

**Detección de *Streptococcus agalactiae* por PCR en Tejidos de  
Tilapias rojas (*Oreochromis* spp.) menores de 20g**

**ÁNGELA PATRICIA JIMENEZ LEAÑO**

**MAESTRIA INTERFACULTADES DE MICROBIOLOGIA  
GRUPO DE INVESTIGACIÓN EN PATOBIOLOGIA VETERINARIA  
UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA  
BOGOTA  
2010**

**Detección de *Streptococcus agalactiae* por PCR en Tejidos de  
Tilapias rojas (*Oreochromis* spp.) menores de 20g**

**Ángela Patricia Jiménez Leño**

**Tesis de grado como requisito para optar al título de MsC en Microbiología.**

**Director: Fernando Ariza M.V. MsC, PhD.**

**Codirector: Carlos Iregui M.V., DVM.**

**Asesor: Víctor Manuel Tibata M.V, MsC**

**MAESTRIA INTERFACULTADES DE MICROBIOLOGIA  
GRUPO DE INVESTIGACIÓN EN PATOBIOLOGIA VETERINARIA  
UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA  
BOGOTA  
2010**

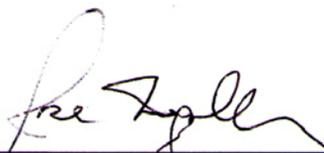
## NOTA DE ACEPTACION

La presente tesis fue sustentada y aprobada para el grado de Maestría en Microbiología, el 21 de Junio de 2010.

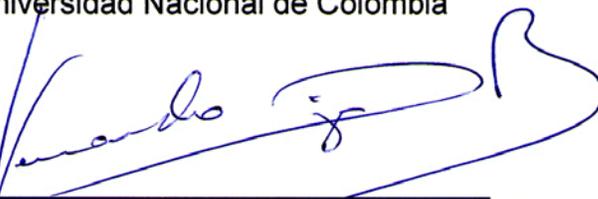
En constancia firman:



Jurado: Dra. Catalina Arévalo Ferro  
Departamento de Biología  
Universidad Nacional de Colombia



Jurado: Dr. José Darío Mogollón  
Departamento de Salud Animal  
Universidad Nacional de Colombia



Director: Dr. Manuel Fernando Ariza Botero  
Departamento de Salud Animal  
Universidad Nacional de Colombia



Codirector: Dr. Carlos Arturo Iregui C.  
Departamento de Salud Animal  
Universidad Nacional de Colombia

## DEDICATORIA

A mí hija Silvana, arcoiris de mí vida.

## **AGRADECIMIENTOS**

A Dios padre.

A mi madre Olga y mi Padre Humberto, por su incondicional amor.

A Eduardo.

Al Dr. Carlos Iregui, por su colaboración y paciencia en la culminación exitosa de este proceso.

Al Dr. Fernando Ariza.

A Victor Manuel, por ser mi guía e incondicional apoyo.

A Andres Pulido.

A Marlly Guarin.

A Maritza Sierra por su colaboración con algunas de las técnicas.

A la Dra. Martha Fontanilla, por su gran carisma con los estudiantes.

A todos los integrantes del Grupo de investigación en Patobiología Veterinaria.

## TABLA DE CONTENIDO

INTRODUCCIÓN .....	14
1. REVISION DE LITERATURA .....	17
1.1 LA ESTREPTOCOCOSIS EN PECES .....	17
1.1.1 Agente etiológico.....	17
1.1.2 Características de cultivo de la bacteria .....	18
1.1.3 Situación epidemiológica nacional e internacional.....	19
1.1.4 Formas de presentación y manifestaciones patológicas.....	23
1.1.5 Diagnóstico .....	25
1.1.6 Salud pública.....	27
1.2 REACCION EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR).....	27
1.2.1 Aspectos Generales .....	27
1.2.2 La PCR anidada .....	31
1.2.3 Región intergénica 16S-23S RNAr vs genes 16SARNr y 23SARNr para la identificación microbiana y análisis filogenéticos .....	33
1.2.4 Empleo de técnicas moleculares para el diagnóstico e investigación de infecciones bacterianas en peces.....	34
2. MATERIALES Y METODOS .....	39
2.1 ESTANDARIZACION DE LA TÉCNICA DE PCR PARA LA DETECCIÓN DE <i>S.</i> <i>agalactiae</i> A PARTIR DE TEJIDOS DE TILAPIA ROJA .....	39
2.1.1 Extracción de ADN de <i>S. agalactiae</i> a partir de tejidos congelados.....	39
2.1.2 Extracción de ADN de <i>S. agalactiae</i> a partir de tejidos embebidos en parafina ..	40
2.1.3 Estandarización de PCR anidado .....	41
2.2 DETECCIÓN DEL ADN DE <i>S. agalactiae</i> EN TILAPIAS MENORES DE 20g PROVENIENTES DE MUESTREOS EN CAMPO .....	47
2.2.1 Larvas y alevinos congelados.....	47
2.2.2 Larvas y alevinos embebidos en parafina.....	49
2.3 DETECCIÓN DEL <i>S agalactiae</i> EN SEMEN, OVAS INFECUNDAS Y FECUNDADAS PROVENIENTES DE MUESTREOS EN CAMPO.....	51
2.4 CONFIRMACION DE POSITIVIDAD O NEGATIVIDAD DE LAS MUESTRAS .....	51

2.5 COMPARACION DE LA SENSIBILIDAD DE LA PCR vs. MICROBIOLOGIA E INMUNOPEROXIDASA INDIRECTA.....	53
2.6 ANALISIS ESTADISTICO .....	53
3. RESULTADOS.....	54
3.1 ESTANDARIZACION DE LA TÉCNICA DE PCR PARA LA DETECCIÓN DE <i>S. agalactiae</i> A PARTIR DE TEJIDOS DE TILAPIA ROJA .....	54
3.1.1 Extracción de ADN de <i>S. agalactiae</i> a partir de tejidos congelados.....	54
3.1.2 Extracción de ADN de <i>S. agalactiae</i> a partir de tejidos embebidos en parafina ..	55
3.1.3 Estandarización del PCR anidado .....	56
3.1.4 Evaluación de la Especificidad de la Técnica .....	60
3.1.5 Evaluación de la Sensibilidad de la Técnica .....	60
3.2 DETECCIÓN DEL ADN DE <i>S. agalactiae</i> EN TILAPIAS MENORES DE 20g PROVENIENTES DE MUESTREOS EN CAMPO .....	62
3.2.1 Larvas y Alevinos congelados .....	62
3.2.2 Larvas y Alevinos embebidos en parafina .....	65
3.3 DETECCIÓN DE LA BACTERIA EN SEMEN, EN OVAS INFECUNDAS Y OVAS FECUNDADAS PROVENIENTES DE MUESTREOS EN CAMPO.....	66
3.4 CONFIRMACION DE LA NEGATIVIDAD DE LAS MUESTRAS .....	67
3.5 COMPARACION DE LA SENSIBILIDAD Y ESPECIFICIDAD DE LA PCR vs. MICROBIOLOGIA E IPI .....	68
4. DISCUSION .....	70
5. CONCLUSIONES.....	78
6. RECOMENDACIONES .....	79
ANEXOS.....	80
REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS .....	92

## LISTA DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1. Pruebas de identificación de <i>Streptococcus spp.</i> aislados de peces.....	19
Tabla 2. Mezcla por muestra para la PCR simple (iniciadores externos).....	44
Tabla 3. Mezcla por muestra para la PCR simple (iniciadores internos).....	44
Tabla 4. Programación del termociclador para la PCR simple de la región intergénica inespecífica 16S-23S ARNr, <i>S. agalactiae</i> .....	45
Tabla 5. Programación del termociclador para la PCR anidada de la región intergénica 16S-23S ARNr, específica del <i>S. agalactiae</i> . .....	45
Tabla 6. Diluciones para la determinación del límite de detección de la PCR a partir de tejidos congelados y embebidos en parafina. ....	48
Tabla 7. Distribución de las muestras congeladas para determinar la presencia de <i>S. agalactiae</i> en tilapias menores de 20g. ....	49
Tabla 8. Distribución de los animales embebidos en parafina para determinar la presencia de <i>S. agalactiae</i> . en tilapias menores de 20g.....	51
Tabla 9. Bloques y tejidos embebidos en parafina para la detección de <i>S. agalactiae</i> .....	51
Tabla 10. Condiciones de amplificación para el gen de la B-actina.....	54
Tabla 11. Perfil térmico para el PCR simple del gen que codifica para B-actina ..	54
Tabla 12. Concentraciones de ADN de <i>S. agalactiae</i> obtenido por extracción con fenol saturado a partir de tejidos inoculados experimentalmente y congelados. ...	56
Tabla 13. Concentraciones de ADN de <i>S. agalactiae</i> obtenido mediante el kit UltraClean Tissue and Cells ADN isolation kit, Mo Bio Laboratorios Inc®, a partir de tejidos de peces inoculados intraperitonealmente y órganos inyectados con <i>S. agalactiae</i> y posteriormente congelados.....	57
Tabla 14. Concentraciones de ADN de <i>S. agalactiae</i> obtenido a partir de tejidos embebidos en parafina mediante el kit UltraClean Tissue and Cells ADN isolation kit, Mo Bio Laboratorios Inc®.....	58

Tabla 15. Concentraciones de ADN por fluorometria a partir de tejidos congelados provenientes de muestreo en campo.....	66
Tabla 16. Concentraciones de ADN por fluorometria, a partir de tejidos embebidos en parafina.....	69
Tabla 17. Concentraciones de ADN por fluorometria, a partir de semen y ovas....	70

## LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Amplificación exponencial a partir de un fragmento de ADN molde tras una serie de ciclos de PCR .....	31
Figura 2. Esquema del procedimiento de la PCR.....	32
Figura 3. Diagrama que ejemplifica la amplificación anidada: incluye una PCR simple con iniciadores externos y una segunda PCR con iniciadores internos que se hibridan en la primera región previamente amplificada.....	35
Figura 4. Esquema de PCR anidada para la región intergénica 16S-23S de 192pb del <i>S. agalactiae</i> .....	41
Figura 5. Electroforesis en gel de agarosa al 1.5% de amplificados con iniciadores externos inespecíficos, empleando gradientes de temperatura .....	61
Figura.6 Electroforesis en gel de agarosa al 1,5%. Evaluación de la concentración óptima de Mg <sub>2</sub> Cl . PCR con iniciadores internos específicos .....	62
Figura 7. Electroforesis en gel de agarosa al 1,5% de amplificados de 192 pb con iniciadores internos específicos para <i>S. agalactie</i> .....	63
Figura 8. Electroforesis en gel de agarosa al 1,5% . Amplificados de 375pb con iniciadores externos inespecíficos a partir de ADN de Ojo y Cerebro embebidos en parafina de alevinos inoculados experimentalmente.....	64
Figura 9. Electroforesis en agarosa al 1,5%. Prueba de especificidad.....	65
Figura. 10: Electroforesis en agarosa al 1,5%. Prueba de sensibilidad para ADN de <i>S. agalactiae</i> .....	66
Figura 11. Electroforesis en agarosa al 1,5%. Prueba de sensibilidad ADN de <i>S.agalactiae</i> .....	67
Figura 12. Electroforesis en gel de agarosa al 1.5%. Amplificados a partir de ADN de ojos congelados de alevinos, provenientes de muestreos en campo.....	69

Figura 13. Electroforesis en gel de agarosa al 1.5%. Amplificados a partir de ADN de larvas congeladas provenientes de muestreos en campo.....	69
Figura 14. Electroforesis en gel de agarosa al 1.5%. Amplificados a partir de ADN de cerebros congelados de alevinos provenientes de muestreos en campo .....	69
Figura 15. Electroforesis en gel de agarosa al 1.5%. Amplificados a partir de ADN de tejidos embebidos en parafina provenientes de muestreos en campo.....	71
Figura 16. Electroforesis en gel de agarosa al 1.5%. Amplificados a partir de ADN de ovas infecundas,ovos fecundadas y semen provenientes de muestreos en campo	73
Figura 17. Electroforesis en gel de agarosa al 1.5%. Amplificados con iniciadores específicos para el gen de 135pb que codifica para B-actina .....	74

## RESUMEN

La estreptococosis es uno de los problemas sanitarios más importantes en la acuicultura mundial. En Colombia, dentro de las especies de estreptococos, solo se ha confirmado la presencia del *S. agalactiae* en animales mayores de 20g, causando importantes pérdidas en las explotaciones de tilapia (*Oreochromis spp*). Su diagnóstico se basa en los signos clínicos, las lesiones histopatológicas y el aislamiento microbiológico; sin embargo, se requiere de técnicas más sensibles que confirmen o descarten la presencia de la bacteria en animales de tallas menores. La técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) anidada permite identificar con una alta sensibilidad y especificidad un gen de interés de un microorganismo que posiblemente se encuentre en bajas concentraciones en una muestra. El objetivo de esta investigación fue evaluar mediante la amplificación anidada de la región intergenica 16S-23S ARNr (Berridge et al en el 2001) la presencia o ausencia de *S. agalactiae* en tejidos congelados y embebidos en parafina de tilapias menores de 20g (*Oreochromis spp.*) así como en ovas, ovas fecundadas y semen, provenientes de granjas positivas a la infección. El 99,75% de las muestras (403) provenientes de larvas y alevinos resultaron negativas, al igual que el 100% de las muestras (88) de semen, ovas y ovas fecundadas. La PCR estandarizada no evidencio reacción cruzada con otros microorganismos Gram positivos (*S. iniae*, *Enterococcus faecalis*, *S. pneumoniae*, *L. garviae*) y mostró un límite de detección de 6,95 fg en el caso de tejidos congelados y de 6,95 pg para tejidos embebidos en parafina.

Palabras clave: PCR anidada, tilapia, larvas, alevinos, estreptococosis.

## **ABSTRACT**

The streptococcosis is one of the most important health problems in world aquaculture. In Colombia, within the streptococcal species, has only confirmed the presence of *S. agalactiae* in animals older than 20g, causing significant losses on their holdings of tilapia (*Oreochromis spp.*) Diagnosis is based on clinical signs, histopathological lesions and the microbiological isolation, but requires more sensitive techniques to confirm or rule out the presence of bacteria in animals of smaller size. The technique of Polimerase Chain Reaction (PCR) nested to identify with high sensitivity and specificity of a gene of interest by a microorganism that may be present in low concentrations in a sample. The objective of this research was to evaluate by nested amplification of the intergenic region 16S-23S (Berridge et al., 2001) the presence or absence of *S. agalactiae* in frozen tissue and paraffin embedded under 20g tilapia (*Oreochromis spp.*), as well as eggs, fertilized eggs and semen from farms positive for infection. The 99.75% of the samples (403) from larvae and fry were negative, as 100% of the samples (88) of semen, ova and fertilized eggs. The PCR method did not evidence microorganisms cross-react with other Gram positive (*S. iniae*, *Enterococcus faecalis*, *S. pneumoniae*, *L. garviae*) and showed a detection limit of 6.95 fg in the case of frozen tissue and 6.95 pg for paraffin embedded tissue.

Key words: nested PCR, tilapia, larvae, fry, streptococcosis

## INTRODUCCIÓN

Las tilapias, superadas únicamente por las carpas, son los peces de agua dulce de mayor producción en el mundo (sobrepasaron las 800.000 toneladas métricas cultivadas en el año 1999), se han convertido en la principal especie en sistemas dulceacuícolas de países tropicales y subtropicales gracias a su fácil reproducción en cautiverio, disposición para el consumo de una amplia variedad de alimentos naturales o concentrados, tolerancia a aguas de pobre calidad y crecimiento rápido; sumado a los costos relativamente bajos de producción y a la gran aceptación en el mercado (Popma and Masser, 1999).

La explotación piscícola en Colombia ha crecido a un ritmo aproximado del 50% anual durante los últimos 10 años. De esta producción aproximadamente el 40% corresponde a híbridos de tilapia (*Oreochromis* spp), con 15.224 ton/año, por encima de los cultivos de cachama (*Piaractus brachypomus*) 7.872 ton/año y trucha arcoiris (*Oncorhynchus mikiss*) 1.930 ton/año para el 2002 (Min. agricultura, 2005), lo que convierte a la tilapia en la principal especie acuícola explotada en nuestro país (Min. agricultura, 2005).

Tales crecimientos se han acompañado por la búsqueda de sistemas de producción cada vez más intensivos y con mayores densidades de explotación. Estas condiciones presionan al pez al máximo de su capacidad de resistencia y adaptación fisiológica y de alguna manera, no completamente conocida, propician las condiciones para que tanto patógenos oportunistas como obligados desencadenen procesos patológicos con serias repercusiones poblacionales y económicas.

Las patologías inducidas por bacterias de los grupos Gram (+) y Gram (-) son, quizás, uno de los principales problemas patológicos que afectan a las distintas

especies animales de producción, incluidos los peces. Dentro de las Gram (+), el género *Streptococcus* es en la actualidad uno de los más prevalentes mundialmente, en cultivos de peces de aguas calidas, con serias repercusiones sanitarias y económicas (Shoemaker and Klesius, 1997; Bercovier et al., 1997; Russo et al., 2006; Yang and Li, 2009, Bulushi et al., 2010). Se han reportado múltiples aislamientos de estas bacterias en todo el mundo en gran variedad de especies ícticas de agua dulce y salada; especialmente en aquellas sometidas a explotación intensiva (Boomker et al., 1979; Eldar et al., 1994; Kusuda and Salati, 1993; Perera et al., 1997; Ferguson et al., 1994; Chang and Plumb, 1996; Bowser et al., 1998). Las pérdidas económicas anuales debidas a la estreptococosis en todas las especies piscícolas cultivadas pueden superar los 150 millones de dólares en el mundo entero (Austin and Austin , 2007)

El *S.agalactiae* es uno de los principales agentes etiológicos relacionado con septicemia y meningoencefalitis en peces (Evans et al., 2006, Mian et al., 2009). En Colombia, esta especie hasta el momento es la única detectada como causante de brotes de morbi-mortalidad, inicialmente en híbridos de tilapia roja (*Oreochromis* spp.) en el Departamento del Tolima, diseminándose después a otros Departamentos y afectando a otras especies como la tilapia nilotica (*O. niloticus*) y trucha aro iris (*Oncorhynchus mykiss*) (Pulido et al., 1999; Iregui et al., 2004, Jiménez et al, 2007; Hernandez et al., 2009).

Aún no se conoce las repercusiones económicas de la estreptococosis en Colombia; aún así, del primer reporte que se tiene de la enfermedad se calcula que las pérdidas sobrepasaron los 100 millones de pesos en dos y medio años de actividad productiva (Pulido et al., 1999). Si esta tendencia se mantiene, las repercusiones habrán de ser bastante preocupantes para la naciente industria piscícola nacional, tal como lo documentan los efectos causados en el exterior (Mata et al., 2004).

Según estudios previos del Grupo de Investigación en Patobiología Veterinaria de la Universidad Nacional de Colombia, existiría un espacio generacional en que la bacteria aparentemente desaparece o disminuye su número significativamente en la población: desde los huevos hasta que los animales alcanzan los 20 g; mientras que los reproductores activos y las tilapias mayores de 20 g adquieren la infección y pueden desarrollar la enfermedad (Pulido et al., 2004; Hernández, 2005; Penagos, 2005).

La no detección de la infección ni de la enfermedad por *S. agalactiae* en las larvas y alevinos (tilapias menores de 20 g) de diferentes granjas y en distintos Departamentos del país por técnicas como microbiología, inmunoperoxida e histopatología, permitió plantear la hipótesis de que estos grupos etéreos por razones desconocidas, posiblemente poseen una resistencia relativa o absoluta frente al microorganismo; de ser cierta esta proposición, se intentarían intervenciones de manejo de estos peces a fin de disminuir el riesgo de la posterior presentación de la enfermedad. Sin embargo, la declaración definitiva de negatividad de estas edades frente al *S. agalactiae* demanda técnicas más sensibles y precisas como la propuesta en este trabajo.

## 1. REVISION DE LITERATURA

### 1.1 LA ESTREPTOCOCOSIS EN PECES

#### 1.1.1 Agente etiológico

La estreptococosis es una enfermedad originada por un grupo de cocos Gram (+) que inducen una signología clínica bastante característica que involucra muchos órganos del pez. Hasta el momento los cocos Gram(+) identificados como agentes patógenos para los peces incluyen: *Streptococcus* sp., *S. agalactiae*, *S. iniae*, *S. dysgalactiae*, *S. milleri*, *S. ictaluri*, *S. parauberis*, *Enterococcus* sp., *E. seriolicida*, *Lactococcus* sp., *L. garviae*, *L. piscium*, *Vagococcus* sp., *V. salmoninarum*, *Carnobacterium piscícola* (Prieta et al., 1993; Eldar et al., 1994; Toranzo et al., 1994; Domenech., 1996; Michel et al., 1997, Mata et al., 2004, Yang and Li, 2009).

El *S. agalactiae* pertenece al grupo B de los estreptococos, es un patógeno importante en humanos, bovinos y peces. En estos últimos es causante de meningoencefalitis; en bovinos de mastitis clínica y subclínica y en humanos es causa de infecciones superficiales de piel, faringitis, sepsis, pneumonia, meningitis, endocarditis, fiebre reumatoidea, glomerulonefritis, meningitis neonatal (Berridge et al., 2001, Duarte et al., 2004, Lindahl et al., 2005, Mian et al., 2009, Poppert et al., 2009, Pereira et al., 2010).

Debido a la dificultad para la identificación precisa por los métodos tradicionales y dado el hecho de que el cuadro patológico ocasionado en peces es bastante similar entre estos microorganismos, el término estreptococosis es utilizado para agrupar a todos los procesos ocasionados por alguna de estas bacterias (Bercovier et al., 1997).

### 1.1. 2 Características de cultivo de la bacteria

Los medios de cultivo usualmente empleados para el aislamiento de estas bacterias deben ser suplementados con sangre ovina desfibrinada al 5%; dentro de estos se pueden mencionar: agar tripticasa soya (TSA) (Perera et al., 1994; Baya et al., 1996; Cheng and Chen, 1998), agar triptona sangre (BTA) (Bragg and Broere, 1986; Ceschia et al., 1992), y agar infusión cerebro corazón (BHI) (Prieta et al., 1993; Nieto et al., 1995; Yuasa et al., 1999).

En general, se obtiene el crecimiento de colonias pequeñas (0.5-1.5 mm), blancas opacas, viscosas, redondeadas y con un borde liso (Plumb et al., 1974; Boomker et al., 1979; Bragg and Broere, 1986; Ceschia et al., 1992; Prieta et al., 1993; Perera et al., 1994; Yuasa et al., 1999). La alta viscosidad comúnmente observada de estas colonias ha sido asociada a la presencia de una cápsula muy prominente (Yoshida et al., 1996).

Adicionalmente, se han desarrollado medios de cultivo selectivos para estas bacterias. Kitao et al., (1979) usaron caldo tioglicolato suplementado con azida de sodio (0.025%) para el aislamiento de *Enterococcus seriolicida* de agua marina y fangos alrededor de las explotaciones de "yellowtail".

Por medio de la coloración de Gram suelen observarse como cocos de 0.6-0.8  $\mu\text{m}$  solos o en cadenas cortas como en el caso de los *S. iniae* y *S. agalactiae* (Kitao, 1993; Perera et al., 1994), como cocobacilos, especialmente el *L. garviae* y *S. parauberis* (Boomker et al., 1979; Bragg and Breore, 1986; Prieta et al., 1993; Doménech et al., 1996) ó como células ovoides (1.4 x 0.7 $\mu\text{m}$ ) en el caso de los *Enterococcus* sp. y *Vagococcus* sp. (Carson et al., 1993; Michel et al., 1997).

En general no son motiles, no esporulados, anaerobios facultativos, no producen catalasa, ácido sulfhídrico, indol, ornitina ni oxidasa, producen ácido láctico a partir de carbohidratos y no suelen reaccionar con los grupos de antígenos

Lancefield (Austin and Austin, 1985; Hardie, 1986). El *S. agalactiae*, es una especie que puede ser identificada por su grupo Lancefield, se caracteriza por fermentar sucrosa, pero no lactosa, salicina o trehalosa. Algunos de los aislados de esta especie se caracterizan por ser débilmente hemolíticos, sin embargo, otros no hemolíticos han sido aislados de humanos, peces, bovinos, ranas y ratones (Berridge et al., 2001). La tabla 1 muestra las principales características de identificación de algunas de las especies de estreptococos aislados de peces.

Tabla 1. Pruebas de identificación de *Streptococcus spp.* aislados de peces.

