueden presentar uno o más de los siguientes signos clínicos, dependiendo de la especie afectada: natación errática, pérdida de orientación, letargia, pérdida de control de la flotabilidad, melanosis, exoftalmia unilateral o bilateral, opacidad de la córnea, hemorragias en o alrededor de los ojos, base de las aletas, ano, o en cualquier otro lugar en el cuerpo, fluido ascítico en la cavidad abdominal y ulceraciones (Eldar y cols., 1994 y 1995-a). Esta sintomatología es muy similar a la producida en otras estreptococias producidas por *Streptococcus parauberis*, *Streptococcus agalactiae* o *Lactococcus garvieae* (Doménech y cols., 1993 y 1996; Eldar y cols., 1994 y 1995-a y b; Bercovier y cols., 1997; Eldar y Ghittino, 1999). En algunos casos, los peces no muestran signos evidentes antes de la muerte. La necropsia puede evidenciar la presencia de líquido hemorrágico en cavidad abdominal, esplenomegalia, palidez hepática, así como la inflamación alrededor del corazón y el riñón. Muchos estreptococos infectan el sistema nervioso de los peces, lo que explica la natación errática frecuentemente observada en peces infectados (Yanong y Francis-Floyd, 2006).

Lesiones de la enfermedad

La histopatología es una herramienta sumamente importante en el diagnóstico de las enfermedades infectocontagiosas de los peces (Sindermann y cols., 1980; Johnson y Bergman, 1984; Meyers y Hendricks, 1985; Noga, 1996). En ocasiones, la información a partir de las observaciones son suficientes para hacer un diagnóstico correcto, pero a veces, es necesario determinar la etiología de la enfermedad mediante otros procedimientos. Es importante realizar un enfoque sistemático de la necropsia y del muestreo de los tejidos para una correcta evaluación histopatológica (Reimschuessel, 1993 y 1999).

Existen multitud de estudios histopatológicos realizados sobre las estreptococias en peces, y así, tilapias (*Oreochromis niloticus*) infectadas por *Streptococcus agalactiae* muestran lesiones típicas de un proceso septicémico con severa infiltración de células mononucleares en meninge, epicardio y ojos, evidenciándose una clara asociación entre la infección por *Streptococcus agalactiae* y la presencia de centros melanomacrofágicos en hígado y bazo (Inocent Filho y cols., 2009). El examen histopatológico de *Lactococcus garvieae* en trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) desveló congestión hepática, así como necrosis y hemorragias en riñón y bazo (Altun y cols., 2005).

Por su parte, *Streptococcus iniae* en pez oscar (*Astronotus ocellatus*), seriola (*Seriola quinqueradiata*), anguila (*Anguilla japonica*) y corvinón ocelado (*Sciaenops ocellatus*) provoca septicemia hemorrágica, con ascitis y trombosis difusa en vasos sanguíneos (Kusuda y cols., 1991; Eldar y cols., 1999; Tukmechi y cols., 2009). En tilapia provoca un cuadro septicémico con una marcada infiltración celular inflamatoria, con predominio del cuadro meningoencefálico con dilatación de capilares meníngeos, extravasación de eritrocitos y densos infiltrados inflamatorios con predominio de granulocitos, macrófagos y linfocitos (Romano y Mejía, 2003). En trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*), *Streptococcus iniae* provoca formación de abscesos en el interior de los músculos abdominales con necrosis por coagulación, así como proliferación de células mucosas y espongirosis en piel, tejido ocular con hiperemia, hemorragias retinianas, inflamación en el vítreo y hemorragias en la cámara posterior del ojo, así como glomerulonefritis, edema y descamación de la mucosa intestinal, y necrosis focal hepática con hiperemia e infiltración linfocitaria (Akhlaghil y Mahjor, 2004).

En otro estudio con trucha arcoíris, Eldar y Ghittino (1999) describen meningitis aguda, panoftalmítis con destrucción de la cámara anterior del globo ocular y afectación del nervio óptico, pero en cambio, describen un tejido renal sin lesiones, que sí se describe en el estudio de Akhlaghil y Mahjor (2004) también con trucha arcoíris.

Diagnóstico de la enfermedad

Los métodos diagnósticos de la enfermedad son variados, desde técnicas bioquímicas convencionales hasta técnicas moleculares. La identificación fenotípica de *Streptococcus iniae* requiere de un análisis bioquímico extenso. Como otros estreptococos, este organismo se describe como un coco agrupado en cadenas, gram positivo, catalasa negativo y aminopeptidasa positivo y sensible a la vancomicina. Cuando el microorganismo se incuba en medios anaeróbicos, se evidencia una clara actividad β -hemolítica. La tipificación molecular se realiza por medio de PFGE (electroforesis en gel de campo pulsante).

La genética molecular es una herramienta muy útil para realizar una correcta identificación mediante las técnicas de la PCR y la secuenciación del gen 16S rRNA. La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se encuentra estandarizada en el diagnóstico de *Streptococcus iniae* y ofrece buenos resultados para uso diagnóstico (Goh y cols., 1998). Aparte de las técnicas moleculares mencionadas, existen técnicas serológicas que detectan anticuerpos de *Streptococcus iniae* (Shelby y cols., 2001).

Control de la enfermedad

El control de esta enfermedad es muy difícil, ya que *Streptococcus iniae* es una bacteria muy ubicua (Sako, 1993), y además, se establecen estados de portador, por lo que muchas veces no es posible eliminar el patógeno de los peces o del medio ambiente, y por lo tanto, la reinfección es muy habitual (Kusuda y Salati, 1998). La quimioterapia es una medida muy efectiva en el tratamiento de la enfermedad, al ser una bacteria muy sensible a antibióticos de amplio espectro como la eritromicina o la doxiciclina. Sin embargo, el uso continuo de antibióticos conduce a menudo al desarrollo de cepas resistentes. Además del problema de la reducción de la eficacia, la resistencia a los antibióticos puede transmitirse a bacterias patógenas, poniendo en peligro la salud pública (Alderman y Hastings

1998; MacMillan, 2001). Es conveniente proceder con otra serie de medidas sanitarias generales, como la rápida eliminación de los tanques de peces enfermos para evitar nuevos contagios, y la mejora de las condiciones higiénicas del agua en cuanto a su limpieza, renovación, niveles de oxígeno, así como evitar la contaminación con aguas procedentes de otras actividades, fundamentalmente ganaderas y humanas.

De manera general, el Género *Streptococcus* es capaz de desarrollar resistencia antibiótica tras exposiciones repetidas a los antibióticos (Browne y cols., 2002; Koeth y cols., 2004). La resistencia a la tetraciclina, un antibiótico de uso común en la acuicultura, ha sido descrita en *Streptococcus iniae* de aislamientos humanos (Facklam y cols., 2005).

Profilaxis de la enfermedad

El uso de vacunas inactivadas frente a *Streptococcus iniae* se presenta como una buena medida preventiva, presentando buena efectividad suministrada en baño (Hastein y cols., 2005). En Israel, la vacunación sistemática de trucha arcoíris frente a *Streptococcus iniae* se mostró muy efectiva durante años, pero la aparición de nuevas cepas refractarias a la vacuna, han convertido a la estreptococia por *Streptococcus iniae* como enfermedad re-emergente (Eyngor y cols., 2010). Actualmente se están investigando nuevas vacunas contra esta enfermedad elaboradas a partir de bacterias enteras muertas (Shin y cols., 2007), bacterias vivas atenuadas (Buchanan y cols., 2005; Locke y cols., 2008) y vacunas recombinantes (Ra y cols., 2009; Cheng y cols., 2010). Recientemente, Sun y colaboradores (2010) han demostrado que la vacuna ADN frente al antígeno pSia10 induce una buena inmunización en rodaballo, debido posiblemente a la capacidad del antígeno pSia10 de producir respuesta inmune tanto específica como inespecífica, que implica la producción de anticuerpos y respuesta celular innata, presentándose dicha vacuna como un excelente candidato para el control de esta enfermedad en acuicultura.

La incorporación de probióticos a los alimentos balanceados es otra buena opción para el control de la enfermedad. Recientemente se han utilizado una mezcla de dos probióticos, *Lactobacillus acidophilus* y *Streptococcus faecium*, que parecen mejorar el medio intestinal, disminuyendo el estrés en los animales y generando alguna protección frente a la infección por parásitos y/o bacterias patógenas como el *Streptococcus iniae* (Tavares-Días y cols., 2001). A su vez, la adición al pienso de *Zooshikella* spp. aislada a partir de sedimentos del Mar Oriental de China produjo el descenso en la mortalidad en lenguado japonés (*Paralichthys olivaceus*) inoculado con *Streptococcus iniae* del 85% al 25% (Kim y cols., 2010).

I.2.4.- Factores de virulencia de *Streptococcus iniae*

La reciente secuenciación del genoma completo de *Streptococcus iniae* ha permitido identificar gran parte de sus factores de virulencia. En la Figura 3, se encuentran detallados los diferentes genes reguladores de estos factores. Sin embargo, los estudios sobre la epidemiología y la patogenicidad de las infecciones por *Streptococcus iniae* están aún en estudio.

Los principales factores de virulencia identificados en *Streptococcus iniae* hasta la fecha son:

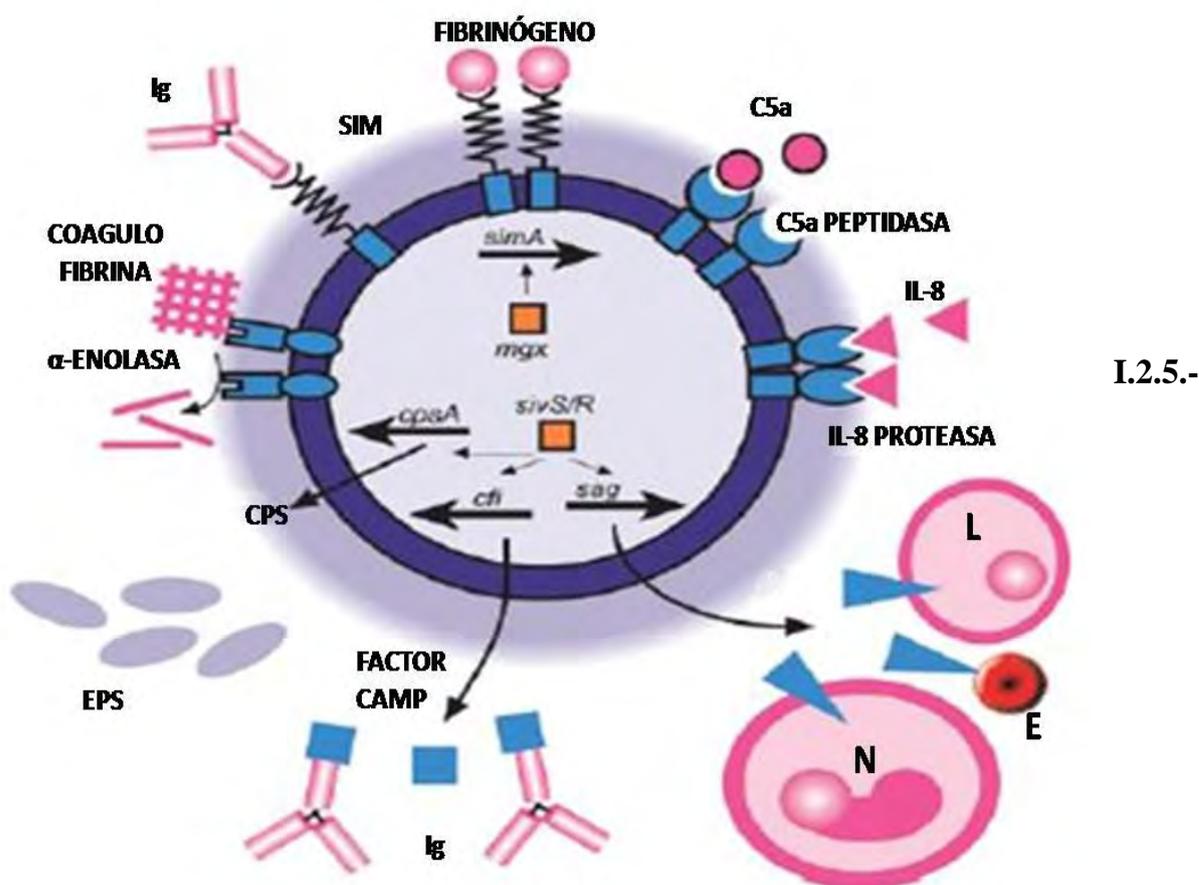
- a) Proteínas SiM: Estas proteínas son unos de los principales factores de virulencia en las diferentes especies de estreptococos. El alto nivel de diversidad de tipos de gen *EMM* (gen hipervariable que codifica la proteína M) ha contribuido al éxito de los estreptococos del grupo A como patógenos humanos. Estudios recientes han identificado este gen en *Streptococcus iniae*, situándolo como uno de los primeros factores de virulencia en esta especie (Baiano y cols., 2008; Locke y cols., 2008).
- b) C5a peptidasa: La C5a peptidasa hidroliza quimio-atrayentes del factor de complemento C5a, por lo que reduce la capacidad del hospedador infectado a combatir

la infección (Locke y cols., 2008). Sin embargo, el intercambio alélico ha demostrado que esta proteína por sí misma no es necesaria para la virulencia en peces y su papel en la patogenicidad es probablemente de poca importancia (Locke y cols., 2008).

- c) Estreptolisina S: La capacidad de *Streptococcus iniae* de hemolizar eritrocitos y dañar membranas celulares es resultado de la actividad de las citolisinas (Fuller y cols., 2002). La citolisina de *Streptococcus iniae* es homóloga a la estreptolisina S de los estreptococos del grupo A, y afecta a los eritrocitos, neutrófilos, linfocitos, y algunos tejidos (Nizet y cols., 2000), pero no desempeña papel alguno en la resistencia fagocítica ni en la adhesión/invasión de células epiteliales (Locke y cols., 2007).
- d) Factor CAMP: Los estreptococos del grupo B producen una proteína difusible y termoestable (factor CAMP) que aumenta la beta-hemolisis. También se ha demostrado que el factor CAMP se une a inmunoglobulina por la región Fc y por lo tanto contribuye a la virulencia (Bolotin y cols., 2007).
- e) Cápsula: Una de las maneras más eficaces para que una bacteria evite la fagocitosis es la producción de polisacárido capsular, por lo que las cepas capsuladas son más virulentas que sus homólogas no encapsuladas (Miller y Neely, 2005; Kanai y cols., 2006).
- f) Fosfoglucomutasa: Se encarga de transformar la glucosa-1-P en glucosa-6-P. Esta reacción, perfectamente reversible, transcurre mediante un mecanismo en el que se origina glucosa-1,6-bis-fosfato. Una mutación al nivel del gen que la codifica, implica una sensibilidad a las células mononucleares T8. Esta susceptibilidad se atribuyó a una

disminución en la cantidad de exopolisacárido en la superficie de la cápsula (Buchanan y cols., 2005).

- g) Exopolisacárido: Son fundamentales para diversos procesos, tales como la viabilidad celular, la comunicación célula-célula y la interacción bacteria-célula. Estas macromoléculas de carbohidratos son sintetizadas por enzimas asociadas a la membrana interna, empleando sustratos citoplasmáticos, debiendo cruzar la pared bacteriana antes de ser liberadas en el medio extracelular. Recientemente, Milani y colaboradores (2010) han determinado que el polisacárido deacetilasa (Pdi) juega un importante papel en la patogénesis de *Streptococcus iniae* al estar implicado en la adhesión e invasión de este patógeno, así como la resistencia a la lisozima y la supervivencia en corriente circulatoria de los peces.
- h) α enolasa: La capacidad de *Streptococcus iniae* de atravesar tejidos a través de la activación del plasminógeno, está facilitada por la α -enolasa (Kim y cols., 2007), conocido factor de virulencia en estreptococos del grupo A (Pancholi y cols., 1998). La actividad proteolítica de la plasmina en la disolución de los coágulos de fibrina, permite a los agentes patógenos migrar más rápidamente a través de las matrices extracelulares (Eberhard y cols., 1999), y la α -enolasa acelera la invasión a través de los tejidos del hospedador (Lottenberg, 1997).

Figura 3.- Factores de virulencia descritos en *Streptococcus iniae* (Baiano y Barnes, 2009)

I.2.5.-

I.2.5.- *Streptococcus iniae* como agente zoonótico

Streptococcus iniae es generalmente un patógeno de peces, pero puede causar celulitis y bacteriemias en personas que manipulan peces, especialmente tilapia (Weinstein y cols., 1997). El primer caso de enfermedad humana por *Streptococcus iniae*, fue descrito en Texas en 1991, y un segundo caso se describió en Ottawa en 1994 por el Centro para el Control y la Prevención de Enfermedades (CDC, 1996). Durante el invierno de 1995 a 1996, se diagnosticaron cuatro casos de pacientes que presentaban celulitis aguda atribuida a *Streptococcus viridans* (Weinstein y cols, 1997), pero pruebas complementarias demostraron que se trataba de *Streptococcus iniae*, siendo la característica común de estos pacientes la manipulación de tilapias vivas o filetes frescos antes del comienzo de la enfermedad. Otros

cinco casos se identificaron ese mismo año en Canadá. Estos casos demuestran claramente, que este patógeno es capaz, no sólo de causar enfermedad seria en peces y mamíferos acuáticos, sino que también es vehiculizado a humanos causando una enfermedad infecciosa de gravedad variable convirtiéndose en una verdadera zoonosis.

Los casos de enfermedad humana, y la especie de pez involucrada se describen en la Tabla 2, donde podemos observar que la tilapia es la especie de mayor importancia como vehículo transmisor de la infección en humanos.

Tabla 2.- Casos descritos en humanos y su relación con la especie de pez con la que estuvo en contacto.

Especie	Autor	Especie	Autor
Tilapia	Fuller y cols, 2001	Tilapia	Weinstein y cols, 1997
Tilapia	Fuller y cols, 2001	Tilapia	Perera y cols, 1994
Tilapia	Weinstein y cols, 1997	Tilapia	Eldar y cols, 1995-a
Tilapia	Weinstein y cols, 1997	Tilapia	Shoemaker y cols, 2001
Tilapia	Weinstein y cols, 1997	Trucha arco iris	Eldar y Ghittino, 1999
Tilapia	Weinstein y cols, 1997	Salmón coho	Kitao y cols, 1981
Tilapia	Weinstein y cols, 1997		

I.3.- Técnicas Inmunohistoquímicas frente a infecciones bacterianas en tejidos animales

Los métodos inmunológicos como la inmunohistoquímica o la inmunofluorescencia permiten una rápida y específica detección de los patógenos en tejidos sin necesidad de aislar al patógeno (Adams y cols., 1995-a y b), siendo ampliamente utilizados tanto para complementar, como para mejorar los métodos de detección tradicionales. La técnica inmunohistoquímica es una simple extensión de la histología que permite la identificación específica de los agentes patógenos en tejidos (Adams y Marín de Mateo, 1994), por lo que permite relacionar al patógeno con la lesión observada por microscopía, sin lugar a dudas. En

la técnica inmunohistoquímica se pueden aplicar diferentes metodologías, como la inmunoperoxidasa indirecta, peroxidasa-antiperoxidasa y Avidina-Biotina.

La inmunohistoquímica se ha utilizado anteriormente frente a *Streptococcus iniae* en tilapia (*Oreochromis* spp.) (Hernández y cols., 2009), así como frente a otros patógenos y especies de peces, donde podemos destacar:

- *Piscirickettsia salmonis* en tejidos de salmón atlántico (*Salmo salar*) (Alday-Sanz y cols., 1994).
- *Renibacterium salmoninarum* en tejidos de trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) (White y cols., 1995).
- *Vibrio salmonicida* en salmón atlántico (*Salmo salar*) infectados de forma experimental y natural (Evensen y cols., 1991).
- *Flexibacter psychrophilum* en tejidos de trucha arcoíris (Evensen y Lorenzen, 1996), así como salmón atlántico (Ostland y cols., 1997).
- *Hafnia alvei* en trucha común (*Salmo trutta*) (Acosta y cols., 2002).
- *Hafnia alvei* en inoculaciones experimentales en dorada (*Sparus aurata*) (Padilla y cols., 2005).

I.4.- Cultivos celulares

El cultivo celular engloba un conjunto de técnicas que permiten el mantenimiento de células *in vitro*, conservando sus propiedades fisiológicas, bioquímicas y genéticas. Las aplicaciones que presenta el cultivo celular abarcan un gran número de disciplinas.

En los últimos años, la aplicación de esta tecnología ha permitido grandes avances en la comprensión de los mecanismos implicados en los procesos intracelulares e intercelulares. Las áreas de investigación que hacen uso actualmente del cultivo celular en sus investigaciones son diversas, entre las que destacamos las siguientes:

- Virología: Diagnóstico de enfermedades virales, cultivo virológico, estudios interacción virus-hospedador, producción de vacunas antivirales, etc.
- Bacteriología: Estudios de invasión y adherencia bacteriana, tránsito intracelular, etc.
- Investigación del Cáncer.
- Inmunología: Producción de anticuerpos monoclonales y análisis de la genética de la célula somática.
- Ingeniería de proteínas: Producción de interferón, insulina, hormona de crecimiento, etc.
- Interacción y señalización celular: Estudio de receptores y vías de translocación de la señal.
- Aplicaciones diagnósticas: Análisis cromosómico de células crecidas a partir de muestras de amniocentesis, ensayos de toxicidad, etc.
- Aplicaciones médicas: Mantenimiento y producción de tejidos para trasplante.
- Aplicaciones industriales y agronómicas: Producción por reproducción *in vitro* de clones de plantas de interés comercial.

El uso del cultivo celular presenta una serie de ventajas e inconvenientes. Como ventajas podemos citar:

- ✓ Permiten un control preciso y fino del medio ambiente. En un cultivo se pueden controlar factores físico-químicos del medio (pH, temperatura, presión osmótica, niveles de O₂, CO₂, tensión superficial, etc.), y factores fisiológicos (hormonas, factores de crecimiento, densidad celular, etc.).
- ✓ Permiten la caracterización y homogeneidad de la muestra. Las células en cultivo de una línea celular inmortalizada son homogéneas, con morfología y composición uniformes. Se pueden obtener con facilidad un número elevado de réplicas idénticas, con lo que se supera el grave problema de heterogeneidad de las muestras, inherente al uso de animales de experimentación.

- ✓ Economía. Suponen una economía en el uso de reactivos o drogas a estudiar pues al realizarse en volúmenes reducidos, y con un acceso directo de las células a la droga, las concentraciones requeridas son mucho más bajas que en el animal completo.
- ✓ Motivaciones éticas. La investigación biomédica supone el sacrificio cada año de muchos miles de animales de experimentación. El cultivo celular no puede reemplazar siempre al ensayo *in vivo*, pero es una alternativa válida en muchas ocasiones.

Por el contrario, el uso de esta técnica presenta una serie de desventajas:

- Técnica muy sensible. El crecimiento de las líneas celulares es mucho más lento que el de los contaminantes más habituales (hongos, bacterias, micoplasmas, etc) y además, dado que proceden de organismos pluricelulares, son incapaces de crecer en ausencia de una compleja mezcla de nutrientes que simula el plasma o el fluido intersticial. Esto supone la necesidad de extremar las condiciones de asepsia en todo momento, lo cual es limitante a nivel, tanto del instrumental requerido, como del personal cualificado para su manipulación.
- Cantidad y coste. El coste de producción de 1 gr de tejido en cultivo es más de 10 veces superior al obtenido en el animal.
- Inestabilidad. Muchas de las líneas celulares inmortalizadas son inestables como consecuencia de la dotación cromosómica aneuploide. La población celular puede variar su composición si alguna de las subpoblaciones celulares es capaz de crecer con una tasa ligeramente superior, es decir, podemos encontrar diferencias significativas en la línea celular de una generación a la siguiente. La única manera de evitarlo es emplear líneas estables que se resiembran a partir de un stock congelado cada determinado tiempo, o después de un determinado número de generaciones.

- Validez del modelo *in vitro*. Cuando nos referimos a un cultivo celular nos estamos refiriendo a un disgregado celular de un tejido de origen, por lo que se diferencia de éste en que se ha perdido la organización espacial tridimensional propia del tejido, las interacciones heterotípicas entre los distintos tipos celulares, y entre las células y la matriz extracelular, así como que carece de los componentes sistémicos de regulación implicados en la regulación de la homeostasis *in vivo*.

I.4.1.- Cultivo celular en Ictiopatología

Desde la primera descripción de una línea celular de peces (Wolf y Quimby, 1962), se han desarrollado un gran número de éstas. Su principal aplicación ha sido el aislamiento, identificación y estudio de virus que provocan brotes epizoóticos, causando enormes pérdidas económicas (Nicholson, 1989; Bols, 1991).

El medio de cultivo celular usado más ampliamente para el cultivo de células de peces es el tradicional medio mínimo esencial de Eagle (MEM) con sales de Earle y suplementado con suero fetal bovino (SFB) al 10%, antibióticos y L-glutamina. No obstante, el medio de Stocker, que es una forma modificada del MEM, que presenta doble concentración de algunos aminoácidos y vitaminas, se recomienda particularmente para aumentar el crecimiento celular, empleando los mismos suplementos que los descritos anteriormente, más un 10% de triptosa fosfato. Alternativamente, para algunas líneas celulares como la SHK1, se puede usar el medio de Leibovitz (L15) suplementado con SFB al 5 ó 10% y L-glutamina.

Para el crecimiento celular, el contenido normal de SFB en el medio es del 10%, mientras que para el aislamiento o replicación viral, el SFB puede reducirse hasta el 2%. De modo similar, el pH del medio de cultivo para el crecimiento de las células es de 7,3-7,4 y se ajusta a 7,6 para la replicación viral.

Para mantener buenas condiciones de asepsia, a los medios de cultivo se le adiciona una mezcla de antibióticos, siendo la unión de penicilina (100 IU/ml) y dihidroestreptomicina (100 µg/ml) la más usada. El uso de antifúngicos como el Mycostatin a una concentración de 50 IU/ml se usa si sospechamos de una posible contaminación por hongos.

En la Tabla 3 se observan las principales líneas celulares de peces, indicando origen y morfología de cada tipo celular.

Tabla 3.- Listado de las principales líneas celulares existentes de peces

Línea celular	Origen	Especie	Morfología
BF-2	Fibroblastos de mojarra de oreja azul	<i>Leponis macrochirus</i>	Fibroblástica
CHSE-214	Células embrionarias de salmón real	<i>Oncorhynchus tshawytscha</i>	Epitelial
EPC	Epitelioma papuloso de carpa	<i>Cyprinus carpio</i>	Epitelial
RTG-2	Gónada de trucha arcoíris	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	Fibroblástica
FHM	Células epiteliales de carpita cabezona	<i>Pinephales promelas</i>	Epitelial
GF	Aleta de ronco catire	<i>Haemulon sciurus</i>	Fibroblástica
SHK-1	Células de riñón anterior de salmón	<i>Salmo salar</i>	Leucocítica
ASK	Células defensivas de salmón	<i>Salmo salar</i>	Leucocítica
SAF-1	Células de aleta de dorada	<i>Sparus aurata</i>	Fibroblástica

El cultivo celular es una herramienta muy útil en el diagnóstico de las enfermedades víricas en granjas de acuicultura (Wolf, 1988; Hetrick y Hedrick, 1993). El cultivo celular se basa principalmente en el uso de líneas celulares sensibles a los diferentes virus (Ahne, 1985; Hetrick y Hedrick, 1993), en las que la infección viral se evidencia por la visualización de efecto citopático por lisis celular, o efecto sincitial por la fusión de células. Además, la infección viral *in vitro* de líneas celulares susceptibles, posibilita el uso de varias técnicas serológicas para la vigilancia y diagnóstico de enfermedades víricas (O.I.E, 2000), incluyendo la detección de anticuerpos de peces contra virus patógenos por medio del test de neutralización viral (LaPatra, 1996). La susceptibilidad de las líneas celulares a un virus concreto no tiene que estar relacionada con la susceptibilidad *in vivo* a la enfermedad, y así, varias líneas celulares que no proceden de salmónidos se usan rutinariamente para el

diagnóstico de enfermedades virales de salmónidos (Lorenzen y cols., 1999; Hostnik y Jencic, 2000).

Como el efecto citopático/sincitial puede demorarse varios días, y en algunos casos no se producen los mismos efectos bajo condiciones semejantes de cultivo, en los últimos años se han desarrollado otros métodos diagnósticos para el diagnóstico de las enfermedades virales de los peces, como son los métodos serológicos que usan anticuerpos monoclonales (Nicholson, 1993; Lorenzo y cols., 1995) y técnicas de biología molecular como la reacción en cadena de la polimerasa (Miller y cols., 1998), o combinación de ambas (Estepa y cols., 1995).

El cultivo celular se ha usado también para la detección de algunas bacterias intracelulares patógenas para peces, como en *Piscirickettsia salmonis* (Fryer y Lannan, 1996) y *Renibacterium salmoninarum* (McIntosh y cols., 1997). Una característica compartida por estos microorganismos es que presentan difícil crecimiento en medios de cultivo bacteriológicos, pero puede crecer en una semana en la línea celular con origen en células de epiteloma papuloso de carpa (EPC), un pez que no es susceptible al patógeno (McIntosh y cols., 1997), permitiendo este método de cultivo la expresión de factores de virulencia específicos de *Renibacterium salmoninarum* y el mantenimiento de la virulencia *in vitro* de los aislados (McIntosh y cols., 1997).

El uso de cultivos celulares es clave para estudiar la biología y mecanismos patogénicos de virus cultivables que afectan a la acuicultura (Wolf, 1988; Hetrick y Hedrick, 1993; Bernard y Bremont, 1995; Essbauer y Ahne, 2001). Estos estudios no sólo incluyen procedimientos diagnósticos, sino también análisis de las interacciones entre virus de peces y sus células hospedadoras para identificar algunos de los mecanismos involucrados en los diferentes pasos de la infección viral.

Sin embargo, los métodos de cultivo celular también se han desarrollado para estudiar factores de virulencia de bacterias (Toranzo y Barja, 1993; Austin y Cross, 1998; Austin y Austin, 1999) y parásitos patógenos de peces (Nielsen y Buchmann, 2000; Nolan y Johnson, 2000). Gran parte de los estudios sobre patogenicidad bacteriana se han centrado en los efectos citotóxicos de los productos extracelulares en células de peces para identificar factores de virulencia (Villena, 2003).

Además, los métodos de cultivo celular han proporcionado un conocimiento más profundo sobre los mecanismos de la interacción hospedador-huésped para algunas bacterias patógenas. Los ensayos *in vitro* se han usado para analizar los mecanismos de patogenicidad incluidos en los diferentes estadios de las enfermedades, como fijación bacteriana y entrada en el hospedador, anulación de los mecanismos de defensa, e infección (Evenden y cols., 1993; Austin y Austin, 1999). Este es el caso de bacterias patógenas intracelulares obligadas o facultativas como *Mycoplasma* spp., *Mycobacterium* spp., algunas *Aeromonas* spp., o *Renibacterium salmoninarum*.

