

La Enfermedad de Invierno en la producción de Dorada: Aspectos microbiológicos

María del Mar Blanco, Alicia Gibello, José Francisco Fernández-Garayzábal, Lucas Domínguez
Dpto. Sanidad Animal, Fac. de Veterinaria, Univ. Complutense de Madrid (España)

Introducción

En términos de producción, la Dorada (*Sparus aurata*) constituye la especie piscícola marina más cultivada en España y Portugal, y una de las más importantes en toda la costa del Mediterráneo. Su cultivo es uno de los que mayor crecimiento ha experimentado en los últimos años, estimándose la producción anual de Dorada en España en unas 12 000 Tm en 2002 (JACUMAR).

Como en toda explotación animal sometida a cría intensiva, los cultivos de Dorada sufren distintas patologías que ocasionan pérdidas económicas al sector productivo. El conocimiento de estas patologías (su etiología, factores de riesgo, periodo de aparición, etc.) es fundamental a la hora de aplicar posibles tratamientos y, fundamentalmente, para establecer las medidas adecuadas para su prevención.

Una de las patologías que más afectan a la Dorada durante la época invernal, y que más preocupan a los piscicultores, es la denominada "Enfermedad o Síndrome de Invierno". Este proceso aparece durante los meses de mayor frío, causando mortalidades en las explotaciones de hasta el 30% de los animales (Doménech y cols, 1997). La temperatura juega un papel fundamental en la enfermedad, sobre todo en relación con el descenso brusco de la temperatura que se produce en el agua entre los meses del otoño, donde puede oscilar entre los 17 y 20°C, y el invierno en el que se pueden registrar entre los 7 y los 12°C de media. Sin embargo, el descenso de la temperatura del agua no es el único factor predisponente para la enfermedad; existen otros factores ambientales y fisiológicos que resultan igualmente determinantes en el desarrollo de la misma: las variaciones en la salinidad del agua, el estado inmunológico del animal y las condiciones de estrés asociado al cultivo intensivo (Cinquina y cols, 1998; Tort y cols, 1998; Sarusic y Bavcevic, 2000). No es extraño que en estas condiciones, las Doradas sean más susceptibles a las infecciones por microorganismos (Reno, 1998). En este sentido, se ha comprobado que existe una clara relación entre la Enfermedad de Invierno de la Dorada y la infección en estos animales por *Pseudomonas anguilliseptica* (Doménech y cols, 1997 y 1999).

La Enfermedad de Invierno, en resumen, constituye una patología de naturaleza multifactorial, en cuyo desarrollo intervienen como factores determinantes el descenso de la temperatura y, desde el punto de vista microbiológico, la infección por *P. anguilliseptica*.

Sintomatología

El signo que hace sospechar la aparición de un brote de Enfermedad de Invierno es el aumento brusco de la mortalidad en la explotación, coincidiendo con un descenso brusco de la temperatura. Los porcentajes de mortalidad observados oscilan entre el 10 y el 15%, aunque en algunas explotaciones alcanza porcentajes de hasta el 30% de los animales (Doimi, 1996; Doménech y cols, 1997).

La sintomatología de las Doradas afectadas por el Síndrome de Invierno es, en principio, poco específica: los animales afectados son tanto jóvenes como adultos, y presentan una natación lenta y errática, disponiéndose ladeados sobre un costado cerca de la superficie y en estado semiletárgico. Al cabo de uno o dos días, los animales enfermos caen al fondo del tanque o jaula.