Prueba	<i>S. agalactiae.</i>	<i>S. iniae</i>	<i>L. garviae</i>
Gram	Cocos Gram+	Cocos Gram+	Cocobacilos Gram+
Hemólisis	- ó +	B	B
Catalasa	-	-	-
Oxidasa	-	NP	NP
Crecimiento en NaCl 6.5%	+	-	NP
Bilis esculina	-	-	NP
Tolerancia a 45°C	-	+	+
Arginina	-	+	NP
Ureasa	-	-	NP
PYR	-	NP	NP
Hidrólisis del Hipurato de Na	-	NP	NP
Motilidad 37°C	-	-	NP
Reacción Voges Proskauer	-	-	NP
Asimilación de carbohidratos (sucrosa, arabinosa, lactosa, maltosa, manitol, rafinosa, sorbitol, trehalosa)	Sucrosa+	Maltosa, manitol, trehalosa +	, Lactosa, maltosa, y trehalosa y manitol +

NP: Prueba no practicada.

(Hernández et al., 2005)

### 1.1.3 Situación epidemiológica nacional e internacional

La estreptococosis tiene muy pocas limitaciones de fronteras geográficas ó de especificidad de huésped (Bromage et al., 1999). El primer caso de esta enfermedad fue reportado en trucha arcoiris (*O. mykiss*) en el Japón por Hoshina et al. (1958).

El *S. iniae* y el *S. agalactiae* (*Streptococcus* del Grupo B – GBS) han sido reportados en 6 continentes y 23 países, especialmente en regiones tropicales que cultivan peces de aguas cálidas. El *S. agalactiae* ha sido reportado en siete

países de tres continentes: Estados Unidos, Israel, Japón, Kuwait, Tailandia, Brasil y Colombia. Más de 50 especies de 29 familias de peces de agua dulce, salada y estuarina, tanto de cultivo como especies ornamentales, han sido reportadas como susceptibles a *S. iniae* o *S. agalactiae*, indicando un amplio rango de hospederos y una alta adaptabilidad ambiental de estos microorganismos (Bercovier et al., 1997; Shoemaker and Klesius, 1997; Perera et al., 1997; Bowser et al., 1998; Bromage et al., 1999; Pulido et al., 1999; Diler et al., 2002; Evans et al., 2002; Duremdez et al., 2004; Klesius et al., 2006; Russo et al., 2006; Mian et al., 2009).

En la actualidad se ha determinado una diversidad genética significativa tanto entre aislamientos de *S. agalactiae* de peces provenientes de diversas regiones geográficas como entre los aislamientos de peces y los de otras especies animales y del ser humano (Dodson et al., 1999; Kvitt and Colorni, 2004; Zhao et al., 2006; Fuster et al., 2008; Suanyuk, et al., 2008). A pesar de la diversidad genética existente, se ha demostrado la capacidad de aislados de *S. agalactiae* de humanos y bovinos, de infectar y causar enfermedad y mortalidad en Tilapias (Pereira et al., 2010)

En Colombia se ha detectado la bacteria en híbridos de tilapia roja (*Oreochromis* spp.), tilapia nilótica (*O. niloticus*) y trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*), en los Departamentos del Tolima, Huila, Valle del Cauca, Meta y Casanare. Hasta el momento, de los Streptococcus reportados internacionalmente, solamente se ha logrado identificar en el país el *S. agalactiae*, por medio de la técnica de PCR a partir de aislamientos obtenidos de brotes de enfermedad (Pulido et al., 1999; Iregui et al., 2004, Jiménez et al., 2007; Hernández et al., 2009).

La transmisión de la estreptococcosis es principalmente horizontal, por contacto directo con peces infectados ó alimento fresco contaminado. La principal fuente de infección son las bacterias liberadas al agua por los peces enfermos o muertos (Kitao, 1993; Shoemaker and Klesius, 1997, Vendrell et al., 2006, Mian et al.,

2009,). Esto se comprueba experimentalmente al provocar la infección en peces sanos por inmersión y por cohabitación con animales enfermos (Prieta et al., 1993; Ferguson et al., 1994; Chang and Plumb, 1996; Perera et al., 1997). Otros autores han reportado la implicación de las narinas como posible sitio de entrada de la infección de *S. iniae* (Evans et al., 2000).

Otros factores desencadenantes de la transmisión de la enfermedad son: el desplazamiento y alimentación en grupo en cercanía a peces muertos, el canibalismo de los ojos y vísceras (Plumb et al., 1974); la utilización de peces crudos en la alimentación de otros peces en cultivo (Toranzo et al., 1994; Domenech et al., 1996); el concentrado contaminado con la bacteria (Bragg and Broere, 1986). El agua, fango y los peces que sobreviven a los brotes de enfermedad han sido identificados como potenciales reservorios de la bacteria (Toranzo et al., 1993; Akhlaghi et al., 1996; Shoemaker and Klesius, 1997; Bromage et al., 1999).

El aislamiento de *Streptococcus* sp. del fango y de crustáceos presentes en una granja con problemas severos de estreptococcosis puede indicar que esta bacteria es un habitante normal del ambiente, que ha sido liberada y mantenida constantemente en el medio, por animales infectados subclínicamente. Otros organismos, como los crustáceos, especies ícticas ajenas a la explotación o especies terrestres depredadoras, pueden actuar como reservorio de la infección (Bragg and Broere, 1986). Algunos parásitos como las sanguijuelas (*Batracobdelloides tricarinata*) también se consideran posibles vectores de la bacteria (Bragg and Broere, 1986). La movilización de animales entre granjas puede ser también un mecanismo de difusión (Kitao, 1993).

En el "yellowtail", la trucha arcoiris y el "turbot", la mortalidad se hace más evidente cuando el agua alcanza las más altas temperaturas, por lo cual se espera una mayor prevalencia en los meses de verano (Bragg and Broere, 1986; Ghittino and Prearo, 1992; Prieta et al., 1993; Doménech et al., 1996).

La enfermedad por *Streptococcus* sp. en híbridos de “striped bass” y tilapia es normalmente crónica con una mayor incidencia después de situaciones de estrés como la manipulación y cosechas parciales; otros factores que probablemente incrementan el riesgo de infección son: el gran número de protozoarios y tremátodos en branquias y piel, altas densidades y pobre calidad del agua (Baya et al., 1996).

El mantenimiento de la enfermedad en una población ocurre gracias a la existencia de portadores aparentemente sanos, estado que ha sido demostrado en salmón, trucha arco iris, “striped bass” y tilapia (Toranzo et al., 1993; Eldar et al., 1995c; Akhlaghi et al., 1996; Romalde et al., 1996). Los peces enfermos o clínicamente sanos eliminan la bacteria vía intestinal o cuando mueren, permitiendo de esta manera la infección de peces sanos e iniciar así un nuevo ciclo de vida bacteriano (Múzquiz et al., 1999)

Bajo condiciones experimentales de bajo oxígeno disuelto, altas concentraciones de amonio, nitritos y nitratos, elevadas temperaturas y distintas prácticas de manipulación desencadenan la diseminación de la enfermedad y la morbilidad (Eldar et al., 1995). Algunos autores reportan como importantes factores de riesgo el aumento de la temperatura del agua, el aumento del PH, la disminución del oxígeno disuelto y las densidades altas (Perera et al., 1997, Shoemaker et al., 2000, Vendrell et al., 2006, Mian et al., 2009).

#### 1.1.4 Formas de presentación y manifestaciones patológicas

El *S. agalactiae* ha sido reconocido como el principal agente etiológico relacionado con septicemia y meningoencefalitis en peces (Eldar et al., 1995b; Evans et al., 2006), causante de brotes de morbi-mortalidad (Mian et al., 2009).

Existen dos formas de presentación de la enfermedad con características patológicas diferentes: sistémica (casos agudos), de presentación súbita y con alta mortalidad y un cuadro clínico con signos y lesiones más variados y severos que es la forma granulomatosa (casos crónicos) donde la mortalidad es baja pero insidiosa (Boomker et al., 1979).

Los signos clínicos, las lesiones macroscópicas y microscópicas suelen variar en extensión y severidad según el tipo de bacteria involucrada y la especie afectada; sin embargo, la presentación de letargia, dificultad en el desplazamiento, nado errático y en círculos, con severa curvatura del cuerpo y rigidez dorsal, acompañados de exoftalmia y opacidad corneal, se identifican como las más frecuentes (Plumb et al., 1974; Boomker et al., 1979; Rasheed et al., 1985; Kitao, 1993; Perera et al., 1994; Bercovier et al., 1997; Michel et al., 1997; Eldar and Ghittino, 1999; Pulido, 2004). Esta signología ha sido la predominante en casos de mortalidad en el país por *S. agalactiae* (Pulido, 2004; Hernández, 2009).

El cuadro clínico observado en Colombia, contrario a lo comúnmente detectado en otros países, tiende a ser un proceso crónico con bajas pero constantes mortalidades; esto posiblemente está relacionado con la especie diferente de la bacteria identificada en nuestro país (*S. agalactiae*) con respecto a la más comúnmente reportada internacionalmente (*S. iniae*) (Pulido et al., 1999; Iregui et al., 2004).

Las lesiones macroscópicas más comúnmente observadas en la estreptococosis incluyendo las causadas por *S. agalactiae* son: hígado con congestión ó palidez, y con hepatomegalia (Boomker et al., 1979; Prieto et al., 1993; Doménech et al., 1996; Eldar and Ghittino, 1999; Yuasa et al., 1999, Hernández, 2005). El corazón puede aparecer cubierto por un material fibrinoso (Chang and Plumb, 1996; Stoffregen et al., 1996; Pulido, 2000; Hernández, 2009) y el riñón congestionado (Boomker et al., 1979; Prieta et al., 1993). En la luz intestinal y en la cavidad abdominal es común notar la presencia de fluidos sanguinolentos ó un material gelatinoso amarillo-verdoso (Plumb et al., 1974; Brangg and Broer, 1986; Paperna, 1996; Hernández, 2009). En la cavidad peritoneal se describen hemorragias en las paredes musculares, el acúmulo de fluido sanguinolento, en ocasiones con apariencia purulenta y la formación de membranas fibrinosas (Plumb et al., 1974; Rasheed et al., 1985; Eldar et al., 1995; Nieto et al., 1995; Bromage et al., 1999; Yuasa et al., 1999).

De acuerdo con la signología nerviosa característica, el cerebro se muestra como uno de los sitios primarios de infección, hecho descrito tanto para el *S. agalactiae* como para otras especies (Paperna, 1996, Pulido, 2004; Hernández, 2009). La lesión más comúnmente reportada es una meningoencefalitis, en ocasión de carácter hemorrágico (Boomker et al., 1979; Baya et al., 1996; Eldar et al., 1995c; Bercovier et al., 1997; Eldar and Ghittino, 1999). Se reporta la presencia de bacterias en el espacio perivascular y en el interior de los capilares cerebrales (Nieto et al., 1995; Eldar and Ghittino, 1999; Pulido, 2000), de igual manera, se describen lesiones mas severas con áreas de malacia y presencia de granulomas meníngeos (Kaige et al., 1984; Miyazaki et al., 1984; Nieto et al., 1995; Perera et al., 1997; Pulido, 2000).

El segundo órgano más afectado es el globo ocular, en el cual comúnmente se encuentra severa endo y panofalmitis hemorrágica con exudado celular, presencia masiva de macrófagos y bacterias comprometiendo en ocasiones el

nervio óptico (Boomker et al., 1979; Rasheed et al., 1985; Baya et al., 1996; Chang and Plumb, 1996; Stoffregen et al., 1996; Perera et al., 1997; Pulido, 2000).

En el corazón se suele reportar epicarditis severa asociada a un gran número de bacterias (Miyazaki et al., 1984; Baya et al., 1996; Ferguson et al., 1994; Michel et al., 1997; Eldar and Ghittino, 1999), Pulido et al (1999) reportan la presencia de granulomas por *S. agalactiae*, en este órgano.

Experimentalmente se ha reproducido la enfermedad en tilapias, a través de inmersión en soluciones bacteriales, por inoculación vía oral y por cohabitación con animales enfermos (Prieta et al., 1993; Ferguson et al., 1994; Chang and Plumb, 1996; Romalde et al., 1996; Perera et al., 1997; Bromage et al., 1999; Shoemaker et al., 2000). Así mismo, se ha replicado el proceso inoculando la bacteria en las narinas (Evans et al., 2000), por inyección intramuscular e intragástrica (Sugiyama et al. 1981; Kusuda and Salati, 1993; Neely et al., 2002) y por las branquias (McNulty et al., 2003; Mian et al., 2009). En nuestro grupo de investigación se ha demostrado la rápida entrada de la bacteria a través del tracto gastrointestinal en inoculaciones oral y por inmersión (Comas, comunicación personal).

### **1.1.5 Diagnóstico**

El diagnóstico presuntivo de la estreptococosis se basa fundamental en la presencia de los signos clínicos y el aislamiento de cocos Gram(+) de órganos internos. Una vez se obtiene el crecimiento de colonias puras en los diferentes medios de cultivo, es necesaria una confirmación más precisa mediante pruebas fisiológicas y bioquímicas (Kitao, 1993; Shoemaker and Klesius, 1997).

Técnicas de inmunohistoquímica han sido utilizadas exitosamente para la identificación de *Streptococcus* sp. en trucha arco iris, “Yellowtail” y Tilapia, la

inmunohistoquímica como la inmunoperoxidasa indirecta ha mostrado una mayor sensibilidad en comparación con el aislamiento microbiológico (Bragg, 1988; Hernández, 2009). Recientemente, se ha empleado inmunofluorescencia para la detección de *S. iniae* en tilapia (Klesius et al., 2006).

En Colombia, el diagnóstico de la estreptococcosis se viene realizando mediante el uso simultáneo de la histopatología, inmunoperoxidasa indirecta (IPI), microbiología y PCR (a partir de colonias bacterianas); bien sea en casos de mortalidad o en programas de monitoreo sanitario que se han realizado periódicamente con propósitos preventivos (Iregui et al., 2004).

Hernández (2009) empleando IPI, microbiología e histopatología en peces de todos los grupos etáreos, determinó que la microbiología fue la técnica que detectó la menor cantidad de peces positivos al *Streptococcus agalactiae* (7%), mientras que la técnica que más detectó fue la histopatología (30%), seguida por la IPI (16%). En los estudios de Hernández, (2009) y en el de Penagos, (2005); ningún pez de los grupos de larvas y alevinos provenientes de granjas positivas a la enfermedad, mostraron signos clínicos, lesiones macro o microscópicas, aislamiento microbiano o reacción positiva a IPI compatibles con la enfermedad.

El hecho de que en estos estudios previos (Hernández, 2009; Penagos, 2005), se detectó infección y enfermedad en reproductores, pero no en larvas, alevinos y juveniles; podría indicar la posibilidad de que las técnicas empleadas no sean lo suficientemente sensibles, ó quizás la existencia de un eslabón débil del ciclo de la bacteria en las poblaciones, así como la posibilidad de la no existencia de transmisión vertical de padres a hijos.

Por todo lo anterior es necesario estandarizar técnicas más sensibles como la PCR a partir de tejidos, especialmente para la detección de la bacteria en los peces menores de 20 g.

### **1.1.6 Salud pública**

El primer caso de enfermedad humana fue reportado en Texas en 1991, un segundo caso apareció en Ottawa en 1994, y nueve casos más entre 1995 y 1996 (Weinstein et al., 1997). Todos los pacientes tuvieron historia de manipulación de tilapias vivas o sus filetes y desarrollaron celulitis aguda, osteomielitis o endocarditis. Por el momento solo se ha implicado el *Streptococcus iniae*, pero se sospecha que otras bacterias relacionadas con la entidad en peces, puedan como esta, causar infección y enfermedad en humanos (Weinstein et al., 1997; Lau et al., 2003). El *S. agalactiae*, la única especie hasta el momento reportada en el país, se considera a nivel mundial como una de las especies más importantes causante de enfermedades neonatales en humanos, como neumonía, septicemia y meningitis (Hansen et al., 2004; Lindahl et al., 2005).

## **1.2 REACCION EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)**

### **1.2.1 Aspectos Generales**

Es una técnica para la síntesis “in vitro” de secuencias específicas de ADN. Las siglas PCR significan “Polimerase Chain Reaction”: reacción en cadena de la polimerasa. Desarrollada originalmente por Kary Mullis en la década de los 80, por lo cual se le adjudicó el Premio Nobel de Química en 1993, ha sido ampliamente utilizada en el campo de la biología molecular como PCR simple y en sus diferentes variedades (PCR multiplex, PCR anidado, RT-PCR, PCR-RFLP, PCR en tiempo real etc.) (Hoorfar et al., 2004, Hoffmann et al., 2010).

La técnica de PCR permite amplificar de manera selectiva fragmentos del ADN, situados entre dos regiones cuyas secuencias son conocidas. Estas dos regiones se utilizan como iniciadores en la reacción de síntesis del ADN, que está catalizada por la enzima ADN polimerasa (Gibello et al., 2001).

Brevemente, la reacción se basa en la repetición sucesiva de 30 a 35 ciclos, conformado cada uno por tres etapas o fases principales: Una primera fase de desnaturalización, donde la doble hélice de ADN se separa en sus dos hebras, una segunda etapa de hibridación, donde los iniciadores específicos se unen a las zonas 3' complementarias que flanquean el fragmento que queremos amplificar, y un paso final de elongación, donde se produce la síntesis de una cadena sencilla complementaria a la original mediante la enzima ADN polimerasa, la cual incorpora los deoxinucleótidos fosfato presentes en el medio, complementarios a la cadena molde. Este ciclo se repite de tal manera que se da una amplificación exponencial de la secuencia de interés, generando al final del proceso billones de copias de ella (Figuras. 1 y 2). Todo el proceso se lleva a cabo en un equipo, denominado termociclador, que realiza los ciclos en los tiempos y temperaturas programadas de forma exacta. Los productos obtenidos se visualizan normalmente por medio de electroforesis en gel de agarosa. La amplificación de un gen específico del patógeno puede de este modo aumentar significativamente la sensibilidad de la detección (Gibello et al., 2001, Cunningham, 2002, Yang and Rothman, 2004).

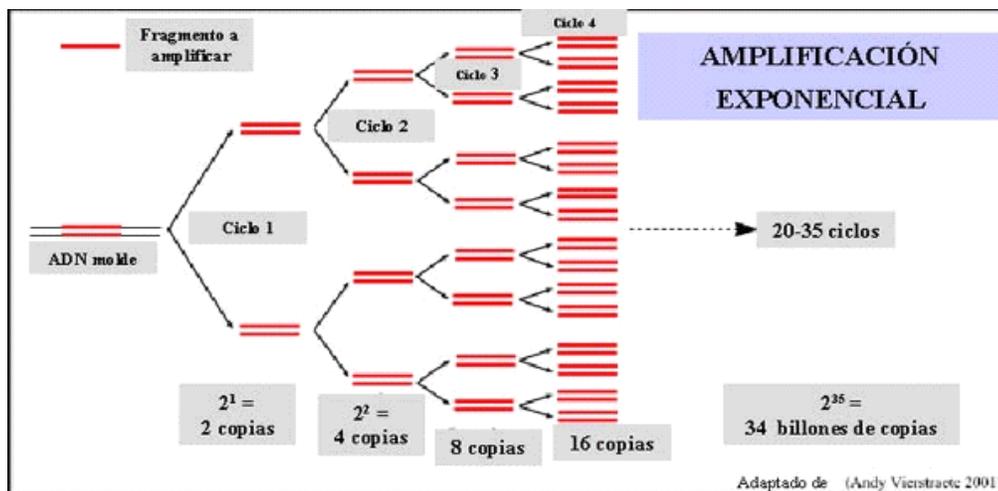


Fig 1. Amplificación exponencial a partir de un fragmento de ADN molde tras una serie de ciclos de PCR (Adaptado de Andy Vierstraete, 2001).

Las ventajas de la PCR sobre otros métodos de diagnóstico genético radican en su simplicidad y rapidez, especificidad y sensibilidad (Johnson, 2000; Gibello et al., 2001).

Las diferentes clases de PCR han sido empleadas ampliamente para el diagnóstico e investigación de infecciones causadas por microorganismos (bacterias, hongos, protozoarios) así como para el estudio de enfermedades de tipo genético, análisis forenses, relaciones filogenéticas entre especies, detección de cepas resistentes a antibióticos etc. a partir de diferentes muestras como sangre, semen, cultivos bacterianos, cultivos celulares, tejidos frescos, congelados o embebidos en parafina, tanto en medicina humana como Veterinaria (Figura 2.) (Yang and Rothman, 2004; Alaeddin et al., 2010).

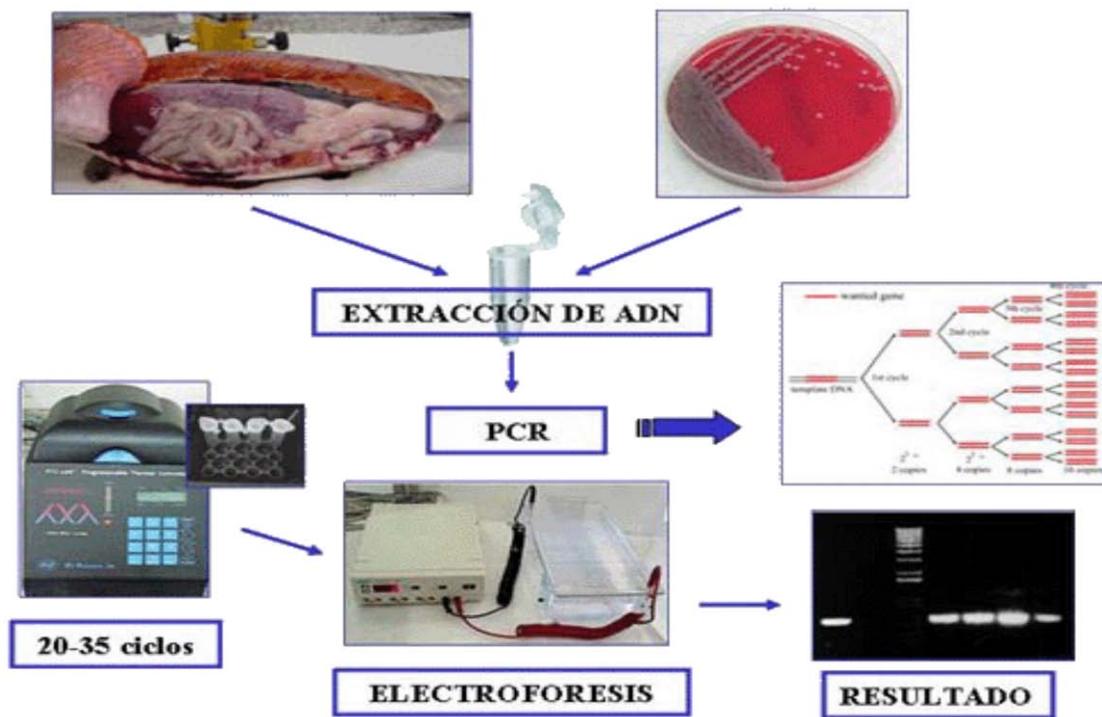


Fig 2. Esquema del procedimiento de la PCR

En las últimas dos décadas la PCR ha sido extensivamente modificada para expandir su utilidad y versatilidad. Por ejemplo, el PCR múltiple permite la

detección simultánea de diferentes secuencias de ADN, por la incorporación de diferentes sets de iniciadores. El PCR anidado, incrementa la sensibilidad y especificidad por medio de dos amplificaciones sucesivas, el PCR-RFLP (Poliformismos en el tamaño de los fragmentos de restricción) permite la amplificación de genes de interés y la posterior digestión con enzimas de restricción permitiendo generar fragmentos de ADN de distintos pesos moleculares, esta técnica es de gran utilidad para la genotipificación de microorganismos y el RT-PCR, permite la detección de RNA por la conversión de RNA en una copia complementaria de ADNc por medio de la enzima transcriptasa reversa, muy útil en la identificación de virus RNA como VIH y hepatitis C (Hoorfar et al., 2004, Hoffmann et al., 2010)

Un avance significativo, fue el desarrollo de la PCR en tiempo real, la cual permite la amplificación y detección de los productos en una única reacción, eliminando la necesidad de electroforesis para la visualización de los amplificados. El PCR en tiempo real permite la amplificación simultánea y la cuantificación en tiempo real (al final de cada ciclo) de secuencias específicas de ácidos nucleicos, además de aumentar la sensibilidad, permite reducir el riesgo de contaminación cruzada (Houghton and Cockerill, 1996 ; Calderano et al., 2006; Hoffmann et al., 2010).

El diagnóstico de infecciones basado en PCR ha sido desarrollado efectivamente para un gran rango de microorganismos, debido a la alta sensibilidad y especificidad y el bajo consumo de tiempo. En el mundo ha sido aplicada a la identificación por género y especie de microorganismos que no crecen in vitro o que requieren un largo tiempo para crecer (Yang and Rothman, 2004). Sin embargo, un limitado número de ensayos ha sido aprobado por la FDA (Food and Drug Administration) y aceptados en la práctica clínica (Yang and Rothman, 2004).