Además, la combinación de cultivo celular y métodos de biología molecular aportan nuevas y útiles herramientas para la investigación de patógenos y hospedadores (Villena, 2003), como en los estudios con *Edwardsiella tarda* (Ling y cols., 2000). En este estudio, cepas virulentas y avirulentas se transformaron con plásmidos que contenían proteínas fluorescentes verdes (GFP) y azules (BFP), y la bacteria marcada se usó para examinar los mecanismos moleculares subyacentes a la adhesión e invasión *in vitro* de células EPC.

I.4.2.- La línea celular SAF-1

En los últimos años, la dorada (*Sparus aurata*) se ha convertido en una de las especies más importantes para la acuicultura marina en los países mediterráneos europeos, por lo que se ha avanzado mucho en toda clase de campos de investigación que mejoren sus índices

productivos. En 1997, se logró establecer la primera línea celular estable de dorada a partir de células fibroblásticas de aleta (Bejar y cols., 1997). Antes de la creación de esta línea celular de dorada, ningún campo de investigación había sido adecuadamente estudiado *in vitro*, debido a la falta de una línea celular propia, y únicamente se habían usado líneas celulares heterólogas (de otras especies) en estudios de patogenia, mientras que en el caso de la genética los estudios eran muy escasos por no decir inexistentes (Balebona y cols., 1995).

Con el establecimiento de una línea específica para la dorada se ha podido evaluar *in vitro* la susceptibilidad de esta especie a diferentes virus y bacterias, así como desarrollar diferentes ensayos *in vitro* en planes de manipulación genética.

Esta línea celular se muestra muy efectiva en la replicación de diferentes rabdovirus y betanodavirus, produciendo efecto citopático a los 2-7 días postinoculación, mostrando una elevadísima susceptibilidad para el virus de la necrosis hematopoyética infecciosa (IHNV), donde se observa efecto citopático dentro de los dos primeros días postinoculación. Muchos productos extracelulares (ECPs) son citotóxicos para la línea celular SAF-1, y así, la mayoría de los ECPs de *Vibrio* spp. son citotóxicos tras 3-6 horas postinoculación, produciéndose cambios morfológicos celulares similares a los del efecto citopático que se produce por la replicación viral, observándose redondeamiento celular, así como la pérdida de la unión intercelular, para posteriormente producirse la destrucción de la monocapa.

Esta línea celular presenta una serie de ventajas frente a otras líneas, como puede ser la buena adaptación para el crecimiento en medios estándares sin requerimientos especiales, su facilidad para el crecimiento óptimo a concentraciones bajas de suero fetal bovino (5%), así como una tasa de supervivencia de las células congeladas del 50%, siendo este porcentaje mucho mayor que el descrito para otras líneas celulares de peces.

I.4.3.- Invasión y adherencia celular

Los estudios de adherencia e invasión celular, tanto *in vivo* como *in vitro*, son usados actualmente para profundizar en diferentes aspectos de la patogenia de las enfermedades infecciosas. La capacidad de ciertas bacterias de invadir células epiteliales es considerado como un importante factor de virulencia de varias bacterias patógenas humanas, como *Escherichia coli*, *Yersinia*, *Salmonella* y *Shigella* (Galán, 1994; Zierler y Galán, 1995).

Entre los patógenos de peces, esta capacidad ha sido demostrada en *Aeromonas hydrophila* (Leung y cols., 1996; Tan y cols., 1998), *Listonella anguillarum* (Wang y cols., 1998), *Photobacterium damsela* subsp *piscicida* (Magariños y cols., 1996; López-Dóriga y cols., 2000; Acosta y cols., 2009), *Yersinia ruckeri* (Romalde y Toranzo, 1993; Tobback y cols., 2009)

Entre los patógenos bacterianos marinos, sin lugar a dudas, los estudios de mayor interés son los realizados con *Photobacterium damseale* subsp. *piscicida*. Así, se ha demostrado que *Photobacterium damseale* subsp. *piscicida*, presenta capacidad de adherirse, invadir y sobrevivir en el interior de células SAF-1, considerándose un factor muy importante para la persistencia y el establecimiento de un estado portador en los peces, ya que esta capacidad puede proporcionar una protección eficaz contra las defensas específicas y no específicas del hospedador (Acosta y cols., 2009). A su vez, *Photobacterium damseale* subsp. *piscicida*, una vez producida la invasión, es capaz de multiplicarse activamente tras 48 h en el interior celular (Acosta y cols., 2009). *Photobacterium damseale* subsp. *piscicida* también ha demostrado capacidad de invasión y adherencia a otras líneas celulares diferentes a SAF-1. En el estudio de Magariños y colaboradores (1996) se demostró que *Photobacterium damseale* subsp. *piscicida* presentaba capacidad para adherirse e invadir la línea celular CHSE-214 con diferentes tasas de adherencia e invasión en función de la cepa probada, y que el proceso de

invasión era inhibido por la citocalasina, indicando la participación activa del citoesqueleto en la internalización de este patógeno. Este mismo patógeno también invade la línea celular EPC.

Streptococcus iniae es una bacteria con capacidad de invadir células epiteliales, y así, Eyngor y colaboradores (2007) estudiaron la cinética de invasión y adherencia de *Streptococcus iniae* en células epiteliales de trucha arcoíris, demostrando que *Streptococcus iniae* se adhería e invadía células epiteliales, pero su persistencia y replicación intracelular era muy corta. La diseminación de la bacteria por los diferentes tejidos del pez se produce a través su internalización en macrófagos, siendo este proceso una de las formas más eficientes de transporte de la infección al sistema nervioso (Zlotkin y cols., 2003; Eyngor y cols., 2007).

La capacidad de adherencia e invasión de *Streptococcus iniae* en líneas celulares de peces ha quedado demostrada en varios estudios. Así, Zlotkin y colaboradores (2003), determinaron unas tasas de adhesión que oscilaban desde el 0,05% en la línea celular RTG-2, hasta el 6,8% con la línea celular macrofágica RTS-11. A su vez, describe tasas de invasión también muy variables, dependiendo de la línea celular empleada (0,05% en RTG-2 y 4,8% en RTS-11)

En otros estudios, también encontramos unas tasas de invasión y adherencia muy variables en función de la cepa y/o línea celular usada, y así, Eyngor y colaboradores (2007) describen unas tasas de invasión para *Streptococcus iniae* en cultivos primarios epiteliales de trucha arcoíris menores al 0,5%, y una adherencia del 12%, así como Buchanan y colaboradores (2008), que describen tasas de adherencia que oscilaban entre el 25% y 0,1%, y de invasión entre el 18% y el 0,1% en función de la cepa y la línea celular probada (línea celular macrofágica de carpa y línea celular epitelial embrionaria de lubina estriada).

I.5.- Objetivos

Este trabajo de investigación se inicia tras la aparición de un brote natural de enfermedad en juveniles de bocinegro (*Pagrus pagrus*) y doradas (*Sparus aurata*) en instalaciones del Instituto Canario de Ciencias Marinas (ICCM) del gobierno de Canarias, con unas tasas de mortalidad del 25% y 10%, respectivamente, durante el verano de 2006. Tras siembra y cultivo en medios de cultivo apropiados, el servicio de diagnóstico de la Unidad de Enfermedades Infecciosas e Ictiopatología del Instituto Universitario de Sanidad Animal (IUSA) de la Universidad de Las Palmas de Gran Canaria, logra identificar a un coco gram positivo, catalasa negativo, como agente causal de la mortalidad observada, descartando otros patógenos conocidos como betanodavirus, *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* y *Listonella anguillarum*, pero no se continúa con la identificación de la cepa, por lo que se procede a su conservación por congelación y liofilización hasta la fecha de inicio de este trabajo de investigación.

Con todo lo expuesto anteriormente, los objetivos que nos hemos planteado en la realización de este trabajo de investigación son los siguientes:

- 1) Identificar la cepa responsable del brote natural de enfermedad en bocinegro y dorada en las instalaciones del ICCM.
- 2) Estudiar en profundidad la patogenicidad y virulencia de esta cepa en dorada y bocinegro mediante experiencias de inoculación en el curso de una infección de curso agudo (DL_{50}), crónico y cohabitación, para posteriormente proceder al estudio histológico e inmunohistoquímico de las lesiones.
- 3) Estudiar las cinéticas de adherencia e invasión de la cepa, y otras de referencia en la línea celular SAF-1.

MATERIAL Y MÉTODOS



II.- Material y Métodos

II.1- Métodos microbiológicos generales

II.1.1- Identificación del agente causal de la enfermedad

La cepa aislada del brote natural de enfermedad que afectó a diferentes tanques de bocinegro y dorada (20g) del ICCM, fue sometida a una batería de pruebas bioquímicas convencionales mediante la metodología descrita por Smibert y Krieg (1981) y al sistema de identificación miniaturizado Api 20 Strep (BioMérieux, Madrid, España).

De manera complementaria, la cepa fue sometida a identificación mediante técnicas de biología molecular por amplificación directa del gen 16S rRNA por PCR, secuenciación parcial del mismo (con lecturas en las dos direcciones) y análisis de las secuencias (Arahal y cols., 2008). A continuación se realizó el análisis BLAST (Zhang y cols., 2000) de las secuencias obtenidas frente a las bases de datos del “National Center for Biotechnology Information” (NCBI), recogiendo la extensión del fragmento solapado, el porcentaje de semejanza y el nombre del microorganismo con mayor grado de semejanza con la secuencia obtenida. Esta fase fue realizada por el servicio de identificación de la Colección Española de Cultivos Tipo de la Universidad de Valencia.

II.1.2- Perfil de resistencia antibiótica

La susceptibilidad a los antibióticos de la cepa aislada se realizó por el método estándar de difusión de discos en agar (Bauer y cols., 1966) mediante el uso de agar Mueller-Hinton adicionado con un 5% de sangre de oveja desfibrinada.

II.1.3- Mantenimiento y conservación de las cepas

Para el mantenimiento de las diferentes cepas usadas en este estudio se usó el medio de cultivo Agar Sangre (Laboratorios Conda, Madrid, España), Caldo Triptona de Soja (TSB) (Laboratorios Conda) y Agar Infusión Cerebro Corazón (BHIA) (Laboratorios Conda). Para su conservación, las diferentes cepas utilizadas en este estudio fueron liofilizadas y congeladas a -80°C en medios de cultivo apropiados.

II.2- Estudios de patogenicidad

II.2.1- Animales sometidos a estudio

En las experiencias *in vivo* para determinar la patogenicidad de la cepa aislada en las instalaciones del ICCM en el curso de una infección aguda, hemos utilizado doradas (*Sparus aurata*) de 15 gramos y bocinegros (*Pagrus pagrus*) de 45 gramos. En el estudio de la infección de curso crónico usamos ejemplares de dorada de 35 gramos. Los peces fueron aclimatados durante una semana a nuestras condiciones de laboratorio, y se seleccionaron aleatoriamente algunos de estos animales para asegurarnos que estaban libres de patógenos mediante análisis microbiológicos de sus órganos internos.

En las diferentes experiencias realizadas, los peces fueron mantenidos en tanques de 500 litros en circuito cerrado a una temperatura del agua de 22-24°C y cambios parciales regulares de agua con aireación constante mediante difusores.

II.2.2- Determinación de la dosis letal 50 (DL₅₀)

Con la finalidad de conocer la respuesta de la dorada y del bocinegro frente a una infección de curso agudo con nuestra cepa de estudio, realizamos experiencias de dosis letal 50 mediante la metodología descrita por Reed & Muench (1938) expresando dicho valor, la dosis capaz de matar al 50% de los ejemplares inoculados.

Tanto en la experiencia con dorada, como en la experiencia con bocinegro, se realizaron un total de 7 lotes con 8 peces por lote. Cada uno de los lotes se corresponde con cada una de las inoculaciones realizadas a partir de diluciones seriadas decrecientes de la cepa a analizar, desde 10⁸ hasta 10³ ufc/pez, más un lote control, inoculado con PBS estéril.

La cepa de estudio se sembró en Caldo Triptona de Soja (TSB) y se incubó durante 24 horas a 25°C para obtener un cultivo en fase exponencial. Al cabo de ese tiempo, se centrifugó el medio a 4.000 rpm durante 10 minutos, retirando posteriormente el sobrenadante y lavando dos veces el precipitado con PBS estéril, para ajustar la suspensión por espectrofotometría (BioPhotometer, Eppendorf) a una absorbancia de 1 (DO_{600nm}), con el fin de obtener una concentración final aproximada de 2x10⁹ ufc/ml, confirmada posteriormente por recuento en placa. A partir de este inóculo inicial, se realizan diluciones seriadas 1/10 hasta una concentración de 10⁴ ufc/ml para la experiencia de inoculación.

Cada pez recibió vía intraperitoneal 0,1 ml de la suspensión bacteriana a concentraciones decrecientes por lote, desde 10⁹ hasta 10⁴ ufc/ml. Los peces del lote control se inocularon con 0,1 ml de PBS estéril por la misma vía.

Para el cálculo de la DL₅₀ empleamos la fórmula descrita por Reed y Muench (1938):

$$- \text{Log DL}_{50} = (\text{DP} \times \log 10) + \log <50\%$$

Para ello, necesitamos conocer la distancia proporcional (DP), mediante la fórmula:

$$- DP = (50 - <50\%) / (>50\% - <50\%)$$

La mortalidad de los peces fue tomada en cuenta hasta quince días después de que cesaran las muertes de todos los grupos inoculados. Los peces muertos durante la experiencia, así como los peces inoculados y los peces control que tuvieron que ser sacrificados al final de la fase experimental, fueron sometidos a análisis microbiológico y conservados en solución tamponada de formol al 10% para su posterior estudio histopatológico e inmunohistoquímico.

II.2.3- Estudio de la infección de curso crónico

Con la finalidad de conocer las consecuencias epidemiológicas y patogénicas de una infección de curso crónico por nuestra cepa en estudio en dorada, realizamos una serie de experiencias de inoculación según la metodología descrita por Teshima y colaboradores (1992) y Padilla y colaboradores (2005).

En este estudio hicimos 6 lotes de 15 peces cada uno, de los cuales 3 se inocularon con una suspensión bacteriana a una concentración de 10^5 ufc/pez, mientras que los otros 3 lotes correspondían a los lotes control. La experiencia de inoculación se realizó de la siguiente manera:

Lote I: grupo de peces inoculados una sola vez al comienzo de la experiencia (a tiempo cero).

Lote II: grupo de peces con dos inoculaciones, con un intervalo de 15 días entre la primera y la siguiente (a tiempo cero y día 15).

Lote III: grupo de peces con tres inoculaciones, separadas con cuatro días entre una y otra inoculación (a tiempo cero, día cuatro y día ocho).

Los lotes IV, V y VI se corresponden con los grupos control de cada uno de los tres lotes inoculados con la cepa en estudio.

Todos los peces inoculados recibieron vía intraperitoneal 0,1 ml de una suspensión bacteriana a una concentración de 10^6 ufc/ml, mientras que los peces de los grupos control se inocularon con 0,1 ml de PBS por la misma vía.

La mortalidad de los peces inoculados fue evaluada hasta el día 90 postinoculación. Los peces inoculados y los peces control sacrificados al final de la fase experimental, fueron sometidos a análisis microbiológico y conservados en solución tamponada de formol al 10% para su posterior estudio histopatológico e inmunohistoquímico.

II.2.4.- Estudio de la experiencia por cohabitación

En este estudio se pretende valorar el grado de contagiosidad de *Streptococcus iniae* entre una serie doradas (35 gramos) y bocinegros (45 gramos) inoculados experimentalmente, y otros no infectados puestos en contacto en un mismo tanque postinoculación. Para ello, realizamos una serie de experimentos intraespecies (bocinegro frente a bocinegro, y dorada frente a dorada) e interespecies (bocinegro frente a dorada y dorada frente a bocinegro). Para cada experiencia, se inoculó una dosis de 10^5 ufc/pez de *Streptococcus* como describimos a continuación:

PEZ INOCULADO	PEZ NO INOCULADO
1 DORADA	3 BOCINEGROS
5 BOCINEGROS	5 BOCINEGROS
1 BOCINEGRO	3 DORADAS
5 DORADAS	5 DORADAS

II.2.5- Estudio microbiológico en experiencias de inoculación

Para el estudio microbiológico, se tomaron muestras de riñón, hígado, bazo y cerebro. Las muestras se sembraron en Agar Sangre (Laboratorios Conda) y fueron incubadas a 25°C durante 24 horas. Para confirmar que la bacteria aislada a partir de los tejidos de los peces inoculados se correspondía con la cepa inoculada, cada aislamiento fue sometido a pruebas clásicas de identificación, ayudándonos en ocasiones del sistema Api 20 Strep, comparando estos resultados con los obtenidos en la identificación inicial de la cepa causante de la estreptococia en las instalaciones del ICCM.

II.2.6- Estudio histopatológico de las experiencias de inoculación

Para el estudio histopatológico se tomaron muestras de riñón, hígado, bazo y cerebro, que fueron fijados en solución tamponada de formol al 10%, embebidas en parafina y posteriormente cortadas con el microtomo en láminas de unas 5µm. A continuación, se procedió a la tinción de los cortes histológicos con hematoxilina-eosina. Esta fase fue realizada en coordinación con la Unidad de Anatomía Patológica del Instituto Universitario de Sanidad Animal bajo la supervisión de la Dra. María José Caballero.

II.2.7- Estudio inmunohistoquímico de las experiencias de inoculación

La finalidad de realizar el estudio inmunohistoquímico fue demostrar la presencia de la cepa testada en los tejidos, con independencia de las lesiones encontradas. Para ello, elaboramos un antisuero policlonal con nuestra cepa según la metodología descrita por Harlow y Lane (1988) y Acosta y colaboradores (2002). Un conejo de raza californiana de aproximadamente 3 kg de peso se inoculó con una suspensión compuesta por 1 ml de Adyuvante de Freund incompleto (Sigma) y 1 ml de una suspensión inactivada de nuestra cepa. La suspensión inactivada se realizó mediante su cultivo en BHI líquido (Laboratorios

Conda) a 25°C durante 24 horas. Posteriormente, el medio fue centrifugado a 3.000 rpm durante 5 minutos, retirando el sobrenadante y añadiendo PBS estéril para su lavado en dos ocasiones. A dicha suspensión se le adiciona un 5% de formol y se incuba durante 24 horas a 25°C para proceder a la inactivación de las bacterias. Transcurridas 24 horas, sembramos una alícuota de la suspensión en Agar Sangre (Laboratorios Conda) a 25°C durante 24 horas para garantizar la esterilidad de la suspensión.

El conejo recibió el inóculo repartido en 10 puntos de inyección por vía subcutánea por diversas zonas del lomo. Transcurridas 5 semanas desde la primera inoculación, se le aplicó una segunda dosis para provocar así una buena hiperinmunización. A los 15 días de esta segunda inoculación se procedió al sangrado completo del conejo, previa anestesia con Ketamina y Diazepam.

Una vez obtenida la sangre, se mantuvo refrigerada durante 2 horas para la formación del coágulo. Posteriormente se centrifugó a 3.000 rpm durante 5 minutos, y el suero se conservó a -80°C para ser usado en el estudio inmunohistoquímico.

Una vez obtenido el antisuero, procedemos a la realización de la técnica inmunohistoquímica. Brevemente, una vez desparafinados una serie de cortes seleccionados (3µm), sometemos a los tejidos a la acción de suero normal de cabra al 10% durante 30 minutos para posteriormente exponerlos durante una hora al anticuerpo primario, que en este caso es nuestro antisuero (anticuerpo policlonal) obtenido en conejo. Tras lavados con PBST y PBS se incuba una hora con el anticuerpo secundario (suero de cabra anti-conejo) y para el revelado se prepara el substrato del cromógeno utilizando un kit comercial (AEC Staining Kit de laboratorios Sigma). Finalmente procedemos a la tinción del tejido mediante solución de hematoxilina de Mayer.

II.3.- Experiencias de adherencia e invasión celular

Para las diferentes experiencias de adherencia e invasión intracelular usamos la línea celular SAF-1, línea de origen fibroblástico a partir de células de aleta de dorada, que nos fue proporcionada por el Dr. José García de la Facultad de Veterinaria de la Universidad Complutense de Madrid. La línea celular se cultivó utilizando medio L15 (Sigma) suplementado con un 10% de suero fetal bovino (SFB) descomplementado previamente tras incubación a 56°C en baño maría durante 30 minutos.

Los datos representados en las diferentes figuras representan la media y su desviación estándar (\pm SD) de tres experimentos independientes realizados por triplicado, en placas de cultivo celular de 24 pocillos (Corning Costar, Corning Incorporated, USA). El análisis estadístico de los resultados fue realizado con el paquete estadístico SPSS versión 17.

Los ensayos descritos a continuación se basan en la metodología descrita por Isberg y Falkow (1985), así como por Pizarro-Cerdá y colaboradores (2002). Como control negativo de las experiencias de invasión usamos la cepa no invasiva *Escherichia coli* DH5- α (Padilla y cols., 2008; Acosta y cols., 2009).

II.3.1.- Efecto de la temperatura de crecimiento sobre la adherencia y la internalización/invasión bacteriana

El objetivo de esta experiencia es determinar las tasas de adherencia e internalización/invasión celular de nuestra cepa, y otras de referencia en función de la temperatura de incubación (20-25°C).

Las cepas usadas en este estudio se cultivaron a 20°C y 25°C durante 20 horas para obtener cultivos en fase exponencial. Para homogeneizar las suspensiones, llevamos los cultivos, previos lavados con PBS, a una absorbancia de 1 a 600 nm por espectrofotometría. Cada

pocillo, a una confluencia del 80-90%, se infectó con 10µl de las diferentes suspensiones bacterianas. Una vez inoculadas, las placas se centrifugaron a 450 rpm durante 5 minutos, y se incubaron a 25°C.

Transcurridas dos horas de incubación, en la mitad de los pocillos realizamos el recuento de bacterias totales (adheridas e internas). Para ello, procedemos al lavado de cada pocillo con PBS, para posteriormente lisar las células del tapiz con 100 µl de tritón X-100 al 0,2%. Seguidamente, realizamos recuento en placa mediante la realización de diluciones seriadas, obteniendo el conjunto de bacterias adheridas e internas para cada una de las cepas probadas a las temperaturas de 20 y 25°C.

La otra mitad de los pocillos, se lavan 3 veces con PBS estéril y se añaden 500 µl de medio L15 con gentamicina durante 2 horas a una concentración de 200 µg/ml para eliminar las bacterias adheridas al tapiz celular. Transcurridas estas 2 horas, procedemos a eliminar los restos de antibiótico mediante lavados sucesivos con PBS estéril. Seguidamente, añadimos 100 µl de tritón X-100 al 0,2% para lisar las células del tapiz y para que liberen las bacterias intracelulares que han escapado a la acción bactericida del antibiótico. Mediante su recuento en placa por diluciones seriadas tendremos una idea de la tasa de penetración de cada una de las cepas probadas a las temperaturas de 20 y 25°C, al relacionarlo con el inóculo inicial de cada una de las cepas analizadas.

El número de bacterias adheridas, para poder determinar la tasa de adhesión bacteriana a diferentes temperaturas, no será sino la resta entre el recuento de bacterias totales e internas.

II.3.2- Efecto del tiempo de infección en la internalización bacteriana

El objetivo de este ensayo es conocer el tiempo que necesita la bacteria para entrar en la línea celular SAF-1. Para ello incubamos nuestras cepas a 25°C, y dejamos tiempos de

infección de 30 min, 60 min, 90min y 120 min. Tras esos tiempos de incubación, procedemos al lavado de cada pocillo con PBS y añadimos 500µl de medio de cultivo celular con gentamicina (200µl/ml) durante dos horas. Transcurrido ese tiempo, lavamos con PBS estéril, lisamos con tritón y sembramos para recuento en placa con la misma metodología descrita en ensayos previos.

II.3.3- Efecto de la preincubación con antisuero de conejo

El objetivo de este ensayo es analizar si el antisuero bloquea ligandos específicos bacterianos impidiendo su unión a receptores celulares. Para ello procedemos a la inoculación de diferentes pocillos con estas suspensiones:

- 75 µl de antisuero completo + 75 µl del cultivo en fase exponencial.
- 75 µl de antisuero descomplementado + 75 µl del cultivo en fase exponencial.
- 75 µl de PBS + 75 µl del cultivo en fase exponencial.

Estas suspensiones se incubaron previamente durante 30 minutos a temperatura ambiente, para posteriormente proceder al cálculo de este inóculo inicial por recuento en placa por diluciones seriadas de las diferentes suspensiones, para poder así relacionar las tasas de invasión producidas bajo las diferentes condiciones probadas. Cada pocillo se infecta con 20 µl (estos 20 µl serán equivalente a los 10 µl habituales inoculados, ya que hemos añadido 10 µl de antisuero o PBS en la mezcla). Tras 2 horas de infección, lavamos los pocillos, añadimos gentamicina, volvemos a lavar, lisamos con tritón X-100 y procedemos al recuento en placa, determinando tasas de infección bajo estas condiciones para valorar el bloqueo de ligandos específicos.

II.3.4- Efecto de la concentración del inóculo en la internalización bacteriana

El objetivo de este ensayo es determinar la existencia de receptores celulares implicados en la invasión celular y su posible saturación aumentando la concentración del inóculo inicial.

Para este ensayo, cultivamos nuestras cepas a 25°C durante 20 horas para obtener un cultivo en fase exponencial, e infectamos diferentes pocillos con 1 µl, 5 µl, 10 µl, 20 µl y 30µl. El resto del ensayo sigue la misma metodología descrita anteriormente en ensayos previos.

II.3.5- Efecto de la presencia de azúcares en la internalización bacteriana

En las células eucariotas, muchos receptores celulares son azúcares que son reconocidos por ligandos bacterianos, por lo que si previamente bloqueamos estos ligandos adicionando azúcares durante la incubación de los inóculos bacterianos, se bloqueará la posterior unión con el receptor celular, y se evitara la penetración celular por parte de la bacteria.

Preparamos nuestros inóculos en presencia de un 1% de glucosa y un 1% de manosa, así como un inóculo control sin azúcares. Tras 20 horas de incubación, procedemos al cálculo de los diferentes inóculos por recuento en placa tras diluciones seriadas.

El ensayo prosigue como ensayos previos, observando tasas de invasión bacteriana bajo las condiciones probadas.

II.3.6- Efecto de la incubación a 4°C en la internalización bacteriana

El objetivo de este ensayo es determinar la intervención del metabolismo celular en el proceso de invasión de *Streptococcus iniae* en la línea celular SAF-1. Unos 20 minutos previos a la infección, incubamos una placa de cultivo celular de 24 pocillos a 4°C. Una vez

infectados los pocillos, incubamos durante 90 minutos a 4°C y procedemos al recuento de bacterias intracelulares tras eliminación de bacterias adheridas con gentamicina. El control de la infección se realiza al mismo tiempo pero incubando a 25°C.

II.3.7- Estudio de la tasa de replicación intracelular

El objetivo de este ensayo es determinar si una vez producida la invasión, nuestras cepas se mueren en el interior celular, quedan latentes, o son capaces de multiplicarse/replicarse activamente.

Para este ensayo usamos un tapiz celular con una confluencia del 60% - 70% debido a que este ensayo se va a prolongar durante varios días. Se infectan placas de 24 pocillos con nuestras cepas. Transcurridas dos horas de incubación, procedemos a la eliminación del medio de cultivo, y realizamos lavados con PBS. Posteriormente añadimos medio de cultivo con gentamicina a una concentración de 200µl/ml para eliminar bacterias adheridas. Tras la incubación con gentamicina, un grupo de pocillos se lava con PBS, se añade Tritón X-100 y se procede al recuento en placa (2h). En el resto de pocillos se elimina el medio de cultivo con gentamicina a 200µl/ml y se sustituye por medio de cultivo con gentamicina a una concentración de 20µl/ml con el fin de mantener un ambiente extracelular estéril. Con estos pocillos se realizarán recuentos de bacterias intracelulares a las 24, 48, 72 y 96 horas.

Con este ensayo tendremos la tasa de replicación intracelular (índice IPRO), que expresa la relación entre el número de bacterias intracelulares viables presentes a las 24 horas con las presentes tras 2 horas postinfección, así como la evolución de las bacterias intracelulares a lo largo del tiempo.

II.3.8- Controles de invasión

El objetivo de esta experiencia es ver o no la presencia de bacterias intracelulares tras la inactivación bacteriana por calor. Si tras la infección no se observaran bacterias internas, la entrada se realiza por mecanismos bacterianos que se inactivan por calor por lo que podríamos hablar de invasión bacteriana. Por el contrario, si observamos bacterias intracelulares tras inactivación por calor querrá decir que existe fagocitosis de la línea celular empleada. El control de invasión se realiza por inmunofluorescencia, cuyo protocolo se describe a en el punto II.3.9.

II.3.9.- Inmunofluorescencia

Las células de la línea SAF-1 fueron depositadas en placas de 24 pocillos (Corning) con una lentilla de vidrio de 12 mm de diámetro en el fondo de cada pocillo. Para la infección se inocularon 5 µl de cultivo bacteriano.

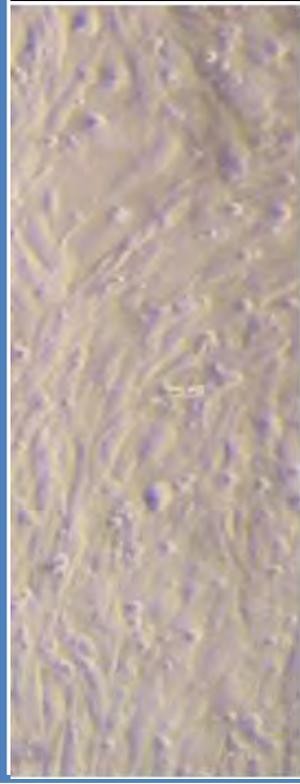
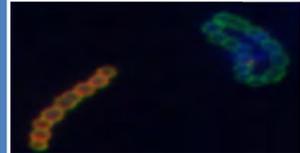
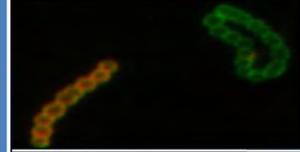
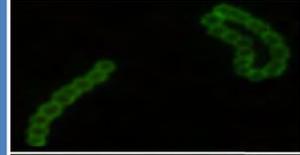
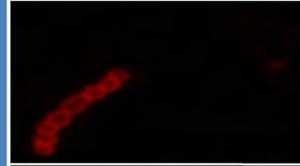
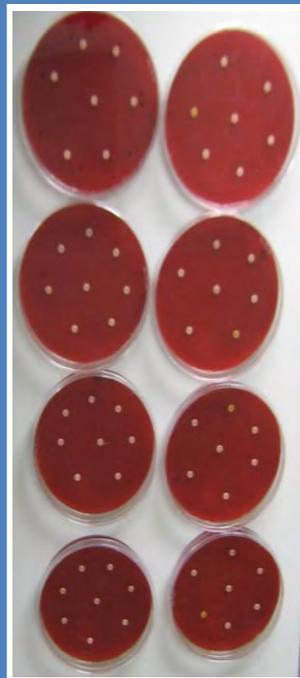
Tras la incubación de las células inoculadas a 25°C durante 60, 90 y 120 minutos, se realizaron 3 lavados con PBS y se fijaron con una solución de paraformaldehído al 4% durante 20 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, las lentillas con las células fijadas fueron extraídas cuidadosamente de los pocillos y depositadas en una cámara húmeda donde se realizó la técnica de la inmunofluorescencia.

