

***Streptococcus agalactiae*: HASTA AHORA EL ÚNICO *Streptococcus* patógeno DE TILAPIAS CULTIVADAS EN COLOMBIA**

Jiménez AP¹, Rey AL², Penagos LG³, Ariza MF⁴, Figueroa J⁵, Iregui CA⁶

Grupo de Patobiología Veterinaria, Departamento de Ciencias para la Salud Animal, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional de Colombia

RESUMEN

Las estreptocosis son un conjunto de enfermedades ocasionadas por un grupo de cocos Gram positivos con similares signologías que involucran distintos órganos en los individuos afectados. La identificación precisa de cada uno de estos microorganismos no se logra de manera definitiva por los métodos tradicionales microbiológicos, por lo que se debe acudir a otro tipo de metodologías como las técnicas de biología molecular. En 1999 se identificó por primera vez en Colombia la estreptocosis en híbridos de tilapias de cultivo. La posterior secuenciación del ADN de distintos aislamientos obtenidos de varias regiones del país demostró un 98,8% de afinidad con el *Streptococcus agalactiae*. El presente estudio pretende definir si hasta la fecha existe solo esta especie de *Streptococcus* en el país causando infección o enfermedad en tilapias de cultivo o, por el contrario, son varias las especies que intervienen en los cuadros infecciosos. Se evaluaron aislamientos de tejidos, de agua y fango de los sitios de cultivo, así como de lugares de expendio de tilapia roja (*Oreochromis* sp.), utilizando técnicas microbiológicas, inmunoperoxidasa indirecta (IPI) y PCR, específicas para el aislamiento e identificación del *S. agalactiae*. Los resultados del presente estudio demostraron que hasta la fecha en el país únicamente se ha identificado la especie *S. agalactiae* causando infección o enfermedad en tilapias. No tenemos evidencia de que otros *Streptococcus* reportados internacionalmente como *S. iniae* y otros Gram positivos causen estreptocosis en Colombia. La tilapia parece ser el principal reservorio del *S. agalactiae* en el país, y el riesgo zoonótico, aunque existe, es mínimo si se toman las medidas apropiadas de bioseguridad.

Palabras clave: tilapia, *Streptococcus agalactiae*, microbiología, inmunoperoxidasa, PCR.

***Streptococcus agalactiae*: UP TO DATE THE ONLY PATHOGENOUS *Streptococcus* OF CULTURED TILAPIAS IN COLOMBIA**

ABSTRACT

Streptococcosis are a set of diseases with similar signs and pathological features involving different organs and caused by a group of Gram (+) cocci. The precise identification of each microorganism is not feasible only by the conventional microbiological methods, instead molecular biology techniques must be used. In Colombia, the first streptococcosis case in

1 apjimenezl@unal.edu.co

2 alreyc@unal.edu.co

3 lgpenagosc@unal.edu.co

4 mfarizab@unal.edu.co

5 jfigueroaa@unal.edu.co

6 caireguic@unal.edu.co

tilapias was diagnosed in 1999. The DNA sequencing of isolates from different regions of the country demonstrated an affinity of 98,8% with *Streptococcus agalactiae*. This study was intended to find out whether up to date the only Gram (+) cocci responsible for infection and/or disease in cultured tilapias in Colombia is *S. agalactiae*, or whether exist other genus or species. The study included microbiological, immunohistochemical (indirect immunoperoxidase) and PCR techniques for isolating and identification of bacteria from tissues of fish, water and mud obtained from cultured ponds, also were examined tilapias from markets and supermarkets. The techniques used are specific for isolating and identification of *S. agalactiae*. Our results permit us to suggest that up to date only *S. agalactiae* is responsible for the infection and/or disease in cultured tilapia in Colombia. We do not have evidence for other *Streptococcus* such *S. iniae* or other Gram (+) cocci causing disease in Colombia. Tilapia seems to be the main reservoir of *S. agalactiae* in the country and the transmission risk for the human being, although possible, is considerably low if appropriate measures are taken.

Key words: Tilapia, *Streptococcus agalactiae*, microbiology, immunoperoxidase, PCR.

INTRODUCCIÓN

El término estreptococosis en patología de peces agrupa una serie de procesos causados por diferentes *Streptococcus* que inducen cuadros clinicopatológicos similares (1-4). La enfermedad es sistémica y, en los casos con manifestación clínica, comúnmente cursa con signos neurológicos. La estreptococosis se reporta en más de 20 especies piscícolas cultivadas en aguas dulces, estuarinas o saladas de muchas partes del mundo (1, 4, 5).