En medicina humana es un método de rutina para el diagnóstico y clasificación de enfermedades hematolinfoides, bacterianas (*Mycobacterium tuberculosis*, *Streptococcus*, *Neisseria gonorrhoeae*), fúngicas (*Chlamydia spp*, *Aspergillus*,

*Candida*), parasitarias (*Plasmodium*, *Trypanosoma*, *Leishmania*, *Giardia*, *Entamoeba histolytica* etc), virales (Herpes, *cytomegalovirus*, *Poxvirus*, *adenovirus*, *influenza* etc) y de enfermedades neoplásicas (Weiss, 1995, Espy et al., 2006; Hutchins and Grabsch; 2009, Mengoli et al., 2009; Olson et al., 2010).

En Medicina Veterinaria, se emplea en el diagnóstico de infecciones virales, bacterianas y parasitarias, principalmente en aves (New castle, Influenza aviar) Bovinos (Diarrea viral Bovina, Leucosis bovina) y Cerdos (Síndrome Respiratorio Porcino-PRRS, *Haemophilus parasuis*, *Streptococcus suis*, Influenza porcina, Circovirus porcino, Peste porcina clásica, Neumonía enzoótica porcina) (Pulido et al., 2006; Hoffmann et al., 2009).

### **1.2. 2 La PCR anidada**

Es una PCR muy sensible ya que el producto de una primera amplificación es utilizado como molde para realizar una segunda amplificación con iniciadores que se ubican dentro de la primera secuencia amplificada. Por ser de alta sensibilidad (límite de detección del orden de fg de ADN), es muy exitoso en el diagnóstico de infección en muestras que posiblemente contienen un muy bajo número del microorganismo de interés. Este PCR ha sido usado con éxito en medicina humana para la detección altamente sensible de múltiples microorganismos en muestras de sangre, tejidos, líquido cerebrospinal, líquido sinovial; por ejemplo el *Toxoplasma gondii* es detectado con éxito en muestras sanguíneas de mujeres embarazadas sospechosas en Italia (Calderano et al., 2006), estos mismos autores compararon la sensibilidad entre este tipo de PCR y PCR en tiempo real para dicho microorganismo, detectando una muy buena sensibilidad por ambas técnicas. También ha sido empleado en la identificación de Giardias (Miller and Sterling et al., 2007), *Streptococcus pneumoniae* (Rudolph et al., 1993, Murdoch et al., 2003) y *Mycobacterium tuberculosis*, entre otros (Takahashi et al., 2008).

En animales, la PCR anidada y sus variaciones (semi-anidada) han sido empleadas para la detección de *Mycoplasma hyopneumoniae*, Coronavirus bovino, virus de la leucosis bovina, virus de Newcastle en aves, leishmaniasis, leptospiras, herpesvirus bovino y equino, entre otros. (Brandão et al., 2003; Felmer et al., 2006; Pulido et al., 2006; Zhang et al., 2010).

En la Figura 3, se observa la representación de las dos amplificaciones sucesivas que le confieren una mayor sensibilidad y especificidad a la PCR anidada.

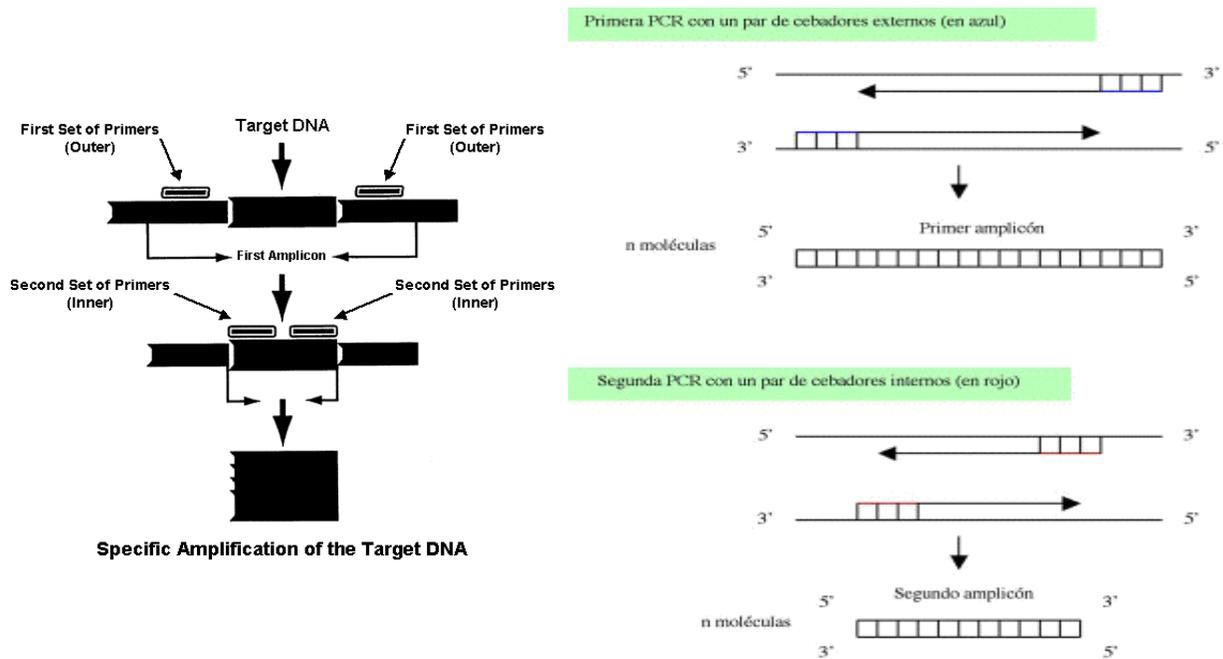


Fig 3. Diagrama que ejemplifica la amplificación anidada: incluye una PCR simple con iniciadores externos y una segunda PCR con iniciadores internos que se hibridan en la primera región previamente amplificada.

### 1.2.3 Región intergénica 16S-23S RNAr vs genes 16SARNr y 23SARNr para la identificación microbiana y análisis filogenéticos

Numerosos autores han empleado los genes 16S y 23S RNAr para la identificación de microorganismos (Hassan et al., 2008, Sontakke et al., 2009, Olson et al., 2010). La identificación de especies de estreptococos mediante la amplificación del gen 16S RNAr ha sido ampliamente utilizada, así como para las bacterias del género *Enterococcus*, de igual manera la amplificación del gen 23S RNAr ha sido empleada para la identificación de *S. uberis*, *S. parauberis*, *S. phocae* (Hassan et al., 2003, Hassan et al., 2008), a pesar de ello recientemente se describen algunos limitantes en el uso de estos genes para el estudio de diversidad genética microbiana y análisis de filiación, estudios recientes sugieren la posibilidad de transmisión horizontal y recombinación del gen 16SRNA en algunas especies microbianas como *Rhizobium*, *Aeromonas*, *Bradyrhizobium*, *Streptococcus*, otro limitante lo constituye las múltiples copias del operon RNAr y la heterogeneidad del gen 16S, algunos autores sugieren la presencia de copias divergentes de este gen en un mismo microorganismo, esto puede ser abolido identificando genes que tengan una única copia en el microorganismo, como el gen de la ARN polimerasa beta (*rpoB*), DNA girasa subunidad B (*gyrB*) y el gen de la proteína de choque térmico (*dnaK*) (Rajendhran and Gunasekaran, 2010).

En contraste, se ha demostrado que la región espaciadora intergénica ribosomal 16S-23S del RNAr es mucho más variable en comparación con los genes ribosomales y es una región que podría tener mínima presión selectiva durante la evolución, convirtiéndose en una región del genoma bacteriano útil en la recopilación de información taxonómica especialmente respecto a la identificación a nivel de especie. La secuenciación de esta región revela que tiene una región central de longitud muy variable, flanqueada por regiones conservadas. El análisis de su secuencia se ha aplicado con éxito para la identificación y diferenciación de varias especies de bacterias incluidas diferentes especies de estreptococos: *S.*

*uberis*, *S. parauberis*, *S. agalactiae*, *S. dygalactiae*, *S. iniae* y *Enterococcus spp* (Berridge, 1998, Berridge et al., 2001, Mora et al., 2003, Rajendhran and Gunasekaran, 2010) .

La longitud de la región varía dependiendo de la especie, primordialmente al número y tipo de RNAt que tenga. Por ejemplo, en *E.coli* existen dos tipos de ITS (internally transcribed spacer), de los siete operones ARNr cuatro de ellos contienen un único gen RNAt<sup>Glu</sup> y los otros tres tienen dos genes RNAt (tRNA<sup>Ile</sup> and tRNA<sup>Ala</sup>) en esta región, esta variación en longitud y secuencia de la ITS es útil para la identificación de procariones (Rajendhran and Gunasekaran, 2010).

#### **1.2.4 Empleo de técnicas moleculares para el diagnóstico e investigación de infecciones bacterianas en peces**

Las técnicas moleculares cada vez son más utilizadas como medio de diagnóstico en acuicultura en moluscos, crustáceos y peces en la identificación, clasificación y caracterización genética de muchos patógenos de peces, incluyendo agentes bacterianos, parasitarios, fúngicos y virales; las técnicas más empleadas incluyen la PCR, RFLPs, hibridación y secuenciación de nucleótidos (Cunningham, 2002, East, 2008). Muchas de estas técnicas han sido involucradas dentro de la legislación en salud piscícola como una herramienta para controlar la diseminación de enfermedades. La tecnología genética posibilita la detección del patógeno directamente, complementando o reemplazando el cultivo microbiológico y las técnicas serológicas e histológicas (Cunningham, 2002).

La PCR es muy útil por ejemplo para la expedición de certificados sanitarios o como parte de una investigación para declarar la ausencia de una enfermedad (Jaroenram et al., 2009). Algunos autores reportan que en muchos casos dichas técnicas presentan una sensibilidad y/o especificidad de diagnóstico inferior al 100%, siendo muy frecuente la presentación de falsos negativos y positivos, lo que obliga a analizar un gran número de muestras para obtener resultados

estadísticamente significativos. El uso de mezclas de muestras o de dos pruebas de PCR independientes puede reducir sustancialmente el número de ensayos requeridos y con ello los costos asociados a este tipo de estudios (East, 2008).

En el caso de bacterias Gram negativas se ha empleado PCR para la identificación y clasificación de especies como: *Yersinia ruckeri*, *Pseudomonas anguilliseptica*, *Renibacterium salmoninarum*, *Aeromonas salmonicida*, así mismo han sido probadas con éxito diferentes PCRs en la identificación de cocos Gram positivos: *Lactococcus garviae*, *S. iniae*, *S. parauberis*, *S. phocae* y *S. agalactiae* (Zlotkin et al., 1998; Iregui et al., 2004; Mata et al., 2004). Recientemente se ha empleado PCR para la amplificación del gen 16S RNAr en la identificación de bacterias Gram positivas en peces marinos (Bulushi et al., 2010), y para la identificación de distintos virus ARN implicados en la necrosis pancreática infecciosa (IPN), necrosis hematopoyética infecciosa (IHN) y septicemia hemorrágica viral (VHS) (Gibello et al., 2001).

Debido a que muchos métodos de identificación fenotípica requieren gran cantidad de pruebas bioquímicas que en ocasiones dificultan el diagnóstico, las técnicas moleculares han cobrado gran importancia, estas demandan menos tiempo y además ofrecen una alta sensibilidad y especificidad. En el caso específico del diagnóstico microbiológico en peces, aunque comercialmente existen estuches para la identificación específica de estreptococos, como el sistema API 20 STREP®; estos han mostrado no ser apropiados para la identificación de cepas de Gram(+) en peces, ya que originalmente fueron desarrollados para aislamientos clínicos de mamíferos. Estos sistemas pueden ser de utilidad en la identificación de aislamientos si se incluyen en sus bases de datos un mayor número de especies patógenas para los peces (Santos et al., 1993). Lo anterior, sumado a que algunas de estas bacterias Gram(+) de peces poseen características de cultivo y bioquímicas muy similares (Kitao, 1993),

hacen de las técnicas moleculares una excelente opción para la detección de infecciones por este grupo de bacterias en peces.

Empleando PCR para amplificar el gen 16S ARNr, fue posible identificar al *S. iniae* asociado a mortalidades en híbridos de tilapia en Estados Unidos (Perera et al., 1994), y al *S. parauberis* en el turbot en España (Doménech et al., 1996). Así mismo, fue posible determinar como algunas infecciones localizadas en humanos estuvieron relacionadas con *S. iniae*, elucidando el potencial zoonótico de esta bacteria (Lau et al., 2003). En España, esta misma especie de estreptococo, se ha identificado por amplificación del gen Lactato Oxidasa (*lctO*) por PCR multiplex, a partir de tejidos inoculados experimentalmente (Mata et al., 2004)

En el mundo ya ha sido empleada la PCR para la identificación y caracterización de la variabilidad genética de aislados *S. agalactiae* de peces (Suanyuk et al., 2008). En Colombia, mediante PCR simple a partir de cultivo bacteriano ha sido posible identificar como *S. agalactiae* a los aislamientos de brotes de morbi-mortalidad de explotaciones de tilapia roja de varias regiones del país (Iregui et al., 2004).

Aunque el empleo de otras técnicas moleculares como la hibridización in situ ha sido ampliamente reportada en humanos para la detección de Streptococcus hemolíticos, incluyendo *S. agalactiae* (Artz et al., 2003, Poppert et al., 2005, Poppert et al., 2009), en peces se han iniciado los primeros estudios para el empleo de esta técnica en investigaciones epidemiológicas y de patogénesis relacionadas con *S. agalactiae* (Pulido et al., 2010). La hibridización in situ tiene un gran potencial en el mapeo de cromosomas y en el estudio genético de poblaciones piscícolas (Phillips and Reed, 1996), así como en el diagnóstico de infecciones bacterianas por *S. agalactiae* y en el estudio de su patogénesis (Pulido et al., 2010).

➤ **Región intergénica 16S-23S del *S. agalactiae***

Aunque ha sido empleada más frecuentemente la identificación del gen 16S ARNr en las distintas especies de estreptococos, más recientemente se ha implementado el uso de la ITS para análisis de especies estrechamente relacionadas y como blanco para el diagnóstico molecular especie específico, es así que esta región ha permitido aclarar la estrecha relación genética existente entre el *S. difficile* y el *S. agalactiae*, de tal manera que hoy en día se consideran sinónimos. (Berridge et al., 1998; Berridge et al., 2001; Kawamura et al., 2005). Berridge et al (2001) desarrollaron un set de primers para la identificación anidada específica de esta región en *S. agalactiae* obtenido a partir de cultivo bacteriano, evidenciando la no existencia de reacción cruzada con otros estreptococos como *S. iniae*, *S. uberis*, *S. dysgalactiae*, *Enterococcus seriolicida*, *E. faecium* y con gram negativas como *A. hydrophila*, *A. salmonicida*, *Edwardsiella tarda*, *E. ictaluri*, *Vibrio parahaemolyticus*, por lo cual estos set de iniciadores son recomendados para el diagnóstico de infección por *S. agalactiae* en cultivos de peces comerciales.

La Figura 4. Esquematiza el resultado de la PCR anidada para la región intergénica 16S-23S ARNr de *S. agalactiae*: Una primera PCR genera un amplicon de 375pb inespecífico, este sirve de ADN molde para una segunda amplificación de 192pb que inicia en la posición 5´61 y termina en la posición 3´252 de la región intergénica 16S-23S específica del *S. agalactiae*.

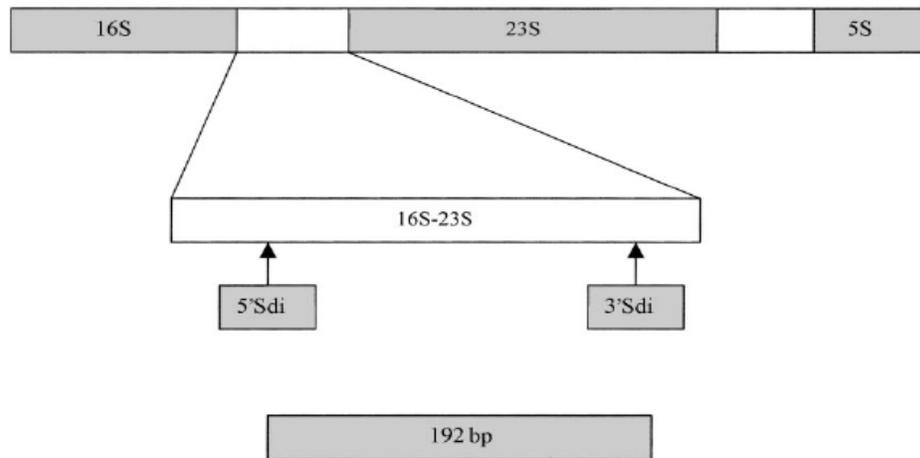


Fig 4. Esquema de PCR anidada para la región intergénica 16S-23S de 192pb del *S. agalactiae*. Berridge et al., 2001

## 2. MATERIALES Y METODOS

### 2.1 ESTANDARIZACION DE LA TÉCNICA DE PCR PARA LA DETECCIÓN DE *S. agalactiae* A PARTIR DE TEJIDOS DE TILAPIA ROJA

#### 2.1.1 Extracción de ADN de *S. agalactiae* a partir de tejidos congelados.

Se emplearon 20 tilapias de 10-20g provenientes de granjas certificadas como libres de la enfermedad por histopatología, microbiología e inmunohistoquímica. Los peces se aclimataron durante 7 días en acuarios de 60 L con T<sup>0</sup> promedio de 28°C, aireación permanente y alimentadas con balanceado comercial. Posteriormente, se inocularon intraperitonealmente con 100µl de una solución que contenía 10<sup>9</sup> UFC/ml de *S. agalactiae*, (cepa ST991); aislada de un brote de enfermedad de tilapia en un sistema de producción en jaulas flotantes en Colombia. Previo al estudio, el gen 16S ARNr de la cepa bacteriana fue secuenciado y analizado en el programa bioinformático BLAST de la NCBI ([www.ncbi.nlm.nih.gov/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/)), análisis que permitió confirmar que la cepa pertenecía al género *Streptococcus* y con un 98.8% de identidad a la especie *agalactiae*.

Los animales se sacrificaron antes de 48 horas pos-inoculación, tiempo en el cual según estudios previos (Comas et al., 2005), la bacteria ya ha alcanzado órganos como cerebro y ojo. Los animales fueron anestesiados con metasulfonato de tricaina sódica (MS-222®) a una concentración del 5% y posteriormente eutanasiados con un corte de la médula espinal cervical.

Se tomaron muestras de ojo y cerebro para aislamiento microbiológico en agar BHI suplementado con sangre ovina al 5%, se incubó a 28°C durante 24 h. Adicionalmente, de los mismos órganos, se tomaron porciones para ser fijadas en formaldehído tamponado al 3.7%, durante 24 h; se practicó tinción de Gram a los cortes histológicos para explorar la presencia de la bacteria.

20 cerebros y 20 ojos de los peces inoculados, así como 10 cerebros y 10 ojos inoculados directamente con 100  $\mu$ l de una solución que contenía  $10^9$  UFC/ml de *S. agalactiae* (cepa ST991), fueron congeladas en buffer TE 1X pH. 8.0 (10mM Tris HCl, 1mM EDTA), a  $-20^{\circ}\text{C}$ . Para la extracción del ADN de la bacteria se evaluaron dos metodologías: la mitad de las muestras (15 ojos y 15 cerebros) fueron procesadas mediante la extracción con fenol descrita por Inagawa et al., 2004 (Comunicación personal) (Anexo 1) y las restantes con el kit de extracción: UltraClean Tissue and Cells ADN isolation kit, Mo Bio Laboratorios Inc®. (Anexo 2). Los ADNs obtenidos fueron mantenidos a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta la realización de la PCR.

### **2.1.2 Extracción de ADN de *S. agalactiae* a partir de tejidos embebidos en parafina**

Se usaron 10 tilapias de 10-20g inoculadas intraperitonealmente con 100 $\mu$ l de una solución que contenía  $10^9$  UFC/ml de *S. agalactiae* (cepa ST991). Los animales eran provenientes de granjas libres de la infección, y fueron mantenidos y sacrificados según lo descrito para los peces del numeral anterior.

10 cerebros y 10 ojos fueron fijados en formaldehído tamponado al 3.7%, durante 24 h y posteriormente incluidos individualmente en bloques de parafina, según la técnica de rutina. Adicionalmente se usaron cinco cerebros y cinco ojos inyectados directamente con 100  $\mu$ l de la misma solución de *S. agalactiae* (cepa ST991), y fueron incluidos y procesados bajo las mismas condiciones.

De cada órgano (ojo y cerebro) tanto de los animales inoculados vivos como de los órganos aislados e inoculados directamente, se practicaron 20 cortes de 3 a 4  $\mu$ m de grosor, se colocaron en un vial de 1,5 ml para ser desparafinados con 1,5 ml de xilol absoluto a  $60^{\circ}\text{C}$  por 25 min, después de centrifugar por 10 minutos a 14000 rpm se descartó el sobrenadante y de nuevo se repitió el procedimiento; cada muestra fue lavada dos veces con 1 ml de etanol absoluto y una vez con

etanol al 70%, se centrifugó a 14000 rpm durante 10 minutos, cada vez se descartó el sobrenadante, finalmente las muestras se rehidrataron dos veces con buffer TE 1X pH 8.0 a 55°C por 5 min (Coura et al., 2005).

Una vez desparafinadas las muestras, el ADN fue obtenido mediante el kit de extracción de ADN a partir de tejidos: UltraClean Tissue and Cells ADN isolation kit, Mo Bio Laboratorios Inc®. (Anexo 3); los ADNs obtenidos fueron mantenidos a -20°C hasta la realización de la PCR.

Los ADNs extraídos tanto de tejidos congelados como embebidos en parafina, fueron visualizados por electroforesis en geles de agarosa al 1.5% y teñidos con bromuro de etidio.

### **2.1.3 Estandarización de PCR anidado**

Todos los ADNs extraídos de tejidos congelados y embebidos en parafina, fueron cuantificados por fluorometría mediante el fluorómetro Qubit fluorometer Invitrogen S.A® (Anexo 4) y posteriormente diluidos con buffer TE1X a una concentración de 10ng/μl para la PCR y mantenidos a -20°C.

Se hizo una PCR anidada, con una primera amplificación de la región intergénica inespecífica 16S-23S ARNr de 375 pb con los iniciadores: 5´AGTCGTAACAAGTGAAGCCG3´ y 5´C T/C A/G T/C TGCCAAGCATCCACT3´.

El producto de la primera amplificación se usó de molde para una nueva reacción para amplificar el gen de 192 pb que codifica para la región intergénica específica 16S-23S del ARNr del *S. agalactiae*, para esta segunda PCR se emplearon los iniciadores específicos: 5´AGGGAAACCTGCCATTTGCG3´ y 5´CAATCTATTTCTAGATCGTGG3´ (Berridge et al., 2001).

Para la estandarización de la PCR se evaluaron gradientes de temperatura de anillamiento de los iniciadores, desde 53°C hasta 62°C, para determinar la óptima, tanto en la PCR simple como en la anidada. De igual manera se evaluaron diferentes concentraciones de Mg<sub>2</sub>Cl (1.5, 2.0, 2.5, 3.0, 3.5 y 4.0 mM), con base en estos resultados se practicaron las PCRs simple y anidada a todos los ADNs previamente cuantificados.

El volumen de la mezcla para la PCR simple (iniciadores externos) y anidada (iniciadores internos) fue de 26 µl, las tabla 2 y 3 registran los volúmenes y concentraciones de los reactivos:

**Tabla 2. Mezcla por muestra para la PCR simple (iniciadores externos)**

Reactivo	Concentración inicial	Concentración final	Volumen ( $\mu$ l)
AGUA	-----	-----	2,5
DNTPs (A, T G C) (nucleótidos Promega®)	1 mM c/u	0,15mM c/u	4
Buffer B10X (Kit Tucan taq polimerasa®, Corpogen S.A)	10X	1X	2,5
Mg <sub>2</sub> Cl	25 mM	2,4 mM	2,5
Iniciador foward	10 $\mu$ M	0,8 $\mu$ M	2
Iniciador reverse	10 $\mu$ M	0,8 $\mu$ M	2
Taq polimerasa (Tucan Taq®)	5 Unidades/ $\mu$ l	0,09 U/ $\mu$ l	0,5
ADN molde	10 ng/ $\mu$ l	3,8ng/ $\mu$ l	10

**Tabla 3. Mezcla por muestra para el PCR anidado (iniciadores internos)**

Reactivo	Concentración inicial	Concentración final	Volumen ( $\mu$ l)
AGUA	-----	-----	7,5
DNTPs (A, T G C) (nucleótidos Promega®)	1 mM c/u	0,15mM c/u	4
Buffer B10X (Kit Tucan taq polimerasa®, Corpogen S.A)	10X	1X	2,5
Mg <sub>2</sub> Cl	25 mM	2,4 mM	2,5
Iniciador foward	10 $\mu$ M	0,8 $\mu$ M	2
Iniciador reverse	10 $\mu$ M	0,8 $\mu$ M	2
Taq polimerasa (Tucan Taq®)	5 Unidades/ $\mu$ l	0,09 U/ $\mu$ l	0,5
Producto de la amplificación inicial	-----	-----	5

Las tablas 4 y 5 muestran la programación del equipo para la PCR simple y anidada, de acuerdo a las temperaturas óptimas de anillamiento.