Los anticuerpos primarios y secundarios se diluyeron a una concentración de 1:500 en albúmina sérica bovina (Sigma) (1% en PBS).

Las lentillas se lavaron con PBS y se incubaron durante 20 minutos con el anticuerpo primario (anticuerpo policlonal anti-*Streptococcus iniae* de conejo). Se realizaron nuevos lavados con PBS y las lentillas se incubaron durante 20 minutos con el anticuerpo secundario anti-conejo (Alexa-594) para teñir las bacterias extracelulares. Posteriormente, las células se

permeabilizaron utilizando una solución de Triton X-100 al 0,1% en PBS durante 4 minutos a temperatura ambiente, y transcurrido este tiempo, proceder a su lavado con PBS. Para proceder a la tinción de las bacterias totales (extracelulares + internas) las lentillas se vuelven a incubar con el anticuerpo primario siguiendo el proceso descrito anteriormente, para proceder posteriormente a la incubación con el anticuerpo secundario anti-conejo Alexa-488. De este modo, las bacterias extracelulares quedarán marcadas con ambos anticuerpos secundarios (emisión en rojo y verde), mientras que las bacterias intracelulares únicamente con el alexa 488 con emisión en verde (Padilla y cols., 2008; Acosta y cols., 2009). Después de realizar otros 3 lavados con PBS, se procedió al montaje de las lentillas en portaobjetos con ProLong Gold con DAPI (Invitrogen). Todas las preparaciones se examinaron con microscopio de epifluorescencia Zeiss con cámara digital Zeiss AxioCam HRc y objetivo de inmersión. Las imágenes digitales se procesaron con Photoshop CS3 (Adobe). Las imágenes fueron obtenidas en el laboratorio del Dr. José Ramos Vivas del servicio de inmunología del Hospital Marqués de Valdecillas de Santander.

RESULTADOS



III.- Resultados

III.1- Identificación del agente causal del brote natural de enfermedad

III.1.1-Descripción del brote natural de enfermedad

En el brote natural de enfermedad observado en bocinegro (*Pagrus pagrus*) y dorada (*Sparus aurata*) de 20g en las instalaciones del ICCM durante el verano de 2005, se describieron síntomas clínicos de septicemia hemorrágica, con letargia, anorexia, pérdida de orientación, natación errática, exoftalmia y muerte súbita, con tasas de mortalidad del 25% en diferentes lotes de bocinegro, y del 10% en dorada en el periodo de una semana. Tras tratamiento antibiótico a base de enrofloxacin en baño durante 5 días, se logró controlar la mortalidad.

III.1.2-Identificación del agente causal

La cepa aislada por el servicio de diagnóstico de la Unidad de Enfermedades Infecciosas e Ictiopatología del Instituto Universitario de Sanidad Animal (IUSA) se trataba de un coco gram positivo, oxidasa y catalasa negativo, por lo que el informe enviado al Instituto Canario de Ciencias Marinas describía la estreptococia como la enfermedad sufrida en sus instalaciones, pero sin profundizar en un diagnóstico definitivo del agente causal, por lo que se procedió a la liofilización y congelación de la cepa para su conservación.

Una vez retomada la identificación para el desarrollo de este trabajo de investigación, se intentó su identificación por varios procedimientos. Mediante tablas de identificación a través de pruebas bioquímicas convencionales en placa y tubo, no obtuvimos una identificación definitiva de la cepa. En la Tabla 4, observamos el resultado de las diferentes pruebas bioquímicas realizadas. Como observamos en dicha Tabla, la cepa aislada, un coco gran

positivo β -hemolítico, se trataba de una bacteria inmóvil, con crecimiento negativo a 10°C, negativo a las pruebas de la oxidasa y catalasa, Voges Proskauer (VP) negativo, así como positivo a la descarboxilación de la arginina, y negativo a la lisina y ornitina, indol negativo, producción de sulfhídrico negativo, ureasa negativo y no reductora de los nitratos a nitritos. Mediante esta batería de pruebas, no logramos una correcta identificación, ya que no podíamos discriminar entre *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus dysgalactiae*, *Streptococcus uberis*, *Streptococcus parauberis* o *Streptococcus iniae*.

Con el sistema de identificación Api 20 Strep obtuvimos resultados positivos para las pruebas β -glucuronidasa (β -GUR), fosfatasa alcalina (PAL), leucina aminopeptidasa (LAP), arginina dihidrolasa (ADH), así como acidificación del medio por utilización de ribosa (RIB), manitol (MAN), trehalosa (TRE) y glucógeno (GLYG). Por el contrario, el resto de las pruebas presentaron un resultado negativo. Tras consulta del código obtenido por el sistema de identificación Api 20 Strep (código 4563116), no se obtuvo una correcta identificación, ofreciendo el sistema la posibilidad como taxón más significativo a *Streptococcus dysgalactiae* subsp. *equisimilis*.

La secuenciación parcial del gen 16S rARN tras amplificación directa por PCR, y posterior análisis por BLAST de la secuencia obtenida, confirmó definitivamente la etiología del agente causal del brote natural de enfermedad en las instalaciones del ICCM. Nuestra cepa presentó una homología del 100% sobre un total de 1011 pares de bases con la secuencia AF335572 de la base de datos del NCBI de la cepa tipo NR 025148 de *Streptococcus iniae*. A partir de este momento, designaremos a esta cepa de *Streptococcus iniae* como IUSA-1.

Una vez identificada la cepa causante de la estreptococia en las instalaciones del ICCM en verano de 2005, seleccionamos 3 cepas de referencia de *Streptococcus iniae* del Instituto

Pasteur, la cepa CIP 102508 aislada en delfín amazónico, CIP 105804 aislada también en delfín amazónico, y la cepa de referencia CIP 103769 aislada en sistema nervioso de tilapia.

En la Tabla 4, observamos las características fenotípicas de nuestra cepa, IUSA-1, tanto mediante pruebas bioquímicas convencionales (conv) como por el perfil obtenido por la galería miniaturizada Api 20 Strep, comparada con la cepa de referencia del Instituto Pasteur *Streptococcus iniae* CIP 102508. Como observamos en dicha Tabla, nuestra cepa presenta el mismo perfil fenotípico que la cepa de referencia, tanto mediante bioquímica convencional como mediante la galería Api 20 Strep, a excepción de la acidificación del medio mediante la utilización del almidón en el sistema de identificación Api.

III.1.3-Perfil de resistencia antibiótica

La cepa de *Streptococcus iniae* (IUSA-1) es sensible a antibióticos beta-lactámicos como la penicilina, meticilina, ampicilina y amoxicilina, así como a la eritromicina, lincomicina, nitrofurantoína, enrofloxacin, bacitracina y oleandomicina, mientras que se muestra resistente al ácido nalidíxico, estreptomina, kanamicina y cefalotina. En la Tabla 5, observamos los perfiles de resistencia/sensibilidad antibiótica de nuestra cepa, comparada con las cepas de referencia del Instituto Pasteur, pudiendo observarse que las 4 cepas de *Streptococcus iniae* presentan unos perfiles semejantes.

Tabla 4. Caracterización fenotípica de la cepa de *Streptococcus iniae* aislada en bocinegro (*Pagrus pagrus*) y dorada (*Sparus aurata*) comparada con la cepa de referencia CIP 102508 de la Colección del Instituto Pasteur mediante bioquímica convencional (conv) y sistema Api 20 Strep (Api)

Reacción	Características fenotípicas de <i>Streptococcus iniae</i>			
	CIP 102508		Cepa aislada de bocinegro y dorada	
	conv	Api	conv	Api
Gram	+		+	
Morfología	c		c	
Movilidad	-		-	
Crecimiento a 10°C	-		-	
Hemólisis	β		β	
Oxidasa	-		-	
Catalasa	-		-	
Pirrolidonil arilamidasa	+	+	+	+
Voges Proskauer	-	-	-	-
Hidrolisis Hipurato		-		-
Degradación esculina		+		+
α-galactosidasa		-		-
β-glucuronidasa		+		+
β-galactosidasa		-		-
Fosfatasa alcalina		+		+
Leucina aminopeptidasa		+		+
Arginina dihidrolasa		+		+
Acidificación a partir de:				
Ribosa		+		+
Arabinosa		-		-
Manitol		+		+
Sorbitol		-		-
Lactosa		-		-
Trehalosa		+		+
Inulina		-		-
Rafinosa		-		-
Almidón		+		-
Glicógeno		+		+
Indol	-		-	
Producción de H ₂ S	-		-	
Ureasa	-		-	
Reducción nitratos	-		-	
Descarboxilación de:				
Arginina	+		+	
Lisina	-		-	
Ornitina	-		-	

(+) Reacción positiva

(c) coco

(-) Reacción negativa

(β) beta hemólisis

Tabla 5.- Perfil de resistencia antibiótica de la cepa *Streptococcus iniae* IUSA-1, comparada con 3 cepas de referencia del Instituto Pasteur.

	Perfil de Resistencia antibiótica			
	CIP 102508	CIP 103769	CIP 105804	IUSA-1
Ácido nalidíxico	R	R	R	R
Estreptomina	R	R	R	R
Kanamicina	R	R	R	R
Cefalotina	R	R	R	R
Ampicilina	I	R	R	S
Oleandomicina	I	R	I	S
Meticilina	I	S	I	S
Penicilina	I	I	I	S
Enrofloxacin	S	S	S	S
Lincomicina	S	S	S	S
Bacitracina	S	S	S	S
Nitrofurantoina	S	S	S	S
Amoxicilina	S	S	S	S
Vancomicina	S	S	S	S
Eritromicina	S	S	S	S

(R) Cepa Resistente

(I) Cepa con Sensibilidad Intermedia

(S) Cepa Sensible

III.2- Estudios de patogenicidad

III.2.1- Determinación de la dosis letal 50 (DL₅₀)

En las Tablas 6 y 7, observamos el valor de la dosis letal 50 (DL₅₀) en las experiencias de inoculación de curso agudo en bocinegro y dorada. Como se observa, la DL₅₀ de *Streptococcus iniae* en bocinegro (*Pagrus pagrus*) se sitúa en $1,7 \times 10^4$ ufc/pez, mientras que en dorada (*Sparus aurata*) se corresponde con un valor de $1,32 \times 10^5$ ufc/pez. Los peces inoculados mostraron signos clínicos de septicemia hemorrágica, con letargia, anorexia, pérdida de orientación, natación errática, exoftalmia y muerte súbita.

La bacteria inoculada se recuperó de bocinegros y doradas en cultivo puro, a partir de sus órganos internos, principalmente en cerebro y riñón anterior. Como podemos observar, las dosis de 10^8 y 10^7 ufc/pez se mostraron letales tanto en bocinegro como dorada, provocando la muerte de los peces inoculados vía intraperitoneal con *Streptococcus iniae* entre las 48 y 36 horas postinoculación.

Tabla 6.- Cálculo de la DL₅₀ en bocinegro de 45 g (*Pagrus pagrus*)

DOSIS	MUERTOS POR LOTE	VIVOS POR LOTE	MUERTOS ACUMULADOS↑	VIVOS ACUMULADOS↓	TOTAL MUERTOS	% MUERTOS
10^8	8	0	34	0	34	100
10^7	8	0	26	0	26	100
10^6	6	2	18	2	20	90
10^5	5	3	12	5	17	70,5
10^4	4	4	7	9	16	43,7
10^3	3	5	3	14	17	17,6
Control	0	8	-	-	-	-

$$\boxed{DL_{50} = 1,7 \times 10^4}$$

Tabla 7.- Cálculo de la DL₅₀ en dorada de 15 g (*Sparus aurata*)

DOSIS	MUERTOS POR LOTE	VIVOS POR LOTE	MUERTOS ACUMULADOS↑	VIVOS ACUMULADOS↓	TOTAL MUERTOS	% MUERTOS
10 ⁸	8	0	28	0	28	100
10 ⁷	8	0	20	0	20	100
10 ⁶	6	2	12	2	14	85,7
10 ⁵	3	5	6	7	13	46,1
10 ⁴	2	6	3	13	16	18,7
10 ³	1	7	1	20	21	4,7
Control	0	8	-	-	-	-

$$\text{DL}_{50} = 1,32 \times 10^5$$

III.2.2- Evaluación de la infección crónica

Durante los 3 meses que duró esta experiencia para evaluar los efectos de una infección crónica en dorada, no se produjeron bajas entre los peces inoculados sometidos a estudio. Asimismo, tampoco se observó la aparición de una sintomatología clínica evidente en los grupos de peces inoculados una, dos, y tres veces con *Streptococcus iniae*, salvo una ligera anorexia y melanosis postinoculación. En los muestreos realizados, a los 30, 60 y 90 días, no se logró aislar la cepa inoculada de los órganos internos de los animales sacrificados.

III.2.3- Evaluación de la experiencia por cohabitación

En la Tabla 8 observamos el resultado de las diferentes experiencias de cohabitación realizadas. En la experiencia en la que se inoculó una dorada y se puso en contacto con tres bocinegros, se produjo la muerte de uno de los tres bocinegros en cohabitación. En la segunda experiencia de cohabitación, tras inocular 5 bocinegros y ponerlos en contacto con otros 5 bocinegros no inoculados, se produjo la muerte de 2 de los 5 bocinegros en cohabitación, así como de los 5 bocinegros inoculados. En la tercera experiencia, tras inocular un bocinegro, no

se produjeron bajas entre las doradas puestas en cohabitación. En última experiencia, tras la inoculación de 5 doradas, no se produjeron bajas entre las doradas en cohabitación ni entre las inoculadas. De todos los ejemplares muertos en la experiencia de cohabitación pudimos aislar la cepa inoculada a partir de diferentes órganos internos de los ejemplares puestos en cohabitación.

Tabla 8.- Peces muertos en experiencia de cohabitación

PECES INOCULADOS		PECES EN COHABITACIÓN	NUMEROS DE MUERTOS INOCULADOS/COHABITACIÓN
1 DORADA	→	3 BOCINEGROS	0/1
5 BOCINEGROS	→	5 BOCINEGROS	5/2
1 BOCINEGRO	→	3 DORADAS	1/0
5 DORADAS	→	5 DORADAS	0/0

III.3.- Estudios histopatológicos e inmunohistoquímicos

III.3.1- Estudio histopatológico e inmunohistoquímico de la infección de curso agudo (DL₅₀)

En lo referente al estudio histopatológico de la infección de curso agudo para la determinación de la DL₅₀ en bocinegro y dorada, las lesiones fundamentales se localizaron a nivel del sistema nervioso con una meningoencefalitis granulomatosa, con focos de macrófagos, eosinófilos y células mononucleares. En bazo y riñón, observamos centros melanomacrofágicos con menor cantidad de pigmento y una reacción inflamatoria caracterizada por la existencia de múltiples focos de infiltración de macrófagos. En corazón observamos endocarditis y miocarditis con presencia de células inflamatorias.

En la Figura 4, observamos la evolución de la meningitis en bocinegro en función de la dosis inoculada de *Streptococcus iniae*. En el grupo de animales inoculados con las dosis mayores (10^8 y 10^7 ufc/pez), las muertes se produjeron dentro de las primeras 36-48 horas, no encontrando a nivel histológico lesiones compatibles con la meningitis. Entre los animales inoculados con dosis entre 10^6 y 10^3 ufc/pez, la meningitis es más grave a la dosis de 10^6 ufc/pez, caracterizándose por la formación de granulomas e infiltración de macrófagos, eosinófilos y células mononucleares.

En la Figura 5, observamos en el bazo y riñón centros melanomacrofágicos con menor cantidad de pigmento y constitución de nuevos centros con predominio de macrófagos. A dosis bajas (10^4 ufc/pez) observamos en bazo y riñón anterior un gran número de centros melanomacrofágicos situados en la periferia de dichos órganos (de fuera hacia al centro del tejido). La relación entre las lesiones descritas anteriormente y la presencia de la cepa inoculada la encontramos mediante la inmunoreactividad positiva del estudio inmunohistoquímico (Figuras 6, 7, 8, 9 y 10). La inmunoreactividad positiva manifestó mayor intensidad en aquellos tejidos de peces inoculados con dosis mayores de *Streptococcus iniae*, y así, en las Figuras 7 y 8, podemos observar la diferente intensidad de la técnica inmunohistoquímica entre el hígado y el bazo (respectivamente) de un bocinegro inoculado con una dosis de 10^8 ufc/pez y otro a 10^6 ufc/pez. Además, también hemos observado cómo la intensidad de la técnica inmunohistoquímica variaba dentro un mismo grupo inoculado a la misma dosis entre sus órganos internos, y así, el órgano que manifestaba mayor intensidad era el bazo (Figura 8b) y riñón anterior (Figura 9b), seguido del sistema nervioso (Figuras 6b y 6c) y finalmente el hígado (Figura 7c) y corazón (Figura 10b), que eran los órganos que presentaban una menor intensidad.

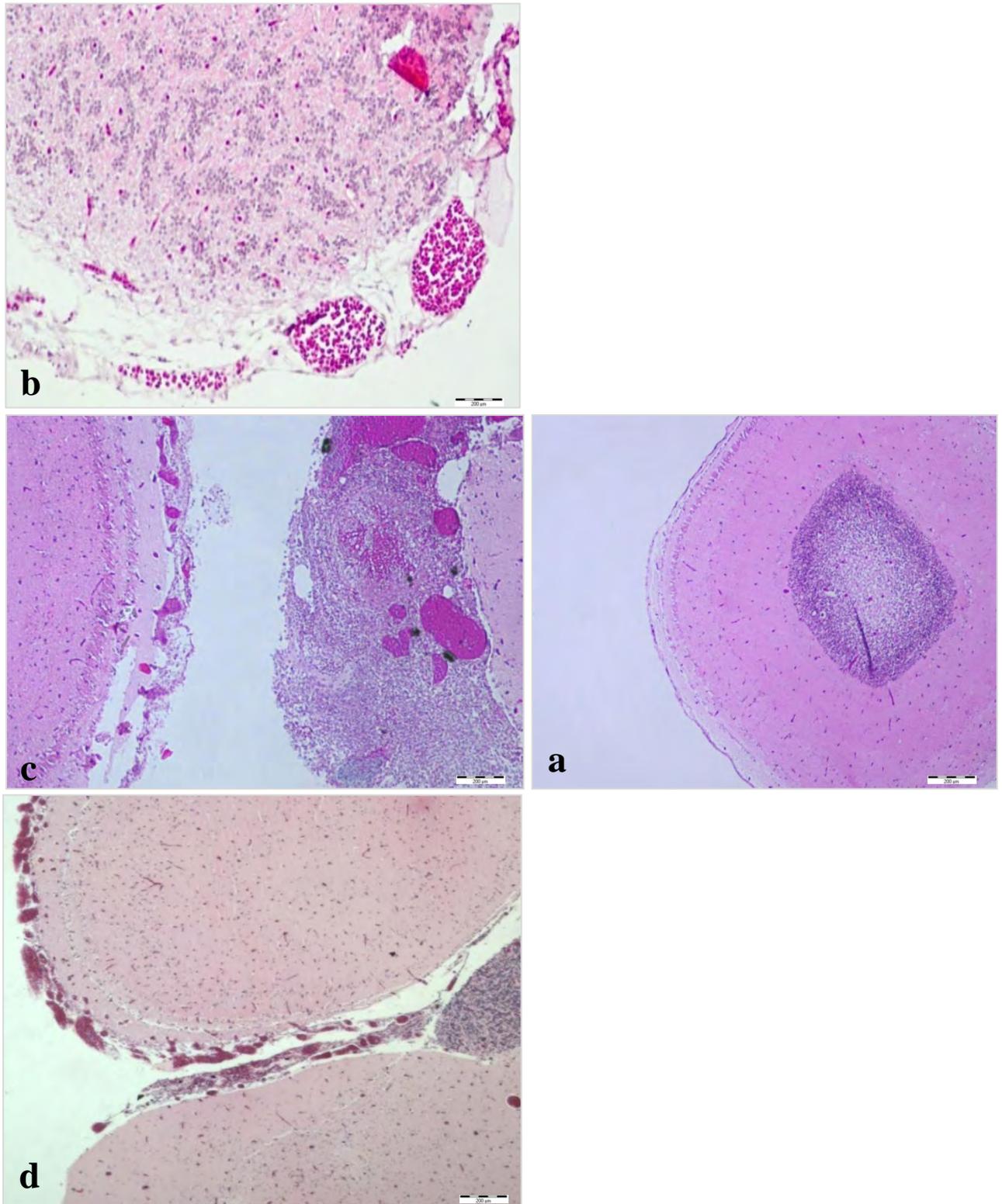


Figura 4.- Evolución de la meningitis en bocinegro en función de la dosis inoculada de *Streptococcus iniae* en la experiencia de DL_{50} . a) Cerebro de pez control. b) Cerebro de pez inoculado con 10^7 ufc/pez, c) Cerebro de pez inoculado con 10^6 ufc/pez, y d) Cerebro de pez inoculado con 10^4 ufc/pez (H-E x40).

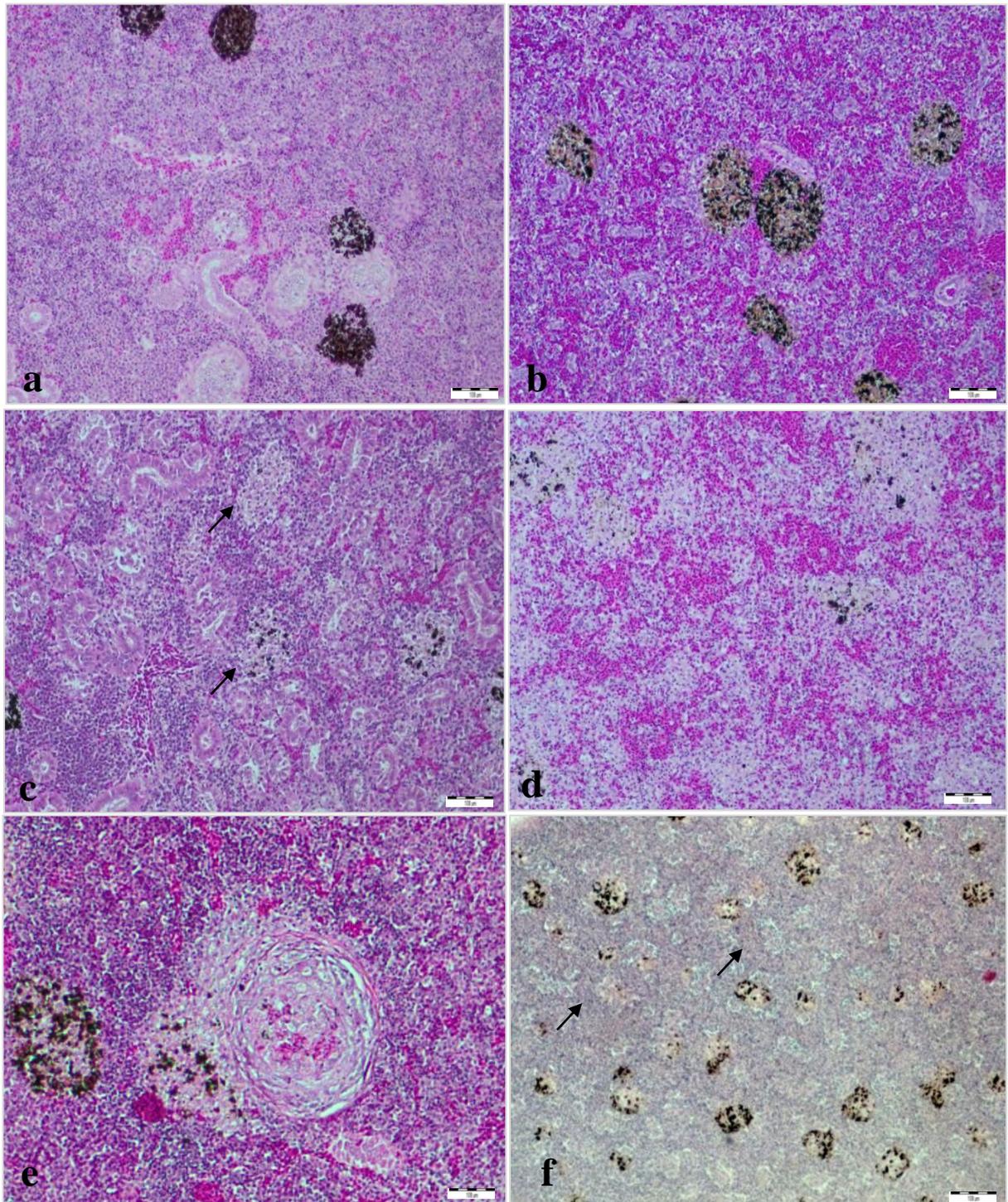


Figura 5.- Múltiples focos de infiltración con macrófagos observados en el riñón anterior y el bazo de bocinegro inoculado con la cepa *Streptococcus iniae* IUSA-1 en la experiencia de DL_{50} (H-E). a) y b) respectivamente, riñón anterior y bazo de pez control. c) y d) respectivamente, riñón anterior y bazo de pez inoculado con una dosis de 10^6 ufc/pez. e) y f) respectivamente, riñón anterior (con granuloma) y bazo de pez inoculado con una dosis de 10^4 ufc/pez. La flecha muestra nuevos centros melanomacrofágicos. (x100)

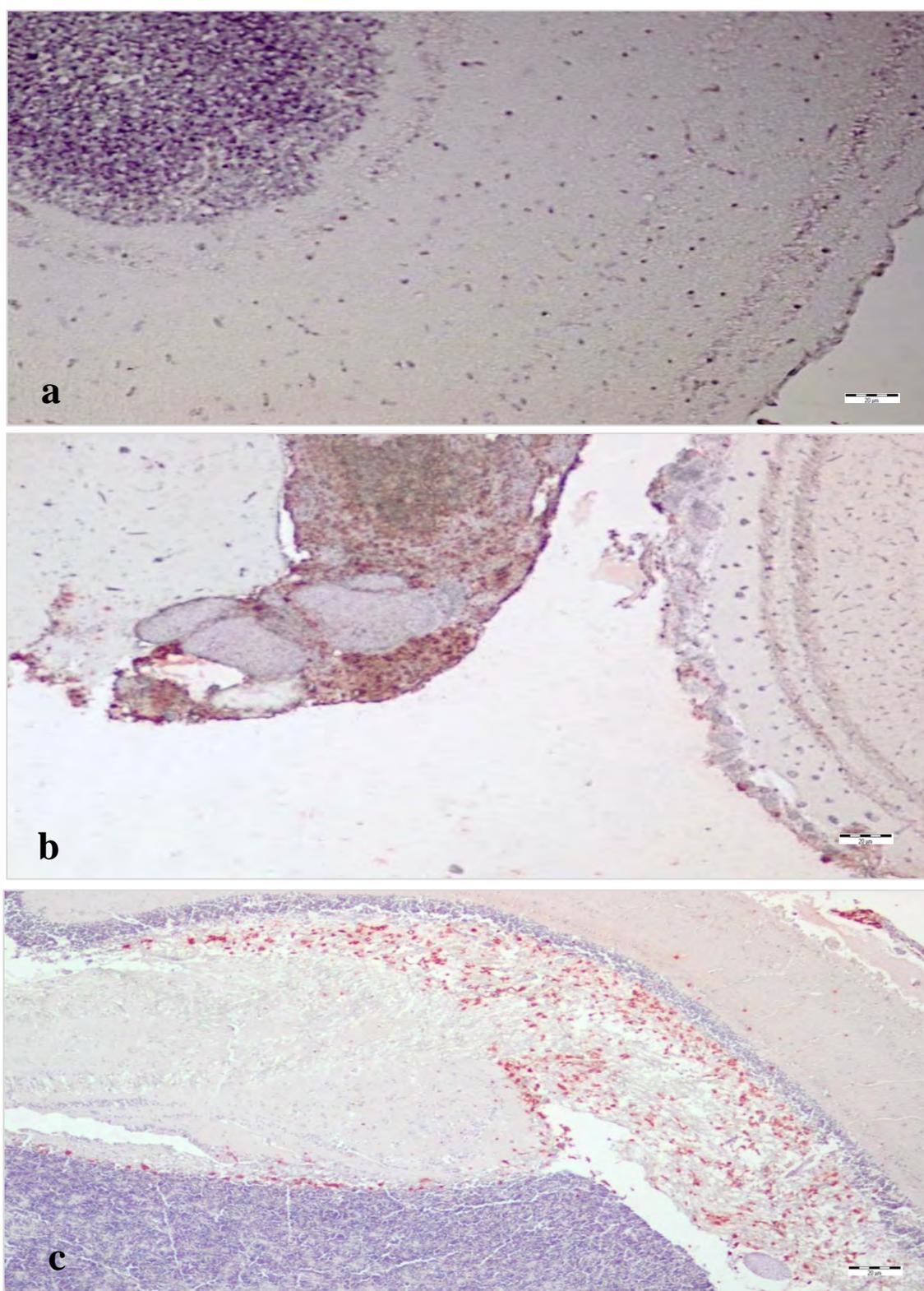


Figura 6.- Reacción positiva a la técnica de la inmunohistoquímica en sistema nervioso de dorada (x40) inoculada con *Streptococcus iniae* con una dosis de 10^6 ufc/pez en experiencia de DL_{50} . a) Cerebro pez control. b) y c) Cerebro pez inoculado.