Los *Streptococcus* hasta ahora reportados como agentes patógenos para los peces incluyen: *Streptococcus iniae*, *S. agalactiae* (*S. difficile*), *S. parauberis*, *S. dysgalactiae*, *S. milleri*, *Lactococcus garviae* (*Enterococcus seriolicida*), *L. piscium* y *Vagococcus salmoninarum* (1-2, 6-13).

La estreptococosis es considerada actualmente uno de los problemas sanitarios más importantes en la acuicultura mundial debido a su amplia distribución geográfica, a las diversas especies afectadas, y a las cuantiosas pérdidas por mortalidad, costos de tratamiento, disminución en el crecimiento y dificultad en la comercialización (1, 14-16). Recientemente, la preocupación se ha aumentado por la creciente aparición de casos clínicos en humanos (17). Las especies fcti-

cas con altos volúmenes de producción son las más afectadas, entre ellas las tilapias.

Existen dos formas de manifestación de la enfermedad: casos agudos con presentación sistémica, con súbita y alta mortalidad (18, 19), y formas crónicas en las que los signos y las lesiones son más variados, con formación de granulomas, en las que la mortalidad es baja pero insidiosa (11, 20, 21).

En contraste con el relativo fácil aislamiento de los miembros de este género y del diagnóstico patológico de las entidades, la clasificación precisa de los cocos responsables de cada patología requiere la aplicación de técnicas sensibles y específicas como el caso de aquellas basadas en la biología molecular. Dentro del grupo de los cocos, el *S. iniae* es considerado el más importante (13), éste afecta distintas especies de peces en el mundo, y se reportan casos en humanos. Sin embargo, el *Streptococcus agalactiae*, identificado por primera vez a partir de muestras de riñón, ojo, hígado y fluidos corporales de un pez en Alabama (22), y posteriormente diagnosticado como causa de meningococcalitis en peces en 1994 (identificado inicialmente como *S. difficile*) (9), es aislado cada vez con mayor frecuencia en brotes de mortalidad en el ámbito mundial. Uno de los más severos brotes se reportó recientemente, en el que se aisló una cepa β hemolítica y causó

alta mortalidad en silver promfret (*Pampus argenteus*) cultivados en Kuwait (23).

En Colombia se han obtenido aislamientos en distintas regiones (21, 24). La secuenciación del ADN de algunos de estos aislamientos demostró un 98,8% de afinidad con secuencias del *S. agalactiae* utilizado como referencia, confirmando posteriormente con pruebas de PCR practicadas a dichos aislamientos, y en donde se utilizaron *primers* específicos.

El presente estudio intentó definir si hasta la fecha existe una sola especie de *Streptococcus* en el país que causa infección o enfermedad en tilapias, o si, por el contrario, existirían varias especies u otros géneros relacionados; además, cuáles son sus posibles reservorios y su posible significado en salud pública. Se realizaron aislamientos bacterianos a partir de tejidos de peces obtenidos en 6 granjas productoras y en lugares de expendio de tilapia roja (*Oreochromis* sp.), se intentaron aislamientos del agua y fangos de los estanques de cultivo, se utilizó la técnica de inmunoperoxidasa indirecta (IPI) en tejidos de algunos de estos peces, y técnicas de biología molecular basadas en PCR.

MATERIALES Y MÉTODOS

DETERMINACIÓN DE LA PREVALENCIA DE *S. agalactiae* EN GRANJAS PRODUCTORAS DE TILAPIA ROJA

Se realizaron cuatro visitas durante dos años a seis granjas de cultivo de tilapia y se tomaron muestras de los peces para microbiología a partir de cerebro, ojo y bazo según el tamaño del animal. El número de peces tomado fue establecido asumiendo una prevalencia del 10% para lotes de más de 100.000 animales, y con un nivel de confianza del 95% según la tabla propuesta por Simon and Schill en 1984 (citados por Blanch) (25); el número mínimo de peces

en cada visita fue de 30, los cuales fueron colectados por medio de un muestreo al azar estratificado por grupos etarios proporcional a la población total de cada grupo, para un total de 120 animales por granja.