Tabla 4. Programación del termociclador para la PCR simple de la región intergénica inespecífica 16S-23S ARNr, *S. agalactiae*

PASO	TEMPERATURA	TIEMPO
1. Pre calentamiento	94°C	3 minutos
2. Desnaturalización	94°C	30 segundos
3. Asociación de iniciadores inespecíficos	58°C	30 segundos
4. Elongación	72°C	30 segundos
5. Go to 2, (30 ciclos)		
6. Extensión final	72°C	3 minutos
8. Fin		

Tabla 5. Programación del termociclador para la PCR anidada de la región intergénica 16S-23S ARNr, específica del *S. agalactiae*.

PASO	TEMPERATURA	TIEMPO
1. Pre calentamiento	94°C	3 minutos
2. Desnaturalización	94°C	30 segundos
3. Asociación de iniciadores específicos	60°C	30 segundos
4. Elongación	72°C	30 segundos
5. Go to 2, (30 ciclos)		
6. Extensión final	72°C	3 minutos
8. Fin		

Previo a la PCR, los ADNs fueron calentados a 100°C por 10 min, con el objeto de evitar la acción de posibles inhibidores como sangre en la amplificación.

En cada reacción de PCR simple se emplearon dos controles negativos: agua como sustituto del ADN molde y mezcla de solo reactivos sin agua y sin ADN molde; y dos controles positivos: 100 ng de ADN purificado de *S. agalactiae* cepa ST991 y 100 ng de ADN purificado de *S. agalactiae* ATCC 12386.

Se emplearon cuatro controles negativos para las segundas reacciones de amplificación (iniciadores internos): agua como sustituto del ADN molde, mezcla de solo reactivos sin agua y sin ADN molde y los mismos controles negativos de la primera amplificación, como templetes para la segunda amplificación. Los

controles positivos correspondían a los dos amplificadores provenientes de los dos controles positivos de la primera amplificación.

Los productos de ambas PCRs fueron visualizados por electroforesis en gel de agarosa al 1.5%, mezclando 7µl de muestra con 2 µl de buffer carga Promega®, en buffer TAE 1X a 70 voltios, por una hora. Se empleó un patrón de peso molecular de 100 pb de Promega®. Los geles fueron teñidos con bromuro de etidio y visualizados en transiluminador.

Se secuenciaron dos de los amplificadores (uno a partir de tejido congelado y otro de tejido embebido en parafina), servicio prestado por la empresa Corpogen S.A.

#### ➤ **Evaluación de la especificidad de la técnica**

Se utilizó ADN obtenido a partir de tejidos (ojo y cerebro) inyectados directamente con otras bacterias Gram (+): *Streptococcus pneumoniae* ATCC 49619 *Enterococcus faecalis* ATCC 29272 (proporcionadas por el Instituto Nacional de Salud), *Streptococcus iniae* y *Lactococcus garviae* (cepas donadas por la Universidad de Miyazaki, Japón). El *Enterococcus sp*, *S. iniae* y *L. garviae* son reconocidos como parte del grupo de patologías denominadas estreptococosis de peces; y el *S. pneumoniae*, recientemente también ha sido aislado a partir de casos de enfermedad en peces (Mata et al.,2004), el laboratorio cuenta con un control positivo (músculo inoculado con este microorganismo embebido en parafina) de esta última especie. Además se evaluó la posibilidad de reacción cruzada con la bacteria Gram(-): *Aeromonas hydrophila* (aislamiento procedente de brotes de enfermedad en tilapia en el país). Todos los tejidos fueron procesados por congelación e inclusión en parafina de la misma manera que los tejidos positivos a *S. agalactiae*.

Se practicó PCR anidado bajo las condiciones estandarizadas para la amplificación de la región intergénica 16S-23S RNAr del *S. agalactiae* de referencia (cepa ST991).

Previo a la determinación de especificidad de cada una de las anteriores muestras de tejidos, se evaluó la especificidad de la técnica de los cultivos de cada una de las especies antes mencionadas. La técnica de extracción de ADN a partir de cultivo de *S. agalactiae*., así como para bacterias Gram (-), ya había sido estandarizada previamente en nuestro laboratorio (Anexos 5 y 6).

#### ➤ **Evaluación de la Sensibilidad de la técnica**

Para determinar el límite de detección de la técnica se hicieron 10 diluciones en base diez de ADN de *S. agalactiae* ATCC (obtenido a partir de cultivo bacteriano puro), se determinó su concentración por fluorometría (31,6 µg/ml), y cada dilución fue mezclada con ADN de cerebro congelado negativo a *S. agalactiae* o con ADN de cerebro embebido en parafina también negativo, en cantidades constantes (1140ng y 934ng, respectivamente). A todas las muestras mencionadas se les realizó PCR anidado, bajo las condiciones previamente estandarizadas. La tabla 6 registra las cantidades de ADN evaluadas para determinar el límite de detección de la técnica, tanto en tejidos congelados como embebidos en parafina.

Tabla 6. Diluciones para la determinación del límite de detección de la PCR a partir de tejidos congelados y embebidos en parafina.

Muestra	Cantidad de ADN de <i>S. agalactiae</i>	Cantidad de ADN de tejido congelado	Cantidad de ADN de tejido embebido en parafina
1: ADN bacteriano sin diluir.	69.5 ng (0.0695 µg)	1140ng (1,140µg)	934 ng (0,934 µg)
D1: Dilución 1 de ADN bacteriano	6.95 ng (0.00695 µg)	1140ng (1,140µg)	934 ng (0,934 µg)
D2: Dilución 2 de ADN bacteriano	0,695 ng (695 pg)	1140ng (1,140µg)	934 ng (0,934 µg)
D3:Dilución 3de ADN bacteriano	69,5 pg	1140ng (1,140µg)	934 ng (0,934 µg)
D4:Dilución 4 de ADN bacteriano	6,95 pg	1140ng (1,140µg)	934 ng (0,934 µg)
D5:Dilución 5 de ADN bacteriano	0,695 pg (695 fg)	1140ng (1,140µg)	934 ng (0,934 µg)
D6:Dilución 6 de ADN bacteriano	69,5 fg	1140ng (1,140µg)	934 ng (0,934 µg)
D7:Dilución 7de ADN bacteriano	6,95 fg	1140ng (1,140µg)	934 ng (0,934 µg)
D8: Dilución 8 de ADN bacteriano	0,695 fg	1140ng (1,140µg)	934 ng (0,934 µg)
D9: Dilución 9 de ADN bacteriano	0.0695 fg	1140ng (1,140µg)	934 ng (0,934 µg)
D10: Dilución 10 de ADN bacteriano	0,00695 fg	1140ng (1,140µg)	934 (0,934 µg)

## 2.2 DETECCIÓN DEL ADN DE *S. agalactiae* EN TILAPIAS MENORES DE 20g PROVENIENTES DE MUESTREOS EN CAMPO

### 2.2.1 Larvas y alevinos congelados

Se tomaron 180 tilapias y se dividieron en dos grupos, menores de 5 g y de 5.1 g hasta 20 , provenientes de 2 granjas ubicadas en el Departamento del Huila, las cuales en monitoreos periódicos han sido diagnosticadas como positivas a la infección por *S. agalactiae* por microbiología, histopatología e inmunohistoquímica. En la tabla 7 se incluye la distribución de las muestras para la detección de ADN de la bacteria a partir de tejidos congelados.

Para calcular la población a examinar se utilizó un índice de prevalencia esperado del 10%, un error del 5% y un nivel de confianza del 95% según lo descrito por Martín et al. (1987). Los animales fueron tomados de manera aleatoria

Tabla 7. Distribución de las muestras congeladas para determinar la presencia de *S. agalactiae* en tilapias menores de 20g.

<b>Grupo etareo</b>	<b>Municipio de procedencia</b>	<b>No. de animales</b>
LARVAS (< 5g)	Hobo	96
ALEVINOS (> 5- 20g)	Represa Betania , Municipio Yaguará	84
TOTAL		180

De las larvas (menores de 5 g) se congelo la cabeza, de los animales mayores de 5 g se tomó el cerebro y ojo y se congelaron en TE 1x pH 8.0. A todas las muestras se les practicó la extracción de ADN (UltraClean Tissue and Cells ADN isolation kit, Mo Bio Laboratorios Inc®) y PCR anidada estandarizada para este tipo de muestras. En total se procesaron 264 muestras para la PCR: 96 larvas (cabeza) y 84 alevinos (2 órganos por animal: cerebro y ojo).

Antes de practicar las PCRs, cada muestra de ADN se precalentó a 100°C durante 10 minutos, para evitar la acción de inhibidores. Se prepararon mastermix para 100 muestras, la mastermix incluía todos los reactivos excepto el ADN molde. Una vez alicuotada la mastermix en viales para PCR de 25 µl, se colocaba el ADN de la muestra correspondiente.

Los controles de cada reacción para el PCR simple y anidado fueron los descritos en el capítulo correspondiente a la estandarización de la técnica.

Los amplificadores resultantes de la PCR específica (iniciadores internos) fueron visualizados por electroforesis en gel de agarosa al 1.5%, mezclando 7µl de

muestra con 2  $\mu$ l de buffer carga Promega <sup>®</sup>, en buffer TAE 1X a 200 voltios, por una hora, en cámara de electroforesis Sub Cell GT<sup>®</sup> de Bio Rad. Se empleó un patrón de peso molecular de 100 pb de Promega<sup>®</sup> (5  $\mu$ l). Los geles fueron teñidos con Bromuro de etidio y visualizados en transiluminador Spectroline<sup>®</sup> (Anexo 7).

### **2.2.2 Larvas y alevinos embebidos en parafina**

Se tomaron 52 bloques embebidos en parafina que contenían cerebros y ojos de tilapia roja menores de 20 g, que habían sido tomadas en otro estudio de manera aleatoria y sus tejidos fijados en formaldehído tamponado al 3.7%, estos peces habían sido evaluados previamente por microbiología, histopatología e IPI en el Laboratorio de Patología Veterinaria de la Universidad Nacional de Colombia, y diagnosticados como negativos para *S. agalactiae*, (Penagos, 2005). Dichos animales provenían de tres granjas con ciclo completo de producción, es decir, reproducción, precría, cría, preengorde y engorde; estas granjas habían sido declaradas como positivas a la estreptococosis en individuos mayores de 20g, por las técnicas mencionadas.

La tabla 8. Registra la distribución de los animales por granja y departamento de procedencia.

Tabla 8. Distribución de los animales embebidos en parafina para determinar la presencia de *S. agalactiae*. en tilapias menores de 20g.

<b>Grupo etareo</b>	<b>Departamento de procedencia</b>	<b>No. de animales</b>
LARVAS (< 5g)	Granja No. 1 Tolima	20
	Granja No. 2 Tolima	20
	Granja Huila	20
ALEVINOS (> 5- 20g)	Granja No. 1 Tolima	40
	Granja No. 2 Tolima	40
	Granja Huila	40
<b>TOTAL</b>		<b>180</b>

Cada bloque procesado contenía de 4 a 10 cerebros u ojos correspondientes a igual número de alevinos; en el caso de las larvas cada bloque contenía 2 a 6 larvas completas.

La tabla 9. registra la cantidad de bloques analizados (unidad muestral) y el número total de animales.

Tabla 9. Bloques y tejidos embebidos en parafina para la detección de *S. agalactiae*.

<b>Cantidad de bloques (unidad muestral)</b>	<b>Promedio de tejidos por bloque</b>	<b>No. total de tejidos analizados</b>	<b>No. total de animales</b>
20	6	120 Ojos de alevino	120 Alevinos
20	6	120 Cerebros de alevino	
12	5	60 Larvas	60 Larvas

En este caso la unidad muestral fue el bloque de parafina, ya que los tejidos contenidos en cada uno, eran procesados como un pull en una única reacción, es decir de cada bloque que contenía ojos o cerebros de alevinos y de bloques que contenían larvas, se extrajo el ADN y se practicó PCR anidado por las técnicas estandarizados para tejidos embebidos en parafina.

Como controles positivos de la presencia del ADN de *S. agalactiae* en tejidos, se usaron bloques de órganos inyectados experimentalmente con esta bacteria y que habían resultado positivos por PCR en los experimentos anteriores y bloques de pellets bacterianos puros embebidos en parafina, obtenidos directamente de cultivo. Como controles negativos se emplearon tejidos (ojo y cerebro) de tilapias positivas a *A. hydrophila*, así como bloques de tejidos de otra especie animal (ratón) negativos a *S. agalactiae*.

La visualización de los amplificadores se practicó bajo las mismas condiciones descritas para alevinos y larvas congeladas.

### **2.3 DETECCIÓN DEL *S. agalactiae* EN SEMEN, OVAS INFECUNDAS Y FECUNDADAS PROVENIENTES DE MUESTREOS EN CAMPO**

Se tomaron 26 muestras de semen de reproductores, 32 muestras de ovas de hembras y 30 muestras de ovas fecundadas, provenientes de la granja del Municipio de Hobo, Huila, de donde se habían tomado también las larvas utilizadas en éste estudio. Las muestras fueron congeladas a -20°C y posteriormente se les practicó el procedimiento estandarizado para la extracción de ADN y la PCR anidada para los tejidos de peces congelados. Los amplificadores fueron visualizados por electroforesis bajo las mismas condiciones descritas.

### **2.4 CONFIRMACION DE POSITIVIDAD O NEGATIVIDAD DE LAS MUESTRAS**

La positividad se confirmó gracias al empleo de varios controles en cada una de las reacciones: para el PCR simple se emplearon dos controles negativos (agua como sustituto del ADN molde y mezcla de solo reactivos sin agua y sin ADN molde) y dos controles positivos (100 ng de ADN purificado de *S. agalactiae* cepa ST991 y 100 ng de ADN purificado de *S. agalactiae* ATCC 12386). Se

emplearon cuatro controles negativos para las segundas reacciones de amplificación (iniciadores internos): agua como sustituto del ADN molde, mezcla de solo reactivos sin agua y sin ADN molde y los dos controles negativos provenientes de la primera amplificación, como templates para la segunda amplificación. Como control positivo en la segunda reacción se emplearon como template los amplificados controles positivos resultantes de la primera reacción.

Para descartar falsos negativos, 100 muestras de las que resultaron negativas a *S. agalactiae* (cerebros, ojos, cabezas de larvas, semen y ovas congelados, así como larvas, ojos y cerebros embebidos en parafina) fueron procesadas con iniciadores específicos para B-actina como control interno (Joshua et al., 2007), por medio de un PCR simple. Los iniciadores empleados fueron: Beta actina F : CGG AAT CCA CGA AAC CAC CTA y Beta Actina R: ATC TCC TTC TGC ATC CTG TCA, para amplificar el gen que codifica para B-Actina de tilapia *Oreochromis niloticus* de 135 pb. La tabla 10 describe las condiciones de la amplificación del gen que codifica para la B-actina para un volumen de reacción de 26 µl.

Tabla 10. Condiciones de amplificación para el gen de la B-actina.

Reactivo	Concentración inicial	Concentración final	VOLUMEN (µl)
AGUA	-----		7,5
DNTPs (A, T G C) (nucleótidos Promega®)	1 mM c/u	0,15mM c/u	4
Buffer B10X (Kit Tucan taq polimerasa®, corpogen S.A)	10X	1X	2,5
Cl Mg	25 mM	2,4mM	2,5
Iniciador Foward	10µM	0,77µM	2
Iniciador reverse	10µM	0,77µM	2
Taq polimerasa (Tucan Taq®)	5 Unidades/µl	0,09 Unidades/µl	0,5
ADN	20ng/µl	3,8ng/µl	5

Tabla 11. Perfil térmico para el PCR simple del gen que codifica para B-actina

<b>PASO</b>	<b>TEMPERATURA</b>	<b>TIEMPO</b>
1. Pre calentamiento	94°C	3 minutos
2. Desnaturalización	94°C	30 segundos
3. Asociación de primers	50°C	30 segundos
4. Elongación	72°C	30 segundos
5. Go to 2, (30 ciclos)		
6. Extensión final	72°C	3 minutos
8. Fin		

Las electroforesis para los controles internos se practicaron bajo las mismas condiciones descritas para los productos del PCR anidado de la región intergénica 16S-23S rRNA del *S. agalactiae*.

## **2.5 COMPARACION DE LA SENSIBILIDAD DE LA PCR vs. MICROBIOLOGIA E INMUNOPEROXIDASA INDIRECTA**

Con el objeto de comparar la sensibilidad de la PCR con otras técnicas de rutina para el diagnóstico de la estreptococosis utilizadas en el Laboratorio de Patobiología Veterinaria, a partir de los mismos alevinos cuyo cerebro y ojo fueron congelados, se tomaron muestras de los mismos órganos para microbiología e IPI, para el caso de microbiología las muestras fueron sembradas en agar BHI con sangre al 5% e incubadas a 28°C durante 48 horas y para IPI se usó el protocolo estandarizado por Hernández (2005) (Anexo 8).

## **2.6 ANALISIS ESTADISTICO**

Se empleó estadística descriptiva (porcentajes). Para comparar la especificidad entre las técnicas se utilizó el parámetro probatorio valor predictivo negativo (VPN), de acuerdo al método de dos por dos descrito por Saunders and Trapp, 1994.

### 3. RESULTADOS

#### 3.1 ESTANDARIZACION DE LA TÉCNICA DE PCR PARA LA DETECCIÓN DE *S. agalactiae* A PARTIR DE TEJIDOS DE TILAPIA ROJA

##### 3.1.1 Extracción de ADN de *S. agalactiae* a partir de tejidos congelados

La cantidad de DNA obtenido por el método de fenol saturado fue baja comparada con la cantidad resultante al usar el kit UltraClean Tissue and Cells ADN isolation, Bio Laboratorios Inc®. Las tablas 12 y 13 registran las concentraciones de ADN de *S. agalactiae* de algunos de los tejidos empleados para la estandarización de la extracción por las dos técnicas evaluadas.

Tabla 12. Concentraciones de ADN de *S. agalactiae* obtenido por extracción con fenol saturado a partir de tejidos inoculados experimentalmente y congelados.

Muestra	Concentración de ADN en ng/ $\mu$ l
Ojo inyectado <sup>1</sup>	1,3
Cerebro inyectado	0,9
Cerebro 16 horas postinoculación <sup>2</sup> .	0,85
Cerebro 16 horas postinoculación	1,6
Cerebro 16 horas postinoculación	0,96
Ojo 16 horas posinoculación	1,5
Cerebro 2 4 horas postinoculación	1,2
Cerebro 24 horas postinoculación	1,3
Ojo 24 horas postinoculación	1,2

<sup>1</sup> Tejidos inyectados con 100 $\mu$ l de una solución que contenía 10<sup>9</sup> UFC/ml de *S. agalactiae*.

<sup>2</sup> horas después de la inoculación intraperitoneal de alevinos con 100 $\mu$ l de una solución que contenía 10<sup>9</sup> UFC/ml de *S. agalactiae*

Tabla 13. Concentraciones de ADN de *S. agalactiae* obtenido mediante el kit UltraClean Tissue and Cells ADN isolation kit, Mo Bio Laboratorios Inc®, a partir de tejidos de peces inoculados intraperitonealmente y órganos inyectados con *S. agalactiae* y posteriormente congelados

Muestra	Concentración de ADN ng/μl
Cerebro inyectado <sup>1</sup>	10,9
Ojo inyectado	28,3
Ojo inyectado	23,9
Ojo 5 horas postinoculación <sup>2</sup>	11,8
Cerebro 5h postinoculación	14
Ojo 16 h postinoculación	3,34
Cerebro 16 horas postinoculación	12,36
Ojo 24 horas postinoculación	36
Cerebro 24 horas postinoculación	10,7
Cerebro 24 horas postinoculación	49,8
Cerebro 24 h postinoculación	7,46

<sup>1</sup> Tejidos inyectados con 100μl de una solución que contenía 10<sup>9</sup> UFC/ml de *S. agalactiae*.

<sup>2</sup> horas después de la inoculación intraperitoneal de alevinos con 100μl de una solución que contenía 10<sup>9</sup> UFC/ml de *S. agalactiae*.

### 3.1.2 Extracción de ADN de *S. agalactiae* a partir de tejidos embebidos en parafina

Para este tipo de muestras se utilizó el método del kit UltraClean Tissue and Cells ADN isolation kit, Mo Bio Laboratorios Inc®. Algunas de las concentraciones de los ADNs se observan en la tabla 14.

Tabla 14. Concentraciones de ADN de *S.agalactiae* obtenido a partir de tejidos embebidos en parafina mediante el kit UltraClean Tissue and Cells ADN isolation kit, Mo Bio Laboratorios Inc®.

Bloque/ Muestra	Concentración de ADN ng / $\mu$ l
7561-354 / Ojo inyectado con <i>S. agalactiae</i> , fijado en formol 24 h	5,62
7561-355 /Cerebro inyectado con <i>S. agalactiae</i> , fijado en formol 24 h	2,92
7561-357/ pez inoculado IP, 12 h postinoculación fijado formol 24h	8,11
7561-358/ pez inoculado IP, 36 h postinoculación fijado formol 24h	3,6
7561-359/ pez inoculado IP, 57 h postinoculación fijado formol 24h	4,05

### 3.1.3 Estandarización del PCR anidado

Las temperaturas óptimas de anillamiento fueron 58°C y 60°C para el PCR con los iniciadores externos y para el PCR con iniciadores internos, respectivamente. La figura 5 muestra los gradientes de temperatura evaluados para la PCR con iniciadores externos, mediante el cual se obtuvo un amplificado de 375 pb aproximadamente, mientras que en la PCR con iniciadores internos específicos para la amplificación intergénica 16-23S RNAr de *S. agalactie*, el amplificado fue de 192 pb. (Figura. 6).

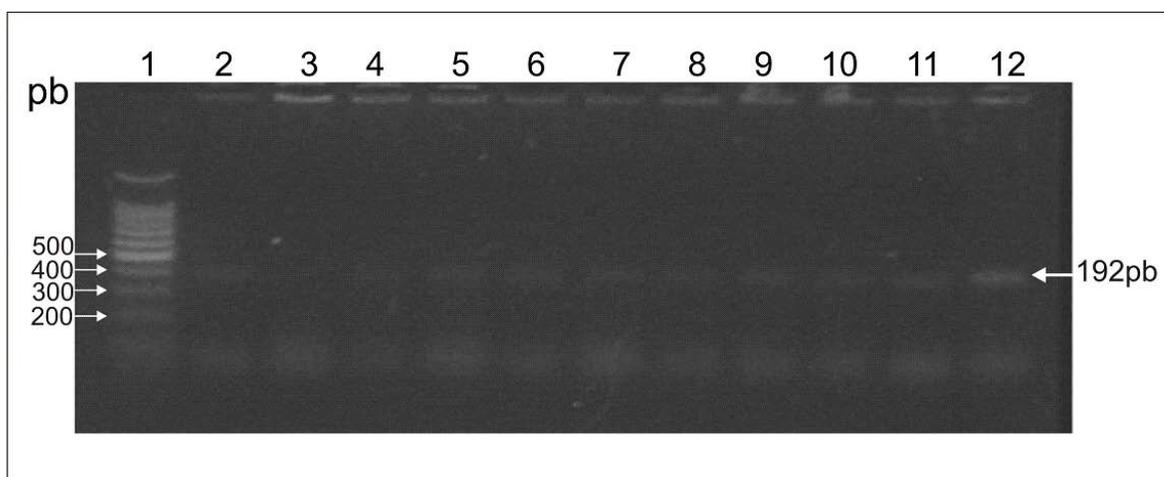


Fig 5. Electroforesis en gel de agarosa al 1.5% de amplificados con iniciadores externos inespecíficos, empleando gradientes de temperatura: Carril 1: Patrón de PM 100pb Promega®, Carriles 2 al 12: 53°C, 53.5°C, 54°C, 54.5°C, 55°C,55.5°C, 56°C,56.5°C,57°C,57.5°C.,58, respectivamente. Amplificados de 375pb a partir de ADN de cerebro congelado.

Se determinó 2,5 mM como la concentración de trabajo de  $MgCl_2$ , ya que tanto en el PCR con primers internos como con los externos mostró banda definida del tamaño esperado (Figura. 6).