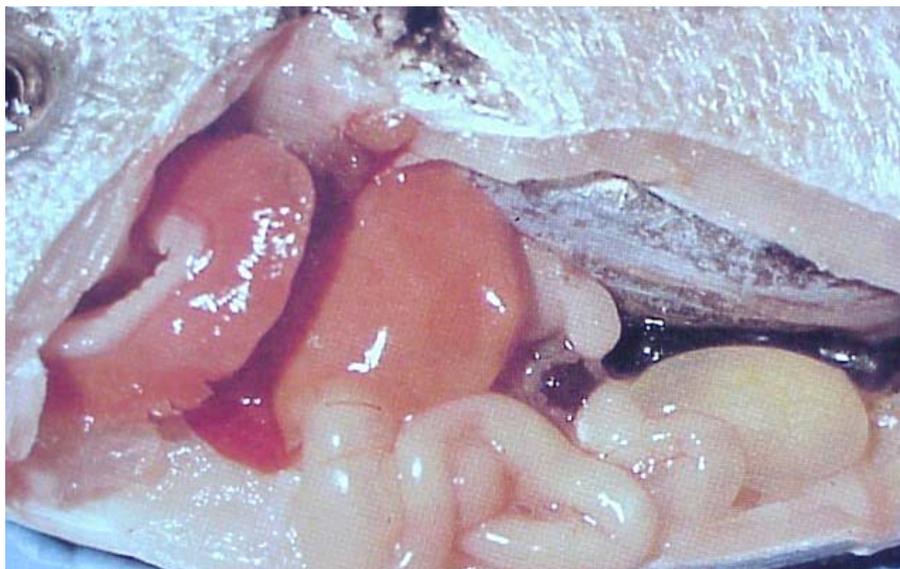
Externamente, el síntoma más evidente es la distensión abdominal producida por la acumulación de abundante líquido ascítico (Figura 1) (Bovo y cols, 1995; Berthe y cols, 1995; Doimi, 1996; Doménech y cols, 1999). También se han observado en ocasiones otras alteraciones como queratitis, petequias y úlceras en la piel, y enrojecimiento de la boca y base de las aletas (Bovo y cols, 1995; Berthe y cols, 1995; Doimi, 1996).

Figura 1. Sintomatología de la Enfermedad de Invierno: abdomen distendido por la acumulación de líquido ascítico, y afectación de los órganos abdominales.



Al hacer la necropsia de los peces se observa la presencia de abundante líquido ascítico. Además, se ven afectados los órganos abdominales, pues el proceso cursa con infección septicémica: el hígado aparece pálido y aumentado de tamaño, pudiendo observarse en él ocasionalmente petequias, al igual que en el bazo. El riñón se ve aumentado de tamaño, y se pueden apreciar hemorragias petequiales en riñón y en peritoneo. La lesión más característica del proceso es el intestino hemorrágico, con un exudado fibrinoso y amarillento en su interior (Figura 2) (Doimi, 1996; Tort, y cols, 1998; Doménech y cols, 1999).

Figura 2. Sintomatología de la Enfermedad de Invierno: abdomen distendido por la acumulación de líquido ascítico, y afectación de los órganos abdominales.



Histológicamente, durante el curso de la enfermedad se produce una pancreatitis difusa, de subaguda a crónica, con atrofia de la estructura pancreática. En el intestino se aprecia una evidente enteritis descamativa, con infiltración de células granulares eosinófilas y linfocitos; en algunos casos se aprecian lesiones necróticas en la zona apical de los pliegues intestinales (Tort y cols, 1998; Berton). En alguna ocasión se ha observado también, encefalitis en los animales afectados (Padrós y Crespo, 2002).

Etiología

Aunque siempre se han considerado fundamentales los condicionantes de tipo ambiental y fisiológico para la aparición de la enfermedad, desde el punto de vista microbiológico ha existido una cierta confusión respecto a los posibles microorganismos asociados a este síndrome: al darse una serie de circunstancias que provocan inmunodepresión en los animales, éstos son más susceptibles a una infección por las bacterias presentes en el ambiente, pudiendo comportarse éstas como patógenos oportunistas. Varias han sido las especies microbianas que se han asociado a la Enfermedad de Invierno, como *Aeromonas hydrophila*, *Photobacterium damselae*, así como distintos tipos de virus (Bovo y cols, 1995; Cinquina y cols, 1998). No obstante, los estudios realizados durante los últimos años a este respecto, muestran que existe una clara asociación entre la aparición de la Enfermedad de Invierno de la Dorada y la infección en estos animales por *P. anguilliseptica* (Doménech y cols, 1997 y 1999; Zarza y Fonlut, 2002; Hernández y cols, 2002).