Las muestras se sembraron en agar infusión cerebro-corazón (BHI) con sangre ovina, y se incubaron a 37 °C. Las colonias positivas se definieron por color y morfología, y se caracterizó la bacteria por medio de pruebas biológicas y bioquímicas convencionales (tinción de Gram, oxidasa, catalasa, hemólisis) y otras si era necesario. Las bacterias fueron analizadas por PCR utilizando *primers* específicos para la secuencia 16S rRNA del *S. agalactiae*. El fragmento amplificado por la PCR corresponde aproximadamente a un producto de 860 pb (24).

S. agalactiae U OTROS GÉNEROS DE COCOS RELACIONADOS PRESENTES EN EL AGUA Y FANGOS DE ESTANQUES DE CULTIVO DE TILAPIA

Se tomaron 212 muestras de agua y 212 de fango de los estanques de las 6 granjas visitadas. Para establecer la técnica de cultivo de cocos Gram positivos a partir de estas muestras se tomó como guía la metodología utilizada por Nguyen *et al.* (26). El medio de cultivo utilizado fue agar Todd Hewitt suplementado con sangre ovina y adicionado con ácido oxalínico (AO): 5 mg/L, sulfato de colistina (SC): 10 mg/L y acetato de talio (AT), 1 g/L (THAOSCAT). La técnica estandarizada es la siguiente:

Procesamiento de aguas para aislamiento de cocos Gram positivos:

- Centrifugar el agua a 4000 rpm por 30 min.
- Descartar el sobrenadante, hacer dos diluciones 1:10 y 1:100, mezclar y sembrar 100 μ L de la solución madre y de las dos diluciones en el medio de cultivo mencionado previamente.

Procesamiento de fango para aislamiento de cocos Gram positivos:

- Pesar 1 g de fango y diluirlo en 9 ml de solución salina fisiológica (SSF).
- Hacer diluciones 1:10, 1:100, 1:1000.
- Sembrar 100 μ l de la solución madre, y de cada dilución en el medio de cultivo mencionado previamente.

Todos los cultivos se incuban a 37 °C durante 24-48 horas.

Las colonias compatibles con *Streptococcus* spp. u otros cocos se vuelven a aislar en medio BHI suplementado con sangre ovina, para continuar su clasificación.

Las colonias positivas se definieron con los mismos criterios antes citados para los aislamientos de los peces. Las bacterias fueron sometidas a la prueba de PCR para determinar si eran *S. agalactiae*. Se inocularon vía intraperitoneal en tilapias de aproximadamente 10 g, y sus tejidos fueron sometidos a inmunoperoxidasa indirecta (IPI) utilizando anticuerpos policlonales contra *S. agalactiae*.

DETERMINACIÓN DE LA PREVALENCIA DE CEPAS DE *S. agalactiae* U OTROS GÉNEROS DE COCOS RELACIONADOS EN TILAPIAS DE EXPENDIO

En Colombia la producción de tilapia para el año 2003 fue de aproximadamente 20.000 toneladas, de las cuales el 40% se comercializó en Bogotá (Fedecua, comunicación personal), es decir, 8.000 toneladas/año equivalentes a 22 millones de tilapias de aproximadamente 350 g (peso comercial). Para determinar la prevalencia de la infección se utilizó la fórmula planteada por diversos autores (27- 29):

$$n = 4 * P * (1-P) / L^2$$

donde:

n: tamaño de la muestra necesario

P: prevalencia esperada

L: error aceptado

Tomando como base una prevalencia del 10%, con un nivel de confianza del 95%, y un error aceptado del 5%, el tamaño mínimo de la muestra fue de 144 animales:

$$n = 4 * 0,10 * (1-0,10) / 0,05^2 = 144$$

Se tomaron entonces 15 animales en 10 muestreos durante 2 años para un total de 150 tilapias de 350 g seleccionadas al azar en 5 de los principales sitios de expendio en la ciudad de Bogotá (supermercados y plazas de mercado). Las muestras fueron analizadas por medio de las siguientes técnicas: inmunoperoxidasa indirecta (IPI) en tejidos de órganos aún presentes como cerebro, ojo, branquias y corazón; por microbiología, en cultivos en medio selectivo siguiendo la técnica utilizada por Nguyen *et al.* (26) y mencionada en el punto anterior; por biología molecular empleando la técnica de PCR para clasificación específica de los aislamientos.

Las colonias positivas se definieron por los mismos criterios antes citados para los aislamientos de los peces. Se inocularon vía intraperitoneal en tilapias de aproximadamente 10 g, y sus tejidos fueron sometidos a IPI utilizando anticuerpos policlonales contra *S. agalactiae*.