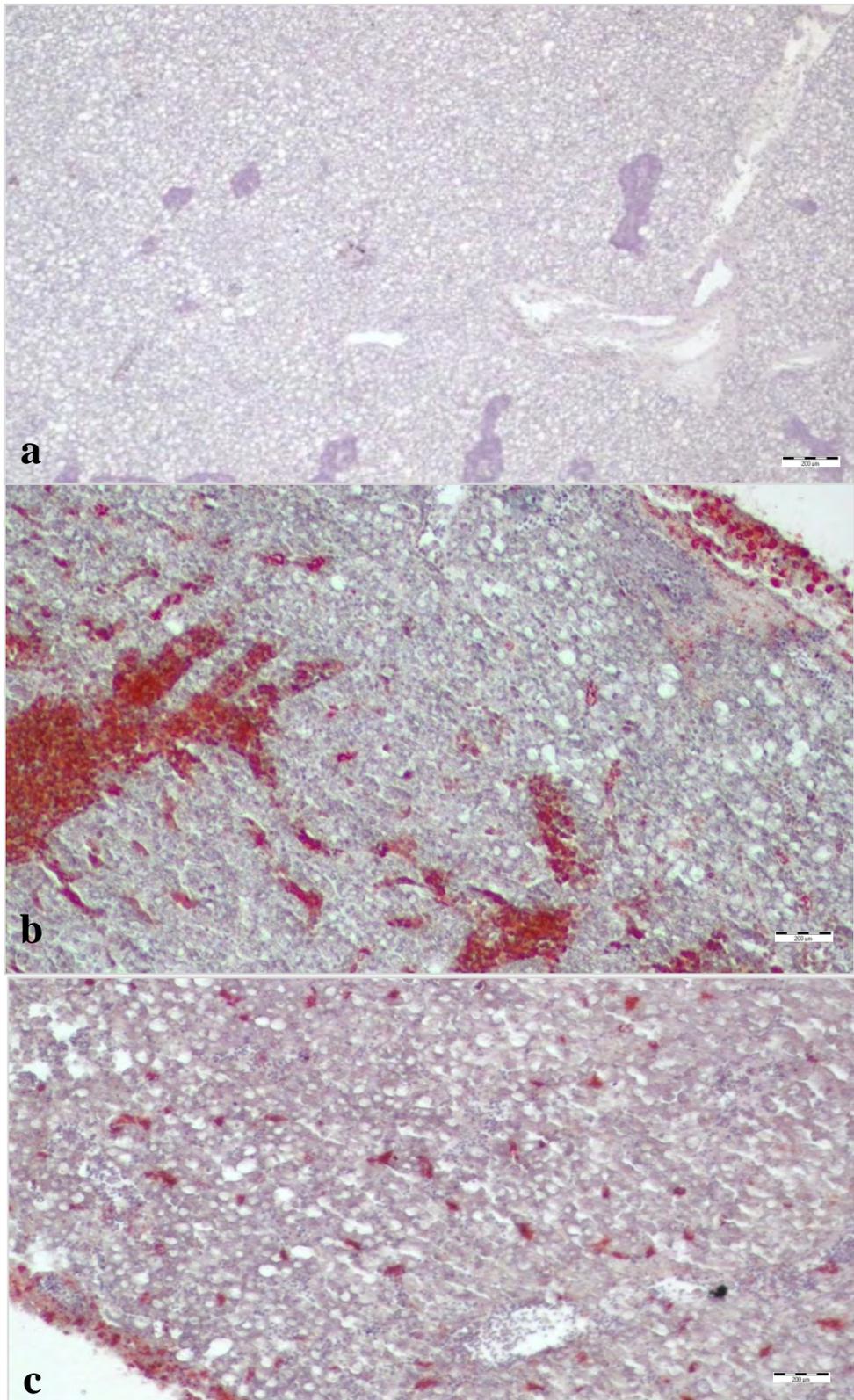


Figura 7.- Reacción positiva a la técnica de la inmunohistoquímica en el hígado de bocinegro (x40) inoculado con *Streptococcus iniae* en experiencia de DL₅₀. a) Hígado de pez control. b) Hígado de pez inoculado con una dosis de 10^8 ufc/pez y c) Hígado de pez inoculado con una dosis de 10^6 ufc/pez.

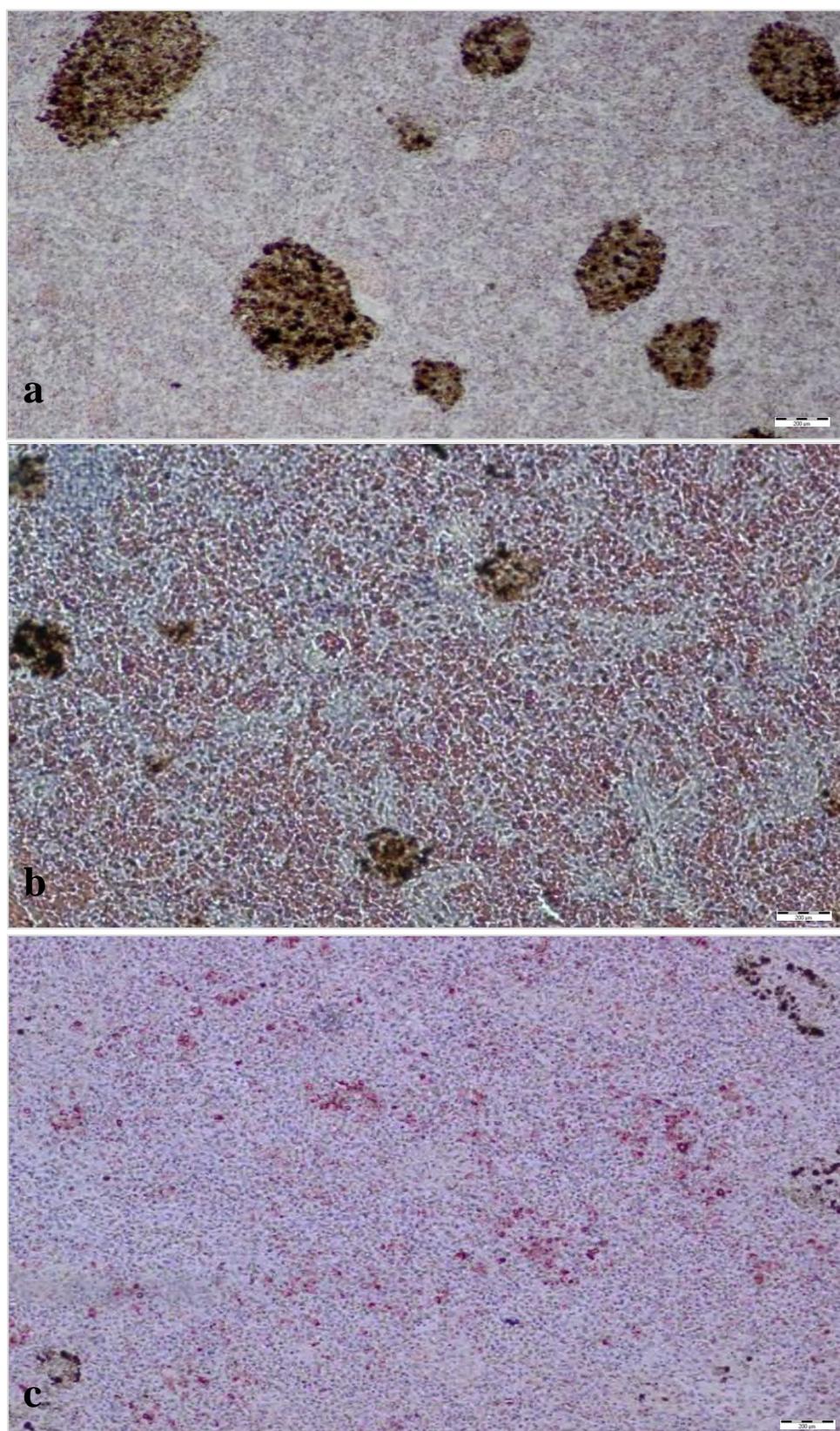


Figura 8.- Inmunohistoquímica del bazo de bocinegro inoculado con *Streptococcus iniae* (x40).
a) Bazo pez control. b) y c) Bazo de pez inoculado con una dosis de 10^8 y 10^6 ufc/pez, respectivamente.

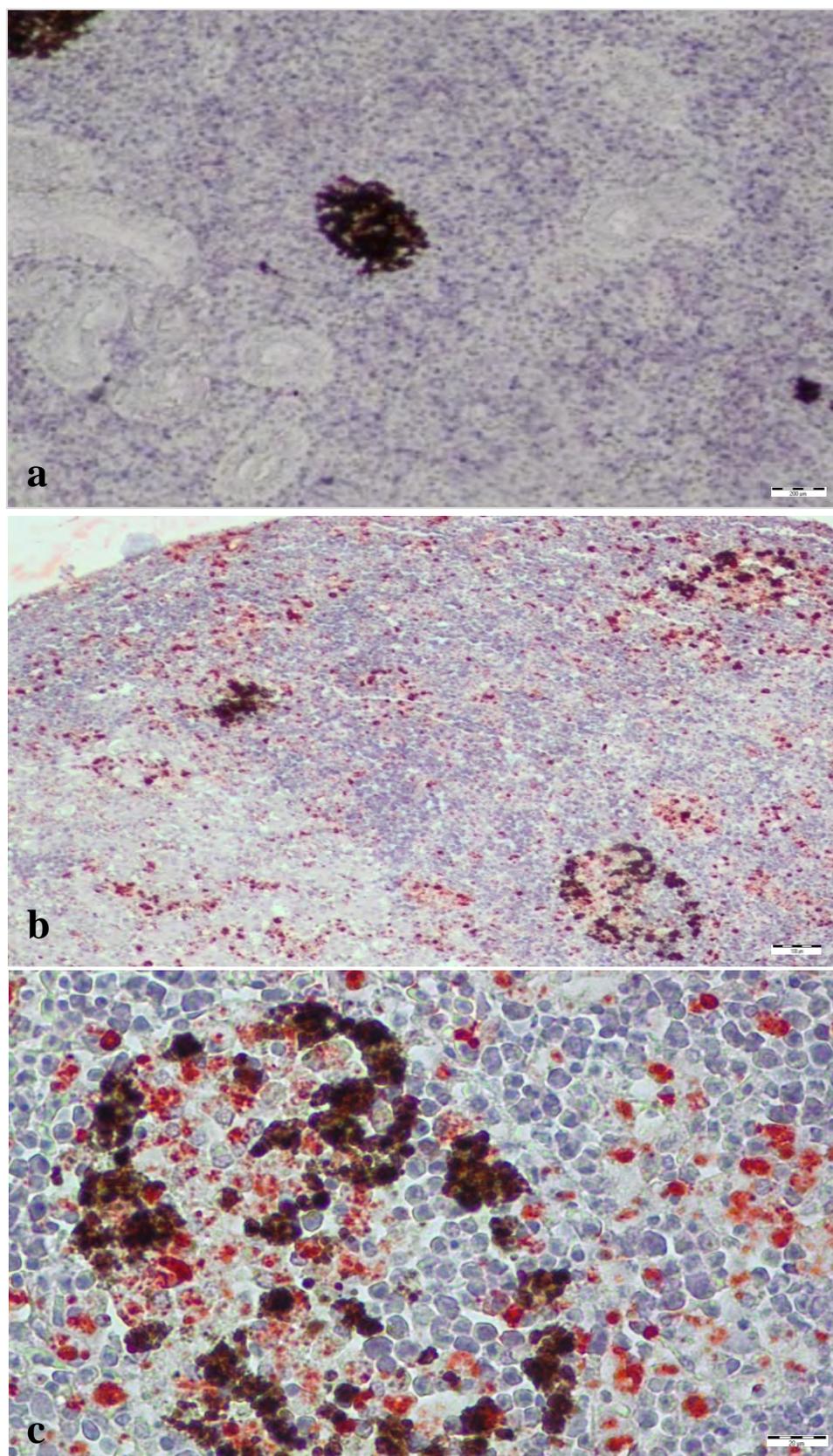


Figura 9.- Inmunohistoquímica del riñón anterior de bocinegro inoculado con un dosis 10^6 ufc/pez de *Streptococcus iniae*. **a)** Riñón anterior pez control (x40). **b)** Riñón anterior de pez inoculado (x100). **c)** Riñón anterior de pez inoculado (x400).

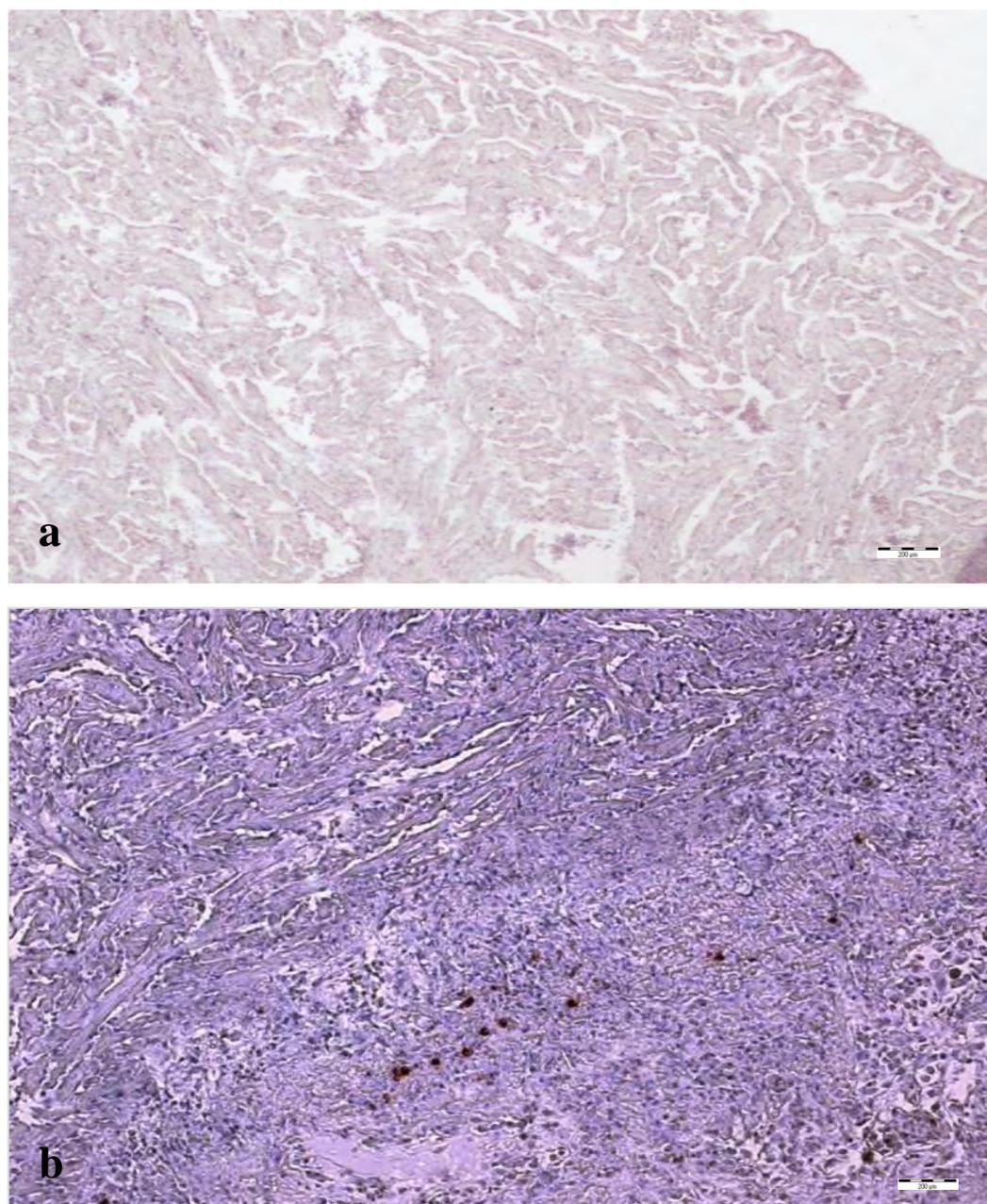


Figura 10.- Inmunoreactividad positiva en el corazón de bocinegro inoculado con *Streptococcus iniae* (x 40). a) Corazón de pez control. b) Corazón de pez inoculado con una dosis de 10^6 ufc/pez.

III.3.2- Estudio histopatológico e inmunohistoquímico de la infección de curso crónico

A nivel histopatológico no se encontraron lesiones significativas en los diferentes tejidos analizados de los tres grupos de doradas inoculadas experimentalmente en la experiencia de evaluación del curso crónico, salvo el aumento del número de centros melanomacrofágicos en peces inoculados frente a los grupos control (Figura 11a).

A nivel inmunohistoquímico, únicamente encontramos inmunoreactividad positiva en el grupo de doradas inoculadas tres veces, en corazón y bazo (Figuras 11 b y c).

III.3.3- Estudio histopatológico e inmunohistoquímico de la experiencia por cohabitación

En los bocinegros muertos en la experiencia de cohabitación, encontramos infiltraciones de macrófagos, así como despigmentación de centros melanomacrofágicos (Figura 12a). A nivel inmunohistoquímico encontramos inmunoreactividad positiva a nivel de sistema nervioso, bazo, riñón anterior y corazón (Figuras 12a y 13a y b). En las doradas sacrificadas al final de la experiencia, no encontramos lesiones de interés.

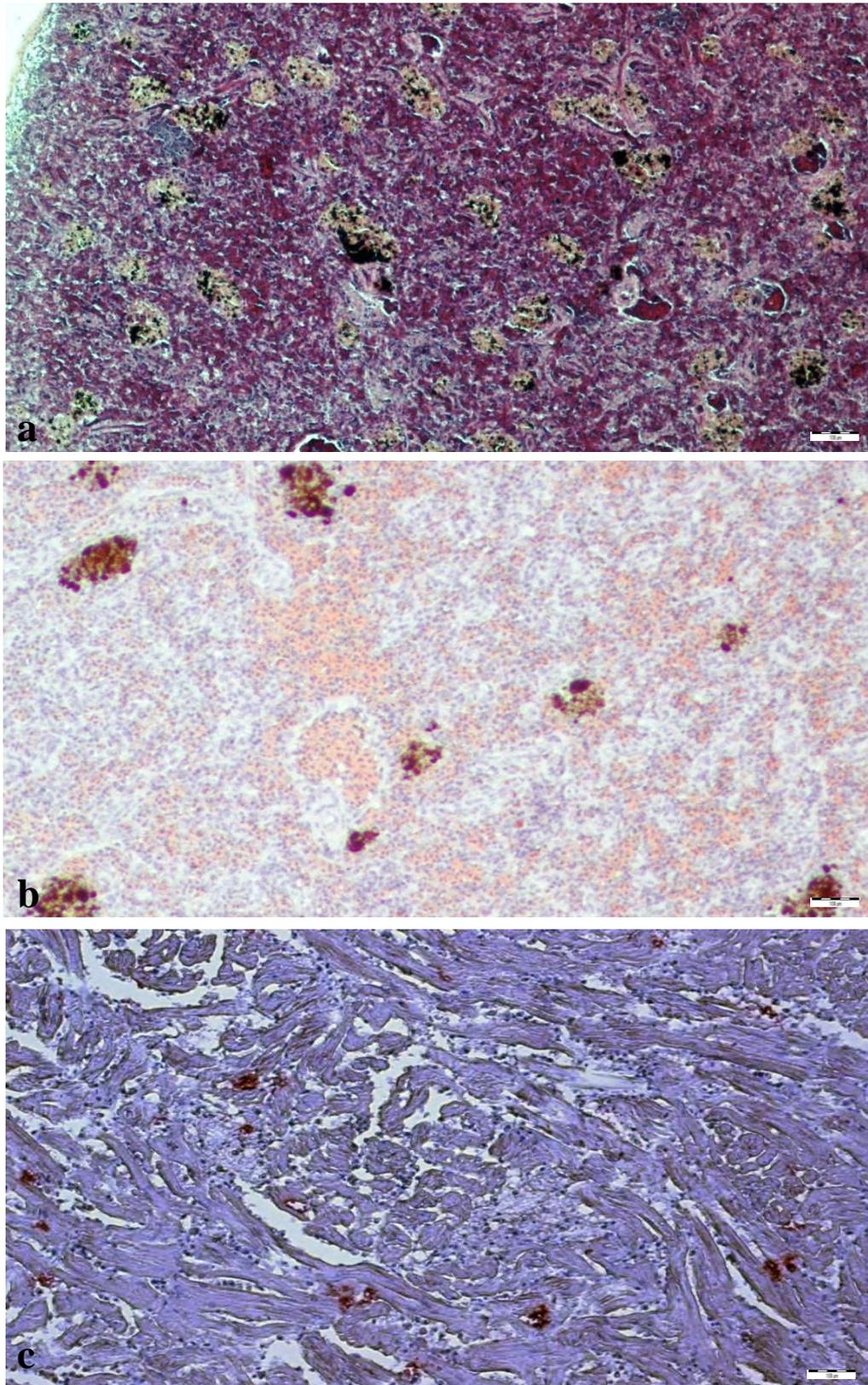


Figura 11.- Histología e inmunohistoquímica de bazo de dorada inoculada en tres ocasiones con 10^5 ufc/pez por *Streptococcus iniae* en la experiencia de evaluación de la infección en curso crónico 90 días post-inoculación) (x100). **a)** Bazo pez inoculado (H-E). **b)** y **c)** Inmunoreactividad positiva en el bazo y corazón de dorada.

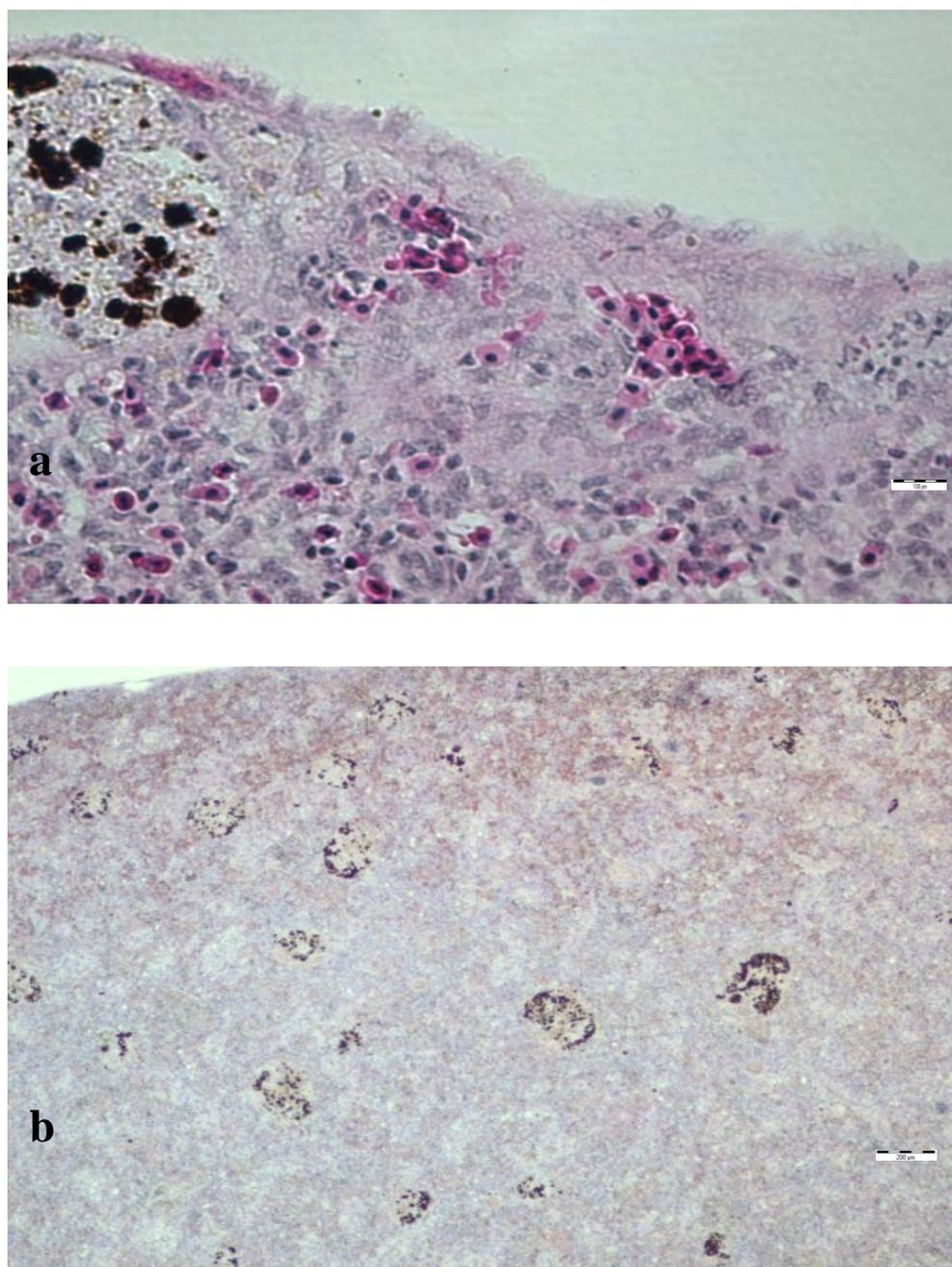


Figura 12.- Histología e inmunohistoquímica de bazo de bocinegro en la experiencia de cohabitación con dorada inoculada. **a)** Histología del bazo de bocinegro (x100) (H-E). **b)** Inmunohistoquímica del bazo de bocinegro (x40).

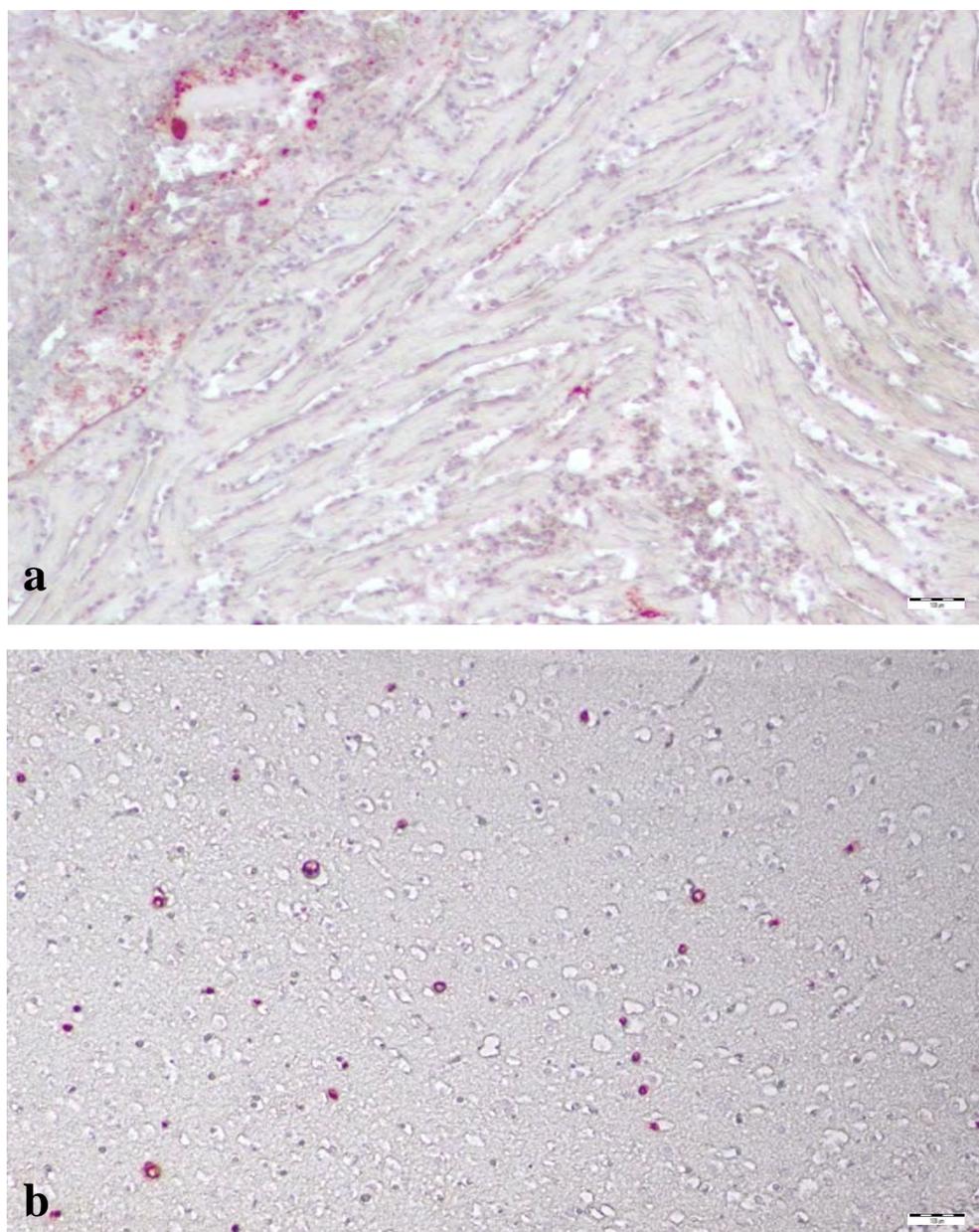


Figura 13.- Inmunoreactividad positiva en bocinegro en cohabitación con bocinegro inoculado con *Streptococcus iniae* a una dosis de 10^5 ufc/pez. a) y b) respectivamente, corazón y cerebro de bocinegro (x100).

III.4- Experiencias de adherencia e internalización celular

III.4.1.- Efecto de la temperatura de crecimiento sobre la adherencia y la internalización

Como observamos en las Figuras 14 y 15, las tasas de adherencia e internalización tras 2 horas de incubación de las cuatro cepas de *Streptococcus iniae* analizadas, presentaron valores muy diferentes en función de las dos temperaturas de incubación analizadas (25°C y 20°C). Las mayores tasas de adherencia e internalización se observaron cuando la temperatura de incubación fue de 25°C, si bien es cierto, a nivel estadístico sólo fue significativo para la cepa CIP 103769 ($p < 0,01$). Como observamos en la figura 14, la cepa IUSA-1 presenta una tasa de adherencia en la línea celular SAF a las 2 horas del 1,86% a 25°C, mientras que desciende hasta el 1,5% a 20°C. Estos valores de adherencia son inferiores, a los observados en la cepa de *Streptococcus iniae* CIP 103769, ya que presenta tasas de adherencia del 5,4% a 25°C y del 3,6% a 20°C ($p < 0,01$). Sin embargo, nuestra cepa (IUSA-1) presenta una tasa de adherencia superior a las observadas en las cepas CIP 102508 (1,7% a 25°C y 1,5% a 20°C) y CIP 105804 (1,6% a 25°C y 0,9% a 20°C), si bien, a nivel estadístico no se observan diferencias entre estas dos cepas y la cepa IUSA-1.

Como se observa en la figura 15, tras 2 horas de incubación, la cepa IUSA-1 presenta una tasa de internalización del 0,31% a 25°C, mientras que a 20°C queda establecida en 0,21%. Al igual que lo observado con la adherencia, la cepa de *Streptococcus iniae* CIP 103769 es la que presenta el mayor valor, con una tasa de internalización del 0,94% a 25°C y del 0,60% a la temperatura de incubación de 20°C ($p < 0,05$). A su vez, la cepa IUSA-1, presenta una tasa de internalización superior a las observadas para las otras dos cepas en estudio, CIP 102508 (0,25% a 25°C y 0,18% a 20°C) y CIP 105804 (0,19% a 25°C y 0,18% a 20°C), pero sin diferencias a nivel estadístico.