P. anguilliseptica ha sido identificada como el agente etiológico de la Enfermedad del Punto Rojo, un proceso caracterizado por la aparición de hemorragias petequiales en la piel (Figura 3). Esta enfermedad se describió por primera vez en las Anguilas japonesas en 1972 (Wakabayashi y Egusa, 1972). En 1981 la Enfermedad del Punto Rojo se describe en la Anguila europea en Escocia (Nakai y Muroga, 1982) y desde entonces se ha extendido por toda Europa y a otras especies como el Salmón del Atlántico y otros salmónidos (Wiklund y Bylund, 1990), la Lubina y la Dorada (Berthe y cols, 1995) y la Perca cultivada (Al-Marzouk, 1999).

Figura 3. Enfermedad del Punto Rojo en Anguila: típicas Petequias en la piel.



P. anguilliseptica es una bacteria Gram negativa con forma de bacilo largo y estrecho, que forma colonias blanquecinas o blanco-grisáceas, planas y brillantes en medios de cultivo Agar Triptosa-Soja (TSA) y Columbia-sangre. Aunque la bacteria es capaz de crecer entre los 5°C y los 29°C, uno de los factores más críticos en el desarrollo de las enfermedades producidas por *P. anguilliseptica* es la temperatura del agua. Esta dependencia entre el desarrollo de la enfermedad y la temperatura responde a la influencia de ésta sobre las características fisiológicas de la bacteria, que tiene una temperatura óptima de crecimiento en el rango de 15 a 20°C. Así, por ejemplo, la motilidad de *P. anguilliseptica* disminuye a medida que aumenta la temperatura (Muroga y cols, 1977; Berthe y cols, 1995). Otro de los factores ambientales que más influyen en el crecimiento y viabilidad de *P. anguilliseptica* es la salinidad. La bacteria presenta un crecimiento óptimo a una concentración de sal comprendida entre el 0,5 y el 1% pero puede crecer a concentraciones de sal entre 0-4% (Stewart y cols, 1983), lo que incluye tanto ambientes marinos como salobres.

Como se ha descrito anteriormente, *P. anguilliseptica* es una bacteria capaz de infectar y causar enfermedad en distintas especies de peces, principalmente en ambientes marinos. Los estudios realizados muestran la homogeneidad fenotípica y genética de *P. anguilliseptica* aislada a partir de diferentes especies de peces (Berthe y cols, 1995); sin embargo, la patogenicidad de esta bacteria varía para las diferentes especies a las que afecta (Lönnström y cols, 1994). En este sentido, los estudios serológicos realizados con esta bacteria, muestran la presencia de distintos serotipos de *P. anguilliseptica* en función de la especie afectada (Nakai y cols, 1981; Wiklund y Bylund, 1990; López-Romalde y cols, 2003).

Diagnóstico de la Enfermedad de Invierno

Normalmente la Enfermedad de Invierno de la Dorada se diagnostica fácilmente por la sintomatología mostrada por los animales durante la época de riesgo (desde el otoño a la primavera). Sin embargo, la implicación de *P. anguilliseptica* en esta enfermedad ha resultado muy controvertida debido, en parte, a la dificultad del aislamiento e identificación de esta bacteria. *P. anguilliseptica* es una bacteria de crecimiento lento, necesiándose al menos cinco días para su aislamiento en medios de cultivo a partir de

muestras clínicas. Además, a nivel bioquímico, el comportamiento inerte de la bacteria dificulta su identificación, y esta circunstancia unida al hecho de que *P. anguilliseptica* no está incluida en ninguna base de datos de sistemas comerciales de identificación bioquímica ha hecho que, en muchos casos de Enfermedad de Invierno, el agente etiológico de la enfermedad no se haya podido identificar correctamente (Doimi y cols, 1996) o, como se ha mencionado anteriormente, se haya atribuido a otros patógenos oportunistas de crecimiento más rápido presentes en las muestras.