RESULTADOS

DETERMINACIÓN DE LA PREVALENCIA DE *S. agalactiae* EN GRANJAS PRODUCTORAS DE TILAPIA ROJA

Los aislamientos positivos fueron obtenidos a partir de muestras de cerebro, ojo y bazo. Estos se identificaron como cocos gGram positivos, oxidasa y catalasa negativa, no hemolíticos y crecieron a 37 °C. Posteriormente, fueron identificados como *S. agalactiae* mediante la prueba de PCR (Figura 1). Por la técnica de microbiología, la prevalencia general de aislamientos de *S. agalactiae* fue del 3,94%; en la Figura 2 se

puede observar la prevalencia correspondiente a cada granja visitada.

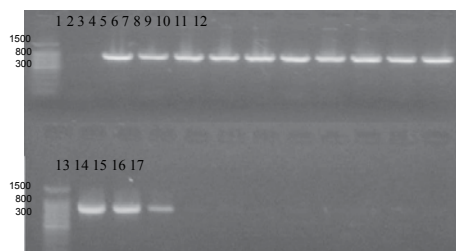


Figura 1. PCR simple para *S. agalactiae* mediante electroforesis en gel de agarosa. Columnas 1 y 13, marcador de peso molecular de 300 a 1500 pb; columna 2, aislamiento proveniente de tilapia de expendio; columnas 3 a 12 y 14 a 15, aislamientos provenientes de tejidos de peces muestreados en granjas; columnas 16 y 17, controles positivo y negativo, respectivamente.

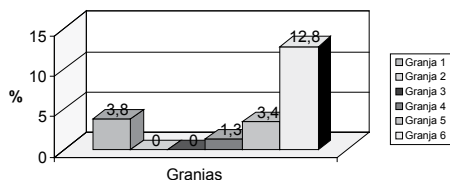


Figura 2. Prevalencia de aislamientos de *S. agalactiae* en tilapias de las seis granjas visitadas.

S. agalactiae U OTROS GÉNEROS DE COCOS RELACIONADOS PRESENTES EN EL AGUA Y FANGOS DE ESTANQUES DE CULTIVO DE TILAPIA

Seis aislamientos compatibles con *Streptococcus* spp. fueron identificados a partir del agua de los estanques (Figura 3); no se obtuvo aislamiento alguno a partir de fango. De los aislamientos del agua ninguno fue positivo por PCR simple o anidado para *S. agalactiae*. De la misma manera, la prueba de IPI para los tejidos de los peces inoculados con estos aislamientos a partir del agua fue negativa. Todos estos aislamientos fueron clasificados por la prueba de API20 Strep (Biomérieux®) como *Enterococcus faecalis* (con una validez de la prueba entre 99,1 y 99,3%).

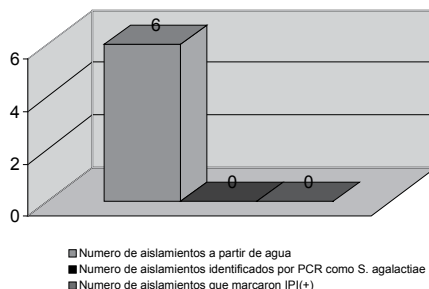


Figura 3. Cantidad de aislamientos a partir de agua, clasificación por PCR como *S. agalactiae*, y marcación positiva a IPI.

DETERMINACIÓN DE LA PREVALENCIA DE CEPAS DE *S. agalactiae* U OTROS GÉNEROS DE COCOS RELACIONADOS EN TILAPIAS DE EXPENDIO

En la Figura 4 se encuentran las prevalencias generales de los aislamientos compatibles con *Streptococcus* spp. obtenidos de muestras de ojo y cerebro, así como la prevalencia de marcación específica para *S. agalactiae* por la técnica IPI en tejidos de 150 tilapias de expendio. Se obtuvieron 10 aislamientos bacterianos (6,7%) pero solamente uno fue identificado por PCR como *S. agalactiae* (0,7%) y provenía de una plaza de mercado.

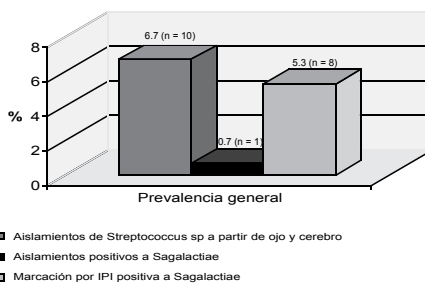


Figura 4. Prevalencia de aislamientos de *Streptococcus* spp. y de *S. agalactiae* (confirmado por PCR) a partir de ojo y cerebro, y marcación específica de *S. agalactiae* por la prueba de IPI a partir de tilapias de expendio.