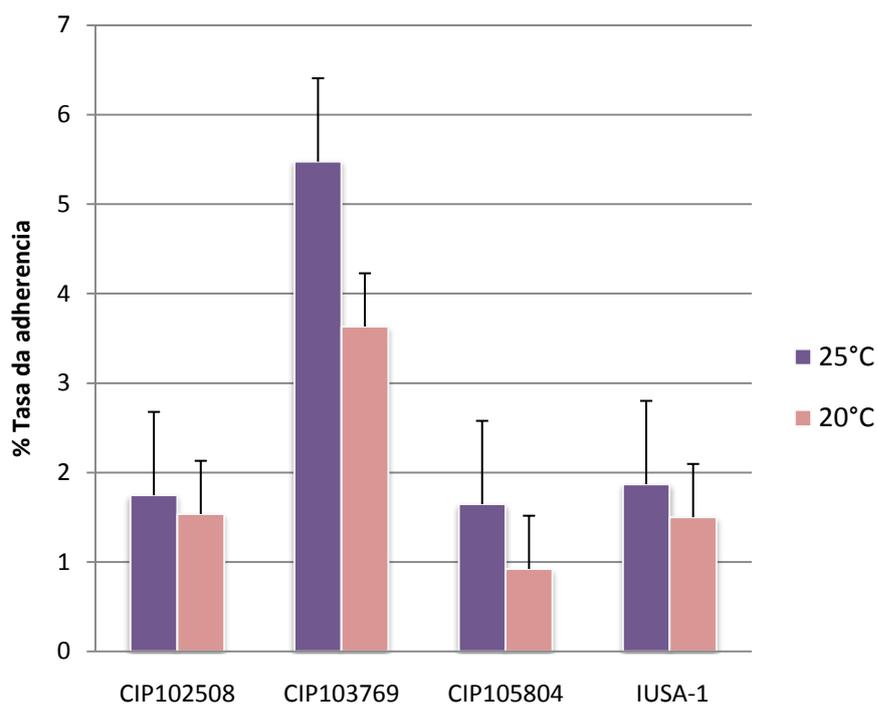


Figura 14.- Efecto de la temperatura de crecimiento bacteriano sobre la adherencia de *Streptococcus iniae* en la línea celular SAF-1 tras 2 horas de incubación.

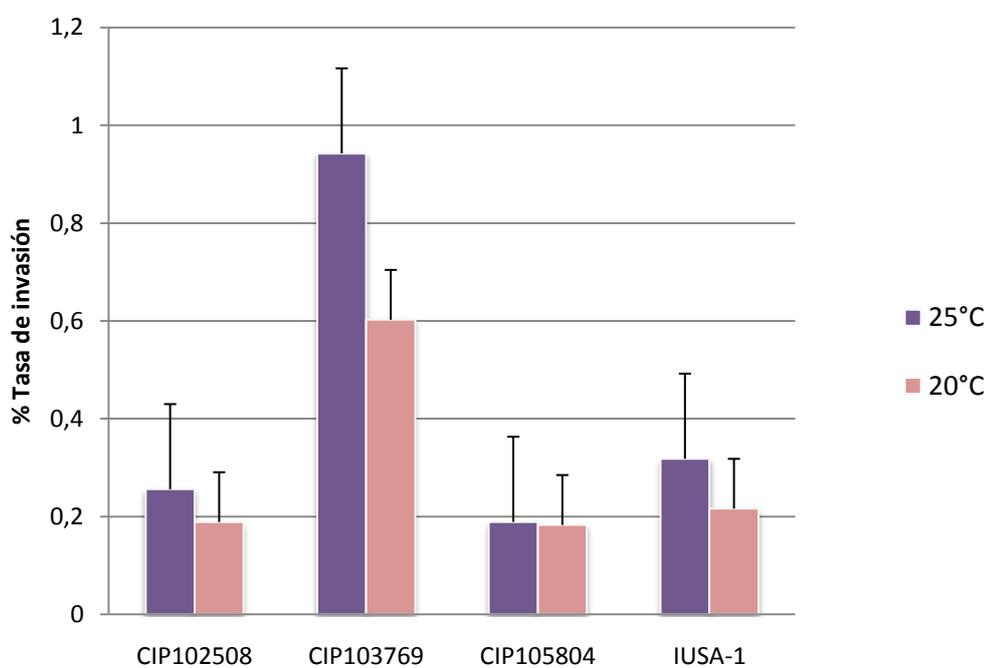


Figura 15.- Efecto de la temperatura de crecimiento bacteriano sobre la internalización de *Streptococcus iniae* en la línea celular SAF-1 tras 2 horas de incubación.

III.4.2- Efecto del tiempo de infección en la internalización

En la Figura 16, se observa la tasa de internalización intracelular de las diferentes cepas de *Streptococcus iniae* usadas en el estudio, en función de los diferentes tiempos de infección probados. Como observamos, la tasa de invasión aumenta con el tiempo de incubación en las 4 cepas, y así, la cepa CIP 103769, cepa con mayor tasa de invasión en el ensayo anterior, presenta una tasa de invasión del 0,26% a los 60 minutos, del 0,64% a los 90 minutos, y del 0,94% a los 120 minutos, mientras que a los 30 minutos la tasa de invasión es prácticamente inexistente, al igual que ocurre con el resto de las cepas de *Streptococcus iniae* analizadas. Las otras cepas en estudio, IUSA-1, CIP 102508 y CIP 105804 presentan una cinética similar, con tasas del 0,01% a los 60 minutos, del 0,26% a los 90 minutos, y del 0,31% a los 120 minutos para el caso de la cepa IUSA-1.

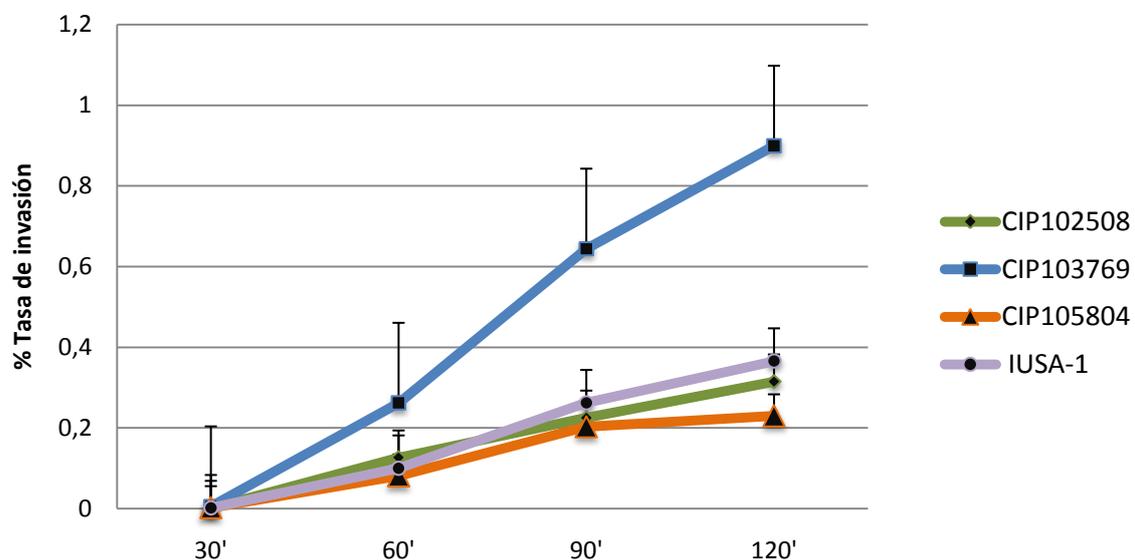


Figura 16.- Efecto del tiempo de incubación en la invasión de *Streptococcus iniae* en la línea celular SAF-1.

III.4.3- Implicación de la incubación celular a 4°C en la internalización de *Streptococcus iniae* en la línea celular SAF-1

En la figura 17 observamos los efectos producidos en la internalización de *Streptococcus iniae* por la incubación de la línea celular SAF-1 a 4°C. Como observamos, el hecho de incubar la línea celular a 4°C, produce una drástica disminución en la tasa de invasión de *Streptococcus iniae* ($p < 0,01$).

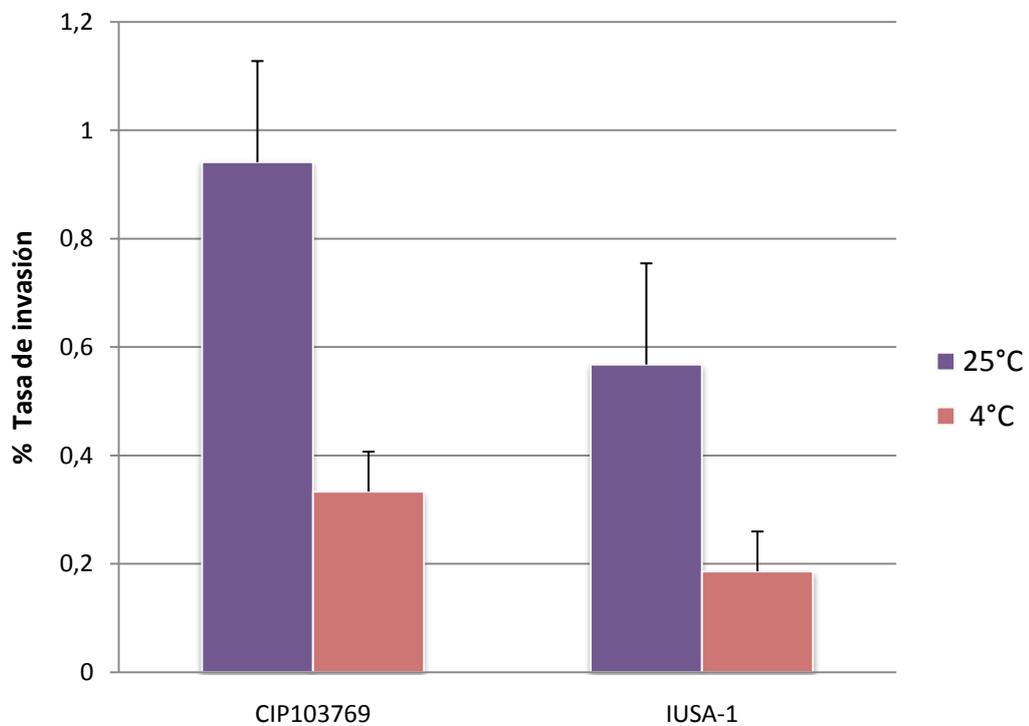


Figura 17.- Tasas de internalización de *Streptococcus iniae* en SAF-1 incubada a 4°C.

III.4.4- Efecto de la preincubación con antisuero de conejo

En la Figura 18 podemos observar el efecto de la preincubación de *Streptococcus iniae* con suero completo y descomplementado de conejo anti-*Streptococcus iniae*. Como se observa, tanto la incubación con suero de conejo completo, así como suero descomplementado, produce la disminución de manera significativa ($p < 0,01$) en las tasas de internalización de *Streptococcus iniae* en la línea celular SAF-1, siendo dicha disminución más evidente tras la preincubación con suero completo que con suero descomplementado. Con respecto a la cepa CIP 103769, de una tasa de internalización del 0,93%, tras preincubación con suero descomplementado pasa al 0,71%, y tras preincubación con suero completo al 0,39%. Por su parte, la cepa IUSA-1 pasa del 0,31% al 0,20% y 0,13% respectivamente.

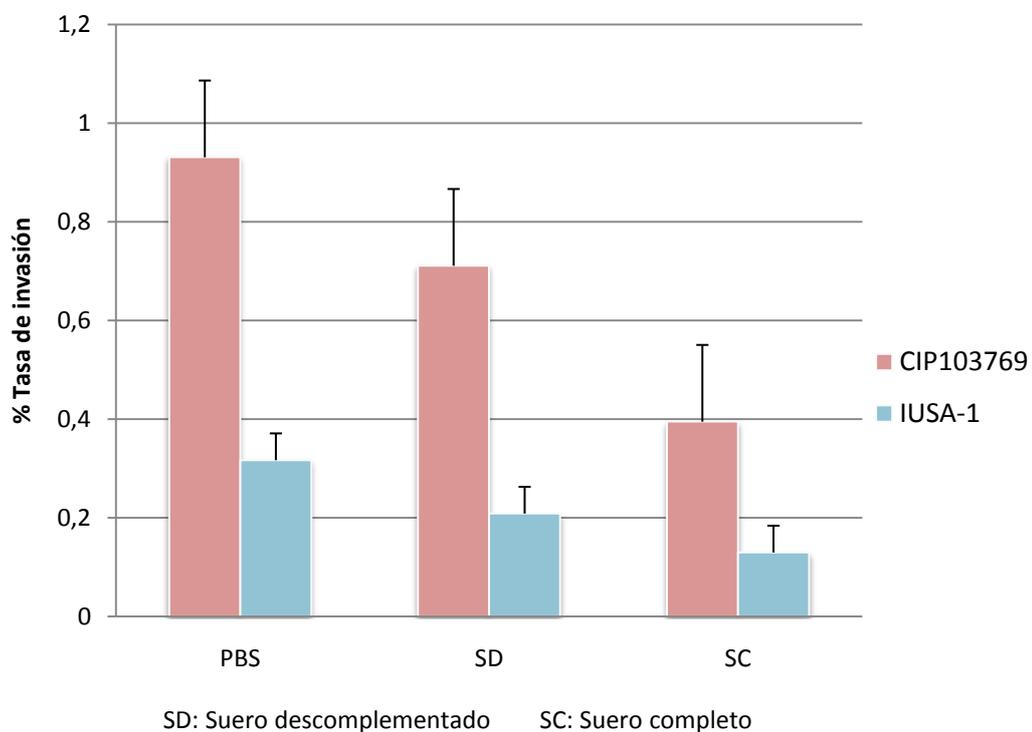


Figura 18.- Efecto de la preincubación con suero anti-*Streptococcus iniae* en la internalización en la línea celular SAF-1.

III.4.5- Efecto de la concentración del inóculo en la internalización bacteriana

En la Figura 19, se observa que la tasa de internalización aumenta con el incremento de la concentración del inóculo. Como se observa, se produce un aumento significativo ($p < 0,01$) de la tasa de internalización conforme incrementamos el inóculo inicial de 0,1X a 0,5X (siendo 1X la cantidad de 10 μ l), para posteriormente producirse un estancamiento, no existiendo aumento significativo en la tasa de invasión al incrementar la concentración del inóculo de 1X hasta 2X y 3X.

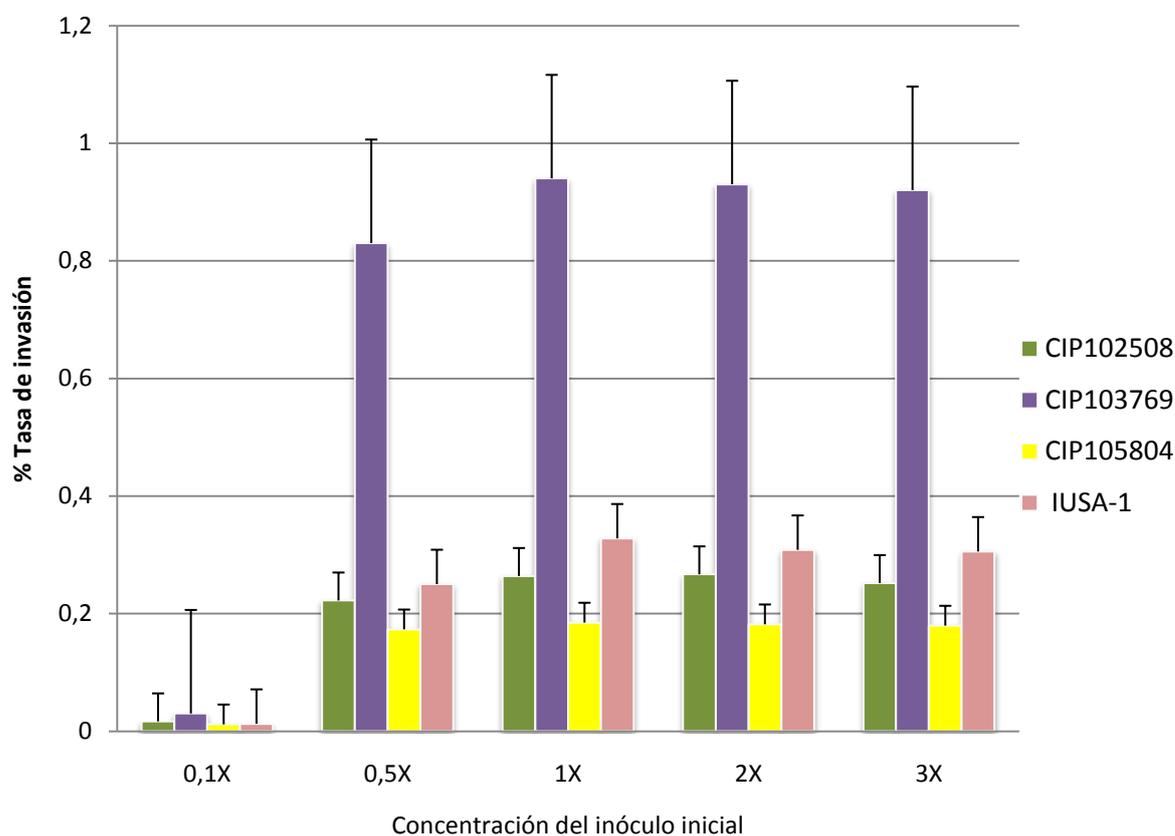


Figura 19.- Efecto de la concentración del inóculo inicial de *Streptococcus iniae* en la internalización en la línea celular SAF-1.

III.4.6- Efecto de la presencia de azúcares en la internalización bacteriana

En la Figura 20, se observa el efecto de cultivar las diferentes cepas de *Streptococcus iniae* en presencia de los azúcares glucosa y manosa. Como observamos, el hecho de cultivar las cepas en presencia de estos azúcares produce una disminución significativa en las tasas de internalización de las cepas de *Streptococcus iniae* CIP 103769 ($p < 0,01$) y IUSA-1 ($p < 0,05$) en la línea celular SAF-1. La cepa CIP 103769 pasa de una tasa de internalización del 0,94% tras dos horas de infección, a una tasa de internalización del 0,18%, mientras que la cepa IUSA-1 pasa del 0,31% al 0,15%.

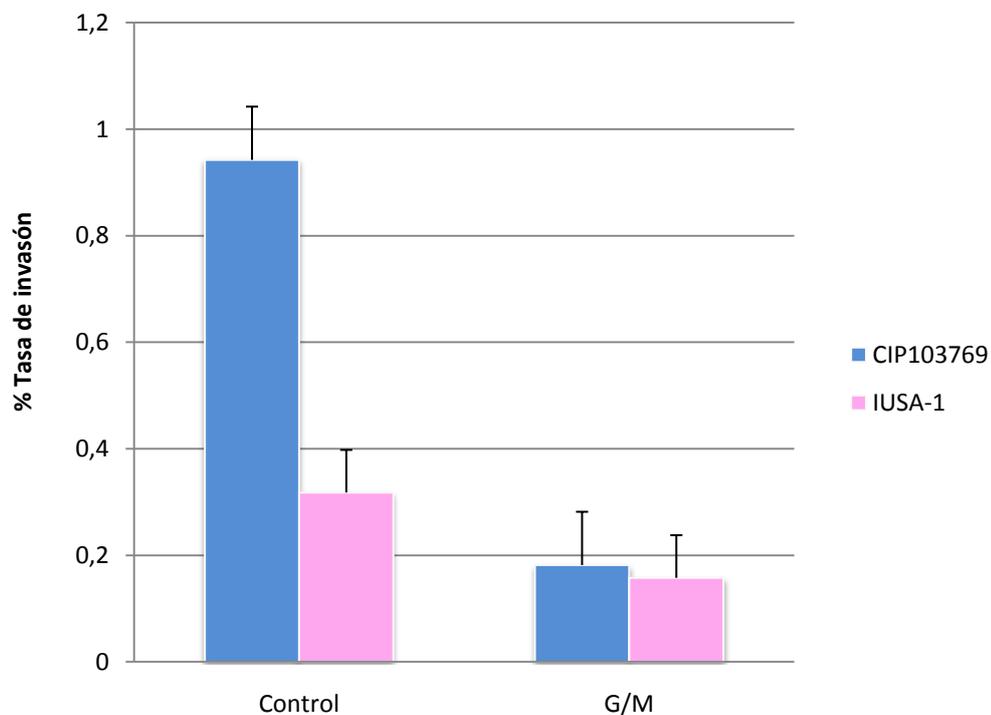


Figura 20.- Efecto del cultivo de *Streptococcus iniae* con glucosa y manosa en la internalización en la línea celular SAF-1.

III.4.7- Estudio de la tasa de supervivencia/replicación intracelular

En la Figura 21, observamos la evolución intracelular de *Streptococcus iniae* en la línea celular SAF-1. Los índices de proliferación intracelular (índice IPRO) de las cepas CIP103769 y IUSA-1, relación entre bacterias viables a las 24h y 2h, quedaron establecidos en 1,5 y 1,52, respectivamente, indicando una ligera multiplicación en el interior celular.

Como se observa en la Figura 21, *Streptococcus iniae* se multiplica ligeramente en el interior celular hasta las 24 horas postinfección, para después producirse una ligera disminución del número de bacterias viables del interior celular.

Dimos por finalizada la experiencia a las 72 horas postinoculación al observar pasado este tiempo daño celular con destrucción del tapiz.

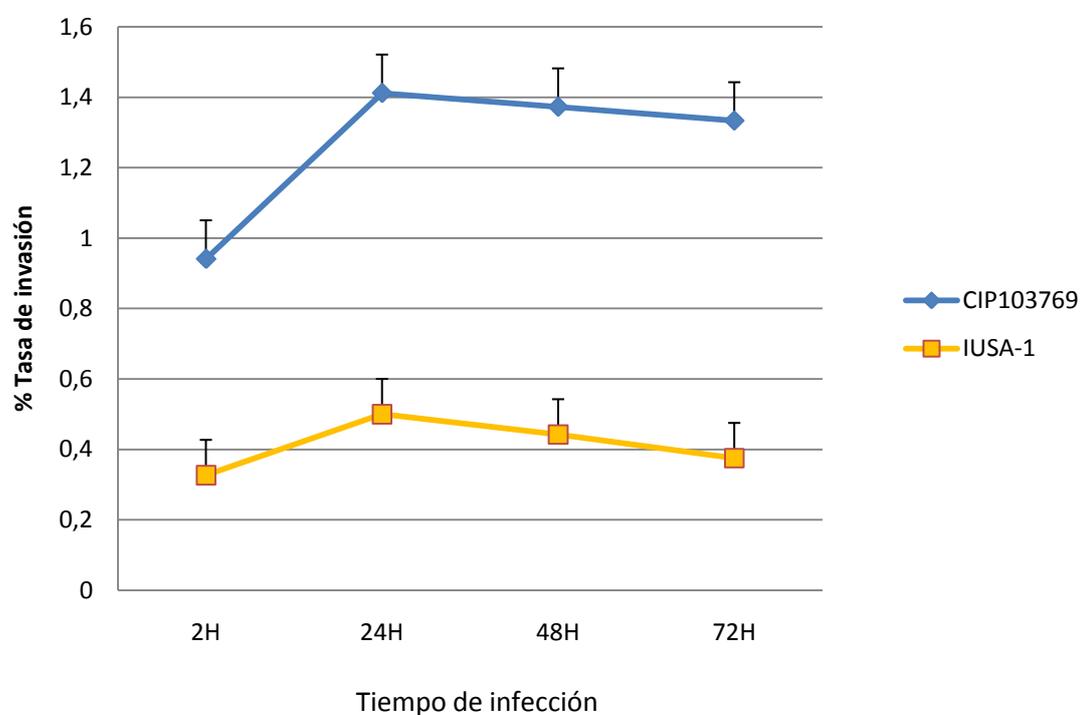


Figura 21.- Replicación intracelular de *Streptococcus iniae* en la línea celular SAF-1.

III.5.- Análisis de la adherencia e internalización intracelular por inmunofluorescencia

En la Figura 22, observamos la secuencia de la tinción doble por inmunofluorescencia realizada en la línea celular SAF-1 tras 90 minutos de infección con *Streptococcus iniae*. Las bacterias extracelulares las observamos teñidas en rojo con el fluorocromo alexa-594 en células sin permeabilizar (Figura 22a).

Una vez permeabilizadas las células, en verde observamos el total de bacterias (adheridas e internas) teñidas con el fluorocromo alexa-488 (Figura 22b) en donde la flecha indica un grupo de bacterias internas.

La siguiente secuencia (Figura 22c) se corresponde con la acción del DAPI, que tiñe de manera selectiva el ADN bacteriano y celular. La última imagen (Figura 22d) se corresponde con la superposición de las imágenes anteriores, donde podemos observar en naranja, bacterias adheridas teñidas con ambos fluorocromos, en verde bacterias internas, y en azul ADN bacteriano y celular. En el margen derecho de la imagen observamos una ampliación de la imagen enmarcada en “d” (x1000).

En la experiencia de control de adherencia por inactivación bacteriana por calor, no encontramos por inmunofluorescencia bacterias internas.

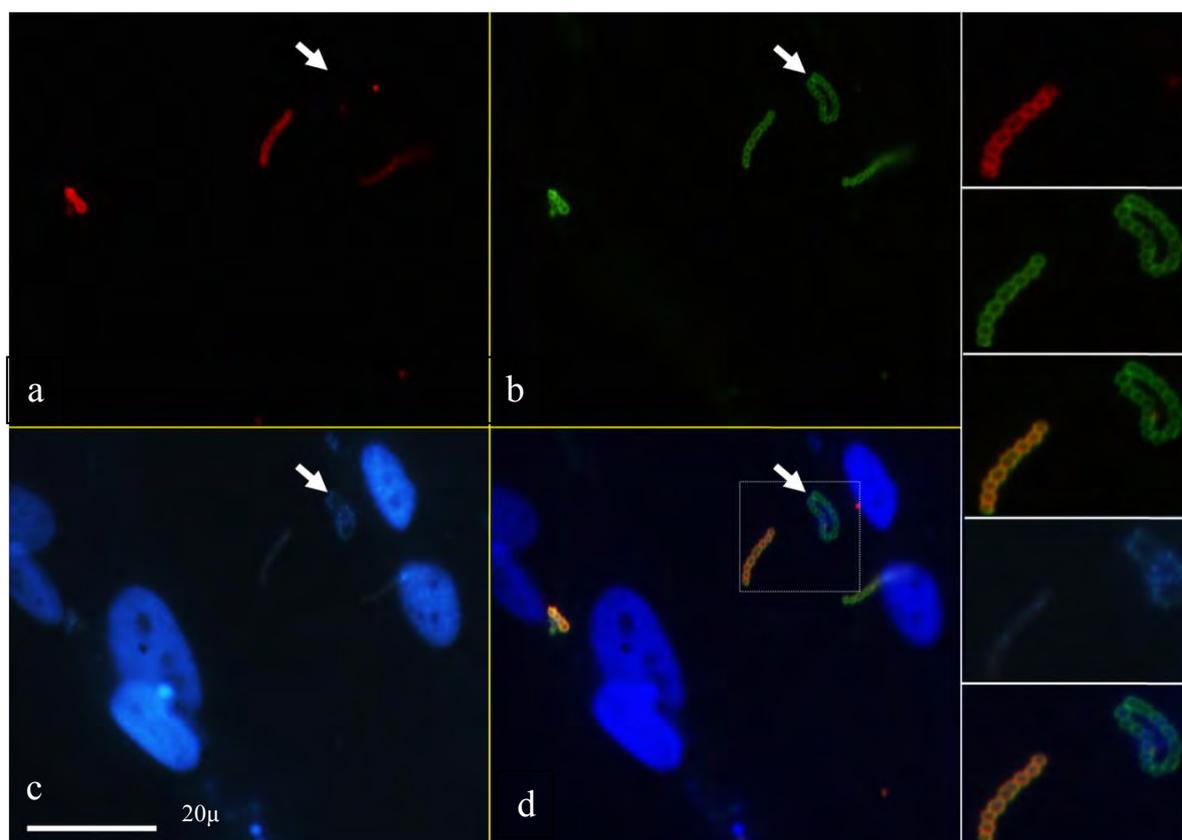


Figura 22.- Internalización y adherencia de *Streptococcus iniae* en SAF-1 por inmunofluorescencia



DISCUSIÓN

IV.- Discusión

IV.1- Identificación del agente causal del brote natural de enfermedad

La infección por *Streptococcus iniae* se asocia con mortalidades agudas y crónicas en muchas especies de peces, tanto de pesca extractiva como de acuicultura, y así, al menos, 27 especies de peces han sido descritas como sensibles a la infección (Agnew y cols., 2007). Sin embargo, no existen descripciones en bocinegro (*Pagrus pagrus*), y en dorada (*Sparus aurata*, L) es la primera vez que se describe esta infección en Europa.

En este estudio, la infección natural en bocinegro y dorada mostró elevada mortalidad en el periodo de una semana, con signos clínicos de septicemia hemorrágica, anorexia, natación anormal y muerte súbita, siendo éstos, signos clínicos similares a los descritos por otros autores en diferentes especies de peces infectados por *Streptococcus iniae*, como en híbridos de lubina estriada (*Morone chrysops x Morone saxatilis*) (Stoffregen y cols., 1996; Evans y cols., 2000), tilapia del nilo (*Oreochromis niloticus*) (Kitao y cols., 1981; Shoemaker y Klesius, 1997; Bowser y cols., 1998; Shoemaker y cols., 2001), híbridos de tilapia (*Oreochromis niloticus x Oreochromis aurea*) (Perera y cols., 1994 y 1998), trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) (Kitao y cols., 1981; Eldar y cols., 1995-a), corvinón ocelado (*Sciaenops ocellatus*) (Eldar y cols., 1999), seriola (*Seriola quinquerodiata*) (Kaige y cols., 1984); sigano pintado (*Siganus canaliculatus*) (Yuasa y cols., 1999), lubina (*Dicentrarchus labrax*) (Colorni y cols., 2002), lenguado japonés (*Paralichthys olivaceus*) (Nguyen y cols., 2002), pez ayu (*Plecoglossus altivelis*) (Kitao y cols., 1981), barramundi (*Lates calcarifer*) (Bromage y cols., 1999), así como especies de ciprínidos ornamentales (Russo y cols., 2006).

En lo referente a la identificación del agente causal del brote natural de enfermedad ocurrido en el verano de 2005 en las instalaciones del Instituto Canario de Ciencias Marinas, mediante

pruebas bioquímicas convencionales en placa y tubo no alcanzamos una correcta identificación, puesto que la identificación por características fenotípicas es muy dificultosa en ciertas especies del Género *Streptococcus*, debido a la imposibilidad de discriminar entre varias especies mediante pruebas bioquímicas básicas, tal y como describe Toranzo y colaboradores (2004). Sin embargo, nuestra cepa presenta el mismo perfil fenotípico que la cepa de referencia del Instituto Pasteur de *Streptococcus iniae* (CIP 102508).