Las características morfológicas de la bacteria, y la reacción positiva a la prueba de la oxidasa, pueden resultar indicativas de *P. anguilliseptica* cuya identificación a nivel bioquímico se puede realizar utilizando las galerías comerciales API 20E y API ZYM (bioMérieux) conjuntamente, contrastando los resultados obtenidos con los descritos para esta bacteria (Doménech y cols, 1997). No obstante, el crecimiento lento de esta bacteria hace que sean necesarios al menos diez días para su aislamiento e identificación completa a partir de las muestras clínicas. La lentitud del crecimiento bacteriano, que retrasa considerablemente el diagnóstico, hace necesaria la aplicación de métodos de diagnóstico alternativos, como los basados en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), que posibiliten la detección rápida y fiable del agente causal de la enfermedad (Gibello y cols, 2001).

En nuestro laboratorio hemos desarrollado un ensayo basado en la reacción de PCR específica para *P. anguilliseptica* que acelera significativamente la identificación de esta bacteria y su detección en muestras clínicas facilitando, por tanto, el diagnóstico de los procesos en los que esta bacteria está implicada (Blanco y cols, 2002). El sistema de PCR se ha diseñado para la amplificación de un fragmento de 439 pares de bases del ADN que codifica el ARN 16S de la bacteria, utilizando dos oligonucleótidos o iniciadores de las zonas no conservadas del gen en *P. anguilliseptica*, y que no se encuentran en otras bacterias filogenéticamente relacionadas, incluidas distintas especies de *Pseudomonas* (Figura 4). Este sistema de PCR permite la detección de 200 bacterias por reacción de PCR y de $3,4 \times 10^4$ bacterias/g de tejido en 8 horas, a partir de la necropsia de los animales enfermos (Blanco y cols, 2002).

Figura 4. Especificidad de la técnica de PCR: sólo las cepas de *P. anguilliseptica* mostraron reacción positiva.