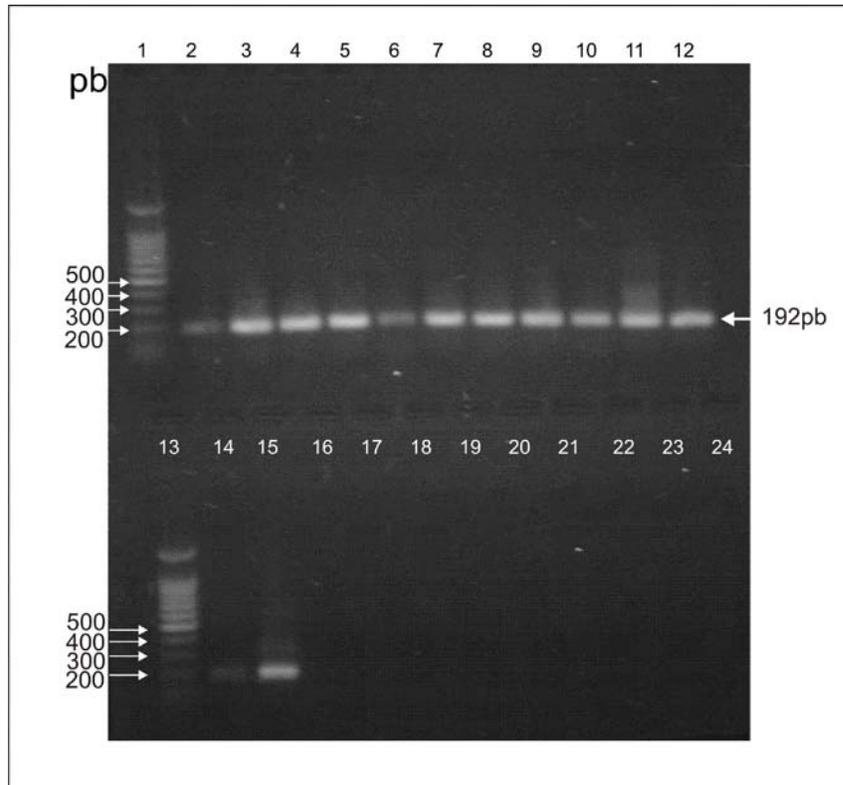


Fig.6 Electroforesis en gel de agarosa al 1,5%. Evaluación de la concentración óptima de  $MgCl_2$ . PCR con iniciadores internos específicos. Carriles 1 y 13: Patrón de PM 100pb Promega®, Carriles 2 al 7: Amplificados de 192 pb a partir de ADN extraído de cerebro congelado de tilapia inoculada experimentalmente,  $Mg_2Cl$ : 1.5, 2.0, 2.5, 3.0, 3.5 y 4.0 mM, respectivamente. Carril 8 al 12 y 14: Amplificados de 192 pb a partir de ADN de *S. agalactiae* ATCC,  $Mg_2Cl$  1.5, 2.0, 2.5, 3.0, 3.5, y 4.0 mM, respectivamente.

Fig 7. Electroforesis en gel de agarosa al 1,5% de amplificados de 192 pb con iniciadores internos específicos para *S. agalactiae*. T<sup>0</sup> de anillamiento 60°C, Mg<sub>2</sub>Cl 2,5mM. Carriles 1 al 4: Ojos congelados de alevinos inoculados experimentalmente, carriles 6 al 10: Cerebros congelados de alevinos inoculados experimentalmente. Carriles 5 y 11: Patrón de PM 100pb Promega®, Carriles 12 al 14 controles positivos.

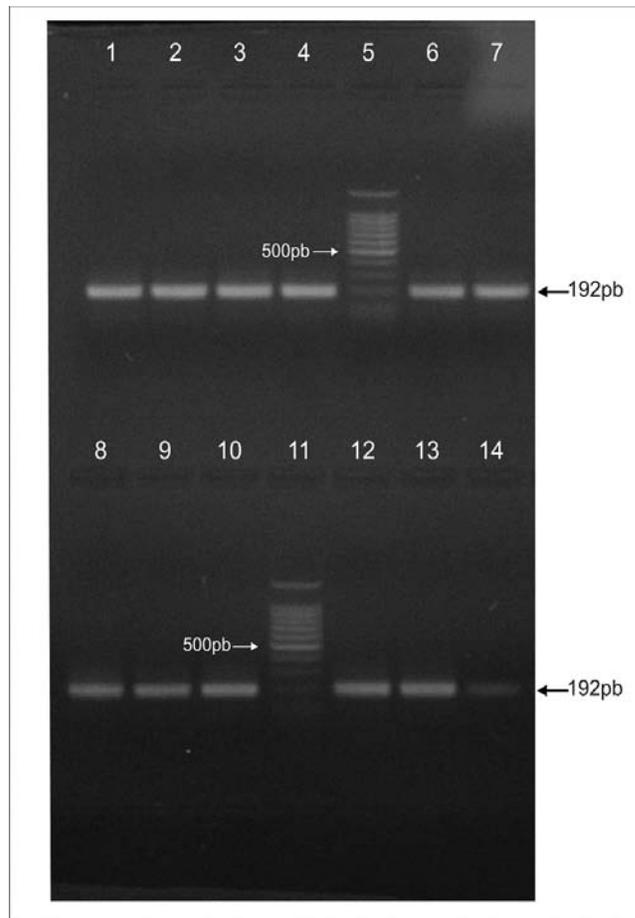
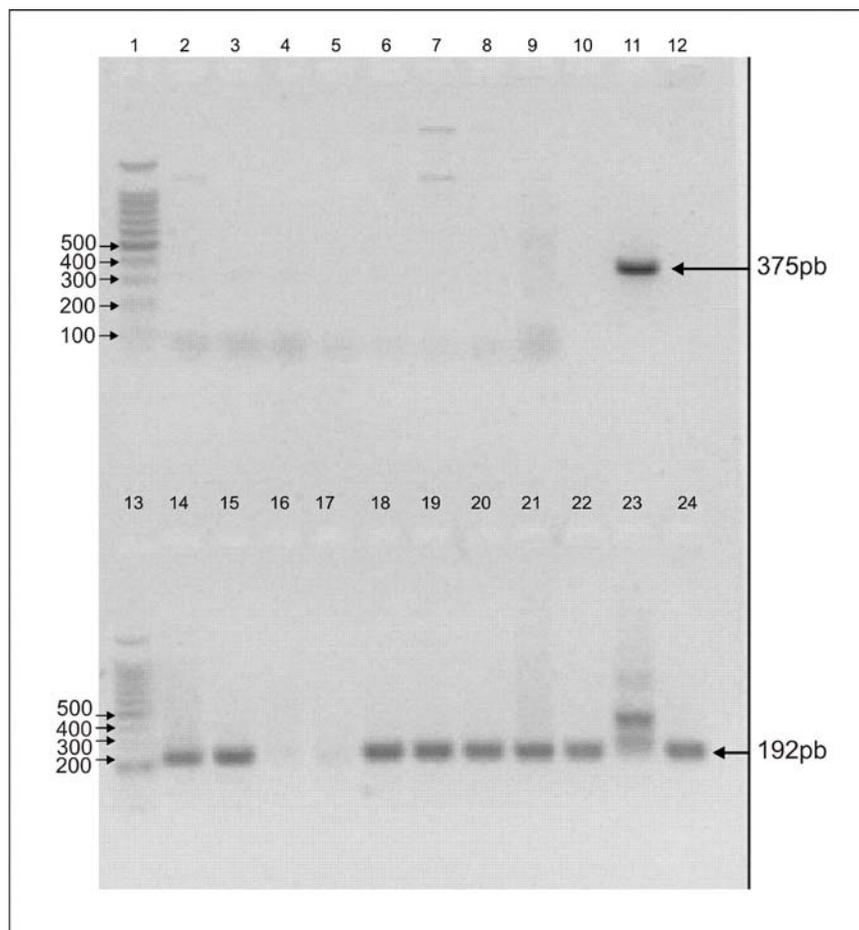


Fig 8. Electroforesis en gel de agarosa al 1,5% . Carriles 1 y 13: Patrón de PM 100pb Promega®. Carriles 2 al 10: amplificados de 375pb con iniciadores externos inespecíficos a partir de ADN de Ojo y Cerebro embebidos en parafina de alevinos inoculados experimentalmente. Carriles 14 y 15, 18 al 22 y 24: amplificados con iniciadores internos específicos para *S. agalacti*.. Carril 11: Control positivo PCR simple, Carril 23: Control positivo PCR anidada. Carriles 12,16 y 17 controles negativos.



Tanto los controles negativos como los positivos se comportaron como tales en las PCRs de la totalidad de los ADNs obtenidos a partir de tejidos congelados y embebidos en parafina, a partir de animales o de tejidos inoculados experimentalmente.

De acuerdo al análisis bioinformático de la secuenciación de dos de los amplificados resultantes del PCR específico con primers internos (un cerebro

congelado y otro embebido en parafina), el producto correspondió a *Streptococcus agalactiae*.

### 3.1.4 Evaluación de la Especificidad de la Técnica

La PCR estandarizada no mostró amplificación cruzada con ninguna de las bacterias Gram positivas evaluadas (*Streptococcus pneumoniae* ATCC 49619, *Enterococcus faecalis* ATCC 29272, *Streptococcus iniae* o *Lactococcus garviae*), a partir de ADN extraído de cultivo bacteriano ni a partir de ADN de esos microorganismos extraído de tejidos congelados o embebidos en parafina. Tampoco se detectó amplificación cruzada con *Aeromonas hydrophila* (Figura.9).

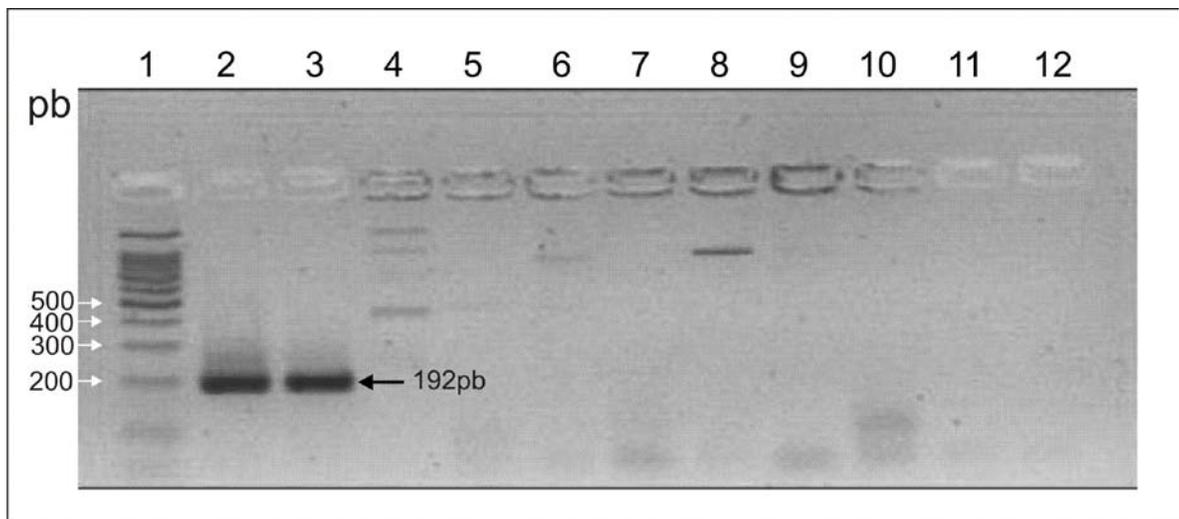


Fig 9. Electroforesis en agarosa al 1,5%. Prueba de especificidad (ADN obtenido de cultivo bacteriano) Carril 1: Patrón PM 100pb Promega® Carril 2: Amplificado de 192 pb a partir de ADN *S. agalactiae* ST991, carril 3: ADN *S. agalactiae* ATCC, Carril 4: ADN *S. iniae*, Carril 5: ADN *L. garviae*, Carril 6: ADN *E. faecalis*, Carril 7: ADN *S. Pneumoniae*, Carril 8: ADN *A. hydrophila*. Carriles 9-12: Controles negativos.

### 3.1.5 Evaluación de la Sensibilidad de la Técnica

El límite de detección de la técnica para la amplificación de la región intergénica 16-23S del ARNr a partir de ADN de *S. agalactiae* sin la presencia de ADN tisular fue de 15,8 fg. La misma técnica mostró un límite de detección de 6,95 fg para el ADN de *S. agalactiae* ATCC mezclado con ADN proveniente de tejido

congelado (cerebro); en el caso de ADN genómico de *S. agalactiae* mezclado con ADN en parafina (cerebro) el límite de detección fue de 6,95 pg (Figuras. 10 y 11).

Fig. 10 A: Electroforesis en agarosa al 1,5%. **Prueba de sensibilidad para ADN de *S. agalactiae* ATCC puro.** Amplificados con primers internos específicos. Carril 1: Patrón PM 100 pb Promega®. Carril 2: DNA de *S. agalactiae* 31,6ng/μl (158ng en 5μl para la PCR), Carril 3: 15,8ng, Carril 4: 1,58ng, Carril 5: 0,158ng (158 pg), Carril 6: 15,8 pg, Carril 7: 1,58 pg, Carril 8: 0,158 pg (158 fg), Carril 9: 15,8 fg, Carril 10: 1,58 fg. Carriles 11 y 12: Controles positivos.

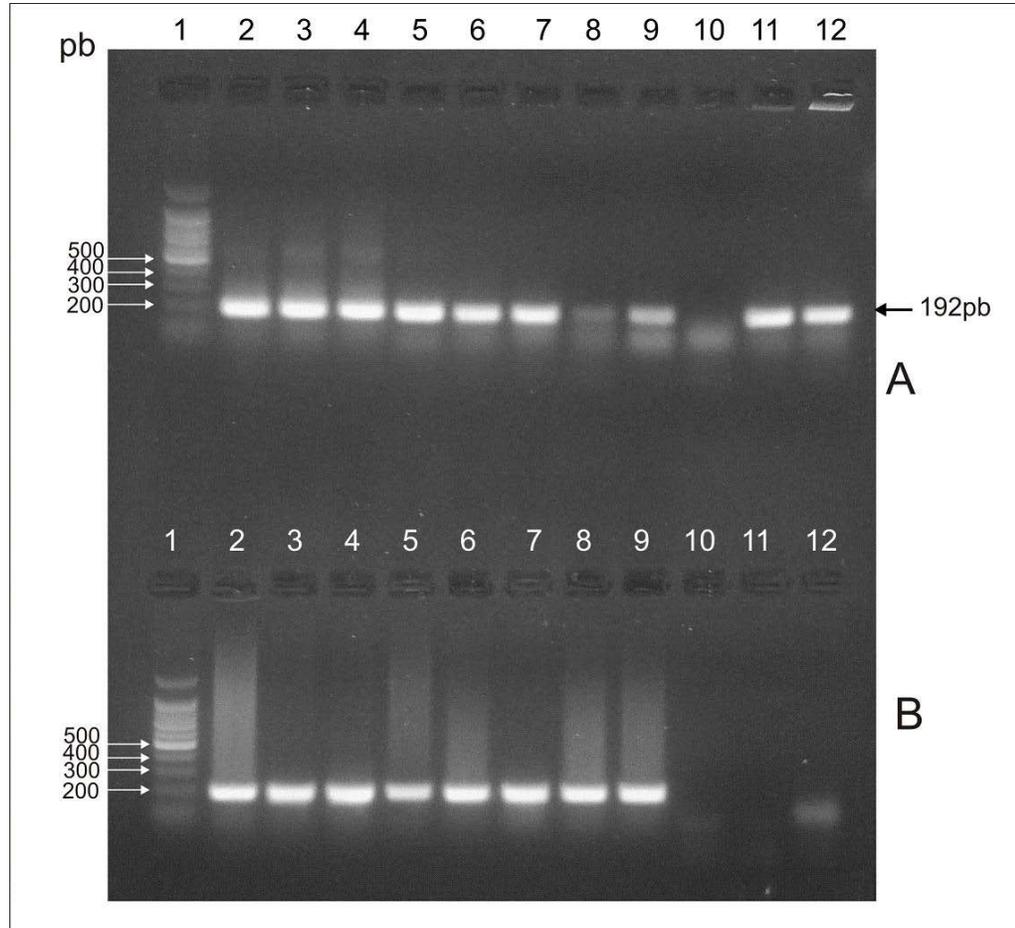


Fig 10 B. Electroforesis en agarosa al 1,5%. **Prueba de sensibilidad ADN de *S. agalactiae* ATCC mezclado con ADN de cerebro congelado negativo a *S. agalactiae*.** Amplificados con primers internos específicos. Carril 1: Patrón PM 100 pb Promega®. Carriles 2 al 9: ADN tisular (congelado) constante: 1140ng. ADN de *S. agalactiae*: Carril 2: 69,5ng, Carril 3: 6,95ng, Carril 4: 695 pg, Carril 5: 69,5 pg, Carril 6: 6,95 pg, Carril 7: 695 fg, Carril 8: 69,5 fg, Carril 9: 6,95 fg, Carril 10: 0,695 fg, Carril 11: 0,0695 fg, Carril 12: 0,00695 fg.

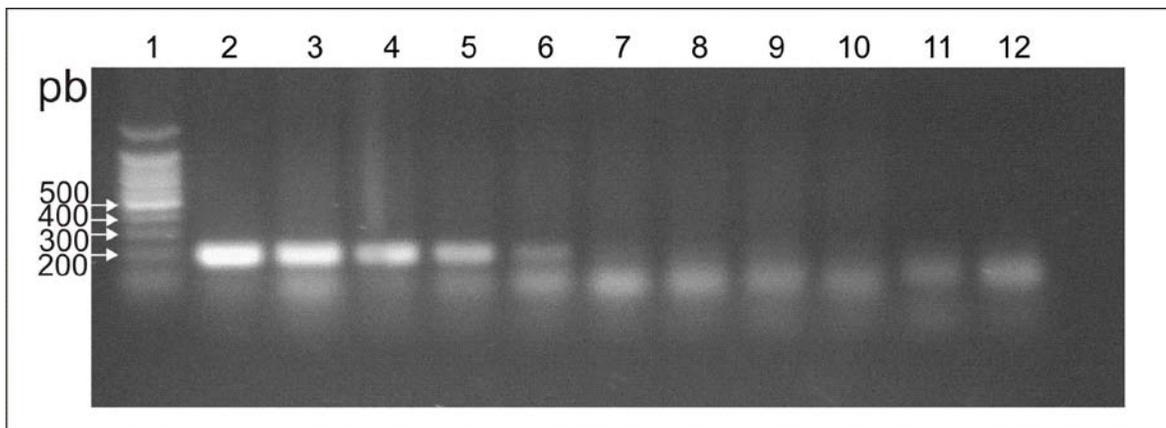


Fig 11. Electroforesis en agarosa al 1,5%. **Prueba de sensibilidad ADN de *S.agalactiae* ATCC mezclado con ADN extraído de cerebro embebido en parafina negativo a *S. agalactiae*.** Amplificados de 190 pb con primers internos específicos. Carril 1: Patrón PM 100 pb Promega®. Carril 2 al 12: ADN tisular (parafina) constante: 934ng mezclado con ADN genómico de *S. agalactiae*: Carril 2: 69,5ng, Carril 3: 6,95ng, Carril 4: 695 pg, Carril 5: 69,5 pg, Carril 6: 6,95 pg, Carril 7: 695 fg, Carril 8: 69,5 fg, Carril 9: 6,95 fg, Carril 10: 0,695 fg, Carril 11: 0,0695 fg, Carril 12: 0,00695 fg.

## 3.2 DETECCIÓN DEL ADN DE *S. agalactiae* EN TILAPIAS MENORES DE 20g PROVENIENTES DE MUESTREOS EN CAMPO

### 3.2.1 Larvas y Alevinos congelados

Las tablas muestran algunas de las concentraciones de los ADNs cuantificados por fluorometría a partir de las 264 muestras congeladas: 96 larvas (cabeza) y 84 alevinos (2 órganos por animal) procesadas por el método de extracción estandarizado en este estudio.

Todos los 264 ADNs al ser amplificados con los primers específicos para la subunidad 16S-23S rRNA del *S. agalactiae*, resultaron negativos (Figuras. 12,13 y 14)

Tabla 15. Concentraciones de ADN por fluorometria a partir de tejidos congelados provenientes de muestreo en campo.

Muestras de Ojos Congelados	Cocentración ADN ng/μl	Muestras de Cerebros congelados	Cocentración ADN ng/μl	Muestras de Larvas congeladas	Cocentración ADN ng/μl
35O	4,4	59C	10,1	6	1,42
68O	4,48	39C	10,3	1	2,31
41O	5,3	57C	13,6	19	2,35
11O	5,31	17C	13,8	5	3,40
37O	5,86	72C	14	17	3,40
75O	6,29	1C	14,7	9	3,70
10O	7,38	7C	16,2	41	4,85
28O	9,35	19C	17	26	5,08
76O	9,58		13,71	4	5,80
47O	10,74	42C	20,7	32	7,56
64O	6,87	19C	20,8	8	7,80
18O	10,9	54C	21,5	48	7,84
46O	11,4	71C	21,5	7	8,50
59O	11,6	8C	25,8	42	8,70
6O	12,2	84C	25,8	47	8,71
80O	13,3	53C	26,7	45	8,90
39O	14,3	48C	27,5	30	5,65
27O	15,1	67C	28,3	44	9,50
84O	15,5	30C	28,4	32	10,10
14O	16,6	12C	30,3	31	10,20
34O	17,8	45C	31,5	43	10,67
72O	18,2	6C	34,8	45	11,70
77O	18,8	18C	34,9	29	11,77
50O	19,5	37C	36,4	20	11,78
78O	20,18	46C	37,2	16	12,25
66O	23,6	33C	45,1	21	12,31
15O	23,7	79C	46,3	26	12,32
48O	29,8	52C	46,7	56	13,22
5O	31,7	83C	49,3	50	14,85
56O	42,2	64C	49,9	12	15,50

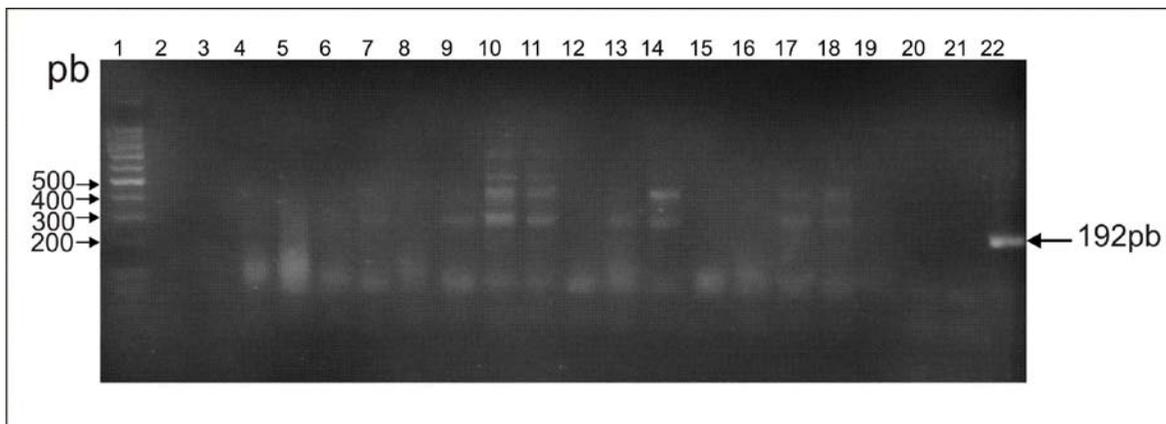


Fig 12. Electroforesis en gel de agarosa al 1.5%. Carril 1: Patrón PM 100 pb Promega®, Carriles 2-21: Amplificados a partir de ADN de ojos congelados de alevinos, provenientes de muestreos en campo, para la región intergénica 16s-23S del RNA r *S. agalactiae* de 192 pb. Carril 22: Control positivo: amplificado de 192 pb correspondiente a la región intergénica 16s-23S del RNA r *S. agalactiae* a partir de ADN de *S. agalactiae* ATCC.

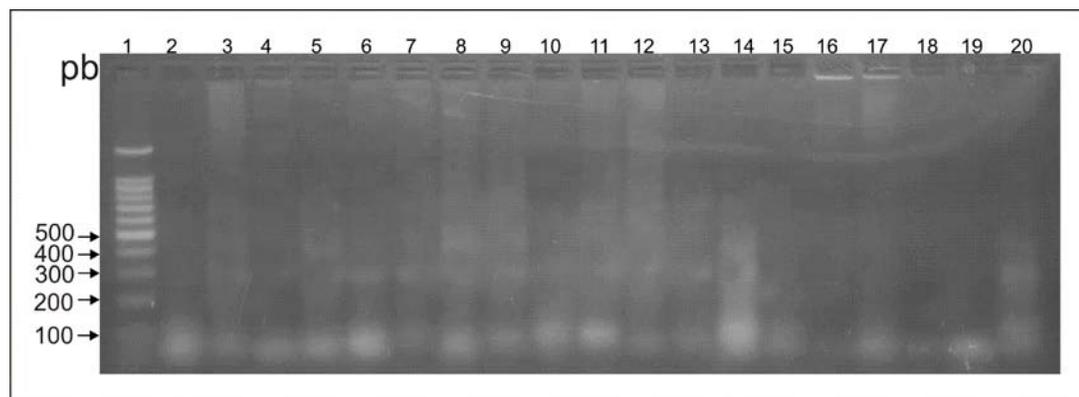


Fig 13. Electroforesis en gel de agarosa al 1.5%. Carril 1: Patrón PM 100 pb Promega®, Carriles 2-20: Amplificados a partir de ADN de larvas congeladas provenientes de muestreos en campo, para la región intergénica 16s-23S del RNA r *S. agalactiae* de 192 pb.