En 8 de los 150 peces de expendio (5,3%) se observó la marcación específica para *S. agalactiae* por la técnica de IPI; debe anotarse que solamente 2 de estos 8 peces pertenecen al grupo a partir del cual se obtuvieron los aislamientos de *Streptococcus* spp.

Finalmente, de los peces que fueron inoculados con estos aislamientos y sometidos a IPI solo marcaron positivo los tejidos de aquellos animales inoculados con la misma cepa clasificada por PCR como *S. agalactiae*.

Los aislamientos negativos a *S. agalactiae* por PCR fueron sometidos a la prueba de API20 Strep (Biomérieux®), y fueron clasificados como *Enterococcus faecalis* (validez de la prueba entre 94,5 y 99,5%).

DISCUSIÓN

Los resultados del presente estudio permiten afirmar que hasta la fecha en el país sólo se ha aislado una especie de *Streptococcus* responsable de la enfermedad e infección en tilapias de cultivo identificada como *S. agalactiae*. De esta manera, se excluyen otros *Streptococcus* como *S. iniae* y otros cocos Gram positivos como causa de la estreptococosis en peces cultivados en Colombia. Por microbiología no se detectó crecimiento alguno diferente a *S. agalactiae* a partir de los tejidos de las tilapias provenientes de las granjas.

En el caso de tilapias obtenidas de expendio hubo mayor marcación específica por IPI que aislamientos microbiológicos correspondientes a *S. agalactiae*, lo cual corrobora la especificidad de esta técnica para la identificación de la bacteria. Se aisló *Enterococcus faecalis* a partir de nueve peces provenientes de expendio, y a partir del agua de cultivo. Este microorganismo no se considera agente inductor de lesiones o enfermedad en tilapias de manera natural, hasta el momento no existen pruebas de su patogenicidad, y nunca ha sido aislado de

peces enfermos de estreptococosis en el país; es probable que los aislamientos de *E. faecalis* obtenidos a partir de tejidos de tilapias de expendio fueran contaminados a partir del agua de cultivo con la cual a menudo se lavan los peces que se comercializan. *E. faecalis* es un habitante natural del tracto gastrointestinal de mamíferos, y también se encuentra frecuentemente en suelos, aguas y alimentos debido a contaminación fecal; sin embargo, dado que es un patógeno oportunista, causante de infecciones del tracto urinario, bacteremia y endocarditis en humanos es importante tener en cuenta este hallazgo para futuros estudios de salud pública (30, 31).

La correcta identificación de *S. agalactiae* y *S. iniae* ha sido complicada por las modificaciones en la taxonomía del género *Streptococcus*, por la fuente de infección, y por su cercana filogenia con otras bacterias Gram positivas que infectan los peces. El desarrollo de las técnicas moleculares ha llevado a cambios en la taxonomía y nomenclatura del género *Streptococcus*, lo que ha contribuido a delinear las diferencias de género y especie bacterianos. Para el diagnóstico de *S. agalactiae* en tilapias en nuestro medio se han estandarizado distintas técnicas para su identificación específica, estas se basan en microbiología convencional complementada con pruebas comerciales, el PCR simple y anidado, y la inmunohistoquímica (inmunoperoxidasa indirecta-IPI) con anticuerpos policlonales específicos, las cuales han demostrado una especificidad del 100% para el *S. agalactiae* (32).

Para este estudio se estandarizó una técnica de cultivo de cocos gram positivos a partir de aguas y fangos, la cual se recomienda para el aislamiento específico del género *Streptococcus* (26). Se obtuvieron aislamientos a partir de aguas, los cuales fueron compatibles con *Streptococcus* spp. –Gram positivos, catalasa y oxidasa negati-

va-, ninguno de los cuales pudo ser clasificado como *agalactiae* ni con PCR ni con IPI. Sin embargo, un estudio previo de nuestro grupo de investigación sí había logrado el aislamiento de *S. agalactiae* a partir del agua utilizando la misma técnica microbiológica. Una probable explicación de la baja especificidad de la técnica para identificar *S. agalactiae* a partir de estas fuentes puede ser el hecho de que la técnica de Nguyen *et al.* (26) fue diseñada para aislamiento de *S. iniae* y no *S. agalactiae*.