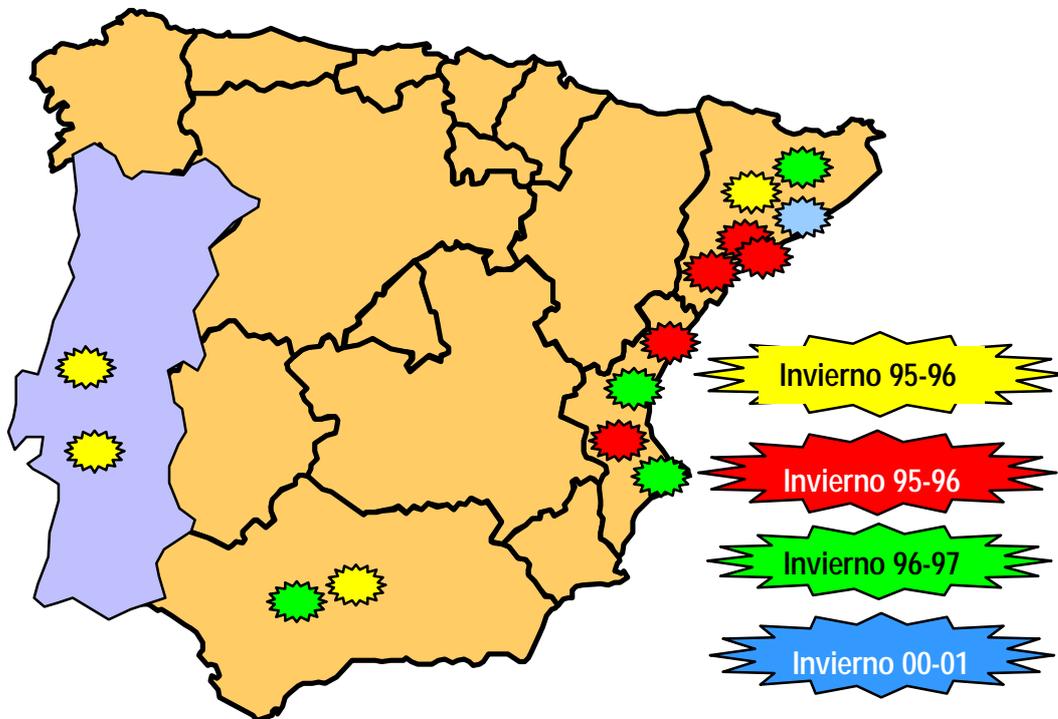
Epidemiología

A pesar de la importancia clínica y comercial de las infecciones causadas por *P. anguilliseptica*, no se han realizado apenas trabajos encaminados a estudiar las relaciones epidemiológicas entre los aislados de esta bacteria a partir de diferentes brotes, así como la fuente de infección y la forma de transmisión de este microorganismo.

Los pocos estudios realizados en este sentido se han centrado principalmente en la caracterización por métodos bioquímicos y serológicos de los aislados de *P. anguilliseptica* a partir de diferentes especies piscícolas (Michel y cols, 1992; Wiklund y Lönström, 1994; Berthe y cols, 1995).

Sin embargo, no se había abordado anteriormente un estudio encaminado a establecer las posibles relaciones epidemiológicas entre los aislados de *P. anguilliseptica* implicados en los brotes de Enfermedad del Invierno en Dorada. Por este motivo, en nuestro laboratorio hemos realizado un estudio epidemiológico mediante la técnica de Electroforesis de Campo Pulsado (PFGE), en el que se han incluido un buen número de aislados de *P. anguilliseptica* obtenidos a partir del análisis microbiológico en Doradas afectadas de la Enfermedad del Invierno en España y Portugal en un periodo comprendido entre los años 1996 y 2001 (Figura 5) (Blanco y cols, 2002).

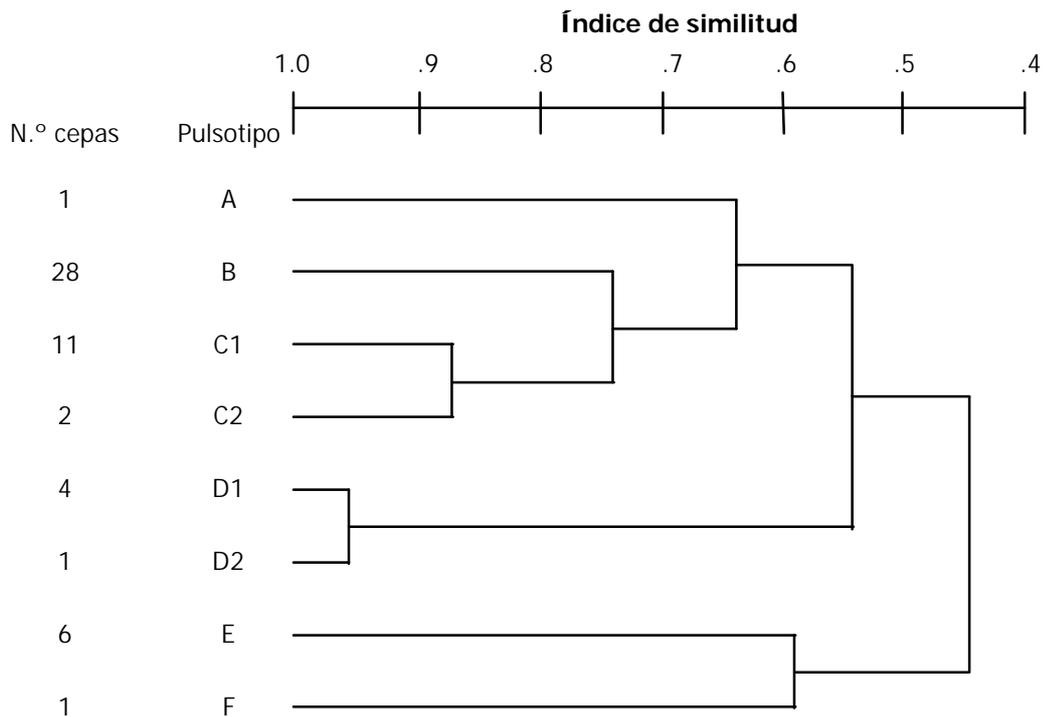
Figura 5. Brotes de la enfermedad de invierno incluidos en el estudio epidemiológico mediante la técnica molecular de PFGE.