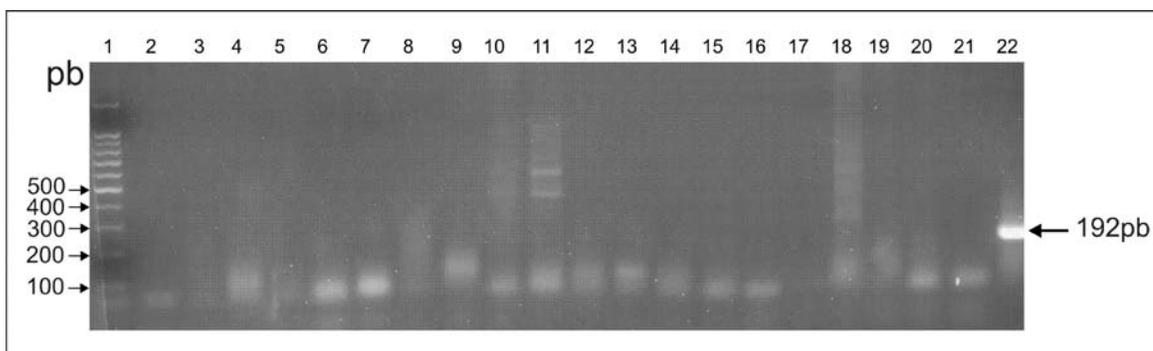


Fig 14. Electroforesis en gel de agarosa al 1.5%. Carril 1: Patrón PM 100 pb Promega®, Carriles 2-20: Amplificados a partir de ADN de cerebros congelados de alevinos provenientes de muestreos en campo, para la región intergénica 16s-23S del RNA r *S. agalactiae* de 192 pb. Carril 22: Control positivo: amplificación para la región intergénica 16s-23S del RNA r *S. agalactiae* a partir de ADN de *S. agalactiae* ATCC.

Los controles positivos y negativos para todas las PCRs practicadas, siempre se comportaron de acuerdo a lo esperado.

### 3.2.2 Larvas y Alevinos embebidos en parafina

La tabla 16 registra algunas de las concentraciones por fluorometria de los ADNs obtenidos a partir de bloques embebidos en parafina.

De todos los 52 bloques embebidos en parafina que representaban 180 animales (300 tejidos), sólo un bloque resulto positivo, este bloque contenía 5 ojos de alevinos pertenecientes a una de las granjas del Departamento del Tolima (Figura. 15). Los demás bloques resultaron negativos por la técnica estandarizada.

Tabla 16. Concentraciones de ADN por fluorometria, a partir de tejidos embebidos en parafina.

<b>ID. Bloque parafina</b>	<b>Cocentración ADN ng/<math>\mu</math>l</b>
7461 E1-12: Ojos	2,2
7461 H1-13: Ojos	3,1
7461 H1-13: Ojos	4,3
7461 I1-32: Ojos	5,8
7461 F1-1: Ojos	6,9
7461 F1:16:Ojos	10,0
7461 H1-12: Ojos	10,1
7461 F1-15: Cerebros	3,4
7461 E1-7: cerebros	3,6
7461 G1-4: Cerebros	4,8
7461 J1-8: Cerebros	8,7
7461 G1-4: Cerebros	9,0
7461 G1-4: Cerebros	9,0
7461 G1-3: Cerebros	10,4
7461 3-16: Larvas	2,8
GNI L1:Larvas	3,8
GPI L17-18:Larvas	5,7
GPI L7-10: Larvas	6,1
GNI L 1-6: Larvas	6,4
GPI L1-6:Larvas	7,8
GNI L13-18: Larvas	10,0

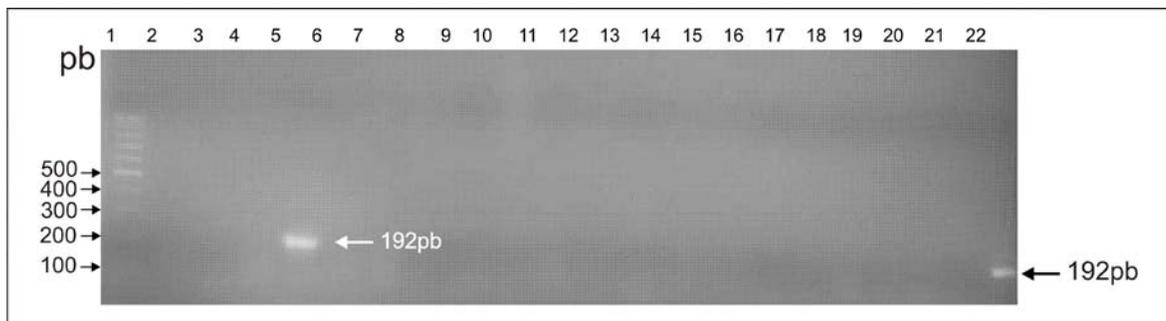


Fig 15. Electroforesis en gel de agarosa al 1.5%. Carril 1: Patrón PM 100 pb Promega®, Carriles 2-20: Amplificados a partir de ADN de tejidos embebidos en parafina provenientes de muestreos en campo. Carril 5: Amplificado de 192 pb a partir de ojos embebidos en parafina. Carril 22: Control positivo: amplificación para la región intergénica 16s-23S del RNA r *S. agalactiae* a partir de ADN de *S. agalactiae* ATCC.

Tanto los controles negativos como los positivos de la totalidad de PCRs se comportaron como tal.

### 3.3 DETECCIÓN DE LA BACTERIA EN SEMEN, EN OVAS INFECUNDAS Y OVAS FECUNDADAS PROVENIENTES DE MUESTREOS EN CAMPO

La tabla 17 registra algunas de las concentraciones por fluorometría de los ADNs obtenidos a partir de bloques embebidos en parafina.

La totalidad de las muestras (26 de semen de reproductores, 32 de ovas de hembras y 30 muestras de ovas fecundadas), resultaron negativas para la amplificación de la región intergénica 16S-23S rRNA del *S. agalactiae* (Figura 16). Los controles para las PCRs se comportaron conforme a lo esperado.

Tabla 17. Concentraciones de ADN por fluorometría, a partir de semen y ovas.

ID. Muestras Semen y Ovas	Cocentración ADN ng/ $\mu$ l
Ova 25	3,0
Ova 14	3,7
Ova 11	7,1
Ova 8	11,8
Ova 15	18,8
Ova 12	19,4
Sem 22	4,0
Sem 9	4,3
Sem 8	5,9
Sem 13	7,8
Sem 10	12,8
Sem 18	18,6

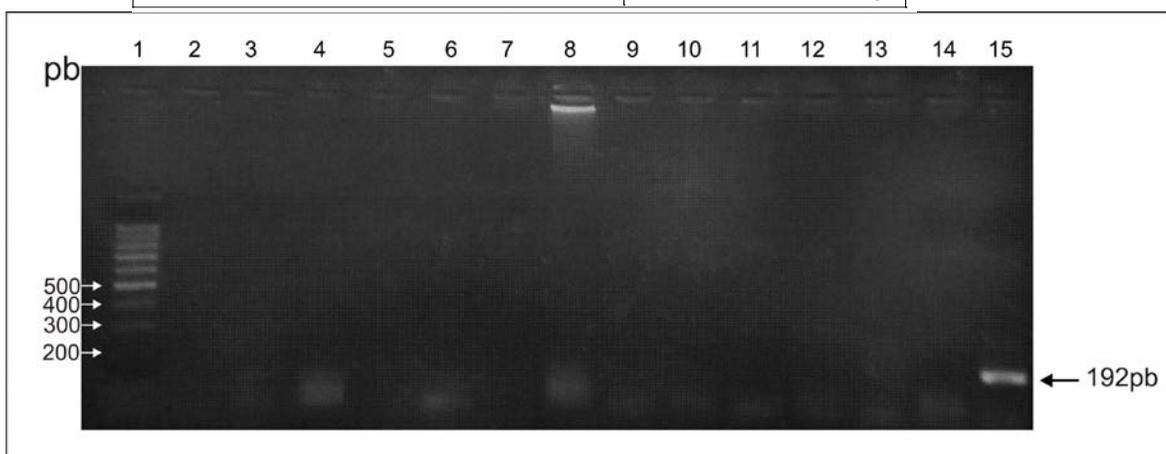


Fig 16. Electroforesis en gel de agarosa al 1.5%. Carril 1: Patrón PM 100 pb Promega®, Carriles 2 al 4: Amplificados a partir de ADN de ovas infecundadas provenientes de muestreos en campo. Carriles 5 al 7: Amplificados a partir de ADN de ovas fecundadas, carriles: 8 al 10: amplificados a partir de ADN de semen. Carriles 11 al 14: Controles negativos, Carril 15: Control positivo: amplificación para la región intergénica 16s-23S del RNAr a partir de ADN de *S. agalactiae* ATCC.

### 3.4 CONFIRMACION DE LA NEGATIVIDAD DE LAS MUESTRAS

Todas las 100 muestras negativas para la amplificación de la subunidad 16S-23S del DNA de *S. agalactiae*, mostraron amplificación del gen que codifica para la B-actina (135pb) de *Oreochromis niloticus* (Figura. 17).

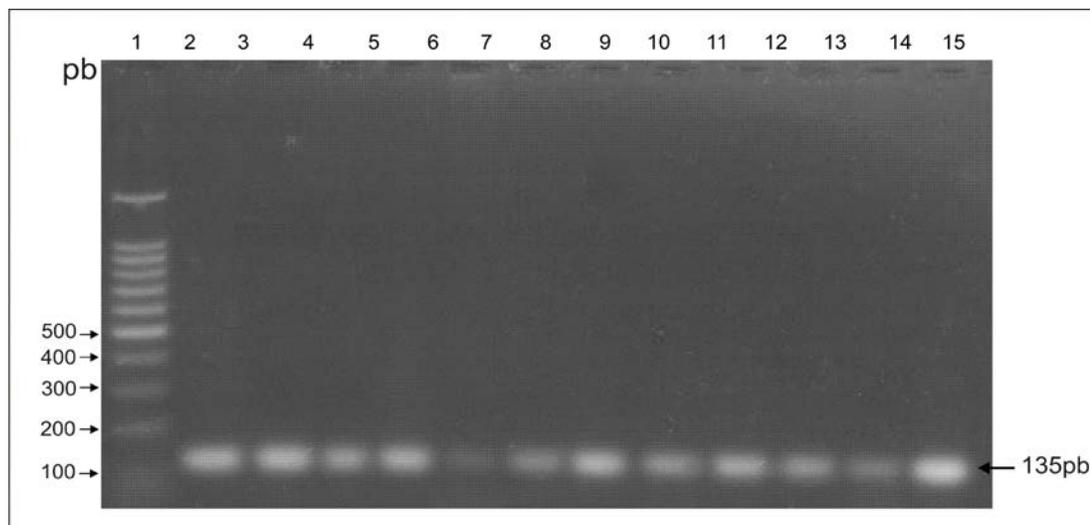


Fig 17. Electroforesis en gel de agarosa al 1.5%. Carril 1: Patrón PM 100 pb Promega®, Carriles 2 al 13: Amplificados con iniciadores específicos para el gen de 135pb que codifica para B-actina (*Oreochromis sp*). Carriles 2 al 4: ADN de cerebro congelado, Carriles 5 al 7: ojos congelados, carriles 8 y 9: larvas congeladas, carriles 10 y 11:ovas, carriles 12 y 13: semen.

### 3.5 COMPARACION DE LA SENSIBILIDAD Y ESPECIFICIDAD DE LA PCR vs. MICROBIOLOGIA E IPI

De las muestras procesadas por PCR para tejidos congelados, no se observó ningún crecimiento microbiano compatible con *Streptococcus spp*, a partir de las 168 muestras (ojo y cerebro de 84 alevinos) que fueron cultivadas en agar BHI. De igual manera los mismos animales resultaron negativos por inmunoperoxidasa indirecta, dicha técnica no mostro marcación alguna en ninguno de los tejidos muestreados.

En el caso de los tejidos embebidos en parafina, estos mismos tejidos previamente habían sido analizados por microbiología, IPI e histopatología, técnicas por las cuales fueron considerados como negativos (Penagos et al., 2005).

No fue posible comparar la sensibilidad de la PCR con microbiología e IPI puesto que no resultaron muestras detectadas como positivas simultáneamente por dos o más de las técnicas mencionadas.

Para el caso de los 84 alevinos procesados por congelación y evaluados simultáneamente por PCR, microbiología y inmunoperoxidasa indirecta, al comparar la especificidad mediante el valor predictivo negativo, todas las técnicas resultaron 100% específicas. En el caso de los 52 bloques embebidos en parafina procesados previamente por histopatología, inmunoperoxidasa indirecta y microbiología, las dos últimas técnicas, y el PCR resultaron 100% específicas, la histopatología arrojó una especificidad del 98%.

#### 4. DISCUSION

Esta investigación corrobora los resultados de trabajos previos de nuestro grupo de investigación, respecto al estado de no infección con *S. agalactiae* en tilapias menores de 20 g. por microbiología, histopatología e inmunohistoquímica (Hernández et al.,2009;Penagos, comunicación personal). Adicionalmente, amplía nuestras anteriores observaciones sobre la negatividad de infección con esta bacteria a otras etapas del desarrollo de esta especie íctica, a saber, los estadios larvarios, los gametos femeninos y masculinos y las ovas fecundadas.

El 99,75% de las muestras (403) resultaron negativas por la prueba de PCR anidado, tan solo el 0.25% (1) fue positiva, la cual correspondió a 5 ojos de alevinos embebidos en parafina. Aunque no podemos definir el significado de la positividad de esta muestra, ni cuántos de los peces incluidos en tal bloque estaban realmente infectados o sí por el contrario, la muestra se contaminó durante su procesamiento, teniendo en cuenta que todas las muestras provenían de tres granjas positivas para *S.agalactiae*, se puede afirmar que la población de peces, ovas fecundas y gametos examinada no está infectada por este patógeno. En adición, los resultados de esta investigación respaldan varias de las hipótesis expresadas en la citada publicación; a saber, que la vía de transmisión vertical del microorganismo queda prácticamente descartada y que en consecuencia el establecimiento de granjas libres como una de las medidas de control del *S. agalactiae* es una alternativa posible (Hernández et al., 2009).

En segundo lugar, en el presente estudio se estandarizó la prueba de la PCR anidada para la amplificación de la región intergénica 16S-23S del ADNr de *S. agalactiae*; esta técnica permitió la identificación de la bacteria en animales y tejidos inoculados experimentalmente y almacenados a -20°C o fijados en formol, embebidos en parafina y procesados previamente por la técnica de rutina de

hematoxilina eosina, es decir, los controles positivos. Esto se soporta no solo por la amplificación de esta región en la totalidad de tejidos inoculados experimentalmente, sino por los resultados de la secuenciación de dos productos de la PCR estandarizada. Además de resaltar la confiabilidad de la técnica, subraya la reproductibilidad de la misma, lo cual la hace una prueba de elección para diagnóstico de rutina, para investigación y estudios epidemiológicos. Aunque el *S. agalactiae* se ha detectado mediante PCR multiplex junto con *S.iniae*, *L. garviae*, *S. parauberis*, a partir de cultivo bacteriano y tejidos de peces inoculados experimentalmente (Mata *et al.*, 2004), y a partir de biofilms en sistemas de recirculación de agua (King *et al.*, 2001), nuestro estudio representa el primer reporte para la detección por PCR anidada de *S. agalactiae* en tejidos de peces provenientes de granja y específicamente en animales de 20 g, semen y ovas.

La PCR estandarizada resultó altamente específica puesto que no amplificó la región intergénica 16S-23 S ARNr de otros patógenos Gram + de peces como: *S. inia*, *L. garviae*, *E. faecalis*, o Gram -: *A. hydrophila*; este resultado era esperable si se tiene en cuenta que se emplearon iniciadores específicos para dicha región intergénica, a una temperatura de anillamiento de 60°C, que favorece la especificidad en esta fase de la PCR. Nuestros resultados concuerdan con otros reportes (Forsman *et al.*, 1997; Berridge *et al.*, 1998; Baliarda *et al.*, 2002) que documentan mayor especificidad en el diagnóstico molecular cuando se emplea esta región genética, por ser un espacio menos conservado evolutivamente, que varía más en secuencia y tamaño entre especies de bacterias estrechamente relacionadas, en comparación con los genes que codifican para las subunidades 16S ARNr y 23S ARNr (Berridge *et al.*, 1998, Forsman *et al.*, 1997, Baliarda *et al.*, 2002). Berridge *et al.* (2001), diseñaron y evaluaron a partir de ADN obtenido de cultivos bacterianos los mismos set de iniciadores empleados en esta investigación, y comprobaron la no existencia de reacción cruzada con otros estreptococos como *S.iniae*, *S. porcinus*, *S. uberis*, *S. dysgalatiae*, y con gram negativas como *A. hydrophila*, *A. salmonicida* y *Edwardsiella tarda*.

El límite de detección de la PCR anidada estuvo en el orden de los fentogramos ( $6,95 \times 10^{-15}$  g) y los picogramos ( $6,95 \times 10^{-12}$  g), ella fue 10 veces mayor (6,95 fg) para tejidos congelados en comparación con los tejidos embebidos en parafina (6,95pg). Sensibilidades del mismo orden (10 fg) se reportan por PCR anidado para la detección de bacterias Gram negativas (*Vibrio vulnificus*) en peces a partir de tejidos en fresco o congelados (Covadonga et al., 1995).

El límite de detección menor de tejidos embebidos en parafina en comparación con los congelados, es entendible por los procesos de fijación en formaldehido que han sufrido las muestras, lo que puede interferir en la detección de la secuencia de ADN objetivo. Srinivasan et al. (2002) sostienen que el formaldehido induce la estrecha unión de las proteínas nucleares lo que condensa la cromatina, y a su vez hace más difícil la accesibilidad del ADN y disminuye la solubilidad del mismo. En nuestro estudio, todas las muestras (30) que fueron experimentalmente inoculadas con el *S.agalactiae* y posteriormente embebidas en parafina resultaron positivas por la técnica, y del total de 52 muestras problema embebidas en parafina una de ellas resulto positiva, este hecho demuestra la viabilidad de la técnica para la amplificación de ADN por PCR, a pesar de los posibles efectos de entrecruzamiento del ADN con proteínas nucleares o de las moléculas del mismo entre sí (Werner et al., 2000), efecto que muy seguramente se disminuye teniendo en cuenta que el formaldehido empleado en la fijación de estos tejidos esta a pH neutro y a una baja concentración.

La PCR para la detección y caracterización molecular de patógenos Gram + (*S. pneumoniae*, *S. agalactiae*, *S. aureus*, *E. faecalis*, *S.mutans*, *S. epidermidis*, *S. pyogenes*, *S. uberis*) a partir de cultivos bacterianos, sangre y tejidos ha sido ampliamente reportada en humanos (Rudolph et al., 1993, Ke et al., 2000, Gauduchon, et al., 2003 ,Murdoch, 2003, Mayoral et al., 2005, Moreno et al., 2005 , Kocabas et al., 2006,Harris et al., 2008, Marquet et al., 2008, Jin et al., 2009, Olson et al., 2010)

En animales la PCR a partir de cultivos bacterianos y leche se ha empleado para la amplificación y detección de *S. agalactiae*, *S. dysgalactiae*, *S. uberis* y *S. parauberis*, todos relacionados con mastitis bovina (Riffon et al., 2001, Bendek et al., 2002, Duarte et al., 2004). También en peces a partir de cultivos bacterianos se ha utilizado en la detección de Gram positivas (*S. iniae*, *L. garviae*, *S. dysgalactiae*, *S. agalactiae*, *S. phocae*) (Zlotkin et al., 1998, Dodson et al., 1999, Berridge et al., 2001, Nomoto et al., 2004, Mata et al., 2004, Mian et al., 2008, Romalde et al., 2008, Yang et al., 2009, Bulushi et al., 2010). De la misma manera en estas especies se ha usado para la detección de bacterias Gram negativas como *Flexibacter maritimus*, *Vibrio vulnificus*, *Edwardsiella tarda*, *Aeromonas hydrophila*, *Aeromonas salmonicida*, *Renibacterium salmoninarum*, *Yersenia ruckeri* a partir de tejidos, cultivos bacterianos, o muestras de agua (Cepeda et al., 2003, Covadonga et al., 1995, Chen et al., 1998, Altinok et al., 2008),

La confiabilidad de la técnica acá estandarizada se sustenta en varios hechos: el tamaño de la muestra (404) proveniente de tres granjas diagnosticadas como positivas a el *S. agalactiae* en otras fases de desarrollo biológico de los peces, incluidos los reproductores por medio técnicas como la microbiología, histopatología e inmunoperoxidasa indirecta, lo cual lo hace altamente significativo, la alta especificidad y sensibilidad de la misma, el comportamiento consistente de los controles positivos, que siempre fueron positivos; de igual manera, la negatividad de prácticamente la totalidad de las muestras es respaldado por la amplificación del control interno para la amplificación del gen que codifica para B- actina de *Oreochromis spp*, lo cual garantiza la no existencia de posibles falsos negativos, asociados a la presencia de inhibidores en la PCR.

Con base en la literatura internacional, resulta controversial el hecho de sí los animales menores de ciertas tallas presentan sintomatología y mortalidad asociadas a los distintos tipos de estreptococosis de los peces, los reportes varían de acuerdo a la especie de estreptococo implicada y la especie de pez afectada;

así por ejemplo, Prieta et al (1993) reportaron ausencia de signos clínicos y mortalidad asociada a Lactococosis en condiciones de cultivo a pesar de que la enfermedad podía ser reproducida en alevinos de tilapia. Sin embargo, en estudios de patogénesis Muzquiz et al (1999) demostraron mortalidades altas por *L. garviae* en menores de 50g en comparación con tilapias mayores de 100g, en este caso, no documentaron el rango mínimo de peso de los peces experimentales, y en consecuencia se podría argumentar que de 50 a 20 g hay todavía un rango importante no de solo de edad sino de condiciones de manejo y hábitat de los animales. Otros autores reportan que en especies como Grey mullet y rainbow trout pueden presentarse brotes en los diferentes estados de desarrollo (Chen et al., 2002, Chang et al., 2002, Pereira et al., 2004). Recientemente *S. focae*, patógeno emergente en trucha arcoiris, es reportado en brotes de enfermedad tanto en juveniles como en adultos de salmón del atlántico (Romae et al., 2007).

Aunque no se conocen trabajos en los que específicamente se oriente el muestreo a confirmar o disconfirmar la presencia del *S.agalactiae* en tilapias menores de 20 g como el que se adelantó en esta investigación, si se reporta una gran variación en la talla de tilapias nilóticas afectadas en condiciones naturales por *S. agalactiae*; sin embargo, todos los peces afectados en tales brotes de enfermedad natural están por encima de 54 g hasta adultos del orden de 1000 g (Mian et al .,2008), lo que de cierta manera se corresponde con nuestros resultados. Quedaría por definir el origen y límite de esta resistencia temporal de las tilapias más jóvenes frente a este microorganismo, puesto que bajo distintas condiciones experimentales ha sido posible la reproducción de signos y lesiones típicos de la enfermedad, y en algunos casos hasta la muerte con el *S.agalactiae* en peces menores de 20 g (Comas et al. 2005; Russo et al., 2006). En el primer caso se logro la morbi-mortalidad puesto que tanto la dosis bacteriana, la vía de exposición y las condiciones ambientales experimentales fueron severamente alteradas a fin de lograr la infección y lesiones, más no la expresión de signos clínicos; en el

segundo, con la aplicación directa del patógeno por vía intraperitoneal, con lo cual se obvian las distintas barreras de defensa naturales que debe atravesar la bacteria antes de hacerse sistémica y desarrollar la enfermedad.

De los anteriores hallazgos quedaría claro que la resistencia de los alevinos menores de 20 g a la bacteria no es absoluta y puede ser resquebrajada por manipulación de su ambiente (Comas et al., 2005); esto a su vez reforzaría nuestra hipótesis de que adicional al relativo estado refractario de las tilapias de menor edad, algunos factores de manejo propios de los sistemas de producción en edades posteriores de los peces jugarían un papel decisivo para la infección y el desencadenamiento de la enfermedad. Al respecto, Hernández et al (2009) reportaron que en condiciones de cultivo, tilapias menores de 20 g permanecían libres de la infección y de la manifestación clínica de la estreptococosis hasta el momento en que cambiaban sus características de manejo, pasando de un sistema semiintensivo de producción en estanques de tierra (1000 g/m<sup>3</sup> de capacidad de carga, antes de los 20 g), a un sistema intensivo en jaulas flotantes (40.000 g/m<sup>3</sup> de capacidad de carga, después de los 20 g). Por lo tanto, vale la pena resaltar lo señalado por Shulze et al. (2006) en el sentido de que en los ambientes acuáticos naturales y de producción los organismos viven típicamente en equilibrio con las bacterias potencialmente patógenas y la estabilidad perdura hasta el momento que los ecosistemas son alterados. En el establecimiento de dicho balance no solamente participan los microorganismos potencialmente patógenos y su hospedero, sino que intervienen activamente microorganismos inocuos y benéficos cuya compleja interacción determinan un ambiente acuático particularmente autoregulado en todos sus aspectos físicos, químicos y biológicos.