Aunque no se logró aislamiento alguno a partir del fango de los estanques de tilapia con la técnica utilizada, no se debe descartar esta fuente como posible reservorio del *S. agalactiae*. Con base en los resultados de este estudio se podría sugerir que el agua y el fango no son los principales medios de transmisión o reservorios importantes del microorganismo, y las tilapias serían las principales responsables del mantenimiento de esta bacteria en la población. Este hallazgo complementa de manera significativa lo reportado por Hernández *et al.* (32) quienes no demostraron la presencia de este microorganismo en otras poblaciones de peces silvestres estrechamente relacionados con los cultivos de tilapias, así como tampoco en aves predatoras u oportunistas que también están en contacto con esta especie comercial. No se puede excluir que estudios más sistemáticos con mayor cubrimiento espacial y temporal, eventualmente refutarán algunos de los hallazgos citados. Sin embargo, y sobre los resultados actualmente disponibles, se podría formular la hipótesis de que el control y la eventual erradicación de esta enfermedad en tilapias de cultivo utilizando distintas herramientas y estrategias serían objetivos alcanzables en el mediano plazo. Lo anterior también indica que se debe establecer un programa de vigilancia epidemiológica para todos los peces y productos relacionados con la piscicultura que

ingresan al país, dado el hecho de que, hasta el momento, en el país no se han reportado otros cocos Gram positivos responsables de estreptococosis.

Las infecciones humanas causadas por patógenos transmitidos a partir de los peces o desde el medio acuático son bastante comunes y dependen del contacto de las personas con los animales o el ambiente relacionado, de los hábitos alimenticios y el estado inmunológico del individuo expuesto. Aún más, los microorganismos patógenos facultativos para peces y humanos se pueden aislar de los primeros sin que tengan síntomas aparentes de enfermedad (33). Las infecciones en humanos debidas a diferentes agentes bacterianos se asocian comúnmente con el consumo de pescados o mariscos crudos (*Vibrios*) o cocinados inapropiadamente, o personas que han estado en contacto con peces infectados (*Mycobacterium*, *Edwardsiella tarda*, *Aeromonas* spp.) (34). El *S. iniae* ha sido aislado de pacientes humanos con historia de haber manipulado tilapias en Canadá y Estados Unidos, aunque no se reporta que *S. iniae* cause infección en humanos por ingestión de peces contaminados (17); en años más recientes se han reportado casos de infección en Hong Kong y Singapur (35, 36). El *S. agalactiae* es un patógeno importante en humanos, particularmente en neonatos, también es causa de enfermedad en una amplia variedad de especies animales incluyendo peces; sin embargo, las líneas que causan enfermedad en humanos al parecer son bioquímica, metabólica y serológicamente diferentes de aquellas que causan enfermedad en animales, por lo anterior, la transmisión zoonótica sería poco frecuente, y si existiera sería de poca importancia según el Centro para la Seguridad Alimentaria y Salud Pública de la Universidad de Iowa (37). De todas formas, se debe tener en cuenta que el *S. agalactiae* se ha recuperado de tejidos de pescados que han permanecido

congelados a -20° C durante 9 meses (38) y en el presente estudio este microorganismo se aisló por microbiología y se detectó por IPI a partir de cerebro y ojo de tilapias frescas listas para el consumo. En consecuencia, el riesgo de transmisión de *S. agalactiae* al humano a partir de tilapias es bajo; también son bajas las posibilidades de que esta bacteria desarrolle capacidades patógenas en este hospedero. Tales conclusiones se deducen tanto de la literatura como de los resultados de este estudio dada la baja prevalencia del *S. agalactiae* en órganos poco consumidos, y de las costumbres de cocción de los alimentos por parte de la población colombiana. No obstante, en los últimos tiempos se ha popularizado el consumo de pescado crudo según tradiciones internacionales; por lo anterior, y en términos de rigor científico, en el área de la salud pública se debe dejar constancia de la permanencia del *S. agalactiae* en tilapias listas para el consumo generalizado.

CONCLUSIONES

Los resultados nos permiten afirmar que hasta la fecha sólo se reporta *S. agalactiae* causando infección o enfermedad en tilapias de cultivo en Colombia, y que esta especie fética es el principal reservorio de la bacteria en las granjas. El riesgo para el consumo humano hasta ahora es muy bajo, el cual se puede disminuir aún más con un manejo adecuado de los peces al momento de su preparación y consumo. Se debe establecer un programa de prevención de ingreso de otros cocos gram positivos al país.