Mediante la galería miniaturizada de identificación Api 20 Strep, obtuvimos el código 4563116, cuya lectura evidencia un error de identificación, ofreciendo como taxón significativo más cercano a *Streptococcus dysgalactiae* subsp. *equisimilis*. Este error en la identificación de *Streptococcus iniae* mediante la utilización de herramientas diagnósticas como la galería miniaturizada Api 20 Strep y otros sistemas de identificación semejantes, se describe anteriormente en multitud de estudios con sistemas como el Api 20 Strep o Rapid ID 32 Strep (Weinstein y cols., 1997; Poyart y cols., 1998; Dodson y cols., 1999; Lau y cols., 2003; Facklam y cols., 2005; Klesius y cols., 2006), sistema VITEK (Weinstein y cols., 1997; Lau y cols., 2003; Facklam y cols., 2005), sistema de ATB expression (Lau y cols., 2003) y sistema WalkAway de Microscan (Facklam y cols., 2005). Estos sistemas identifican erróneamente a *Streptococcus iniae* como *Streptococcus dysgalactiae* subsp. *equisimilis*, al igual que ocurre en nuestro estudio. También se describe un error en la identificación de *Streptococcus iniae* con el rapid ID 32 Strep, ya que algunos de los perfiles obtenidos son característicos de *Streptococcus uberis* (Weinstein y cols., 1997; Ravelo y cols., 2001). La incorrecta identificación de *Streptococcus iniae* mediante estos sistemas se debe a que dicha especie no se encuentra integrada en sus bases de datos (Agnew y cols., 2007), aunque las reacciones bioquímicas individuales de estos sistemas se pueden seguir utilizando en comparación con los estándares conocidos, y así, en la Tabla 4 ofrecemos el resultado individual de las reacciones bioquímicas obtenidas por el sistema Api 20 Strep de la cepa

IUSA-1, en comparación con la cepa de referencia del Instituto Pasteur CIP 102508, observando que ambas cepas presentan el mismo patrón fenotípico, a excepción de la reacción al almidón, donde nuestra cepa presenta resultado negativo, mientras que la cepa de referencia presenta reacción positiva. Es de destacar que, el código obtenido por el sistema Api 20 Strep (4563117) por la cepa de referencia del Instituto Pasteur, identifica erróneamente a la cepa como *Streptococcus dysgalactiae* subsp. *equisimilis* con una probabilidad del 99,9%.

La identificación definitiva mediante la secuenciación parcial del gen 16S rRNA se presentó como una herramienta apropiada en la correcta identificación de la cepa aislada en el Instituto Canario de Ciencias Marinas. Este hecho ya ha quedado reflejado en otros estudios, donde se describe que la secuenciación de dicho gen se mostró como el método más preciso y rápido para la correcta identificación de *Streptococcus iniae* (Zlotkin y cols., 1998-a; Roach y cols., 2006; Zhou y cols., 2008), debido a las dificultades que acarrea la identificación de esta especie mediante el análisis de sus características fenotípicas (Toranzo y cols., 1995).

IV.2- Perfil de resistencia antibiótica

Nuestra cepa de *Streptococcus iniae* fue sensible a 11 de los 15 antibióticos analizados, mostrando un perfil de resistencia antibiótica semejante a los descritos para esta especie en diversas publicaciones científicas. Este perfil, con sensibilidad a los beta-lactámicos, eritromicina, lincomicina, nitrofurantoína, enrofloxacin, bacitracina y oleandomicina, así como la resistencia al ácido nalidíxico, estreptomina, kanamicina y cefalotina, es semejante a los descritos por Pier y Madin (1976), Darwish e Ismaiel (2003), Facklam y colaboradores (2005), Creeper y Buller (2006), así como por Park y colaboradores (2009). A su vez, comparando nuestra cepa, con las cepas de referencia de *Streptococcus iniae* del Instituto Pasteur, CIP 102508, CIP 103769 y CIP 105804, observamos el mismo perfil de resistencia/sensibilidad antibiótica en 11 de los 15 antibióticos probados,

presentando únicamente diferencias de sensibilidad/resistencia antibiótica frente a la ampicilina, oleandomicina, meticilina y penicilina.

IV.3- Estudios de patogenicidad

IV.3.1- Patogenicidad en el curso agudo de la infección

El estudio de la patogenicidad de *Streptococcus iniae* en bocinegro y dorada, entendida como la capacidad de un agente infeccioso de producir enfermedad en un hospedador susceptible, se considera un estudio multifactorial, ya que depende de diversos factores como son la virulencia de la cepa, temperatura del agua, la especie de pez afectada, la vía de infección, la edad del pez y multitud de factores ambientales y de calidad del agua (Agnew y Barnes, 2007).

En nuestro estudio del curso agudo de la infección, hemos encontrado que nuestra cepa de *Streptococcus iniae* (IUSA-1) se muestra extremadamente virulenta para el bocinegro, con un valor de DL_{50} de $1,7 \times 10^4$ ufc/pez. En el caso de la dorada, aunque con un valor un logaritmo superior, hemos de considerar a nuestra cepa como muy virulenta también para la dorada (DL_{50} $1,32 \times 10^5$ ufc/pez). Durante dichas experiencias, se observaron los mismos signos clínicos descritos anteriormente en el brote natural de enfermedad en el ICCM y otras infecciones naturales en especies diferentes de peces (Pier y Madin, 1976; Romano y Mejía, 2003; Akhlaghi y Mahjor, 2004). Estos valores de DL_{50} son semejantes al descrito en barramundi por Bromage y Owens (2009), que determinaron una elevadísima susceptibilidad de esta especie frente a *Streptococcus iniae*, con un valor de DL_{50} de $3,2 \times 10^4$. A su vez, en tilapia se han descrito valores de DL_{50} desde 10^2 ufc/pez hasta 10^8 ufc/pez, en función del número de pases por pez de la cepa de *Streptococcus iniae* en estudio, encontrándose

disminuciones logarítmicas en el valor de la DL_{50} a medida que se sucedían diferentes pases por pez de la cepa, previos a la inoculación (Eldar y cols., 1995 a y b).

En especies ornamentales como el pez tiburón de cola roja (*Epalzeorhynchus bicolor*), *Streptococcus iniae* también se ha mostrado como una especie patógena muy virulenta, ya que la inoculación de $1,5 \times 10^4$ ufc/pez produjo una mortalidad superior al 70% de los peces inoculados en el periodo de 3-4 días. Valores semejantes al nuestro, los podemos encontrar también en trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*), mostrándose como una especie muy susceptible a la infección por *Streptococcus iniae*, con valores de DL_{50} de 3×10^4 ufc/pez (Bercovier y cols., 1997) y $2,5 \times 10^5$ ufc/pez (Eldar y Ghittino, 1999). En nuestras experiencias de DL_{50} , las dosis vía intraperitoneal de 10^8 y 10^7 ufc/pez resultaron letales para los peces inoculados, produciéndose un 100% de mortalidad entre las 48 y 72 horas postinoculación. Un punto importante a tener en cuenta es la temperatura del agua, ya que se ha demostrado que es un factor sumamente importante en la aparición o gravedad del curso clínico de la enfermedad. Y así, por ejemplo, los brotes agudos causados por *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* (pasteurellosis) normalmente sólo aparecen cuando la temperatura del agua se encuentra por encima de los 20°C, ya que por debajo de esta temperatura parece establecerse un equilibrio entre el patógeno y pez susceptible a la enfermedad (Blanco y cols., 2004). Otro ejemplo de la estrecha relación entre virulencia y temperatura del agua la podemos encontrar en el caso de la betanodavirus, donde podemos encontrar mortalidades que varían desde el 100% al 10% en función de la temperatura del agua (Tanaka y cols., 1998; Yuasa y cols., 2007). Nuestras experiencias de inoculación fueron realizadas a una temperatura del agua de 22-24°C, por lo que no podemos descartar variaciones en la virulencia de la cepa IUSA-1, y otras cepas de *Streptococcus iniae* en especies como el bocinegro y la dorada bajo diferentes condiciones experimentales de temperatura y otros factores medioambientales.

IV.3.2- Patogenicidad en el curso crónico de la infección

El estudio con *Streptococcus iniae* en la infección de curso crónico no produjo mortalidad alguna entre las doradas inoculadas una, dos o tres veces, a pesar haber empleado la dosis de 10^5 ufc/pez, dosis capaz de matar al 50% de la población en la experiencia de DL_{50} , siendo los únicos signos clínicos observados de interés la ligera anorexia y melanosis postinoculación. Esta discrepancia se la podemos atribuir a que en la experiencia de DL_{50} empleamos doradas de 15 gramos, mientras que en la experiencia de curso crónico, las doradas presentaban un peso medio aproximado de 35 gramos. Esta diferencia de tamaño parece ser fundamental para la disminución de la virulencia de nuestra cepa observada en la dorada, hecho demostrado en otras enfermedades que afectan a la acuicultura, como es el caso de la pasterelosis causada por *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*, enfermedad muy grave en larvas y alevines de dorada, pero a partir de los 30-50 gramos, esta especie se vuelve muy resistente a la infección (Toranzo y cols., 1997; Blanco y cols., 2004).

IV.3.3- Patogenicidad en los ensayos de cohabitación

El bocinegro se ha mostrado como una especie en la que *Streptococcus iniae* se transmite con facilidad de un ejemplar a otro, así como desde otra especie diferente, como es el caso de la dorada. Sin embargo, la transmisión del patógeno desde un bocinegro inoculado hacia doradas en cohabitación, parece no ser tan sencilla como en el caso anterior, si bien, hay que tener en cuenta que esta experiencia se realizó con ejemplares de dorada de 35 gramos, peso al cual la dorada parece mostrarse bastante resistente a la infección, tal y como comentábamos en la experiencia de evaluación de la infección de curso crónico con doradas de 35g, donde no se produjeron bajas, comparándola con la gran virulencia observada en la experiencia de curso agudo para determinar la DL_{50} usando doradas de 15g.

IV.4.- Estudios histopatológicos e inmunohistoquímicos

IV.4.1- Estudio histopatológico e inmunohistoquímico de la infección de curso agudo (DL₅₀)

La lesión descrita en el estudio histopatológico de la infección por curso agudo (DL₅₀), la meningoencefalitis granulomatosa e infiltración de células inflamatorias, con focos de macrófagos, eosinófilos y células mononucleares, se presenta como la lesión histopatológica más importante en las infecciones por *Streptococcus iniae* y otras estreptococias (Eldar y Ghittino, 1999; Romano y Mejía, 2003; Akhalghil y Mahjor, 2004; Altun y cols., 2005), pudiéndose correlacionar esta lesión con los síntomas clínicos de letargia y pérdida de orientación encontrados en nuestro estudio, tal y como han sugerido anteriormente Eldar y colaboradores (1999). A su vez, los hallazgos descritos en hígado, bazo y riñón, (infiltraciones multifocales de macrófagos), ya han sido descritas anteriormente en otras especies (Bercovier y cols., 1996; Eldar y Ghittino, 1999; Bromage y Owens, 2002). Sin embargo, no hemos encontrado otras lesiones descritas para *Streptococcus iniae* en otras especies, como en el caso de la trucha arcoíris, donde se describe glomerulonefritis y necrosis hepática focal (Akhalghil y Mahjor, 2004), si bien es cierto, también hemos encontrado otros estudios que describen un tejido renal en trucha arcoíris sin lesiones de interés, salvo ligeras infiltraciones celulares (Eldar y Ghittino, 1999). Estas discrepancias se pueden deber a varios factores, como una mayor o menor susceptibilidad en función de la especie afectada, edad, virulencia de la cepa causante de la infección, factores medioambientales, etc.

IV.4.2- Estudio histopatológico e inmunohistoquímico de la infección de curso crónico

A diferencia del estudio histopatológico de la infección de curso agudo, en esta experiencia no se encontraron lesiones histopatológicas de interés, a pesar de que la dosis inoculada, 10^5 ufc/pez, una, dos o tres veces, según el lote de peces, se corresponde con el mismo logaritmo que produjo el 50% de muertes de los animales inoculados en la experiencia de DL_{50} con doradas, y cuyo valor quedó establecido en $1,32 \times 10^5$ ufc/pez.

Una vez observada la inexistencia de bajas entre las doradas inoculadas una, dos y tres veces, unida a la falta de lesiones histopatológicas de interés en las dorada de 35g usadas en esta experiencia, nos hace sospechar que la patogenicidad de *Streptococcus iniae* está directamente influenciada por el tamaño del pez. Una vez que no pudimos aislar la cepa inoculada por métodos microbiológicos en los peces sacrificados, y que sin embargo el estudio inmunohistoquímico sí evidenció inmunoreactividad positiva, únicamente podemos atribuir esta inmunoreactividad a la presencia de bacterias muertas y/o antígenos en los lotes de peces inoculados en 3 ocasiones, aunque no podemos descartar totalmente la existencia de una carga bacteriana residual latente en macrófagos u otros tipos celulares.

IV.4.3- Estudio histopatológico e inmunohistoquímico de la experiencia por cohabitación

Con los datos que se desprenden de la Tabla 8, observamos que la infección es fácilmente transmitida a bocinegros a partir de otros bocinegros o doradas inoculadas. Sin embargo, no hemos observado contagio de doradas a partir de bocinegros o doradas inoculadas. Con estos resultados habría que extremar las condiciones higiénico-sanitarias de las explotaciones que cultiven diferentes especies, y especialmente bocinegros, ya que se muestra como una especie muy sensible y de fácil contagio a partir de otros ejemplares de su

misma especie o especies diferentes. Tampoco podemos descartar el contagio hacia doradas de menor tamaño, ya que esta especie se mostró muy sensible a la infección en la experiencia de determinación de DL_{50} con peces de 15 gramos.

IV.5- Experiencias de adherencia e invasión celular

Hasta los trabajos de Zlotkin y colaboradores (2003), *Streptococcus iniae* no era considerado un patógeno intracelular facultativo, capaz de invadir y sobrevivir en el interior de células eucariotas. La capacidad de adherirse e invadir células de peces puede permitir a *Streptococcus iniae* atravesar barreras protectoras, evadir mecanismos de defensa natural, y potencialmente, establecer la infección (Eyngor y cols., 2007). Hasta ahora, los mecanismos involucrados en la adherencia, invasión y supervivencia intracelular de *Streptococcus iniae* en tejidos de peces son poco conocidos a pesar de la utilización de diferentes modelos *in vitro* e *in vivo*.

La adherencia e internalización de *Streptococcus iniae* en SAF-1, línea celular no fagocítica derivada de fibroblastos de aleta de dorada, no había sido analizado previamente, a pesar de la importancia de esta línea celular como un modelo para estudiar la patogenicidad de *Streptococcus iniae* en dorada y otras especies marinas.

Nuestros datos demuestran que *Streptococcus iniae* tiene capacidad de adherirse e invadir la línea celular SAF-1 con diferentes tasas, en función de la cepa analizada, observándose una correlación positiva entre tasa de adherencia e invasión, corroborando que la invasión de *Streptococcus iniae* en la línea celular SAF-1 es un evento postadherencia. Tras la internalización, *Streptococcus iniae* permanece viable durante más de 72 horas, por lo que existe la posibilidad de que *Streptococcus iniae* pueda persistir o difundirse a través de células

no fagocíticas en diferentes tejidos de los peces, pudiendo facilitar la progresión de la enfermedad en los peces infectados.

A la hora de comparar diferentes estudios, hay que tener en cuenta una serie de consideraciones, ya que los resultados se pueden ver influenciados por las diferentes cepas analizadas, medios de cultivo bacteriano usados, y el uso de diferentes métodos de cuantificación de bacterias internalizadas, tal y como describen Elkamel y Thune (2003) y López-Dóriga y colaboradores (2000) con *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* con la línea celular EPC, donde se obtienen resultados contradictorios en la capacidad de replicación intracelular de este patógeno. Con respecto a estudios realizados con *Streptococcus iniae*, en el trabajo de Buchanan y colaboradores (2008), también se observa la enorme variabilidad en los datos observados, describiéndose tasas de adherencia muy diferentes en función de la línea celular utilizada (entre el 25% y 0,1%), así, como unas tasas de invasión entre el 18% y el 0,1%. A su vez, Eyngor y colaboradores (2007), usando las mismas cepas que en el trabajo de Buchanan y colaboradores (2008), describieron tasas de adherencia e invasión del 11,3% y 1,35%, respectivamente, en células epiteliales de trucha arco iris. La máxima adherencia descrita en nuestro estudio para la línea celular SAF-1 (5,4% para la cepa CIP 103769 a 25°C) es inferior a la descrita en otros estudios para otras líneas celulares, pudiéndose explicar este hecho por factores como las cepas empleadas, línea celular usada, temperatura de incubación, etc, pudiendo concluir que la adherencia y la invasión celular dependen directamente de varios factores, como la línea celular utilizada, cepas analizadas y sus condiciones de cultivo. Un hecho sorprendente es lo descrito por Buchanan y colaboradores (2008) con células epiteliales de carpa (línea celular CLC) que describen que cepas avirulentas de *Streptococcus iniae* eran significativamente más adherentes e invasivas que cepas virulentas, por lo que se sugieren que la incapacidad de producir enfermedad en los peces no está relacionado con la capacidad de adherirse o invadir células de peces.

Los mecanismos que permiten a *Streptococcus iniae* atravesar la barrera hematoencefálica no están claras. La mayoría de los patógenos meníngeos, como *Streptococcus pneumoniae*, *Escherichia coli* K1, y los estreptococos del grupo B, interactúan directamente con las células de la barrera hematoencefálica como bacterias libres (Tuomanen, 1996). La posibilidad de que un evento similar se lleve a cabo también en la infección por *Streptococcus iniae* se ve reforzada por los estudios de Fuller y colaboradores (2001) que demostraron que *Streptococcus iniae* causaba daño celular en la línea celular CEMB, sugiriendo que la afectación del sistema nervioso central (SNC) se podía atribuir en parte a la capacidad de este patógeno de inducir lesión celular, produciendo la alteración de la barrera hematoencefálica. Otra posibilidad, como ocurre en *Streptococcus suis* tipo II (Williams y Blakmore, 1990) o *Listeria monocytogenes* (Drevets y cols., 2001), es que las bacterias puedan transportarse hasta el SNC en asociación con monocitos o fagocitos.

Nuestros datos confirman que en el proceso de internalización de *Streptococcus iniae* en células SAF-1, interviene activamente el metabolismo celular, ya que el proceso de invasión fue inhibido parcialmente por la incubación celular a 4°C, tal y como se ha descrito en otros estudios con otros patógenos (Magariños y cols., 1996; López-Dóriga y cols., 2000; Padilla y cols., 2008; Acosta y cols., 2009). La incapacidad de *Streptococcus iniae* de invadir la línea celular SAF-1 tras su inactivación por calor, confirma que el proceso de internalización es dependiente de factores que se inactivan por calor y que la línea celular SAF-1 no es una línea fagocítica.

Tanto la preincubación con suero completo y suero descomplementado, así como azúcares como glucosa y manosa parecen bloquear ligandos y receptores específicos bacterianos y celulares, respectivamente, ya que se produce la disminución en la capacidad invasiva de *Streptococcus iniae* en la línea celular SAF-1. Los mecanismos responsables de la adhesión, y cómo pueden interactuar con los receptores celulares presentes en células no fagocíticas y con

los ligandos bacterianos para facilitar la invasión de *Streptococcus iniae*, cobra gran importancia para el mejor entendimiento de la patogenicidad de *Streptococcus iniae* en acuicultura, por lo que se hacen necesarios estudios que profundicen y clarifiquen este aspecto.

En conclusión, nuestros datos demuestran que *Streptococcus iniae* es capaz de invadir células no fagocíticas de peces, y que una vez en su interior, es capaz de replicarse permaneciendo viables durante más de 72 horas. Estos hallazgos *in vitro* son de sumo interés, ya que plantean la posibilidad de que *Streptococcus iniae* pueden difundirse *in vivo* a través de células no fagocíticas facilitando la difusión de la enfermedad, permitiéndole a su vez, proporcionarle cierto grado de protección frente a las defensas del pez o proporcionar un nicho adecuado para su proliferación, permitiendo también el establecimiento del estado portador de la enfermedad.

IV.6- Líneas futuras de trabajo

Una vez conocido que *Streptococcus iniae* es un patógeno intracelular facultativo capaz de residir en el interior de células no fagocíticas de la dorada y otras especies de peces, se abren nuevas de líneas futuras de trabajo.

La entrada de este patógeno en células no fagocíticas puede ser utilizada por esta bacteria para escapar del sistema inmunitario o para facilitar la diseminación en los tejidos de pez. El estudio en profundidad del tráfico intracelular de *Streptococcus iniae* en células no fagocíticas de los peces nos permitirá conocer las bases celulares y moleculares de dichos procesos, hoy en día totalmente desconocidos.

La profundización en el estudio sobre las estrategias de invasión y tráfico intracelular de *Streptococcus iniae* en células no fagocíticas de peces no sólo ayudará al desarrollo de nuevas dianas terapéuticas y vacunas, sino también, a identificar aspectos desconocidos de las vías de señalización relacionadas con la respuesta celular e inmunitaria frente a las infecciones por *Streptococcus iniae* y otros patógenos intracelulares de peces.

En el caso de *Streptococcus iniae*, la interacción con células no fagocíticas de los peces puede conferirle cierto grado de protección frente a las defensas del pez, principalmente macrófagos, o proporcionar un nicho adecuado el establecimiento del estado portador. Además, la infección de células no pertenecientes al sistema inmunitario de la dorada por *Streptococcus iniae*, podría afectar el curso de la infección en los tejidos, ya que actualmente se sabe que las infecciones bacterianas activan defensas celulares directa o indirectamente a través de la inducción de mediadores proinflamatorios y citoquinas. El análisis de la expresión de citoquinas en células de peces infectadas por *Streptococcus iniae* pueden ser relevante para la alerta inmunitaria frente a infecciones por patógenos intracelulares de peces. Asimismo, es

posible que este patógeno intracelular facultativo inhiba algunas de las rutas de señalización encaminadas a la producción de mediadores inflamatorios o citoquinas, lo cual, evitaría un despliegue eficaz de células del sistema inmunitario. Para ello, será necesario la utilización de la PCR a tiempo real tras infecciones experimentales con *Streptococcus iniae* para conocer los perfiles de expresión de genes de peces como la dorada que sean relevantes en nuestro modelo.

Por lo tanto, descifrar si *Streptococcus iniae* es capaz de inducir o amplificar señales inmunitarias tras la infección intracelular en células no fagocíticas, podría ayudar a comprender mejor el sistema inmunitario de peces.

En este estudio hemos comprobado que diferentes cepas de *Streptococcus iniae* son capaces de penetrar en células no fagocíticas de dorada y de multiplicarse y permanecer en el interior celular. Tras estos resultados, estamos convencidos de que un mejor conocimiento de la patogénesis de *Streptococcus iniae* en células no fagocíticas y por tanto, de las interacciones bacteria-célula, puede ayudar al desarrollo de nuevas herramientas para combatir esta enfermedad, y también aumentará nuestro conocimiento sobre el sistema inmunitario de los peces.



CONCLUSIONES

PRIMERA.- *Streptococcus iniae* se muestra como una especie patógena muy virulenta para el bocinegro (*Pagrus pagrus*) y algo menos la dorada (*Sparus aurata*), si bien, dicha virulencia puede verse influenciada por diversos factores como la edad del pez afectado, temperatura del agua...

SEGUNDA.- *Streptococcus iniae* se transmite fácilmente entre bocinegros, y desde doradas infectadas hacia bocinegros que pudieran encontrarse en las inmediaciones.

TERCERA.- *Streptococcus iniae* es capaz de adherirse e invadir la línea celular SAF-1, y una vez en su interior, se replica permaneciendo viable durante más de 72 horas, planteando la posibilidad de que *Streptococcus iniae* se difunda a través de células no fagocíticas del pez, facilitando la difusión de la enfermedad.

CUARTA.- La capacidad de *Streptococcus iniae* de invadir células no fagocíticas de peces, le puede proporcionar cierto grado de protección frente a las defensas del pez o proporcionar un nicho adecuado para su proliferación, posibilitando el establecimiento del estado portador.





BIBLIOGRAFÍA

- Acosta F, Real F, Caballero MJ, Sieiro C, Fernández A y Rodríguez LA. (2002). Evaluation of immunohistochemical and microbiological methods for the diagnosis of brown trout infected with *Hafnia alvei*. *Journal of Aquatic Animal Health*. 14: 77-83.
- Acosta F, Vivas J, Padilla D, Vega J, Bravo J, Grasso V y Real F. (2009). Invasion and survival of *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* in non-phagocytic cells of gilthead sea bream, *Sparus aurata* L. *Journal of Fish Diseases*. 32: 535-541.
- Adams, A y Marín de Mateo. (1994). Immunohistochemical detection of fish pathogens. En: Techniques in Fish Immunology Volume 3. Stolen, Fletcher, Kaattari y Rowley (Eds). SOS Publications. pp 133-144.
- Adams A, Thompson KD, Morris D, Farias C y Chen SC. (1995-a). Development and use of monoclonal antibody probes for immunohistochemistry, ELISA and IFAT to detect bacterial and parasitic fish pathogens. *Journal of Fish and Shellfish Immunology*. 5: 537-547.
- Adams A, Thompson KD, Morris D y Farias C. (1995-b). Fish Immunodiagnosics. Microbes for Better Living, MICON – 1994, 35th Annual Conference of Association of Microbiologists of India, pp. 91-97.
- Agnew W y Barnes AC. (2007). *Streptococcus iniae*: an aquatic pathogen of global veterinary significance and a challenging candidate for reliable vaccination. *Veterinary Microbiology*. 122: 1-15.
- Ahne W. (1985). Viral infection cycles in pike (*Esox lucius* L.). *Zeitschrift für angewandte Ichthyologie*. 1: 90-1.
- Akhlaghil M y Mahjor AA. (2004). Some histopathological aspects of streptococcosis in cultured rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Bulletin of European Association of Fish Pathologists*. 24: 132.
- Alday-Sanz V, Rodger H, Turnbull T, Adams A y Richards RH. (1994). Immunohistochemical identification of *Piscirickettsia salmonis* in Atlantic salmon, *Salmo salar* L. *Journal of Fish Diseases* 17: 189-192.
- Alderman DJ y Hastings TS. (1998). Antibiotic use in Aquaculture: Development of Antibiotic Resistance, Potential for Consumer Health Risks. *International Journal of Food Science & Technology*. 33: 139-55.
- Al-Sereiti M, Abu-Amer K y Sen P. (1999). Pharmacology of rosemary (*Rosmarinus officinalis* Linn.) and its therapeutic potentials. *International Journal of Experimental Biology*. 37:124-130.
- Altun S, Diler A, Diler Ö, Basak K e Isikli B. (2005). Histopathology of streptococcosis in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum). *Bulletin of the European Association of Fish Pathologist*. 25: 131-135.

APROMAR. (2007). Asociación empresarial de productores de cultivos marinos. La acuicultura marina de peces en España. Informe Apromar, 68 pp.

APROMAR (2009). Asociación empresarial de productores de cultivos marinos. La acuicultura marina de peces en España. Informe Apromar, 68pp.

Arahal DR, Sánchez E, Macián MC y Garay E. (2008). Value of *recN* sequences for species identification and as a phylogenetic marker within the family *Leuconostocaceae*. *International Microbiology*. 11: 33-39.

Austin B y Robertson PAW. (1993). Recovery of *Streptococcus milleri* from ulcerated koi carp *Cyprinus carpio* in the UK. *Bulletin of The European Association of Fish Pathologists*. 13: 207-209.

Austin B y Cross, N. (1998). Infection of pronephros cell cultures derived from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum) with bacterial fish pathogens: A comparison with whole fish infectivity studies *Methods in Cell Science*. 19 (4): 317-324.

Austin B y Austin DA. (1999). Bacterial Fish Pathogens. En: Diseases of Farmed and Wild Fish. 3rd edn. Springer-Verlag, Chichester.

Bachrach G, Zlotkin A, Hurvit A, Evans D y Eldar A. (2001). Recovery of *Streptococcus iniae* from diseased fish previously vaccinated with a *Streptococcus* vaccine. *Applied and Environmental Microbiology*. 67: 3756-3758.

Baiano JCF, Tumbol RA, Umaphathy A y Barnes AC. (2008). Identification and molecular characterisation of a fibrinogen binding protein from *Streptococcus iniae*. *Microbiology*. 8: 2180-2188.

Baiano JCF y Barnes AC. (2009). Towards Control of *Streptococcus iniae*. *Emerging Infectious Diseases*. 15: 1891-1896.

Balebona MC, Moriñigo MA y Borrego JJ. (1995). Role of extracellular products in the pathogenicity of *Vibrio* strains on cultured gilthead seabream (*Sparus aurata*). *Microbiology*. 11: 439-446.

Barnes AC, Horne MT, Ellis AE. (2003). *Streptococcus iniae* expresses a cell surface non-immune trout immunoglobulin-binding factor when grown in normal trout serum. *Fish and Shellfish Immunology*. 15: 425-431.

Bauer AW, Kirby WM, Sherris JC y Turck M. (1966). Antibiotic susceptibility testing by standardized single disk method. *American Journal of Clinical Pathology*. 45: 493-496.

Baya AM, Lupiani B, Hetrick FM, Roberson BS, Lukacovic R, May E y Poukish C. (1990). Association of *Streptococcus* sp. with mortalities in the Chesapeake Bay and its tributaries. *Journal of Fish Diseases*. 13:251-253.

- Bejar J, Borrego JJ y Alvarez MC. (1997). A continuous cell line from the cultured marine fish gilt-head seabream (*Sparus aurata* L.). *Aquaculture*. 150: 143-153.
- Bercovier H, Ghittino C y Eldar A. (1996). Immunization with bacterial antigens: infections with streptococci and related organisms. En: Second International Symposium on Progress in Fish Vaccinology, Soria Moria Hotel, Oslo, Norway, June 5-7, pp. 153-160.
- Bercovier H, Ghittino C, y Eldar A. (1997). Immunization with bacterial antigens: Infections with streptococci and related organisms. En: Fish Vaccinology. Gudding, Lillehaug, Midtlyng, y Brown. (eds). *Developments in Biologicals*, Vol. 90. Karger, Basel, Switzerland.
- Bernard J y Bremont M. (1995). Molecular biology of fish viruses: a review. *Veterinary Research*. 26: 341-351.
- Blanco MM, Liébana P, Gibello A, Alcalá C, Fernández- Garayzábal JF y Lucas Domínguez. (2004). Principales patologías bacterianas en la piscicultura española. www.veterinaria.org
- Bolotin S, Fuller JD, Bast DJ, Beveridge TJ y de Azavedo JCS. (2007). Capsule expression regulated by a two-component signal transduction system in *Streptococcus iniae*. *Immunology and Medical Microbiology*. 50: 366-374.
- Bols NC. (1991). Biotechnology and aquaculture: the role of cell cultures. *Biotechnology*. 9: 31-49.
- Bonar CJ y Wagner RA. (2003). A third report of „golf ball disease“ in an Amazon river dolphin (*Inia geoffrensis*) associated with *Streptococcus iniae*. *Journal of Zoo and Wildlife Medicine*. 34: 296-301.
- Bowser PR, Wooster GA, Getchell RG, Timmons MB. (1998). *Streptococcus iniae* infection of tilapia *Oreochromis niloticus* in a recirculation production facility. *Journal of World Aquaculture Society*. 29: 335-339.
- Braag RR y Broere JSE. (1986). Streptococcosis in rainbow trout in South Africa. *Bulletin of the European Association of Fish Pathologists*. 6: 89-91.
- Bromage ES, Thomas A y Owens L. (1999). *Streptococcus iniae*, a bacterial infection in barramundi *Lates calcarifer*. *Disiases of Aquatic Organisms*. 36: 177-181.
- Bromage ES y Owens L. (2002). Infection of barramundi *Lates calcarifer* with *Streptococcus iniae*: effects of different routes of exposure. *Diseases of Aquatics Organisms*. 52:199-205.
- Bromage E y Owens L. (2009). Environmental factors affecting the susceptibility of barramundi to *Streptococcus iniae*. *Aquaculture*. 290: 224-228.
- Browne FA, Clark C, Bozdogan B, Dewasse BE, Jacobs MR y Appelbaum PC. (2002). Single and multi-step resistance selection study in *Streptococcus pneumoniae*

comparing ceftriaxone with levofloxacin, gatifloxacin and moxifloxacin. *International Journal of Antimicrobial Agents*. 20: 93-99.