En los sistemas de producción acuícola dicha estabilidad estaría dada principalmente en el hecho de que las descargas de N y P derivadas del metabolismo de los peces y del suministro de alimento balanceado no sobrepasen la capacidad de los ciclos biológicos y químicos de dichos elementos; de lo

contrario, la más mínima variación en el balance de la calidad del agua, producto de un exceso en las concentraciones de N y P, favorecería la proliferación de los microorganismos potencialmente patógenos y la subsecuente afectación de la salud de los organismos cultivados (Verschure et al.,2000).

Por lo tanto, si se tiene en cuenta que las larvas y alevinos que fueron muestreados en este estudio son producidos en sistemas semiintensivos con estanques de tierra donde la capacidad de carga y las descargas de N y P no sobre pasan los límites de los ciclos de todos los parámetros físicos, químicos y biológicos del agua y por ende la biodiversidad y la calidad de los nichos microbiológicos no pierden la autorregulación, las bacterias potencialmente patógenas como los estreptococos tendrían poca posibilidad de desencadenar una infección.

Por el contrario, las tilapias mayores de 20g son sometidas a producción superintensiva donde la capacidad de carga asociada a la cantidad excesiva de N y P descargada excede entre 40 a 100 veces las condiciones de cultivo de peces menores de 20 g; en consecuencia, las descargas de N y P producto del metabolismo de la mayor biomasa de los animales y del alimento suministrado son tan altas que sobrepasan los límites de los ciclos biológicos del cuerpo de agua, con el desarreglo en la autorregulación de los microorganismos antes anotado. Además, la microflora del tracto gastrointestinal de los peces está en estrecha relación con aquella de los microambientes del agua donde viven; de tal manera que cualquier alteración del balance de las variables físicas, químicas y biológicas del agua alterarían el equilibrio o balance de las poblaciones microbianas del TGI, esto a su vez favorecería la proliferación de bacterias patógenas o potencialmente patógenas, con las correspondientes consecuencias (Bulushi et al., 2010).

En conclusión, se podría afirmar que las tilapias menores de 20 g, los gametos femeninos y masculinos, y las ovas fecundadas son prácticamente libres de

*S.agalactiae* y que en consecuencia el establecimiento de granjas libres de este microorganismo sería factible como un primer paso para la prevención y posterior control de la infección y la enfermedad por este patógeno. En segundo lugar, la técnica de PCR anidada en tejidos de peces congelados o procesados para la técnica de H&E de rutina, es altamente confiable para fines investigativos o de control de poblaciones frente a este microorganismo.

## 5. CONCLUSIONES

- La PCR anidada estandarizada es un método rápido, sensible y específico para la detección de *S. agalactiae* en peces comerciales, útil en investigación, estudios epidemiológicos y diagnóstico.
- Los resultados de este trabajo en la estandarización de la PCR anidada se consideran confiables, en cada prueba se utilizaron controles negativos y positivos, los cuales siempre se comportaron como tales.
- Es posible el establecimiento de granjas de reproducción de tilapias libres de la infección con *S. agalactiae*, con aporte de una mejor semilla a las granjas de engorde y tal vez con mayores probabilidades de prevención y control de la infección y enfermedad en estas últimas

## 6. RECOMENDACIONES

- Es necesario plantear proyectos encaminados a la planificación y desarrollo de programas de control y prevención de la estreptococosis en granjas, que tengan como base la selección de reproductores a partir de lotes menores de 20g diagnosticados libres de la infección, y manejados en ambientes libres del microorganismo, sumado a estrategias sanitarias que involucren manejo de aguas, estanques y elementos de pesca, labores específicas de operarios, monitoreos periódicos de la salud de las diferentes poblaciones, uso de alimentos libres del microorganismo. Planes que permitirían disminuir paulatinamente la prevalencia de la infección en los sistemas de producción.
- Se requiere desarrollar trabajos de investigación que permitan dilucidar y entender los factores que favorecen las alteraciones de la interacción de la microflora tanto del ambiente acuático como del TGI de los peces; que conducen al establecimiento de la infección y la posterior manifestación de la estreptococosis en tilapias cultivadas mayores de 20 g.

**ANEXO 1**  
**PROCOLO DE EXTRACCION CON FENOL DEL DNA DE *S. agalactiae* A**  
**PARTIR DE TEJIDOS CONGELADOS**  
(Inagawa, Universidad de Shimonoski, Japón.  
Comunicación personal).

- Colectar el pellet por centrifugación a 4000 rpm por 10 minutos a 4°C
- Lavar el pellet dos veces con buffer TE 1X, centrifugando a 5000 rpm por 5 min a 4°C. El primer lavado se realiza con 2 ml y el segundo con 1ml en viales de 2ml.
- Proteinasa K 4μl (20mg/ml) y 96μl de TE1X. 56°C por 1 hora
- Resuspender el pellet en 300 μl de buffer de lisis (Tris HCl 10mM pH 8.0 y 7mg de lisozima) incubando a 37°C durante hora y media.
- Adicionar 300 μl de buffer Tris-SDS (100mM Tris HCl pH 9.0 y 4% de SDS) incubando a 55°C durante 30 minutos.
- Adicionar al lisado un volumen igual de fenol saturado y mezclar de lado a lado por 30 minutos.
- Centrifugar a 8000 rpm por 15 minutos y recuperar el sobrenadante (con cuidado de no tomar nada de la interfase).
- Adicionar al sobrenadante dos volúmenes de etanol absoluto frío, mezclando de lado a lado hasta visualizar la red correspondiente al DNA.
- Precipitar durante toda la noche a -20°C.
- Recolectar el DNA por centrifugación a 12000 rpm durante 15 min a 4°C, y lavar con etanol al 70%. Centrifugar, y dejar secar el pellet a 37°C durante media a una hora.
- Resuspender el pellet en 500 μl de TE 1X., mantener a 4°C hasta que disuelva bien.
- Conservar a -20°C.

## ANEXO 2

### PROTOCOLO PARA LA EXTRACCION DE ADN DE *S. agalactiae*, A PARTIR DE TEJIDOS CONGELADOS:

**kit de extracción: UltraClean Tissue and Cells ADN isolation kit, Mo Bio Laboratorios Inc®.**

1. Descongelar los viales que contienen el tejido, centrifugar a 10.000 rpm/10 min., descartar el sobrenadante y añadir 720 µl de solución TD1® y transferir todo el contenido al tubo: Dry Bead Tube®. El cual contiene perlas de silica que permiten el rompimiento celular.
2. Asegurar los Bead Tubes® horizontalmente en el Vortex, y colocar el vortex en la máxima revolución durante 20 min. Asegurando que las perlas golpeen fuertemente el tubo.
3. Centrifugar a 10.000g por 1 min a temperatura ambiente.
4. Transferir el sobrenadante a otro vial de 2 ml
5. Añadir 450 µl de solución TD1® y vortex por 5 segundos.
6. Transferir 650µl a un spin filter y centrifugar por 30 segundos a 10.000g. Se descarta el fluido que atraviesa el filtro y se recarga nuevamente con el resto de la muestra, se centrifuga nuevamente y se descarta el fluido que atravesó el filtro.
7. Adicionar 400µl de solución TD2® y centrifugar por 30segundos a 10.000g. Descartar el fluído que atraviesa el filtro.
8. Centrifugar de nuevo a 10.000g por 1 minuto para remover los residuos de solución TD2, cuidadosamente se transfiere el spin filter® a un nuevo vial de 2ml.

9. Adicionar 50µl de solución TD3® al centro de la membrana blanca del filtro, centrifugar 30segundos a 10.000g.
  
10. Retirar del vial el spin filter, el cual se descarta, quedando el ADN en el fluido del vial. Almacenarlo a -20°C.

### ANEXO 3

#### PROTOCOLO PARA LA EXTRACCION DE ADN DE *S. agalactiae*, A PARTIR DE TEJIDOS EMBEBIDOS EN PARAFINA

**kit de extracción: UltraClean Tissue and Cells ADN isolation kit, Mo Bio Laboratorios Inc®.**

1. A cada bloque de parafina se le practican 20 cortes de 3 a 4  $\mu\text{m}$  de grosor, colocándolos directamente en un vial de 1,5 ml. Entre bloque y bloque se debe cambiar el área de contacto de la cuchilla, para evitar contaminación.
2. Desparafinar con 1,5 ml de xilol absoluto a 60°C por 25 min, después de centrifugar por 10 minutos a 14000 rpm, se descarta el sobrenadante y de nuevo se repite el procedimiento.
3. Lavar a temperatura ambiente durante 5 min, dos veces con 1 ml de etanol absoluto y una vez con etanol al 70%, centrifugando entre cada lavado a 14000 rpm durante 10 minutos, descartar el sobrenadante. Dejar secar el etanol.
4. Rehidratar las muestras dos veces con buffer TE 1X pH 8.0 a 55°C por 5 min.
5. Centrifugar a 10.000 rpm/10 min., descartar el sobrenadante y añadir 720  $\mu\text{l}$  de solución TD1® y transferir todo el contenido al tubo: Dry Bead Tube®.
6. Asegurar los Bead Tubes® horizontalmente en el Vortex, y colocar el vortex en la máxima revolución durante 20 min. Asegurando que las perlas golpeen fuertemente el tubo.
7. Centrifugar a 10.000g por 1 min a temperatura ambiente.

8. Transferir el sobrenadante a otro vial de 2 ml
9. Añadir 450 µl de solución TD1® y vortex por 5 segundos.
  
10. Transferir 650µl a un spin filter y centrifugar por 30 segundos a 10.000g. Se descarta el fluido que atraviesa el filtro y se recarga nuevamente con el resto de la muestra, se centrifuga nuevamente y se descarta el fluido que atravesó el filtro.
  
11. Adicionar 400µl de solución TD2® y centrifugar por 30segundos a 10.000g. Descartar el fluido que atraviesa el filtro.
  
12. Centrifugar de nuevo a 10.000g por 1 minuto para remover los residuos de solución TD2, cuidadosamente se transfiere el spin filter® a un nuevo vial de 2ml.
  
13. Adicionar 50µl de solución TD3® al centro de la membrana blanca del filtro, centrifugar 30segundos a 10.000g.
  
14. Retirar del vial el spin filter, el cual se descarta, quedando el ADN en el fluido del vial. Almacenarlo a -20°C.

## ANEXO 4

### CUANTIFICACION DE ADN POR FLUOROMETRIA

(Qubit Fluorometro® Invitrogen S.A)

1. Preparar por muestra una solución de trabajo que contenga 199  $\mu\text{l}$  de buffer del kit y 1  $\mu\text{l}$  de fluoresceína de alta sensibilidad, también incluida en el kit.
2. Colocar separadamente en viales de 500  $\mu\text{l}$ , debidamente identificados: Solución Standar 1: 10 $\mu\text{l}$ , Solución Standar 2: 10 $\mu\text{l}$  y ADN a cuantificar 2 $\mu\text{l}$ .
3. Distribuir la solución de trabajo: 190  $\mu\text{l}$  para los Standar y 198  $\mu\text{l}$  al ADN a cuantificar.
4. Vortex a todo los los viales , e incubar por 3 minutos.
5. Encender el fluorometro y elegir la opción: Cuantificación ADN HS (Alta sensibilidad), elegir nueva calibración, y calibrar el equipo con el Standar S1 y luego el Standar S2. Posteriormente se cuantifica cada muestra, teniendo en cuenta de elegir la opción: calcular concentración de la muestra.

## ANEXO 5

### PROTOCOLO PARA LA EXTRACCION DEL DNA DE *S. agalactiae* A PARTIR DE CULTIVO BACTERIANO

(Inagawa, Universidad de Shimonoski, Japón.  
Comunicación personal).

- Cultivar la bacteria a 28°C por 24 horas en 10 ml de caldo BHI, sin agitación.
- Colectar el pellet por centrifugación a 4000 rpm por 10 minutos a 4°C
- Lavar el pellet dos veces con buffer TE 1X, centrifugando a 5000 rpm por 5 min a 4°C. El primer lavado se realiza con 2 ml y el segundo con 1ml en viales de 2ml.
- Resuspender el pellet en 300 µl de buffer de lisis (Tris HCl 10mM pH 8.0 y 7mg de lisozima) incubando a 37°C durante hora y media.
- Adicionar 300 µl de buffer Tris-SDS (100mM Tris HCl pH 9.0 y 4% de SDS) incubando a 55°C durante 30 minutos.
- Adicionar al lisado un volumen igual de fenol saturado y mezclar de lado a lado por 30 minutos.
- Centrifugar a 8000 rpm por 15 minutos y recuperar el sobrenadante (con cuidado de no tomar nada de la interfase).
- Adicionar al sobrenadante dos volúmenes de etanol absoluto frío, mezclando de lado a lado hasta visualizar la red correspondiente al DNA.
- Precipitar durante toda la noche a -20°C.
- Recolectar el DNA por centrifugación a 12000 rpm durante 15 min a 4°C, y lavar con etanol al 70%. Centrifugar, y dejar secar el pellet a 37°C durante media a una hora.
- Resuspender el pellet en 500 µl de TE 1X., mantener a 4°C hasta que disuelva bien.
- Conservar a -20°C.

## ANEXO 6

### PROTOCOLO CON FENOL-CLOROFORMO PARA LA EXTRACCIÓN DE ADN A PARTIR DE CULTIVO DE BACTERIAS GRAM (-), (*Aeromonas hydrophila*)

- Se Centrifuga un cultivo en medio líquido (5-10ml) a 3500 rpm/ 15 minutos para obtener el pellet.
- Se lava el pellet con 1 ml de agua estéril, ultra pura y se centrifuga a 12000 rpm/ 15 minutos.
- Agregar al pellet:
  - 500 µl de TEN
  - 100 µl de proteinasa K (1mg/ml)
- Mezclar y añadir 5µl de SDS al 10% y se deja incubando a 56°C por toda la noche (o dejarlo en la mañana y trabajarlo en la tarde)
- Añadir 5 µl NaCl 3M
- Inmediatamente añadir 200 µl de fenol saturado (Tris pH 8,0) y mezclar por 5 minutos (no utilizar vortex sino mezclar de lado a lado).
  
- Añadir 200 µl de cloroformo al 97%-isoamil alcohol 3%, y agitar de lado a lado por minutos.
- Separar fases a 12000 rpm/ 15 minutos.
- Se observan tres fases: fenólica, acuosa e interfase. Tomar fase acuosa y agregar el doble de cloroformo (400 µl), mezclar por 5 minutos y centrifugar a 12000 rpm/ 15 m, y retirar fase acuosa.
- Agregar dos volúmenes (1000 µl) de etanol absoluto, dejar precipitando a - 20 °C (se puede dejar por períodos largos). Inmediatamente se agrega el etanol se mezcla suavemente de lado a lado para que se forme la red, una vez formada se guarda a -20°C.

- Al otro día: se centrifuga a 12000 rpm/ 15 minutos se elimina el etanol, se deja evaporar a 37-40°C con la tapa destapada y se adiciona 400 µl de buffer TE y se guarda a 4°C.
  
- Agregar al día siguiente µl de RNAsa (20 mg/ml) e incubar toda la mañana a 37°C (4 horas).
  
- Agregar 40 µl de NaCl 3 M (1/10 del TEN)
  
- Inmediatamente se coloca 200 µl de fenol y se mezcla (de lado a lado) por 5 minutos
  
- Se adicionan 200 µl de cloroformo-isoamil alcohol, se mezcla por 5 minutos y se centrifuga a 12000 rpm/ 15 minutos, se retira la fase acuosa y se le colocan 400 µl de cloroformo, se mezcla por 5 minutos y se vuelve a centrifugar a 12000rpm/15 minutos, se retira la fase acuosa y se le coloca el etanol absoluto (2 volúmenes) precipitando toda la noche a -20°C. Agregar el etanol frío.
  
- Retirar el etanol (de la misma forma que en el paso 10) y se disuelve una vez seco en 200 µl de buffer TE 1X (Tris 10 mM, EDTA 1mM pH 8,0), si el pellet es muy pequeño agregar 100µl, y se deja a 4°C para que se disuelva bien el DNA. Después de que se disuelva bien se guarda a -20°C.

**ANEXO 7**  
**Electroforesis en gel de agarosa al 1,5% para la identificación de  
amplificados.**

**PREPARACION DE LAS MUESTRAS:**

Se mezclan 5  $\mu$ l de muestra de DNA con 2  $\mu$ l de buffer de carga (Promega®) sobre una lámina de Parafilm. Se destina siempre un carril para el Patrón de peso molecular (100pb Promega® )y se sirven las muestras en cada carril.

La electroforesis se lleva a cabo en geles de agarosa al 1,5% preparada en buffer TAE 1X, para lograr una adecuada dilución se calienta por 15 segundos en el microondas y posteriormente se agrega 0.2  $\mu$ l de bromuro de etidio.

Se ubica la peinilla según el número de muestras a correr, se vierte el gel y una vez endurecido se retira la peinilla y se carga la cámara con buffer TAE 1X hasta que quede completamente cubierto el gel.

En los carriles correspondientes a las muestras se colocan 7  $\mu$ l del producto del PCR y 2 $\mu$ l de buffer de carga, previamente mezclados sobre la lámina de Parafilm. Para el carril correspondiente al patrón de peso se emplean 5  $\mu$ l del marcador con 2 $\mu$ l de buffer de corrida.

Las muestras se corren a 200 voltios por una hora.

**ANEXO 8**  
**TECNICA DE INMUNOPEROXIDASA INDIRECTA (IPI) PARA LA DETECCION**  
**DE *Streptococcus agalactiae*.**  
**(Hernández , 2005)**

1. Adhesión de los tejidos a láminas con poli-L-lysina.
2. Desparafinar las láminas con calor (60°C) y 3 pases de xilol, hidratación con etanol 100, 90, 70% y agua destilada.
3. Bloqueo de la peroxidasa endógena con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 3% en metanol por 30 min.
4. Un lavado en TBST 10mM pH 7.6 (Tris Buffer Salino Tween 20) por 5 min en agitación suave.
5. Bloqueo de sitios inespecíficos con leche en polvo descremada al 2% en TBS Tween 20 por 30 min
6. Colocar en cada lamina 600µl de suero hiperimmune de conejo anti-S. *agalactiae* preparado en TBST a una dilución 1:1000
7. Incubación en Cámara Húmeda una hora a 37°C.
8. Ocho lavados con agitación suave por 5min c/u en TBST.
9. Colocar en cada lámina proteína G recombinante peroxidasa Sigma® en dilución 1:1000, preparada en leche descremada al 2% en TBST,
10. incubación húmeda por una hora a 37°C;
11. Ocho lavados con agitación por 5 min. en TBST, con agitación suave.
12. Revelado por 10 min en THCl 50mM pH 7.6 con diaminobenzidina 4HCl (0,06 % p/v) y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (0,2%v/v).

13. Coloración de contraste con hematoxilina por 5 min., alcohol ácido 0.5%, agua destilada, agua amoniacal 4 %; deshidratación en etanol 70, 90 y 100%, xilol 5 min., montaje con Entellan<sup>®</sup>. Visualización en microscopio de luz.

## REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- Akhlaghi, M.; Munday, B.L., and Whittington, R.J. 1996. Comparison of passive and active immunization of fish against streptococcosis (enterococcosis). *J. Fish Dis.*, 19: 251-258.
- AlonsoDeVelasco, E.; Verheul, A.; Verhoef, J.; Snippe, H. 1995. *Streptococcus pneumoniae*: virulence factors, pathogenesis and vaccines. *Microbiological Reviews*, 59:591-603.
- Altinok I., Capkin E., Kayis S. 2008. Development of multiplex PCR assay for simultaneous detection of five bacterial fish pathogens. *Vet. Microbiol.* 131:332-338.
- Andreassen C.C., Sorensen F.B., Overgaard J., Alsner J. 2004. Optimisation and validation of methods to assess single nucleotide polymorphisms (SNPs) in archival histological material. *Radiotherapy and Oncology*. 72: 351-356.
- Aoki T, Park CI, Yamashita H, Hirono I. 2000. Species-specific polymerase chain reaction primers for *Lactococcus garvieae*. *J Fish Dis*;23:1-6.
- Austin, B., and Austin, D. 1985. Bacterial pathogens of fish. A review. *J. Appl. Bacteriol.*, 58: 483-506.
- Austin, B., Austin, D.A., 2007. *Bacterial Fish Pathogens. Diseases of Farmed and Wild Fish*, 4th ed. Springer/Prazis Publishing, Chichester.
- Baliarda, A., Faure D., Urdaci M.C. 2002. Development and application of nested PCR to monitor brood stock salmonid ovarian fluid and spleen for detection of the fish pathogen *Flavobacterium psychrophilum*. *J. Appl. Microbiol.* 92: 510-516.
- Baya, A.; Navarro, R., and Kotopoulis, E. 1996. Streptococcal infections of hybrid striped bass and tilapia. In: Proc. The Successes and Failures in Commercial Recirculating Aquaculture Conference. Roanoke, Virginia, Jul. 1996, p 32-40.
- Bercovier H, Ghittino C and Eldar A. 1997. Immunization with bacterial antigens: infections with *Streptococcus* and related organisms. *Fish Vaccinology*. 90:153-160.
- Berridge, B.; Fullet, J.; Azavedo, j.; Low, D.; Bercovier, H. and Frelier, P. 1998. Development of specific nested oligonucleotide PCR primers of the *Streptococcus iniae* 16S-23S ribosomal ADN intergenic spacer. *J. Clin. Microbiol.* 36:2778-2781.
- Berridge, B., Bercovier H., Frelier P. 2001. *Streptococcus agalactiae* and *Streptococcus difficile* 16S-23S intergenic rDNA: genetic homogeneity and species-specific PCR. *Vet. Microbiol.* 78: 1165-173.
- Boomker, J.; Imes, G.D.Jr.; Cameron, C. M.; Naude, T.W., and Schoonbee, H.J. 1979. Trout mortalities as a result of *Streptococcus* infection. *Onderstepoort J. Vet. Res.* 46: 71-77.
- Bowser, P.R.; Wooster, G.A.; Getchell, R.G., and Timmons, M.B. 1998. *Streptococcus iniae* infection of tilapia *Oreochromis niloticus* in a recirculation production facility. *J. World Aqua. Soc.*, 3: 335-339.

- Brandão P.E., Gregori F., Monteleone G.S., Soares R.M., Rosales C.A.R., Jerez J.A. 2003. Nested PCR assay for detection of bovine coronavirus s1 gene. *Arq. Inst. Biol.* 70 : 1-3
- Bragg, R. 1988. The indirect fluorescent antibody technique for the rapid identification of streptococcosis of rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Onderstepoort J. Vet. Res.*, 55: 59-61.
- Bragg, R., and Broere, J. 1986. Streptococcosis in rainbow trout in South Africa. *Bull. Eur. Ass. Fish Pathol.*, 3: 89-91.
- Brazeau, C.; Gottschalk, M.; Vincelette, S.; Martineau-Doize, B. 1996. In vitro phagocytosis and survival of *Streptococcus suis* capsula type 2 inside murine macrophages. *Micribiology*, 142:1231-1237.
- Bromage, E.; Thomas, A., Owens, L. 1999. *Streptococcus iniae*, a bacterial infection in barramundi *Lates calcarifer*. *Dis. Aquat. Org.*, 36: 177-181.
- Bulushi,I.;Poole,S.,Barlow, R., Deeth H., and Dykes G. 2010. Speciation of Gram-positive bacteria in fresh and ambient-stored sub-tropical marine fish. *International Journal of Food Microbiology* 138: 32–38
- Carson, J.; Gudkovs, N., and Austin, B. 1993. Characteristic of an *Enterococcus*-like bacterium from Australia and South Africa, pathogenic for rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). *J. Fish Dis.*, 16: 381-388.
- Ceschia, G.; Giorgetti, G.; Giavenni, R., and Sarti, M. 1992. A new problem for italian trout farms: Streptococcosis in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiis*). *Bull. Eur. Assoc. Fish Pathol.*, 2: 71-72.
- Chang, P.H., and Plumb, J.A. 1996. Histopathology of experimental *Streptococcus* sp. infection in tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.), and channel catfish, *Ictalurus punctatus* (Rafinesque). *J. Fish Dis.*, 19: 235-241.
- Cheng, W., and Chen, J. 1998. *Enterococcus*-like infections in *Macrobrachium rosenbergii* are exacerbated by high pH and temperature but reduced by low salinity. *Dis. Aquat. Org.*, 34: 103-108.
- Coura R., Prolla J.C., Meurer I. And Prolla P.A. 2005. An alternative protocol for DNA extraction from formalin fixed and parafin wax embedded tissue. *J.Clin.Pathol.* 58:894-895.
- Cunningham CO. 2002. Molecular diagnosis of fish and shellfish diseases: present status and potential use in disease control. *Aquaculture* 206: 19-55.
- Doménech, A.; Fernández-Garayzábal, J.; Pascual, C.; Garcia, J.; Cutuli, M.; Moreno, M.; Collins, M., and Dominguez, L. 1996. Streptococcosis in cultured turbot, *Scophthalmus maximus* (L.), associated with *Streptococcus parauberis*. *J. Fish Dis.*, 19: 33-38.
- Duarte R.S., Miranda O., Bellei B.c., Brito V. And Teixeira L.M. 2004. Phenotypic and molecular characteristics of *Streptococcus agalactiae* isolates recovered from milk of dairy cows in Brazil. *J. Clin. Microbiol.* 42: 4214-4222.
- East I.J. 2008. Addressing the problems of using the polymerase chain reaction technique as a stand-alone test for detecting pathogens in aquatic animals. *Rev. Sei. Teeh. Off. Int. Epiz.* 27: 829-837.