AGRADECIMIENTOS

Este estudio fue financiado por el Instituto Colombiano para el Desarrollo de la Ciencia y la Tecnología (Colciencias).

Los autores agradecen el apoyo brindado por el señor Gilberto Córdoba, histotecnólogo del Laboratorio de Patología Interfacultades de la Universidad Nacional de Colombia,

a los propietarios de las granjas incluidas en el estudio, y a los supermercados Carulla, Cafam y Carrefour por su interés en el desarrollo del mismo.

REFERENCIAS

1. Toranzo AE, Devesa S, Heinen P, Riasa A, Nuñez, Borja JL. Streptococcosis in cultures turbot caused by a *Enterococcus* -like bacterium. Bull Eur Assoc Fish Pathol; 1:19-23; 1994.
2. Toranzo A, Magariños B, Romalde J. A review of the main bacterial fish diseases in mariculture systems. Aquaculture; 246:37-61; 2005.
3. Akhlaghi M, Munday B, Whittington R. Comparison of passive and native immunization of fish against streptococcosis (enterococcosis). J Fish Dis; 19:251-258; 1996.
4. Múzquiz J, Royo F, Ortega C, de Blas I, Ruiz I, Alonso J. Pathogenicity of Streptococcosis in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): dependence of age of diseased fish. Bull. Eur. Ass. Fish Pathol; 19:114-119; 1999.
5. Kusuda R, Salati F. Major bacterial diseases affecting mariculture in Japan. Ann Rev Fish Dis; 20:69-83; 1993.
6. Pier GB, Madin SH, Al-Nakeeb S. Isolation and characterization of a second isolate of *Streptococcus iniae*. International Journal of Systematic Bacteriology; 28:311-314; 1978.
7. Kusuda R, Hawai K, Salati F, Banner C, Fryer J. *Enterococcus seriolicida* sp. Nov., a fish pathogen. Int J Syst Bacterial; 41:406-409; 1991.
8. Prieta J, Doménech AM, Fernández-Garayzábal JF, Collins MD, Rodrigues UM, Jones D, Rodríguez A, Domínguez L. Lactococcosis de la trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*). Med Vet; 10:367-373; 1993.
9. Eldar A, Bejarano Y, Bercovier H. *Streptococcus shiloi* and *Streptococcus difficile* two new streptococcal species causing a meningoencephalitis in fish. Curr Microbiol; 28:139-143; 1994.