Buchanan JT, Stannard JA, Lauth X, Ostland VE, Powell HC y Westerman ME. (2005). *Streptococcus iniae* phosphoglucomutase is a virulence factor and a target for vaccine development. *Infection and Immunity*. 73: 6935-6944.

Buchanan JT, Colvin KM, Vicknair MR, Patel SK, Timmer AM y Nizet V. (2008). Strain-associated virulence factors of *Streptococcus iniae* in hybrid-striped bass. *Veterinary Microbiology*. 18: 145-53.

Buck JD, Shepard LL, Bubucis SPM, Spotte S, McClave K, y Cook RA. (1989). Microbiological characteristics of white whale (*Delphinapterus leucas*) from capture through extended captivity. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*. 46: 1914-1921.

Carson J, Gudkovs N y Austin B. (1993). Characteristics of an *Enterococcus*-like bacterium from Australia and South Africa, pathogenic for rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum). *Journal of Fish Diseases*. 16: 381-388.

Centers for Disease Control and Prevention (1996). Invasive infection due to *Streptococcus iniae*. Ontario, CDC - *Morbidity and Mortality Weekly Report*. 45: 650-653.

Centers for Disease Control. (2004). Emerging infectious diseases: A Peer-Reviewed. *Journal Tracking and Analyzing Disease Trends*. 10: 1523-1712.

Cheng S, Hu Y, Jiao X, Sun L. (2010). Identification and immunoprotective analysis of a *Streptococcus iniae* subunit vaccine candidate. *Vaccine* (en prensa).

Colorni A, Diamant A, Eldar A, Kvitt H, Zlotkin A. (2002). *Streptococcus iniae* infections in Red Sea cage-cultured and wild fishes. *Diseases of Aquatic Organisms*. 49: 165-170.

Cook DW y Lofton SR. (1975). Pathogenicity studies with a *Streptococcus* sp. isolated from fishes in an Alabama-Florida fish kill. *Transactions of the American Fisheries Society*. 2: 286-288.

Creep J y Buller N. (2006). An outbreak of *Streptococcus iniae* in barramundi (*Lates calcarifera*) in freshwater cage culture, *Australian Veterinary Journal*. 84: 408-411.

Darwish AM y Ismaiel AA. (2003). Laboratory Efficacy of Amoxicillin for the Control of *Streptococcus iniae* Infection in Sunshine Bass. *Journal of Aquatic Animal Health*. 15: 209-214.

Dodson SV, Maurer JJ y Shotts EB. (1999). Biochemical and molecular typing of *Streptococcus iniae* isolated from fish and human cases. *Journal of Fish Diseases*. 22: 331-336.

Doménech A, Prieta J, Fernández-Garayzabal J.F, Collins MD, Jones D, Domínguez L. (1993). Phenotypic and phylogenetic evidence for a close relationship between *Lactococcus garvieae* and *Enterococcus seriolocida*. *Microbiología SEM*. 9: 63-68.

Doménech A, Fernández-Garayzabal JF, Pasqual C, Garcia JA, Cutuli MT, Moreno MA, Collins MD y Domínguez L. (1996). Streptococcosis in cultured turbot, *Scophthalmus maximus* (L.), associated with *Streptococcus parauberis*. *Journal of Fish Diseases*. 19: 33-38.

Drevets DA, Jelinek TA y Freitag NE. (2001). *Listeria monocytogenes*-Infected Phagocytes Can Initiate Central Nervous System Infection in Mice. *Infection and Immunity*. 69: 1344-1350.

Dunn JL, Buck JD y Robeck TR. (2001). Bacterial diseases of cetaceans and pinnipeds. En: CRC Handbook of marine mammal medicine. Dierauf y Gulland (eds.). CRC Press, Boca Raton, Florida, pp. 309-335.

Eberhard T, Kronvall G, Ullberg MBB. (1999). Surface bound plasmin promotes migration of *Streptococcus pneumoniae* through reconstituted basement membranes. *Microbial Pathogenesis*. 26: 175-81.

Eldar A, Bejerano Y y Bercovier H. (1994). *Streptococcus shiloi* and *Streptococcus difficile*: two new streptococcal species causing meningoencephalitis in fish. *Current Microbiology*. 28: 139-143.

Eldar A, Bejerano Y, Livoff A, Horovitz A y Bercovier H. (1995-a). Experimental streptococcal meningo-encephalitis in cultured fish. *Veterinary Microbiology*. 43: 33-40.

Eldar A, Frelie PF, Assenta L, Varner PW, Lawhon S y Bercovier H. (1995-b). *Streptococcus shiloi*, the name of an agent causing septicemic infection in fish, is a junior synonym of *Streptococcus iniae*. *International Journal of Systematic Bacteriology*. 45: 840-842.

Eldar A, Horovitz A y Bercovier H. (1997). Development and efficacy of a vaccine against *Streptococcus iniae* infection in farmed rainbow trout. *Veterinary Immunology and Immunopathology*. 56: 175-183.

Eldar A y Ghittino C. (1999). *Lactococcus garvieae* and *Streptococcus iniae* infections in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*: similar, but different diseases. *Diseases of Aquatic Organisms*. 36: 227-231.

Eldar A, Perl S, Frelief PF y Bercovier H. (1999). Red drum *Sciaenops ocellatus* mortalities associated with *Streptococcus iniae* infection. *Diseases of Aquatic Organisms* 36: 121-127.

Elkamel AA y Thune RL. (2003). Invasion and replication of *Photobacterium damsela* subspecies *piscicida* in fish cell lines. *Journal of Aquatic Animal Health*, 15: 167-174

Essbauer S y Ahne W. (2001). Viruses of lower vertebrates. *Journal of Veterinary Medicine*. 48: 403-475.

Estepa A, De Blas C, Ponz F y Coll JM. (1995). Detection of trout haemorrhagic septicaemia rhabdovirus by capture with monoclonal antibodies and amplification with PCR. *Veterinary Research*. 26: 530-532.

Evans JJ, Shoemaker CA y Klesius PH. (2000). Experimental *Streptococcus iniae* infection of hybrid striped bass (*Morone chrysops*×*Morone saxatilis*) and tilapia (*Oreochromis niloticus*) by nares inoculation. *Aquaculture*. 189: 197-210.

Evans JJ, Klesius PH, Glibert PM, Shoemaker CA, Al Sarawi MA y Landsberg J. (2002). Characterization of beta-haemolytic Group B *Streptococcus agalactiae* in cultured seabream, *Sparus auratus* (L.) and wild mullet, *Liza klunzingeri* (Day) in Kuwait. *Journal of Fish Diseases*. 25:505-513.

Evenden AE, Grayson TH, Gilpin ML y Munn C. (1993). *Renibacterium salmoninarum* and Bacterial Kidney Disease. *Annual Review of Fish Diseases*. 3: 87-104.

Evensen O, Espelid S y Hastein T. (1991). Immunohistochemical identification of *Vibrio salmonicida* in stored tissues of Atlantic salmon, *Salmo salar* from the first known outbreak of coldwater vibriosis "Hitra disease". *Diseases of Aquatic Organisms*. 10: 185-189.

Evensen O y Lorenzen E. (1996). An immunohistochemical study of *Flexibacter psychrophilus* infection in experimentally and naturally infected rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fry. *Diseases of Aquatic Organisms*. 25: 53-61.

Eyngor M, Chilmonczyk S, Zlotkin A, Manuali E, Lahav D y Ghittino C. (2007). Transcytosis of *Streptococcus iniae* through skin epithelial barriers: an *in vitro* study. *Microbiology Letters*. 277: 238-48.

Eyngor M, Lublin A, Shapira R, Hurvitz A, Zlotkin A, Yoram T y Eldar A. (2010). A pivotal role for the *Streptococcus iniae* extracellular polysaccharide in triggering proinflammatory cytokines transcription and inducing death in rainbow trout. *Microbiology Letters* (En prensa).

Facklam R, Elliott J, Shewmaker L y Reingold A. (2005). Identification and characterization of sporadic isolates of *Streptococcus iniae* isolated from humans. *Journal of Clinical Microbiology*. 43: 933-937.

FAO (2009). El Estado Mundial de la Pesca y la Acuicultura

Foo JTW, Ho B y Lam TJ. (1985). Mass mortality in *Siganus canaliculatus* due to streptococcal infection. *Aquaculture*. 49: 185-195.

Fryer JL y Lannan CN. (1996). Rickettsial infections of fish. *Annual Review of Fish Diseases*. 6: 3-13.

Fuller JD, Bast DJ, Nizet V, Low DE y De Azavedo JCS. (2001) *Streptococcus iniae* Virulence Is Associated with a Distinct Genetic Profile. *Infection and Immunity*. 69:1994-2000.

Fuller JD, Camus AC, Duncan CL, Nizet V, Bast DJ, Thune RL, Low DE y De Azavedo JC. (2002). Identification of a streptolysin S-associated gene cluster and its role in the pathogenesis of *Streptococcus iniae* disease. *Infection and Immunity*. 70: 5730-5739.

Galán JE. (1994). Host cell signal transduction and *Salmonella* entry into mammalian cells: different yet converging signaling pathways?. *Trends Cell Biology*. 209:196-199.

Ghittino C y Prearo M. (1992). Segnalazione di *Streptococcosi nella* trota iridea (*Oncorhynchus mykiss*) in Italia: nota preliminare. *Società Italiana Patologia*. 8: 4-11.

Goh SH, Driedger D, Gillett S, Low DE, Hemmingsen SM, Amos M, Chan D, Ovgren M, Willey BM, Shaw C, Smith JA. (1998). *Streptococcus iniae*, a Human and Animal Pathogen: Specific Identification by the Chaperonin 60 Gene Identification Method. *Journal of Clinical Microbiology*. 36: 2164-2166.

Harlow E y Lane, D. (1988). Immunizations. En “Antibodies, a laboratory manual”. Ed. By E. Harlow y D.Lane. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York. pp.53-138.

Hastein T, Gudding R y Evensen O. (2005). Bacterial vaccines for fish: an update of the current situation worldwide. *Developmental Biology*. 121: 55-74.

Henton MM, Zapke O y Basson PA. (1999). *Streptococcus phocae* infections associated with starvation in Cape fur seals. *Journal of the South African Veterinary Medical Association*. 70: 98-99.

Hernández E, Figueroa J e Iregui C. (2009). Streptococcosis on a red tilapia (*Oreochromis spp.*) fish-farm: Case study. *Journal of Fish Diseases*. 32:247-252.

Hetrick FM y Hedrick RP. (1993). New Viruses described in finfish from 1988–1992. *Annual Review of Fish Diseases*. 3: 187-207.

Higgins R, Claveau R y Roy R. (1980). Bronchopneumonia caused by *Streptococcus equi* in a North Atlantic pilot shale (*Globicephala melaena*). *Journal of Wildlife Diseases*. 16: 319-321.

Hoshina T, Sano T y Morimoto YA. (1958). *Streptococcus* pathogenic to fish. *Journal of Tokyo University of Fisheries*. 44: 57-68.

Hostnik P y Jencic V. (2000). Comparison of infectious haematopoietic necrosis virus (IHNV) isolation on monolayers and in suspended cells. *Diseases of Aquatic Organisms*. 40: 225-228.

Inglis V, Robert RJ y Bromage NR. (1993). *Streptococcal Infections: En Bacterial Disease*. Halstead Press/John Wiley & Sons Inc., NY.

Inocent Filho C, Müller EE, Pretto-Giordano LG y Bracarense APFRL. (2009). Histological findings of experimental *Streptococcus agalactiae* infection in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Braz Journal of Veterinary Pathology*. 2: 12-15.

Isberg RR y Falkow S. (1985). A single genetic locus encoded by *Yersinia pseudotuberculosis* permits invasion of cultured animal cells by *Escherichia coli* K-12. *Nature*. 317: 262-264.

Johnson RD y Bergman HL. (1984). Use of histopathology in aquatic toxicology: a critique. En: *Contaminant Effects on Fisheries*. Cairns, Hodson y Nriagu (eds.). John Wiley & sons, New York, pp. 19-36.

Kaige N, Miyazaki T y Kubota SS. (1984). The pathogen and the histopathology of vertebral deformity in cultured yellowtail. *Fish Pathology*. 19: 173-179.

Kanai K, Notohara M, Kato T, Shutou K, Yoshikoshi K. (2006). Serological characterization of *Streptococcus iniae* strains isolated from cultured fish in Japan. *Fish Pathology*. 41: 57-66.

Karaseva TA, Serdyuk AV y Longinova GA. (1991). Experience in treatment of *Streptococcus* sp. Infection in Atlantic salmon *Salmo salar* L. *International Council for the Exploration of the Sea. Mariculture Committee*. F6, 11.

Kim JS, Harikrishnan R, Kim MC, Balasundaram C y Heo MS. (2010). Dietary administration of *Zooshikella* sp. enhance the innate immune response and disease resistance of *Paralichthys olivaceus* against *Streptococcus iniae*. *Fish and Shellfish Immunology*. (En prensa).

Kim MS, Choi SH, Lee EH, Nam YK, Kim SK, Kim KH. (2007). α -enolase, a plasmin(ogen) binding protein and cell wall associating protein from a fish pathogenic *Streptococcus iniae* strain. *Aquaculture*. 265: 55-60.

Kitao T, Aoki T y Sakoh R. (1981). Epizootic caused by beta-haemolytic *Streptococcus* species in cultured freshwater fish. *Fish Pathology*. 15: 301-307.

Kitao T. (1993). Streptococcal infection. En: Bacterial diseases of fish. Inglis, Roberts y Bromage (eds). Blackwell Scientific Publications, Oxford, p 196-210.

Klesius P, Evans J, Shoemaker C, Yeh H, Goodwin A.E, Adams A, Thompson K. (2006) Rapid detection and identification of *Streptococcus iniae* using a monoclonal antibody-based indirect fluorescent antibody technique. *Aquaculture* 258: 180-186.

Koeth LM, Good CE, Saunders KA y Jakielaszek C. (2004). *Streptococcus pneumoniae* *in vitro* development of resistance to amoxicillin/clavulanic acid, cefaclor, levofloxacin and azithromycin. *International Journal of Antimicrobial Agents*. 24: 144-149.

Kusuda R y Salati F. (1993). Major bacterial diseases affecting mariculture in Japan. *Annual Review of Fish Diseases*. 3: 69-85.

Kusuda R y Salati F. (1998). Fish Diseases and Disorders. Vol 3. En: Viral, Bacterial and Fungal Infections. Woo y Bruno (eds.). CABI Publishing, 847pp.

Kvitt H y Colorni A. (2004). Strain variation and geographic endemism in *Streptococcus iniae*. *Diseases of Aquatic Organisms*. 61: 67-73.

LaPatra S. (1996). The use of serological techniques for virus surveillance and certification of finfish. *Annual Review of Fish Diseases*. 6: 15-28.

Lau SKP, Woo PCY, Tse H, Leung KW, Wong SSY y Yuen KY. (2003). Invasive *Streptococcus iniae* infections outside North America. *Journal of Clinical Microbiology*. 41: 1004-1009.

Lawson PA, Foster G, Falsen E, Davison N y Collins MD. (2004). *Streptococcus halichoeri* sp. nov., isolated from grey seals (*Halichoerus grypus*). *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 54: 1753-1756.

Lawson PA, Foster G y Collins MD. (2005). *Streptococcus marimammalium* sp. nov., isolated from seals. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 55: 271-274.

Leung KY, Leung TM, Lim TJ, Lam y Sin YM. (1996). Morphological changes in carp epithelial infected with *Aeromonas hydrophila*, *Journal of Fish Diseases*. 19: 167-174.

Ling SH, Wang XH, Xie L, Lim TM y Leung KY. (2000). Use of green fluorescent protein (GFP) to study the invasion pathways of *Edwardsiella tarda* in *in vivo* and *in vitro* fish models. *Microbiology*. 146: 7-19.

Locke JB, Colvin KM, Varki N, Vicknair MR, Nizet V y Buchanan JT. (2007). *Streptococcus iniae* β -hemolysin streptolysin S is a virulence factor in fish infection. *Diseases of Aquatic Organism*. 76: 17-26.

Locke JB, Aziz RK, Vicknair MR, Nizet V, Buchanan JT. (2008). *Streptococcus iniae* M-like protein contributes to virulence in fish and is a target for live attenuated vaccine development. *PLoS One*. 3: 2824.

López-Dóriga MV, Barnes AC, dos Santos NM y Ellis AE. (2000) Invasion of fish epithelial cells by *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*: evidence for receptor specificity and effect of capsule and serum. *Microbiology*. 146: 21-30.

Lorenzen E, Carstensen B y Olesen NJ. (1999). Inter-laboratory comparison of cell lines for susceptibility to three viruses: VHSV, IHNV and IPNV. *Diseases of Aquatic Organism*. 37: 81-88.

Lorenzo G, Estepa A, Chilmonczyk S y Coll JM. (1995). Different peptides from haemorrhagic septicaemia rhabdoviral proteins stimulate leucocyte proliferation with individual fish variation. *Virology*. 212: 348-355.

Lottenberg R. (1997). A novel approach to explore the role of plasminogen in bacterial pathogenesis. *Trends in Microbiology*. 5: 466-467.

MacMillan JR. (2001). Aquaculture and antibiotic resistance: a negligible public health risk? *Journal of the World Aquaculture Society*. 32: 49-68.

Magariños B, Romalde JL, Noya M, Barja JL y Toranzo AE. (1996). Adherence and invasive capacities of the fish pathogen *Pasteurella piscicida*. *FEMS Microbiology Letters*. 138: 29-34.

McIntosh D, Flano E, Grayson TH, Gilpin ML, Austin B y Villena AJ. (1997). Production of putative virulence factors by *Renibacterium salmoninarum* grown in cell culture. *Microbiology*. 143: 3349-3356.

Meyers TR y Hendricks JD. (1985). Histopathology. En: Fundamentals of aquatic Toxicology. Rand y Petrochelli (Eds). McGraw Hill Int. Book Co, Johannesburg , pp. 283-331.

Michel C, Nougayrede P, Eldar A, Sochon, H y Kinkelin P. (1997). *Vagococcus salmoninarum*, a bacterium of pathological significance in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) farming. *Diseases of Aquatic Organisms*. 30: 199-208.

Milani CJ, Aziz RK, Locke JB, Dahesh S, Nizet V y Buchanan JT. (2010). The novel polysaccharide deacetylase homologue Pdi contributes to virulence of the aquatic pathogen *Streptococcus iniae*. *Microbiology*. 156: 543-554.

Miller S, Dykes D y Polesky H. (1998). A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Research*. 16: 1215.

Miller JD y Neely MN. (2005). Large-scale screen highlights the importance of capsule for virulence in the zoonotic pathogen *Streptococcus iniae*. *Infection and Immunity*. 73: 921-934.

Minami T, Nakamura M, Ikeda Y y Ozaki H. (1979). A betahemolytic *Streptococcus* isolated from cultured yellowtail. *Fish Pathology*. 14: 33-38.

Miyazaki T. (1982). Pathological study on streptococcicosis histopathology of infected fishes. *Fish Pathology*. 17:39-47.

Makatsugawa T. (1983). A streptococcal disease of cultured flounder. *Fish Pathology*. 17: 281-285.

Nguyen HT, Kanai K y Yoshikoshi K. (2002). Ecological investigation of *Streptococcus iniae* in cultured Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*) using selective isolation procedures. *Aquaculture*. 205: 7-17.

Nicholson BL. (1989). Fish as model systems. *Science*. 246: 352-358.

Nicholson BL. (1993). Use of monoclonal antibodies in identification and characterization of fish viruses. *Annual Review of Fish Diseases*. 3: 241-157.

Nielsen CV y Buchmann K. (2000). Prolonged *in vitro* cultivation of *Ichthyophthirius multifiliis* using an EPC cell line as substrate. *Disease of Aquatic Organisms*. 42: 215-219.

Nizet V, Beall B, Bast DJ, Datta V, Kilburn L y Low DE. (2000). Genetic locus for streptolysin S production by group A *Streptococcus*. *Infection and Immunity*. 68: 4245-4254.

Noga EJ. (1996). Fish disease diagnosis and treatment. C.V. Mosby Yearbook Inc., St. Louis.

Nolan DT y Johnson SC. (2000). Interactions between crustaceans ectoparasites and their hosts: a tissue-culture perspective. En: *Aquatic Invertebrate Cell Culture*. Mothersill y Austin (eds.). Praxis Publishing Ltd, Chichester, UK. pp 135-164.

Nomoto R, Nomoto N, Unose Y, Shimahara A, Nakamura T, Hirae K, Maebuchi S, Harada N, Misawa T, Itami H, Kagawa y Yoshida. (2006). Characterization of Lancefield group C *Streptococcus dysgalactiae* isolated from farmed fish. *Journal of Fish Diseases*. 29:673-682.

O.I.E. (2000). *Diagnostic Manual for Aquatic Animal Diseases*, 3rd ed. Office International des Epizooties, World Organisation for Animal Health, Paris, pp. 237, <http://www.oie.int/eng/normes/fmanual/>

Ohnishi K y Jo Y. (1981). Studies on streptococcal infection in pond-cultured fishes-I. Characteristics of a beta-hemolytic streptococcus isolated from cultured ayu and amago in 1977-1978. *Fish Pathology*. 16: 63-67.

Ostland VE, McGrogan DC y Ferguson HW. (1997). Cephalic osteochondritis and necrotic scleritis in intensively reared salmonids associated with *Flexibacter psychrophilus*. *Journal of Fish Diseases*. 20:443-450.

Padilla D, Real F, Gómez V, Sierra E, Déniz S y Acosta F. (2005). Virulence factors and pathogenicity of *Hafnia alvei* for Gilthead seabream, *Sparus aurata* L. *Journal of Fish Diseases*. 28: 411-417.

Padilla D, Acosta F, Bravo J, Grasso V, Real F y Vivas J. (2008). Invasion and intracellular survival of *Hafnia alvei* strains in human epithelial cells. *Journal of Applied Microbiology*, 105: 1614-1622.

Padrós F y Furones MD. (2002). Patología bacteriana en piscicultura. *Actualidad*. 13-21.

Pancholi V y Fischetti VA. (1998). Alpha-enolase, a novel strong plasmin (ogen) binding protein on the surface of pathogenic streptococci. *The Journal of Biological Chemistry*. 273: 14503-14515.

Park YK, Nho SW, Shin GW, Park SB, Jang HB, Cha IS, Ha MA, Kim YR, Dalvi RS, Kang BJ y Jung TS. (2009). Antibiotic susceptibility and resistance of *Streptococcus iniae* and *Streptococcus parauberis* isolated from olive flounder (*Paralichthys olivaceus*). *Veterinary Microbiology*. 14: 76-81.

Perera RP, Johnson SK, Collins MD y Lewis DH. (1994). *Streptococcus iniae* associated with mortality of *Tilapia nilotica* x *T. aurea* hybrids. *Journal of Aquatic Animal Health*. 6: 335-340.

Perera RP, Fiske RA y Johnson K. (1998). Histopathology of Hybrid Tilapias Infected With a Biotype of *Streptococcus iniae*. *Journal of Aquatic Animal Health*. 10(3): 294-299.

Pier GB y Madin SH. (1976). *Streptococcus iniae* sp. nov., a beta-hemolytic streptococcus isolated from an Amazon freshwater dolphin, *Inia geoffrensis*. *International Journal of Systematic Bacteriology*. 26: 545-553.

Pier GB, Madin SH y Al-Nakeeb S. (1978). Isolation and characterization of a second isolate of *Streptococcus iniae*. *International Journal of Systematic Bacteriology*. 28: 311-314.

Pizarro-Cerdá J, Lecuit M y Cossart P. (2002). Measuring and Analysing Invasion of Mammalian Cells by Bacterial Pathogens: The *Listeria monocytogenes* System. *Methods of Microbiology*. 31: 161-176.

Plumb JA, Schachte JH, Gaines JL, Peltier W y Carroll B. (1974). *Streptococcus* sp. from marine fishes along the Alabama and Northwest Florida coast of the Gulf of Mexico. *Transactions of the American Fisheries Society*. 103: 358-361.

Poyart C, Quesne G, Coulon S, Berche P, Trieu-Cout P. (1998) Identification of Streptococci to Species Level by Sequencing the Gene Encoding the Manganese-Dependent Superoxide Dismutase. *Journal of Clinical Microbiology*. 36: 41-47.

Ra CH, Kim YJ, Park SJ, Jeong CW, Nam YK, Kim KH y Kim SK. (2009). Evaluation of optimal culture conditions for recombinant ghost bacteria vaccine production with the antigen of *Streptococcus iniae* GAPDH. *Journal of Microbiology and Biotechnology*. 19: 982–986.

Rasheed V y Plumb J. (1984). Pathogenicity of a nonhaemolytic group B *Streptococcus* sp. in Gulf killifish, *Fundulus grandis* Baird & Girard. *Aquaculture*. 37: 97-105.

Ravelo C, Magariños B, Romalde JL y Toranzo AE (2001). Conventional versus miniaturized systems for the phenotypic characterization of *Lactococcus garvieae* strains. *Bulletin of the European Association of Fish Pathologist*. 21:136-144.

Reed LJ y Muench H. (1938). A simple method of estimating fifty percent end points. *American journal of hygiene*. 21: 493-497.

Reimschuessel R. (1993). Postmortem Examination. En: Fish Medicine, Stoskopf (ed.). W.B. Saunders, Philadelphia, pp. 160-165.

Reimschuessel R, Kane AS, Muhvich AG y Lipsky MM. (1993). Recovery of histological lesions in the gills of brown bullheads exposed to copper. *Marine Environmental Research*. 35:198-199.

Reimschuessel R. (1999). Necropsy techniques in aquarium fish. En: Kirk's Current Veterinary Therapy, Bonagura (ed.). W.B. Saunders, Philadelphia, pp. 1198-1203.

Roach JC, Levett PN y Lavoie MC. (2006). Identification of *Streptococcus iniae* by commercial bacterial identification systems. *Journal Microbiological Methods*. 27: 20-26.

Robinson JA y Meyer FP. (1966). Streptococcal fish pathogen. *Journal of bacteriology*. 92: 512.

Rodríguez S, Alonso M y Pérez-Prieto SI. (2005). Comparison of two birnavirus-rhabdovirus coinfections in fish cell lines. *Diseases of Aquatic Organisms*. 67: 183-190.

Romalde JL y Toranzo AE. (1993). Pathological activities of *Yersinia ruckeri*, the Enteric Redmouth (ERM) bacterium. *FEMS Microbiology Letters* 112: 291-300.

Romalde JL y Toranzo AE. (1999). Streptococcosis of marine fish. En: Identification Leaflets for Diseases and Parasites of Fish and Shellfish. Olivier (Ed.). ICES. No. 56. International Council for the Exploration of the Sea. Copenhagen, Denmark, pp. 1-8.

Romalde JL y Toranzo AE (2002). Molecular approaches for the study and diagnosis of salmonid streptococcosis. En: Molecular Diagnosis of Salmonid Diseases. Cunningham, Cunningham, C.O. (Ed.). Kluwer Academic Publ, Netherlands, pp. 211 –223. Chap. 8.

Romalde JL, Ravelo C, Valdés I, Magariños B, de la Fuente E, San Martín C, Avendano-Herrera R y Toranzo AE. (2008). *Streptococcus phocae*, an emerging pathogen for salmonid culture. *Veterinary Microbiology*.130: 198-207.

Romano LA y Mejía J. (2003). Infección por *Streptococcus iniae*: Una enfermedad emergente que afecta a peces de cultivo y a humanos. *AquaTIC*. 18: 25-32.

Roo, J. (2009). Improvements in the production technology of red porgy (*Pagrus pagrus*) larvae and fry: importance of rearing conditions and diet nutritional value on their quality. Tesis Doctoral: Universidad de Las Palmas de Gran Canaria.

Russo R, Mitchell H y Yanong RPE. (2006). Characterization of *Streptococcus iniae* isolated from ornamental cyprinid fishes and development of challenge models. *Aquaculture* 256: 105-110.

Sako H. (1993). Acquired immunity of yellowtail, *Seriola quinqueradiata*, recovered from experimental infection with beta-hemolytic *Streptococcus sp.* *Suisanzoshoku*, 40: 389-392.

Shelby RA, Shoemaker J, Evans J y Kleisus PH. (2001). Development of an indirect ELISA to detect humoral response to *Streptococcus iniae* of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. *Journal of Applied Aquaculture*. 11: 35-44.

Shen ZH, Qian D, Xu WJ, Gu JH y Shao JZ. (2005). Isolation, identification and pathogenicity of *Streptococcus iniae* isolated from red drum *Sciaenops ocellatus*. *Acta Hydrobiological Sinica*. 29: 678-683.

Shewmaker PL, Camus AC, Bailiff T, Steigerwalt AG, Morey RE y Carvalho Mda G. (2007). *Streptococcus ictaluri* sp. nov., isolated from Channel Catfish *Ictalurus punctatus* broodstock. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 57: 1603-1606.

Shin GW, Palaksha KJ, Kim YR, Nho SW, Kim S y Heo GJ. (2007). Application of immunoproteomics in developing *Streptococcus iniae* vaccine for olive flounder (*Paralichthys olivaceus*). *Journal of Chromatography*. 849: 315-22.

Shoemaker C y Klesius P. (1997). Streptococcal disease problems and control: a review. En: Tilapia Aquaculture. Fitzsimmons (Ed). Northeast Regional Agricultural Engineering Service, Ithaca, NY, vol. 2, pp.671-682.

Shoemaker CA, Klesius PH y Evans J.J. (2001). Prevalence of *Streptococcus iniae* in tilapia, hybrid striped bass, and channel catfish on commercial fish farms in the United States. *American Journal Veterinary Research*. 62: 174-177.

Sindermann CJ, Bang FE, Christensen NO, Dethlefsen V, Harshbarger JC, Mitchell JR y Mulcahy MF. (1980). The role and value of pathobiology in pollution effects monitoring programs. *Publications of the International Council for the Exploration of the Sea*. 179: 135-151.

Sindermann CJ, Bang FB, Christensen NO, Dethlefsen V, Harshbarger JC, Skaar I, Gaustad P, Tonjum T, Holm B y Stenwig H. (1994). *Streptococcus phocae* sp. nov., a new species isolated from clinical specimens from seals. *International Journal of Systematic Bacteriology* 44: 646-650.