De los resultados del estudio realizado se han obtenido unas conclusiones significativas desde el punto de vista epidemiológico de la enfermedad: se obtuvieron cuatro perfiles genéticos distintos, que, además, mostraron una fuerte correlación con los perfiles bioquímicos obtenidos (Figura 6).

La gran mayoría de los aislados (78,8%) pertenecía a dos grupos genéticos (53,8 y 25% respectivamente), correspondientes a los brotes acaecidos principalmente en las regiones de Cataluña y Levante a lo largo de todo el periodo de tiempo estudiado (1996-2001). Otro grupo, relativamente alejado de los anteriores, correspondía a los aislados de los brotes ocurridos en España (Andalucía y Cataluña) y en Portugal en el año 1996; y un cuarto grupo incluía los nuevos aislados responsables de algunos de los brotes detectados en Cataluña en el año 2001.

Figura 6. Dendograma.



Uno de los resultados más interesantes del estudio es el de haber obtenido aislados pertenecientes al mismo grupo genético a partir de brotes ocurridos en las mismas explotaciones en años sucesivos. Esto podría indicar, bien la presencia de animales portadores de *P. anguilliseptica* en la piscifactoría, o bien la alta supervivencia de esta bacteria en la explotación (en el agua, materiales, etc.). El estado de portador de los peces podría explicar la aparición de un mismo brote en zonas distantes de España y Portugal en un solo año, por el comercio de animales entre las diferentes piscifactorías. Otra de las observaciones a tener en cuenta es el hecho de que la mayor parte de los aislados responsables de los brotes estudiados pertenezcan únicamente a dos grupos genéticos, sugiriendo que quizás éstos podrían presentar mayor potencial patógeno para la Dorada.

Además, su distribución en diferentes áreas geográficas, y su aislamiento el mismo año de diferentes piscifactorías muy alejadas geográficamente, sugiere que *P. anguilliseptica* es una bacteria ampliamente diseminada, que habría surgido como un patógeno para la Dorada con el desarrollo de su explotación intensiva, unido a las condiciones ambientales desfavorables para la fisiología de la Dorada.

Prevención y tratamiento

Al tratarse de un síndrome de naturaleza multifactorial, la mejor prevención consiste en reducir lo más posible todos los factores de riesgo implicados en el proceso mediante manejo adecuado, dieta e inmunoprofilaxis. La vigilancia continua del estado higiénico-sanitario de los estanques y el mantenimiento de bajas densidades de peces en los mismos, constituyen las prácticas de manejo dirigidas a reducir el estrés. Otro de los factores de riesgo es el estado nutritivo de la Dorada y, en este sentido, se ha estudiado el efecto de la aplicación de una dieta especial durante el otoño y el invierno: se trata de la administración de un pienso altamente digestible, al que se

incorporan ácidos grasos poliinsaturados, del tipo omega-3 y además, vitaminas, selenio orgánico e inmunoestimulantes para potenciar el sistema inmunológico del pez (Sarusic y Bavcevic, 2000; Coutteau y cols, 2001; Zarza y Fonlut, 2002). Además, estudios recientes de vacunación han mostrado la reducción significativa de la mortalidad en los animales no estresados y alimentados con la dieta adecuada, a los que se aplicó una autovacuna inactivada frente a *P. anguilliseptica* (Zarza y Fonlut, 2002).