- Eldar, A.; Bejerano, Y., and Bercovier, H. 1994. *Streptococcus shiloi* and *Streptococcus difficile*: two new streptococcal species causing a meningoencephalitis in fish. *Curr. Microbiol.*, 28: 139-143.
- Eldar, A.; Bejerano, Y.; Livoff, A.; Horovitz, A., and Bercovier, H. 1995. Experimental streptococcal meningo-encephalitis in cultured fish. *Vet. Microbiol.*, 43: 33-40.
- Eldar, A., and Guittino, C. 1999. *Lactococcus garviae* and *Streptococcus iniae* infections in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*: similar, but different diseases. *Dis. Aquat. Org.*, 36: 227-231.
- Espy M.J., Uhl J.R., Sloan L.M., Buckwalter S.P., Jones M. F., Vetter E. A., Yao J. D., Wengenack N. L., Rosenblatt J. E. 2006. Real-Time PCR in Clinical Microbiology: Applications for Routine Laboratory Testing. *Clin. Microbiol Rev.* 19: 165–256.
- Evans J., Shoemaker C., Klesius P. 2000. Experimental *Streptococcus iniae* infection of hybrid striped bass  $\mu$ (*Morone chrysops* x *Morone saxatilis*) and tilapia  $\mu$ *Oreochromis niloticus* by nares inoculation. *Aquaculture* 189 : 197–210.
- Evans, j.; Klesius, P.; Shoemaker, P.; Sarawi, M.; Landsberg, J.; Duramdez, R.; Marzouk, A.; Zenki, S. 2002. Characterization of B-haemolytic group B *Streptococcus agalactiae* in cultured seabream, *Sparus auratus* L., and wild mullet, *Liza klunzingeri*(day), in Kuwait. *Journal of Fish Disease*, 25: 505-513.
- Evans J., Pasnik D.J., Klesius P.H., Al-Ablani S. 2006. First report of *Streptococcus agalactiae* and *Lactococcus garviae* from a wild bottlenose dolphin (*tursiops truncatus*). *J. Wildlife Dis.* 42: 561–569.
- Felmer R., Zúñiga J., Recabal M. 2006. Estudio comparativo de un PCR anidado, ELISA y AGID en la detección del virus de la leucosis bovina en muestras de suero, sangre y leche. *Arch. Med. Vet.* 38 : 137-141.
- Ferguson, H.W.; Morales, J.A., and Ostland, V.E. 1994. Streptococcosis in aquarium fish. *Dis. Aquat. Org.*, 19: 1-6.
- Fuster O., Klesius P.H., Evans J., Arias C.R. 2008. Molecular typing of *Streptococcus agalactiae* isolates from fish. *J. Fish. Dis.* 31: 277-283.
- Ghittino, C., and Prearo, M. 1992. Comparison of some strains isolated from rainbow trout affected by streptococcosis. In: Proc. Societa Italiana di Patologia Ittica. II° Convegno Nazionale "Problemi Emergenti in Ittiopatologia", Verona, Ottobre, 1992, p 1-11.
- Gibello A, Blanco M, Domínguez L y Fernández-Garayzábal J. 2001. Utilización de la PCR para el diagnóstico en ictiopatología. *Revista AquaTIC*. Nro. 15, Noviembre .
- Giraffa G., Rossetti L., Neviani E. 2000. An evaluation of chelex-based DNA purification protocols for the typing of lactic acid bacteria. *J. Microbiol. Meth.* 42:175-184.
- Hansen M.S., Uldbjerg N., Kilian M., Sorensen S. 2004. Dynamics of *Streptococcus agalactiae* colonization in women during and after pregnancy and in their infants. *J. Clin. Microbiol.* 42: 83-89.

Hassan A.A., Khan I.U., Abdulmawjood A., and Lämmler C. 2003. Inter- and Intraspecies Variations of the 16S–23S rDNA Intergenic Spacer Region of Various Streptococcal Species. *Appl. Microbiol.* 26 : 97–103.

Hassan A.A., Vossen A., Siebert U., Garayza F. 2008. PCR amplification of species specific sequences of 16S rDNA and 16S–23S rDNA intergenic spacer region for identification of *Streptococcus phocae*. *Microbiological Research* 163: 132–135.

Hardie, J. 1986. Genus *Streptococcus* Rosenbach 1884. In: Sneath, P.; Mair, N.; Sharpe, M., and Holt, J. (eds). *Bergey's manual of systematic bacteriology*. Vol. 2. Williams and Wilkins Co., Baltimore, p 1043-1047.

Harris K., Turner, Elaine A. Green E., Hartley J. 2008. Duplex Real-Time PCR Assay for Detection of *Streptococcus pneumoniae* in Clinical Samples and Determination of Penicillin Susceptibility. 46: 2751–2758.

Hernández EA. 2005. Caracterización epidemiológica, microbiológica e inmunohistoquímica de la Streptococosis en tilapias (*oreochromis* sp.) en un brote natural de la enfermedad. Tesis de grado Médico Veterinario. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá.

Hernández E, Figueroa J, and Iregui C. 2009. Streptococcosis on a red tilapia, *Oreochromis* sp., farm: a case study. *J. Fish Dis.*, 32: 247-252.

Hoffmann B., Beer M., Reid S.M., Mertens P. Oura C., Van Rijn., Slomka M.J. 2009. A review of RT-PCR technologies used in veterinary virology and disease control: Sensitive and specific diagnosis of five livestock diseases notifiable to the World Organisation for Animal Health. *Vet. Microbiol.* 139: 1–23

Hoorfar J., Malorny B., Cook A., Wagner M., Fach P. 2004. Practical Considerations in Design of Internal Amplification Controls for Diagnostic PCR Assays. *J. Clinical Microbiol.* 42: 1863–1868.

Hoshina T., Sano T. and Morimoto T. 1958. A *Streptococcus* pathogenic to fish. *Journal Tokyo University Fish* 44: 57-68.

Houghton S. and Cockerill F. 2006. Real-time PCR: Overview and applications. *Surgical research review.* 139: 1-5.

Hutchins G.G.A., Grabsch H.I. 2009. Molecular Pathology the future? Review. *The royal colleges of surgeons of Edinburgh and Ireland. Surgeon* 7, 6: 366-77.

- Iregui C., Comas J., Hernández E. A., Jiménez A.P., Peña L.C., Pulido A., Rey A.L., Rodríguez M. 2004. Primer Mapa epidemiológico de las lesiones y enfermedades de los peces en Colombia. Universidad Nacional de Colombia, Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural, Bogotá-Colombia.
- Jimenez AP, Rey AL, Penagos LG, Ariza MF, Figueroa J e Iregui CA. 2007. Estado actual de la estreptococosis en tilapias cultivadas en Colombia. Rev. Med. Vet. Zoo. 54: 120-123.
- Jin P., Xiao M., Kong F., Oftadeh S., Zhou F., Liu C., and Gilbert G. 2009. Simple, Accurate, Serotype-Specific PCR Assay To Differentiate *Streptococcus pneumoniae* Serotypes 6A, 6B, and 6C. J. Clin. Microbiol. 47: 2470–2474.
- Johnson J.R. 2000. Development of polymerase chain reaction-based assays for bacterial gene detection. J. of Microbiol. Methods 41: 201–209.
- Kaige N, Miyazaki T and Kubota S. 1984. The pathogen and the histopathology of vertebral deformity in cultured yellowtail. Fish Pathol., 19: 173-179.
- Kawamura Y., Itoh Y., Mishima N., Ohkusu K., Kasai H., Ezaki T. 2005. High genetic similarity of *Streptococcus agalactiae* and *Streptococcus difficilis*: *S. difficilis* Eldar et al.1995 is a later synonym of *S. agalactiae* Lehmann and Neumann 1896 (Approved Lists 1980). Internat. J. of Systematic and Evolut. Microbiol. 55: 961–965
- Kitao, T. 1993. Streptococcal infections. In: Inglis, V.; Roberts, R., and Bromage, N. (eds) Bacterial diseases of fish. Blackwell, Oxford, p 196-210.
- Klesius P., Evans J., Shoemaker C., and Yeh H. 2006. Rapid detection and identification of *Streptococcus iniae* using a monoclonal antibody-based indirect fluorescent antibody technique. Aquaculture 258: 180– 186.
- Kocabas E.H., Ucar F., Kocatas N. 2008. Colonization and vertical transmission of *Streptococcus mutans* in Turkish children. Microbiological Research 163: 168—172.
- Kuo, C.; Wu, J.; Tsai, P.; Kao, F.; Lei, H.; Lin, M.; Lin, Y: 1999. Streptococcal pyrogenic exotoxin B induces apoptosis and reduces phagocytic activity in U937 cells. Infection and Immunity, 67:126-130.
- Kusuda, R., and Salati, F. 1993. Major bacterial diseases affecting mariculture in Japan. Ann. Rev. Fish Dis., 3: 69-85.
- Lau, S.; Woo, P.; Tse, H.; Leung, H.; Wong, S.; Yuen, K. 2003. Invasive *Streptococcus iniae* infection outside North America. J Clinl Microbiol, 41: 1004-1009.
- Lindahl G., Stalhammar M., and Areschoug T. 2005. Surface Proteins of *Streptococcus agalactiae* and related proteins in other bacterial pathogens. Clin. Microbiol. Rev. 18: 102-127.
- Marquet N., Fourny L., Arnault L., Domelier A.S., Salloum M., Lartigue M., Quentin R. 2008. Molecular Characterization of Human-Colonizing *Streptococcus agalactiae* Strains Isolated from Throat, Skin, Anal Margin, and Genital Body Sites. J. Clin. Microbiol. 46: 2906–2911
- Martin S. W., Meek A.H. & Willeberg P. Sampling (1987) Sampling Methods. In: *Veterinary Epidemiology Principles and methods* (ed. by S. W. Martin). pp 31-38. Iowa States University Press, Ames.,

- Mata A.I., Gibello A., Casamayor A., Blanco M., Domínguez L. and Garayzábal F. 2004. Multiplex PCR assay for detection of bacterial pathogens associated with warm-water streptococcosis in fish. *App. Environ. Microbiol.* 70: 3183-3187.
- Mengoli C., Cruciani M., Barnes R.A., Loeffler J., Donnelly J.P. 2009. Use of PCR for diagnosis of invasive aspergillosis: systematic review and meta-analysis. *Lancet Infect Dis.* 9: 89–96
- Mian G.F., Leal C.A., Yuhara T.Y., Costa G.M., and Figueiredo H.C. 2009. Aspects of the natural history and virulence of *S. agalactiae* infection in Nile tilapia. *Vet.. Microbiol.*136: 180–183.
- Michel, C.; Nougayrède, P.; Eldar, A.; Sochon, E., and Kinkelin, de P. 1997. *Vagococcus salmoninarum*, a bacterium of pathological significance in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* farming. *Dis. Aquat. Org.*, 30: 199-208.
- Miller K.M and Sterling C.R. 2007. Sensitivity of Nested PCR Detection for Low Numbers 1 of *Giardia lamblia* Cysts. *Appl. Environ. Microbiol.* 10: 1-7.
- Minagricultura. 2005. Acuerdo de competitividad de la cadena de piscicultura en Colombia. Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural. Bogotá D.C..
- Miyazaki, T.; Kubota, S.S.; Kaige, N., and Miyashita, T. 1984. A histopathological study of streptococcal disease in tilapia. *Fish pathol.*, 19: 167-172.
- Mora D., Ricci G., Guglielmetti S., Daffonchio D., and Fortina M.G. 2003. 16S–23S rRNA intergenic spacer region sequence variation in *Streptococcus thermophilus* and related dairy streptococci and development of a multiplex ITS-SSCP analysis for their identification. *Microbiology.* 149: 807–813.
- Murdoch D., Anderson T.P., Beynon A., Angela A.C., Laing M., Town G., Mills G.D., Chambers S., Jenning L. 2003. Evaluation of a PCR Assay for Detection of *Streptococcus pneumoniae* in Respiratory and Nonrespiratory Samples from Adults with Community-Acquired Pneumonia. *J. Clin. Microbiol.* 41: 63–66.
- Múzquiz J, Royo F, Ortega C, Blas de I, Ruiz I and Alonso J. 1999. Pathogenecity of Streptococcosis in rainbow trout (*Oncorhynchus mikiis*): dependence of age of diseased fish. *Bull. Eur. Ass. Fish Pathol.* 19: 114-119.
- Nieto, J.M.; Devesa, S.; Quiroga, I., and Toranzo, A.E. 1995. Pathology of *Enterococcus* sp. infection in farmed turbot, *Scophthalmus maximus* L. *J. Fish Dis.*, 18: 21-30.
- Olafsen J.A. 2001. Interactions between fish larvae and bacteria in marine aquaculture. *Aquaculture* 200: 223–247.
- Olson A.B., Sibley C. D., Schmidt L., Wilcox M. A., Surette M. G., Corbett C.R. Development of real-time PCR assays for detection of the *Streptococcus milleri* Group from Cystic fibrosis clinical specimens using targets for *cpn60* and 16s rRNA genes. *J. Clin. Microbiol.* JCM Accepts, published online ahead of print on 17 February 2010.
- Paperna, I. 1996. Parasites, infections and diseases of fishes in Africa. CIFA technical paper No. 31. FAO, Roma, p 10-12.
- Penagos, G. 2005. Evaluación de la participación de larvas, alevinos y reproductores activos y de reemplazo de tilapia roja (*oreochromis spp*) en el curso de la estreptococcosis en granjas. Tesis de

grado- Medico Veterinario, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá.

Pereira U.P, Mian G.F., Oliveira I.C., Benchetrit L.C., Costa G.M., and Figueiredo H.C. 2010. Genotyping of *Streptococcus agalactiae* strains isolated from fish, human and cattle and their virulence potential in Nile tilapia. *Vet. Microbiol.* 140: 186–192

Perera, R.; Johnson, S.; Collins, M., and Lewis, D. 1994. *Streptococcus iniae* associated with mortality of *Tilapia nilotica* X *T. aurea* hybrids. *J. Aquat. Anim. Health.*, 6: 335-340.

Perera, R.; Johnson, S., and Lewis, D. 1997. Epizootiological aspects of *Streptococcus iniae* affecting tilapia in Texas. *Aquaculture*, 152: 25-33.

Pier, G.; Madin, S., and Al-Nakeeb, S. 1978. Isolation and characterization of a second isolate of *Streptococcus iniae*. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 2: 311-314.

Plumb, J.; Schachte, J.; Gaines, J.; Peltier, W., and Carroll, B. 1974. *Streptococcus* sp. from marine fishes along the Alabama and northwest Florida coast of the gulf of Mexico. *Trans. Amer. Fish Soc.*, 2: 358-361.

Poppert S., Nickel D., Berger A., Yildiz T., Kaestner N., Mauerer S. and Spellerberg B. 2009. Rapid identification of beta-hemolytic streptococci by fluorescence in situ hybridization (FISH). *Internat. J. of Medical Micro.* 299: 421–426.

Popma T and Masser M. 1999. Tilapia life history and biology. Southern Regional Aquaculture Center. SRAC Publication N° 283.

Prieta, J.; Doménech, A.M.; Fernández-Garayzabal, J.F.; Collins, M.D.; Rodrigues, U.M.; Jones, D.; Rodríguez, A. y Domínguez, L. 1993. Lactococcosis de la trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*). *Med. Vet.*, 6: 367-373.

Pulido A., Mogollón JD., Morales H., Rincón M.A. 2006. Estandarización y aplicación de la técnica PCR anidado para la detección de *Mycoplasma hyopneumoniae*. *Rev. Med. Vet. Zoot.* 53: 22-32.

Pulido E.A., Iregui, C.A y Figueroa, J. 1999. Reporte de Streptococcosis en tilapias cultivadas en Colombia. Memorias II Congreso Suramericano de acuicultura. Acuicultura en armonía con el ambiente. Puerto la Cruz. Venezuela. Tomo II. Pag. 229-239.

Pulido, A. 2000. Evaluación clínica y fisiopatológica de un caso de streptococcosis en una explotación de tilapia roja en la represa de hidro prado-Tolima. Tesis de grado-Médico Veterinario, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá.

Pulido A., Iregui C., Figueroa J. y Klesius P. 2004. Estreptococcosis en Tilapias (*Oreochromis* sp.) cultivadas en Colombia. *Aquatic*. No. 20. Disponible en URL: [http:// www.revistaaquatic.com/aquatic/art.asp?t=p&c=170](http://www.revistaaquatic.com/aquatic/art.asp?t=p&c=170).

Rajendhran J., Gunasekaran P. 2010. Microbial phylogeny and diversity: Small subunit ribosomal RNA sequence analysis and beyond. *Microbiological Research* 10: 2-12.

Rasheed, V.; Limsuwan, C., and Plumb, J. 1985. Histopathology of bullminnows, *Fundulus grandis* Baird & Girard, infected with a non-haemolytic group B *Streptococcus* sp. *J. Fish Dis.*, 8: 65-74.

- Romalde J, Magariños B, Nuñez S, Barja J and Toranzo A. 1996b. Host range susceptibility of *Enterococcus* sp. strains isolated from diseased turbot: possible routes of infection. *Appl. Environ. Microbiol.*, 62: 607-611.
- Romalde <sup>a</sup> J.L., Ravelo C.,Valdes I., Magariños B.,De la Fuente E., San Martín R., Herrera R, Toranzo E. 2008. *Streptococcus phocae*, an emerging pathogen for salmonid culture. *Vet. Microbiol.* 130: 198–207.
- Rudolph k., Parkinson A., Black C.,Mayer L. 1993. Evaluation of Polymerase Chain Reaction for Diagnosis of Pneumococcal Pneumonia. *J. Clin. Microbiol.* 31:2661-2666
- Russo R.,Mitchell H.,Yanong R. 2006. Characterization of *Streptococcus iniae* isolated from ornamental cyprinid fishes and development of challenge models. *Aquaculture* 256: 105–110
- Santos, Y.,Romalde, J.,Bandín, I., Magariños,B.,Núñez,S Barja, J., and Toranzo,A. 1993. Usefulness of the API-20E system for the identification of bacterial fish pathogens. *Aquaculture*,116:111-120.
- Saunders B. and Trapp R.G. 1994. Clinical Decision Making. In: *Basic & Clinical Biostatistics* (ed. by B. Dawson\_Saunders and R.G. Trapp), pp. 236-237.
- Shoemaker C and Klesius P. 1997. Streptococcal diseases problems and control: a review. In: Fitzsimmons K. *Tilapia Aquaculture. Proc. Fourth international symposium on tilapia in aquaculture. Florida. USA.* 2: 671-680.
- Shoemaker, C.A., Evans, J.J., Klesius, P.H., 2000. Density and dose: factors affecting mortality of *Streptococcus iniae* infected tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Aquaculture* 188: 229–235.
- Sontakke S., Cadenas M.B., Maggi R.G., Diniz P.P., Breitschwerdt E.B. 2009. Use of broad range 16S rDNA PCR in clinical microbiology. *J. of Microbiol. Methods.* 76: 217–225.
- Suanyuh N.,Kong F., Ko D., Gilbert G. Supamattaya K. 2008. Occurrence of rare genotypes of *Streptococcus agalactiae* in cultured red tilapia *Oreochromis* sp. and Nile tilapia *O. niloticus* in Thailand—Relationship to human isolates? . *Aquaculture*: 284: 35-40.
- Suanyuk N., Kong F., Ko D. 2008. Occurrence of rare genotypes of *Streptococcus agalactiae* in cultured red tilapia *Oreochromis* sp. and Nile tilapia *O. niloticus* in Thailand—Relationship to human isolates?. *Aquaculture*, 284: 35-40.
- Stoffregen, D.A.; Backman, S.C.; Perham, R.E.; Bowser, P.R., and 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. *J. World Aqua. Soc.*, 4: 420-434.
- Takahashi T. Tamura M., Asami Y.,Kitamura E., Saito K. 2008. Novel Wide-Range Quantitative Nested Real-Time PCR Assay for *Mycobacterium tuberculosis* DNA: Development and Methodology. *J. Clini. Microbiol.* 46: 1708–1715.
- Toranzo, A.; Novoa, B.; Baya, A.; Hetrick, F.; Barja, J., and Figueras, A. 1993. Histopathology of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), and striped bass, *Morone saxatilis* (Walbaum), experimentally infected with *Carnobacterium piscicola*. *J. Fish Dis.*,16: 261-267.

- Toranzo, A.E.; Devesa, S.; Heinen, P.; Riaza, A.; Nuñez, S., and Barja, J.L. 1994. Streptococcosis in cultured turbot caused by an *Enterococcus*-like bacterium. *Bull. Eur. Assoc. Fish Pathol.*, 1: 19-23.
- Valentin-Weigand, P.; Benkel, P.; Rohde, M.; Hatwal, G. 1996. Entry and intracellular survival of group B streptococci in J774 macrophages. *Infection and Immunity*, 64:2467-2473.
- Vendrell D., Balcazar J.L., Zarzuela I., De Blas I., Girones O., Muzquiz J.L. *Lactococcus garvieae* in fish: A review. 2006. *Comparative Immunol. microbiol. & Infect. Diseases* 29: 177–19.
- Verschuere L., Rombaut G., Sorgeloos P., Verstraete W. 2000. Probiotic Bacteria as Biological Control agents in Aquaculture. *Microbiol and Mol. Biol. Rev.* 64: 655-671.
- Weinstein MR, Litt M, Kertesz D.A, Wyper P, Rose D, Coulter M, McGeer A, Facklam R, Ostach C, Willey BM, Borczyk A and Low D.E. 1997. Invasive infections due to a fish pathogen, *Streptococcus iniae*. *S. iniae* Study Group. *N. Engl. J. Med.* 337(9): 589-594.
- Weiss J.B. 1995. DNA Probes and PCR for Diagnosis of Parasitic Infections *CLINICAL Microbiol. Rev.* 8: 113–130.
- Wiklund T., Madsen L., Bruun M.S., and Dalsgaard I. 2000. Detection of *Flavobacterium psychrophilum* from fish tissue and water samples by PCR amplification. *J. App. Microbiol.* 88: 299-307.
- Yang W. and Li A. 2009. Isolation and characterization of *Streptococcus dysgalactiae* from diseased *Acipenser schrenckii*. *Aquaculture* 294: 14–17.
- Yang S and Rothman R.E. 2004. Review: PCR-based diagnostics for infectious diseases: uses, limitations, and future applications in acute-care settings. *Lancet Infect Dis* 4: 337–48.
- Yoshida, T.; Yamada, Y.; Sakai, M.; Inglis, V.; Xie, X.J.; Chen, S.-C., and Kruger, R. 1996. Association of the cell capsule with anti-opsonophagocytosis in  $\beta$ -hemolytic *Streptococcus* spp. isolated from rainbow trout. *J. Aquat. Anim. Health*, 8: 223-228.
- Yoshida, T.; Endo, M.; Sakai, M., and Inglis, V. 1999. A cell capsule with possible involvement in resistance to opsonophagocytosis in *Enterococcus seriolicida* isolated from yellowtail *Seriola quinqueradiata*. *Dis. Aquat. Org.*, 29: 233-235.
- Yuasa, K.; Kitanchaon, N.; Kataoka, Y., and Al-Muraby, F. 1999. *Streptococcus iniae*, the causative agent of mass mortality in rabbitfish *Siganus canaliculatus* in Bahrain. *J. Aquat. Anim. Health*, 87-93.
- Zhang L., Pan Z., Geng S., Chen S., Hu S., Liu H., Wu y., Jiao X., Liu X. 2010. Insitive, semi-nested RT-PCR amplification of fusion gene sequences for the rapid detection and differentiation of Newcastle disease virus. *Res. Vet. Sci.* doi:10.1016, in press.
- Zlotkin, A.; Chilmonczyk, SD.; Eyngor, M.; Hurvitz, A.; Ghittino, C.; and Eldar, A. 1998. Trojan horse effect: fagocyte-mediated *Streptococcus iniae* infection of fish. *Infection and Immunity*, 71:2318-2325.

Zlotkin<sup>b</sup> A, Eldar A, Ghittino C, Bercovier H. 1998. Identification of *Lactococcus garvieae* by PCR. J Clin Microbiol;36:983–5.