Skaar I, Gaustad P, Tonjum T, Holm B y Senwig H. (1994). *Streptococcus phocae* sp. nov., a new species isolated from clinical specimens from seals. *International Journal of Systematic Bacteriology*. 44: 646-650.

Smibert RM y Krieg NR. (1981). Systematics: general characterization, En: Manual of Methods for General Bacteriology. Herhardt, Murray, Costilow, Nester, Wood, Krieg y Phillips (ed.). *American Society of Microbiology*. Washington, D.C. pp 409-443.

Stoffregen DA, Backman SC, Perham RE, Bowser PR y Babish JG. (1996). Initial disease report of *Streptococcus iniae* infection in hybrid striped (sunshine) bass and successful therapeutic intervention with the fluoroquinolone antibacterial enrofloxacin, *Journal of the World Aquaculture Society*. 27: 420-434.

Sun Y, Hu YH, Liu CS y Sun L. (2010). Construction and analysis of an experimental *Streptococcus iniae* DNA vaccine. *Vaccine*. (En prensa).

Swenshon M, Laemmler C y Siebert U. (1998). Identification and molecular characterization of beta-hemolytic streptococci isolated from harbor porpoises (*Phocoena phocoena*) of the North and Baltic Sea, *Journal of Clinical Microbiology*. 36: 1902-1906.

Tan E, Low KW, Wong WSF y Leung KY. (1998). Internalization of *Aeromonas hydrophila* by fish epithelial cells can be inhibited with a tyrosine kinase inhibitor. *Microbiology*. 144: 299-307.

Tanaka S, Aoki, H y Nakai T. (1998). Pathogenicity of the Nodavirus detected from diseased sevenband grouper *Epinephelus septemfasciatus*. *Fish Pathology*. 33: 31-36.

Tavares-Dias MT, Martins LM y Moraes FR. (2001). Parasitic fauna of cultivated fishes in feed fishing farm of Franca, Sau Paulo, Brazil. I. Protozoans. *Revista Brasileira de Zoologia* 18: 67-69.

Teshima C, Kudo S, Ohtani Y y Saito A. (1992). Kidney pathology from the bacterium *Hafnia alvei*: experimental evidence. *Transactions of the American Fisheries Society*. 121: 599-607.

Tobback E, Decostere A, Hermans K, Van den Broeck W, Haesebrouck F y Chiens K. (2009). *In vitro* markers for virulence in *Yersinia ruckeri*. *Journal of Fish Diseases*. 33: 197-209.

Toranzo AE y Barja JL. (1993). Virulence factors of bacteria pathogenic for cold water fish. *Annual Review of Fish Diseases*. 3: 5-36.

Toranzo AE, Devesa S, Heinen P, Riaza A, Núñez S y Barja JL. (1994). Streptococcosis in cultured turbot caused by an *Enterococcus*-like bacterium. *Bulletin of the European Association of Fish Pathologists*. 14: 19-23.

Toranzo AE, Cutrín JM, Núñez S, Romalde JL, Barja JL. (1995). Antigenic characterization of *Enterococcus* strains pathogenic for turbot and their relationship with other gram positive bacteria. *Diseases of Aquatic Organisms*. 21: 187-191.

Toranzo AE, Dopazo CP, Romalde, JL. Santos, Y y Barja, JL. (1997). Estado actual de la patología bacteriana y vírica en la piscicultura española. *Aquatic*.1.

Tukmechi A, Hobbenaghi R, Rahmati HH y Morvaridi A. (2009). Streptococcosis in a Pet Fish, *Astronotus Ocellatus*: A Case Study. *Proceedings of world academy of science, engineering and technology*. 37: 14-15.

Tuomanen E. (1996). Entry of pathogens into the central nervous system. *FEMS Microbiology reviews*.18: 289-99.

Willena AJ. (2003). Applications and needs of fish and shellfish cell culture for disease control in aquaculture. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*. 13: 111-140.

Wallbanks S, Martinez-Murcia AJ, Fryer JL, Phillips BA y Collins MD. (1990). 16s rRNA sequence determination for members of the genus *Carnobacterium* and related lactic acid bacteria and description of *Vagococcus salmoninarum* sp. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology*. 40: 224-230.

Wang XH, Oon HL, Ho GW, Wong WS, Lim TM y Leung KY. (1998). Internalization and cytotoxicity are important virulence mechanisms in *Vibrio*-fish epithelial cell interactions. *Microbiology*. 144: 2987–3002.

Weinstein MR, Litt M, Kertesz DA, Wyper P, Rose D, Coulter M, Facklam AR, Ostach C, Willey BM, Borczyk A y Low DE. (1997). Invasive infections due to a fish pathogen, *Streptococcus iniae*. *S. iniae* study group. *The New England Journal of Medicine*. 337: 589-594.

White MR, WU CC y Albrechts SR. (1995). Comparison of diagnostic tests for bacterial kidney disease in juvenile steelhead trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 7: 494-499.

Williams AE y Blackmore WF. (1990). Pathogenesis of meningitis caused by *Streptococcus suis* type 2 meningitis in the pig. *Journal of Infectious Diseases*. 162: 474-481.

Wolf K y Quimby M. (1962). Established eurythermic line of fish cells *in vitro*. *Science*. 135:1065-1066.

Wolf K. (1988). Infectious hematopoietic necrosis. En: Fish viruses and fish viral diseases. *Cornell Univ. Press*, Ithaca, NY, p. 83-114.

Wook Baeck G, Hyung Kim J, Kaw Gómez D y Chang Park S. (2006). Isolation and characterization of *Streptococcus* sp. from diseased flounder (*Paralichthys olivaceus*) in Jeju Island. *The Journal of Veterinary Science*. 7(1): 53-58.

Yanong Roy PE y Francis-Floyd R. (2006). Streptococcal Infections of Fish. University of Florida IFAS Extension. *Circular*. 57: 1-6.

Yuasa K, Kitanchaon N, Kataoka Y y Al-Murbaty FA. (1999). *Streptococcus iniae*, the causative agent of mass mortality in rabbitfish *Siganus canaliculatus* in Bahrain. *Journal of Aquatic Animal Health*. 11: 87-93.

Yuasa K, Koesharyani I y Mahardika K. (2007). Effect of high water temperature on betanodavirus infection of fingerling humpback grouper *Cromileptes altivelis*. *Fish pathology*, 42: 219-221.

Yuniarti A. (2005). Serological Characterization of *Streptococcus iniae* isolates from different parts of Australia. Masters. University of Queensland, St. Lucia, Queensland.

Zhang Z, Schwartz S, Wagner L y Miller W. (2000). A greedy algorithm for aligning DNA sequences. *Journal of Computational Biology*. 7: 203-214.

Zhou SM, Xie MQ, Zhu XQ, Ma Y, Tan ZL y Li AX. (2008). Identification and genetic characterization of *Streptococcus iniae* strains isolated from diseased fish in China. *Journal of Fish Diseases*. 31: 869-875.

Zierler MK y Galán JE. (1995). Contact with cultured epithelial cells stimulates secretion of *Salmonella typhimurium* invasion protein *Inv*. *Journal of Infection and Immunity*. 63(10): 4024-4028.

Zlotkin A, Hershko H y Eldar, A. (1998-a). Possible transmission of *Streptococcus iniae* from wild fish to cultured marine fish. *Applied and Environmental Microbiology*. 64:4065-4067.

Zlotkin A, Eldar A, Ghittino C, Bercovier H. (1998-b). Identification of *Lactococcus garvieae* by PCR. *Journal of Clinical Microbiology*. 36: 983-985.

Zlotkin A, Chilmoneczyk S, Eyngor M, Hurvitz A, Ghittino C y Eldar A. (2003). Trojan Horse Effect: Phagocyte-Mediated *Streptococcus iniae* Infection of Fish. *Infection and Immunity*. 71: 2318-2325.



PUBLICACIÓN



First report of *Streptococcus iniae* in red porgy (*Pagrus pagrus*, L.)

F El Aamri¹, D Padilla¹, F Acosta¹, M J Caballero², J Roo², J Bravo¹, J Vivas³ and F Real¹

1 Instituto Universitario de Sanidad Animal (IUSA). Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. 35413. Arucas, Las Palmas, Spain

2 Grupo de Investigación en Acuicultura, ICCM & IUSA. 35413. Arucas, Las Palmas, Spain

3 Hospital Santa Cruz de Liencres, Servicio de Inmunología e Instituto de Formación e Investigación Marqués de Valdecilla (IFIMAV). 39120. Liencres, Cantabria, Spain

Abstract

This work describes the first isolation of *Streptococcus iniae* in red porgy, *Pagrus pagrus* (L.), and the first European isolation of this pathogen in gilthead seabream, *Sparus aurata* (L.). In both farmed fish species, infection resulted in lethargy, anorexia, abnormal swimming, exophthalmia and sudden death, with mortality rates of over 25% in red porgy and 10% in gilthead seabream. Beta-haemolytic Gram-positive cocci, catalase negative and oxidase negative, were isolated in pure culture from internal organs. Conventional and rapid identification systems, and 16S rRNA gene partial sequencing were used to identify the causative agent of the natural disease. LD₅₀ trials were carried out to show the virulence of this isolated strain in these species, with values of 1.7×10^4 CFU per fish in red porgy and 1.32×10^5 CFU per fish in gilthead seabream. The most prominent lesions were meningoencephalitis and multifocal infiltration of macrophage cells in the kidney and spleen.

Keywords: gilthead seabream, LD₅₀, pathogenicity, red porgy, *Streptococcus iniae*.

Introduction

Streptococcal disease in fish was first reported in 1957, affecting cultured rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), in Japan

Correspondence Dr D Padilla, IUSA, Infectious Diseases, Trasmontaña S/N, Arucas, Las Palmas, Spain 35413 (e-mail: dpadilla@dpat.ulpgc.es)

(Hoshina, Sano & Morimoto 1958). The first identification of *Streptococcus iniae* in aquatic animals was in 1976 from the subcutaneous lesions of a captive Amazon freshwater dolphin, *Inia geoffrensis* (de Blainville), in San Francisco, California, USA (Pier & Madin 1976), from which it derives its name. Dolphin showed an acute infection termed 'golf ball disease'. Since then, numerous fish species have been found to be susceptible to infection (Inglis, Roberts & Bromage 1993; Klesius, Evans, Shoemaker, Yeh, Goodwin, Adams & Thompson 2006), as well as a variety of ornamental fish (Russo, Mitchell & Yanong 2006). Infection of gilthead seabream, *Sparus aurata* (L.), has been described in Israel (Zlotkin, Hershko & Eldar 1998) but has not been reported previously in Europe.

Streptococcus iniae has become one of the most serious aquatic pathogens in the last decade, causing large losses in wild and farmed fish worldwide (Agnew & Barnes 2007). Streptococcal infections have severe economic consequences on fisheries in many areas of the world, with mortality rates between 30% and 50% (Eldar, Bejerano, Livoff, Horovitz & Bercovier 1995; Weinstein, Litt, Kertesz, Wyper, Rose, Coulter, McGerr, Facklam, Ostach, Willey, Borczyk & Low 1997; Shoemaker & Klesius 1997) over a period of 3–7 days. The economic losses caused by this bacterium in aquaculture farms worldwide are estimated to be over US\$ 100 million per year (Shoemaker, Klesius & Evans 2001). Clinical signs of *S. iniae* infection in fish include loss of orientation, lethargy, ulcers and exophthalmia, culminating in a fatal meningoencephalitis (Agnew & Barnes 2007). *Streptococcus*

iniae can cause serious zoonotic infections in humans injured while handling diseased fish (Weinstein *et al.* 1997; Lau, Woo, Tse, Leung, Wong & Yuen 2003).

During the summer of 2006, persistent mortality in red porgy, *Pagrus pagrus* (L.), and gilthead seabream was investigated in the Canary Islands (Spain). To the best of our knowledge, this is the first report describing the infection of red porgy by *S. iniae* and the first record of infection of gilthead seabream in Europe.

Materials and methods

Isolation and identification

A bacterial strain was isolated in our laboratory in the University Institute of Animal Health (IUSA, Universidad de Las Palmas de Gran Canaria), from a natural infection in farmed red porgy and gilthead seabream in the Canary Islands (Spain). The strain was routinely cultured on blood agar (Pronadisa) and trypticasein soy agar (Pronadisa) at 25 °C for 24 h and stored frozen at –80 °C in brain heart infusion broth (Pronadisa) with 15% glycerol. Conventional rapid identification systems (API 20 Strep) and 16S rRNA gene partial sequencing (Arahal, Sánchez, Macián & Garay 2008) by BLAST analysis (Zhang, Schwartz, Wagner & Miller 2000) by the Spanish Type Culture Collection (CECT) were used to identify the causative agent of mortalities in red porgy and gilthead seabream.

Pathogenicity test

The *in vivo* pathogenicity of *S. iniae* in red porgy and gilthead seabream was evaluated using the median lethal dose (LD₅₀). The LD₅₀ value was determined by the method of Reed & Muench (1938) using decreasing doses from 10⁸ to 10² CFU per fish with 16 fish per treatment group. Mortality was attributed to the inoculated bacterium if the injected organism was recovered in pure culture from the internal organs (brain, spleen, kidney and liver). The bacterium was passaged in red porgy three times before performing the pathogenicity tests by intraperitoneal injection route. Juvenile red porgy and gilthead seabream with an average body weight of 45 and 15 g, respectively, were maintained in 500-L tanks with an open-water system at 25 °C with continued

aeration. Fish were inoculated intraperitoneally, and mortality was monitored until no dead fish were observed for 2 weeks. Injected and control fish were analysed by histopathological and microbiological methods. Tissue samples were fixed in 10% buffered formaldehyde followed by processing for paraffin-wax embedding. Sections were stained with haematoxylin and eosin (H&E).

Antibiotic susceptibility pattern

The antibiotic susceptibility pattern of bacterial isolates was determined using the standardized disc diffusion method (Bauer, Kirby, Sherris & Turck 1966) on Mueller–Hinton agar containing 5% defibrinated ovine blood.

Results

Natural infection

Naturally infected red porgy and gilthead seabream showed clinical signs of haemorrhagic septicaemia, with lethargy, anorexia, abnormal swimming, exophthalmia and sudden death. In red porgy, the mortality rate was over 25%, while in gilthead seabream, the mortality rate was 10% over a period of 5 days.

The isolated strain was a β-haemolytic Gram-positive coccus, catalase negative and oxidase negative. The API 20 Strep test was positive for esculine degradation (ESC), pyrrolidonyl arylamidase (PYRA), β-glucuronidase (β-GUR), alkaline phosphatase (PAL), leucine aminopeptidase (LAP), arginine dihydrolase (ADH), ribose (RIB), mannitol (MAN), trehalose (TRE) and glycogen (GLY). All other tests were negative. API 20 Strep (code 4563116) was unable to identify *S. iniae* (Table 1).

Definitive identification of the strain was possible via direct PCR amplification of the 16S rRNA gene, partial sequencing and analysis of the sequences and BLAST analysis of the sequences against the NCBI databases. Our strain, identified as *S. iniae*, showed a similarity of 1011/1011 bp (100%) with sequence AF335572 (type strain NR 025148).

Pathogenicity trials

The LD₅₀ of *S. iniae* for red porgy was 1.7 × 10⁴ CFU per fish, while in gilthead seabream, it was 1.32 × 10⁵ CFU per fish. Inoculated fish

Table 1 Phenotypic characterization of *Streptococcus iniae* isolated from red porgy and gilthead seabream, and the Pasteur Institute Collection (CIP) strain using conventional (conv) and API 20 Strep system (api) tests

Reaction	Phenotypic characteristics <i>S. iniae</i>			
	CIP 102508 strain		Red porgy and gilthead seabream strain	
	conv	api	conv	api
Gram	+		+	
Cell morphology	c		c	
Motility	–		–	
Growth at 10 °C	–		–	
Haemolysis	β		β	
Oxidase	–		–	
Catalase	–		–	
Pyrrolidonyl arylamidase	+	+	+	+
Voges Proskauer	–	–	–	–
Hippurate hydrolysis	–	–	–	–
Esculine degradation		+		+
α-Galactosidase		–		–
β-Glucuronidase		+		+
β-Galactosidase		–		–
Alkaline phosphatase		+		+
Leucine aminopeptidase		+		+
Arginine dihydrolase		+		+
<i>Acid from</i>				
Ribose		+		+
Arabinose		–		–
Mannitol		+		+
Sorbitol		–		–
Lactose		–		–
Trehalose		+		+
Inulin		–		–
Raffinose		–		–
Amidon		+		–
Glycogen		+		+
<i>Decarboxylation of</i>				
Arginine	+		+	
Lysine	–		–	
Ornithine	–		–	
Indol	–		–	
Kligler H ₂ S production	–		–	
Urease	–		–	
Nitrate reduction	–		–	

+, Positive reaction; –, negative reaction; c, cocci; β, beta-haemolytic.

showed the same clinical signs previously described in natural infections. In both fish species, lesions corresponding with acute meningoencephalitis characterized by the infiltration of inflammatory cells and multifocal infiltration of macrophages in the kidney and spleen were observed (Fig. 1). The inoculated bacterium was recovered from red porgy and gilthead seabream in pure culture from the internal organs, mainly from the brain and kidney.

Antibiotic susceptibility pattern

The *S. iniae* strain studied was susceptible to β-lactam antibiotics, including penicillin (10 µg), methicillin (5 µg), ampicillin (10 µg), amoxicillin (30 µg) and cloxacillin (5 µg), as well as erythromycin (15 µg), lincomycin (10 µg), nitrofurantoin (100 µg), bacitracin (10 µg), vancomycin (5 µg) and oleandomycin (15 µg), but was resistant to nalidixic acid (30 µg), streptomycin (10 µg), kanamycin (30 µg) and cephalothin (30 µg).

Discussion

Streptococcosis is associated with acute and chronic mortality in many aquaculture species. At least 27 species of fish have been documented to be infected by *S. iniae* (Inglis *et al.* 1993; Klesius *et al.* 2006; Agnew & Barnes 2007), but red porgy is unreported, and *S. iniae* has not previously been described in gilthead seabream in Europe.

In this study, a natural infection in red porgy and gilthead seabream showed a high mortality rate, exhibiting clinical signs of haemorrhagic septicaemia and sudden death, as found in other fish species infected by *S. iniae*, including hybrid striped bass (Stoffregen, Backman, Perham, Bowser & Babish 1996), tilapia (Shoemaker *et al.* 2001), rainbow trout (Eldar *et al.* 1995), yellowtail (Kaige, Miyazaki & Kubota 1984), sea bass (Colorni, Diamant, Eldar, Kvitt & Zlotkin 2002), ornamental cyprinid fish (Russo *et al.* 2006) and barramundi (Bromage, Thomas & Owens 1999).

Biochemical analyses using API 20 Strep identified our strain as *Streptococcus dysgalactiae* subsp. *equisimilis*. This misidentification has been reported by many researchers using Api 20 Strep or Rapid ID 32 Strep (Weinstein *et al.* 1997; Poyart, Quesne, Coulon, Berche & Trieu-Cout 1998; Dodson, Maurer & Shotts 1999; Lau *et al.* 2003; Facklam, Elliott, Shewmaker & Reingold 2005; Klesius *et al.* 2006), BioMérieux Vitek (Weinstein *et al.* 1997; Lau *et al.* 2003; Facklam *et al.* 2005), the ATB Expression System (Lau *et al.* 2003) and the Microscan WalkAway System (Facklam *et al.* 2005), which were unable to identify *S. iniae* because it was not in the corresponding databases of any of the automated devices. It is known that no commercial bacterial identification system includes *S. iniae* in its database (Agnew & Barnes 2007); however, the individual biochemical reactions read by these systems can still be used and compared to

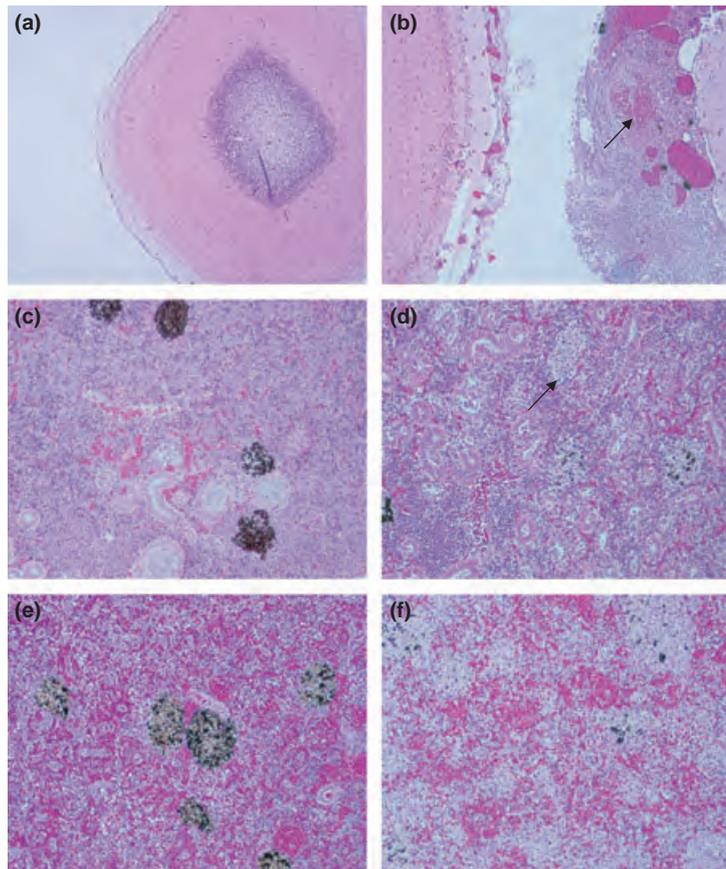


Figure 1 Lesions observed in red porgy inoculated with *Streptococcus iniae* (all sections stained with H&E) (a) Brain of control fish ($\times 40$). (b) Brain of *S. iniae*-infected red porgy. Acute meningitis characterized by the infiltration of inflammatory cells in blood vessels of the meninges and the presence of granuloma (arrow $\times 40$). (c) Anterior kidney of control fish ($\times 100$). (d) Anterior kidney of *S. iniae*-infected red porgy ($\times 100$). The melanomacrophage centres present less pigment. New centre with predominance of macrophages (arrow) ($\times 100$). (e) Spleen of control fish ($\times 100$). (f) Spleen of *S. iniae*-infected red porgy. Note Multifocal infiltration of macrophages ($\times 100$).

known standards. Hence, the species-specific PCR assay utilizing 16S rRNA was a useful alternative approach for the accurate and rapid identification of *S. iniae* (Zlotkin *et al.* 1998; Roach, Levett & Lavoie 2006).

Disease progression in fish is somewhat variable and has been shown to be dependent on the virulence of the isolate, the host species affected, the route of infection, fish age and other environmental and water quality factors (Agnew & Barnes 2007). In our experimental infections, the intraperitoneal dose of *S. iniae* of 10^8 and 10^7 CFU per fish was lethal at between 48 and 72 h post-inoculation, respectively. Our pathogenicity trial based on the LD₅₀ showed a high degree of virulence in red porgy and gilthead seabream, with values of 1.7×10^4 and 1.32×10^5 CFU per fish, similar to those described in other species by Bromage *et al.* (1999) in barramundi, Bercovier, Ghittino & Eldar (1996) and Eldar & Ghittino (1999) in rainbow trout and Eldar *et al.* (1995) in tilapia. Histopathological examination revealed acute to

subacute meningoencephalitis consisting of an exudate covering the brain surface containing colonies of bacteria and multifocal infiltration of macrophage cells in the kidney and spleen as the principal lesions, as previously described by Bercovier *et al.* (1996), Eldar & Ghittino (1999) and Bromage & Owens (2002). These findings can be correlated with the clinical findings of lethargy and loss of orientation (Eldar & Ghittino 1999).

The *S. iniae* strain studied was sensitive to 11/15 of the antibiotics used in this study. A similar profile has been described by various authors (Pier & Madin 1976; Darwish & Ismaiel 2003; Facklam *et al.* 2005; Creeper & Buller 2006; Park, Nho, Shin, Park, Jang, Cha, Ha, Kim, Dalvi, Kang & Jung 2009).

References

- Agnew W. & Barnes A.C. (2007) *Streptococcus iniae*: an aquatic pathogen of global veterinary significance and a challenging candidate for reliable vaccination. *Veterinary Microbiology* **122**, 1–15.

- Arahal D.R., Sánchez E., Macián M.C. & Garay E. (2008) Value of *recN* sequences for species identification and as a phylogenetic marker within the family *Leuconostocaceae*. *International Microbiology* **11**, 33–39.
- Bauer A.W., Kirby W.M., Sherris J.C. & Turck M. (1966) Antibiotic susceptibility testing by standardized single disk method. *American Journal of Clinical Pathology* **45**, 493–496.
- Bercovier H., Ghittino C. & Eldar A. (1996) Immunization with bacterial antigens: infections with streptococci and related organisms. *Fish Vaccinology* **90**, 153–160.
- Bromage E.S. & Owens L. (2002) Infection of barramundi *Lates calcarifer* with *Streptococcus iniae*: effects of different routes of exposure. *Diseases of Aquatic Organisms* **52**, 199–205.
- Bromage E.S., Thomas A. & Owens L. (1999) *Streptococcus iniae*, a bacterial infection in barramundi *Lates calcarifer*. *Diseases of Aquatic Organisms* **36**, 177–181.
- Colorni A., Diamant A., Eldar A., Kvitt H. & Zlotkin A. (2002) *Streptococcus iniae* infections in Red Sea cage-cultured and wild fishes. *Diseases of Aquatic Organisms* **49**, 165–170.
- Creep J. & Buller N. (2006) An outbreak of *Streptococcus iniae* in barramundi (*Lates calcarifera*) in freshwater cage culture. *Australian Veterinary Journal* **84**, 408–411.
- Darwish A.M. & Ismaiel A.A. (2003) Laboratory efficacy of amoxicillin in the control of *Streptococcus iniae* infection in sunshine bass. *Journal of Aquatic Animal Health* **15**, 209–214.
- Dodson S.V., Maurer J.J. & Shotts E.B. (1999) Biochemical and molecular typing of *Streptococcus iniae* isolated from fish and human cases. *Journal of Fish Diseases* **22**, 331–336.
- Eldar A. & Ghittino C. (1999) *Lactococcus garvieae* and *Streptococcus iniae* infections in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*: similar, but different diseases. *Diseases of Aquatic Organisms* **36**, 227–231.
- Eldar A., Bejerano Y., Livoff A., Horovitz A. & Bercovier H. (1995) Experimental streptococcal meningo-encephalitis in cultured fish. *Veterinary Microbiology* **43**, 33–40.
- Facklam R., Elliott J., Shewmaker L. & Reingold A. (2005) Identification and characterization of sporadic isolates of *Streptococcus iniae* isolated from humans. *Journal of Clinical Microbiology* **43**, 933–937.
- Hoshina T., Sano T. & Morimoto Y. (1958) A *Streptococcus* pathogenic for fish. *Journal of the Tokyo University of Fisheries* **44**, 57–58.
- Inglis V., Roberts R.J. & Bromage N.R. (1993) Streptococcal infections. *Bacterial Diseases of Fish*. Halstead Press/John Wiley & Sons Inc, New York.
- Kaige N., Miyazaki T. & Kubota S.S. (1984) The pathogen and histopathology of vertebral deformity in cultured yellowtail. *Fish Pathology* **19**, 173–179.
- Klesius P., Evans J., Shoemaker C., Yeh H., Goodwin A.E., Adams A. & Thompson K. (2006) Rapid detection and identification of *Streptococcus iniae* using a monoclonal antibody-based indirect fluorescent antibody technique. *Aquaculture* **258**, 180–186.
- Lau S.K.P., Woo P.C.Y., Tse H., Leung K.W., Wong S.S.Y. & Yuen K.Y. (2003) Invasive *Streptococcus iniae* infections outside North America. *Journal of Clinical Microbiology* **41**, 1004–1009.
- Park Y.K., Nho S.W., Shin G.W., Park S.B., Jang H.B., Cha S.C., Ha M.A., Kim Y.R., Dalvi R.S., Kang B.J. & Jung T.S. (2009) Antibiotic susceptibility and resistance of *Streptococcus iniae* and *Streptococcus parauberis* isolated from olive flounder (*Paralichthys olivaceus*). *Veterinary Microbiology* **136**, 76–81.
- Pier G.B. & Madin S.H. (1976) *Streptococcus iniae* sp. nov., a beta-hemolytic streptococcus isolated from an Amazon freshwater dolphin, *Inia geoffrensis*. *International Journal of Systematic Bacteriology* **26**, 545–553.
- Poyart C., Quesne G., Coulon S., Berche P. & Trieu-Cout P. (1998) Identification of streptococci to species level by sequencing the gene encoding the manganese-dependent superoxide dismutase. *Journal of Clinical Microbiology* **36**, 41–47.
- Reed L.J. & Muench H. (1938) A simple method of estimating fifty percent end points. *American Journal of Hygiene* **21**, 493–497.
- Roach J.C., Levett P.N. & Lavoie M.C. (2006) Identification of *Streptococcus iniae* by commercial bacterial identification systems. *Journal of Microbiology Methods* **27**, 20–26.
- Russo R., Mitchell H. & Yanong R.P.E. (2006) Characterization of *Streptococcus iniae* isolated from ornamental cyprinid fishes and development of challenge models. *Aquaculture* **256**, 105–110.
- Shoemaker C. & Klesius P. (1997) Streptococcal disease problems and control: a review. In: *Tilapia Aquaculture* (ed. by K. Fitzsimmons), pp. 671–680. Northeast Regional Agricultural Engineering Service, Ithaca, New York.
- 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. *American Journal of Veterinary Research* **62**, 174–177.
- Stoffregen D.A., Backman S.C., Perham R.E., Bowser P.R. & Babish J.G. (1996) Initial disease report of *Streptococcus iniae* infection in hybrid striped (sunshine) bass and successful therapeutic intervention with the fluoroquinolone antibacterial enrofloxacin. *Journal of the World Aquaculture Society* **27**, 420–434.
- Weinstein M.R., Litt M., Kertesz D.A., Wyper P., Rose D., Coulter M., McGerr A., Facklam R., Ostach C., Willey B.M., Borczyk A. & Low D.E. (1997) Invasive infections due to a fish pathogen, *Streptococcus iniae*. *S. iniae* study group. *The New England Journal of Medicine* **337**, 589–594.
- Zhang Z., Schwartz S., Wagner L. & Miller W. (2000) A greedy algorithm for aligning DNA sequences. *Journal of Computational Biology* **7**, 203–214.
- Zlotkin A., Hershko H. & Eldar A. (1998) Possible transmission of *Streptococcus iniae* from wild fish to cultured marine fish. *Applied and Environmental Microbiology* **64**, 4065–4067.

Received: 3 January 2010

Revision received: 15 June 2010

Accepted: 17 June 2010