Una vez desencadenada la enfermedad, el tratamiento con antibióticos suele ser eficaz en el control y erradicación de los brotes, pero es normal que, tras finalizar el tratamiento, si el resto de los factores de riesgo persisten, se vuelvan a producir nuevos focos de la enfermedad. Aunque en general *P. anguilliseptica* resulta susceptible a cualquiera de los antibióticos normalmente utilizados en acuicultura, los estudios realizados en nuestro laboratorio demuestran que la utilización de ácido oxolínico y de la oxitetraciclina, resultan eficaces tanto *in vivo* como *in vitro*, no habiéndose encontrado, hasta la fecha, bacterias resistentes a cualquiera de estos dos antimicrobianos.

Conclusiones

Los estudios realizados en los últimos años sobre la Enfermedad de Invierno de la Dorada ponen de manifiesto la implicación de *P. anguilliseptica* como agente etiológico de este proceso.

La técnica de PCR ha demostrado ser una técnica específica y sensible, que facilita y agiliza notablemente la detección de *P. anguilliseptica* en el diagnóstico de la Enfermedad de Invierno.

Los estudios realizados mediante la técnica molecular de PFGE muestran las relaciones epidemiológicas entre los aislados de *P. anguilliseptica* en distintos brotes del síndrome. No obstante, estos estudios sugieren la necesidad ahondar en el conocimiento de las interrelaciones de este patógeno con los distintos factores que influyen en la aparición de la Enfermedad de Invierno en la Dorada, con el fin de facilitar el establecimiento las medidas dirigidas a su tratamiento y, fundamentalmente, a su prevención.

Bibliografía

1. Al-Marzouk, A.E. (1999). Association of *Pseudomonas anguilliseptica* with mortalities in cultured marine orange-spotted grouper *Epinephelus coioides* in Kuwait. *Fish Pathol.*, 34:167-168
2. Berthe, F.C.J., C. Michel y J.F. Bernardet. (1995). Identification of *Pseudomonas anguilliseptica* isolated from several fish species in France. *Dis. Aquat. Organ.*, 21:151-155
3. Berton, D. URL: <http://www.anapatvet.unimi.it/contr18.htm>
4. Blanco, M.M., A. Gibello, A.I. Vela, M.A. Moreno, L. Domínguez y J.F. Fernández-Garayzábal. (2002). PCR detection and PFGE DNA macrorestriction analyses of clinical isolates of *Pseudomonas anguilliseptica* from winter disease outbreaks in sea bream *Sparus aurata*. *Dis. Aquat. Organ.*, 50:19-27
5. Bovo, G., F. Borghesan, M. Comuzzi, G. Ceschia y G. Giorgetti. (1995). "Winter disease" in orate di allevamento: osservazioni preliminari. *Boll. Soc. It. Patol. Ittica.*, 17:2-11
6. Cinquina, A., A. Raponi, D. Barchi, R. Cozzani, L. Gennari, F. di Giambardino y S. Bilei. (1998). Residui di flumequine in orate. *Ricerche in corso di winter disease. Obiettivi Documenti Veterinari*, 10:57-62