10. Domenech A, Fernández-Garayzábal J, Pascual C, García J, Cutuli M, Moreno M, Collins M, Domínguez L. Streptococcosis in cultured turbot, *Scophthalmus maximus* (L.), associated with *Streptococcus parauberis*. J Fish Dis; 19:33-38; 1996.
11. Michel C, Nougaryede P, Eldar A, Sochon A, Kinkelin P. *Vagococcus salmoninarum*, a bacterium of pathological significance in rainbow trout (*Onchorynchus mykiss*) farming. Dis Aquat Org; 30:199-208; 1997.
12. Nomoto R, Munasinghe LI, Jin DH, Shimahara Y, Yasuda H, Nakamura A, et al. Lancefield group C *Streptococcus dysgalactiae* infection responsible for fish mortalities in Japan. Fish Dis; 27:679-86; 2004.
13. Agnew W, Barnes A. *Streptococcus iniae*: An aquatic pathogen of global veterinary significance and a challenging candidate for reliable vaccination. Veterinary Microbiology; 122:1-15; 2007.
14. Bercovier H, Ghittino C, Eldar A. Immunization with bacterial antigens: infections with *Streptococci* and related organisms. Fish Vaccinology; 90:153-160; 1997.
15. Shoemaker C, Klesius P. Streptococcal diseases problems and control a review. En: Fitzsimmons K, editor. Tilapia Aquaculture 2. Proceedings of the 4th international symposium on tilapia in aquaculture; Florida, US. Northeast Regional Agricultural Engineering Service, Ithaca, NY; p. 671-680; 1997.
16. Rey A, Iregui C, Verjan N. [Clinical and pathological diagnosis of outbreaks disease in tilapia roja (*Oreochromis spp.*)] Esp Rev Med Vet Zoot; 49:13-21; 2003.
17. Weinstein M, Litt M, Kertesz D, Wyper P, Rose D, Coulter M et al. Invasive Infections due to a Fish Pathogen, *Streptococcus iniae*. The New England J of Medicine; 337:589-594; 1997.
18. Yuasa K, Kitanchaen N, Kataoka Y, Al-Murbaty F. *Streptococcus iniae*, the Causative Agent of Mass Mortality in Rabbitfish *Siganus canaliculatus* in Bahrain. J Aquatic Animal Health; 11:87-93; 1999.
19. Evans J, Klesius PH, Glibert PM, Shoemaker CA, Al Sarawi MA, Landsberg J et al. Characterization of beta-haemolytic Group B *Streptococcus agalactiae* in cultured sea bream, *Sparus auratus* L and wild mullet, *Liza klunzingeri* (Day), in Kuwait. J Fish Dis; 25:505-513; 2002.
20. Bromage E, Thomas A, Owens L. *Streptococcus iniae*, a bacterial infection in barramundi *Lates calcarifer*. Dis Aquat Organ; 36:177-181; 1999.
21. Pulido A, Iregui C, Figueroa J, Klesius P. [Streptococcosis in tilapias cultured in Colombia]. Esp Revista Aquatic (serial on-line) 2004 Jan-Jun [Cited 08/05/2007] URL: <http://www.revistaaquatic.com/aquatic/art.asp?t=p&c=170>.
22. Wilkinson HW, Thacker LG, Facklam RR. Nonhaemolytic group B *Streptococci* of human, bovine and ichthyic origin. Infection and Immunity; 7:496-498; 1973.
23. Duremdez R, Al-Marzouk A, Qasem JA, Al-Harbi A, Gharabally H. Isolation of *Streptococcus agalactiae* from cultured silver pomfret, *Pampus argenteus* Euphrasen, in Kuwait. J Fish Diseases; 27:307-310; 2004.
24. Iregui C, Hernández E, Jiménez A, Pulido A, Rey A, Comas J, Peña L, Rodríguez M, editors. [First epidemiological map of the lesions and diseases of fish in Colombia] Esp Bogotá, D.C.; 2004.
25. Blanch A. [Diagnostic techniques of fish diseases] Esp. In: Espinosa de Monteros y Labarta, editors [Aquaculture pathology] Esp CAICT Madrid; p. 391-425; 1998.
26. Nguyen H, Kanai K, Yoshikoshi K. Ecological investigation of *Streptococcus iniae* in cultured Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*) using selective isolation procedures. Aquaculture; 205:7-17; 2002.
27. Martin SW, Meek AH, Willeberg P. Veterinary Epidemiology: principles and methods. Iowa, Iowa State University Press/Ames 1987.
28. Ortega C, De Blas I. [Selection of samples for population study in aquaculture] Esp. Revista

- AquaTIC (serial online), 1998 May [Cited 03/05/2007] URL: <http://www.revistaaquatic.com/aquatic/art.asp?t=h&c=31>
29. De Blas I. [Applications of epidemiology in Aquaculture: analysis and design of epidemiological studies of WSSV in shrimp, and applications in fish farming]. Panorama acuícola magazine (serial online); 2004 Jun. URL: http://www.panoramaacuicola.com/noticia.php?art_clave=701
30. Murray BE. The life and times of the enterococcus. Clin Microbiol Rev; 3:46-65; 1990.
31. Anbumani N, Kalyani J, Mallika M. Isolation, distribution and prevalence of various species of enterococci isolated from clinical specimens in a tertiary care hospital. Indian J Pathol Microbiol; 48:534-537; 2005.
32. Hernandez E, Figueroa J, Iregui C. Epidemiological characterization of streptococcosis on a red tilapia (*Oreochromis* spp.) fish-farm. J Fish Dis; in press; 2007.
33. Novotny L, Dvorska L, Lorencova A, Beran V, Pavlik I. Fish: a potencial source of bacterial pathogens for human beings. Vet Med; 49:343-358; 2004.
34. Greenlees K, Machado J, Bell T, Sundlof S. Foodborne microbial pathogens of cultured aquatic species. Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice; 14:101-112; 1998.
35. Lau S, Woo P, Tse H, Leung K, Wong S, Yuen K. Invasive *Streptococcus iniae* infectious outside North America. J Clin Microbiol; 41:1004-9; 2003.
36. Koh T, Kurup A, Chen J. *Streptococcus iniae* discitis in Singapore. Emerging Infectious Diseases; 10:1694-6; 2004.
37. Center for Food Security and Public Health. Streptococcosis. Iowa state University; 2005.
38. Evans J, Wiedenmayer A, Klesius P, Shoemaker C. Survival of *Streptococcus agalactiae* from frozen fish following natural and experimental infections. Aquaculture; 233:15-21; 2004.