7. Coutteau, P., R. Robles, G. de Nigris, A. Cirillo, P. Vestraete y L. Tort. (2001). Nutritional solutions to winter syndrome in gilthead seabream, *Sparus aurata* verification at a land-based farm. En: Aquaculture Europe 2001: new species, new technologies. Trondheim, Noruega
8. Doimi, M. (1996). A new winter disease in sea bream (*Sparus aurata*): a preliminary report. Bull. Eur. Ass. Fish Pathol., 16:17-18
9. Doménech, A., J.F. Fernández-Garayzábal, P. Lawson, J.A. García, M.T. Cutuli, M. Blanco, A. Gibello, M.A. Moreno, M.D. Collins y L. Domínguez. (1997). Winter disease outbreak in sea-bream (*Sparus aurata*) associated with *Pseudomonas anguilliseptica* infection. 156:317-326
10. Doménech, A., J.F. Fernández-Garayzábal, J.A. García, M.T. Cutuli, M. Blanco, A. Gibello, M.A. Moreno y L. Domínguez. (1999). Association of *Pseudomonas anguilliseptica* infection with "winter disease" in sea bream, *Sparus aurata*. L. J. Fish Dis., 22:69-71
11. Gibello, A., M.M. Blanco, L. Domínguez y J.F. Fernández-Garayzábal. (2001). Utilización de la PCR para el diagnóstico en Ictiopatología. Revista AquaTIC 15 URL: <http://www.revistaaquatic.com/aquatic/art.asp?t=h&c=130>
12. Hernández, A., C. Liarte, L. Acerete, J.C. Balasch, A. Todgham y L. Tort (2002). Hepatic cellular response in gilthead sea bream induced by sudden water temperature changes. En: International Congress on the Biology of Fish. Vancouver, Canadá
13. JACUMAR, URL: <http://www.mapya.es/jacumar/jacumar.asp>
14. Michel, C., J.F. Bernardet y D. Dinand. (1992). Phenotypic and genotypic studies of *Pseudomonas anguilliseptica* strains isolated from farmed European eels (*Anguilla anguilla*) in France. Fish Pathol., 27:229-232
15. Lönnström, L., T. Wiklund y G. Bylund. (1994). *Pseudomonas anguilliseptica* isolated from Baltic herring *Clupea harengus* membras with eye lesions. Dis. Aquat. Organ., 18:143-147
16. López-Romalde, S., B. Magariños, C. Ravelo, A.E. Toranzo y J.L. Romalde. (2003). Existence of two O-serotypes in the fish pathogen *Pseudomonas anguilliseptica*. Vet. Microbiol., 94:325-333
17. Muroga, K., T. Nakai y T. Sawada. (1977). Studies on red spot disease of pond-cultured eels-IV. Physiological characteristics of the causative bacterium, *Pseudomonas anguilliseptica*. Fish Pathol., 12:33-38
18. Nakai, T. y K. Muroga. (1982). *Pseudomonas anguilliseptica* isolated from European eels (*Anguilla anguilla*) in Scotland. Fish Pathol., 17:147-156
19. Nakai, T., K. Muroga y H. Wakabayasi. (1981). Serological properties of *Pseudomonas anguilliseptica* in agglutination. Bull. Jpn Soc. Sci. Fish., 47:699-703
20. Padrós, F. y S. Crespo. (2002). Encephalitis associated with *Pseudomonas anguilliseptica* infection in winter syndrome affected sea bream *Sparus aurata*. En: Aquaculture Europe 2002: seafarming today and tomorrow. Trieste, Italia. 407 pp
21. Reno, P.W. (1998). Factors involved in the dissemination of disease in fish populations. J. Aquat. Anim. Health, 10:160-171
22. Sarusic, G. e Y.L. Bavcevic. (2000). Nutrition as possible ethiological agent of winter disease syndrome in sea bream. Ribarstvo, 58:153-161.
23. Stewart, D.J., K. Woldemariam, G. Dear y F. Mochaba. (1983). An outbreak of "Sekitenbyo" among cultured European eels, *Anguilla anguilla* L., in Scotland. J. Fish Dis., 6:75-76
24. Tort, L., F. Padrós, J. Rotllant, y S. Crespo. (1998). Winter syndrome in the gilthead sea bream *Sparus aurata*. Immunological and histopathological features. Fish Shellfish Immun., 8:37-47
25. Wakabayasi, H. y S. Egusa. (1972). Characteristics of a *Pseudomonas* sp. from an epizootic of pond-cultured eels (*Anguilla japonica*). Bull. Japan. Soc. Scient. Fish., 38:577-587
26. Wiklund, T. y G. Bylund. (1990). *Pseudomonas anguilliseptica* as a pathogen of salmonid fish in Finland. Dis. Aquat. Org., 8:13-19
27. Wiklund, T. y L. Lönnström. (1994). Occurrence of *Pseudomonas anguilliseptica* in Finnish fish farms during 1986-1991. Aquaculture, 126:211-217
28. Zarza, C. y F. Fonlut. (2002). Control del "Síndrome de Invierno" en Dorada. URL: <http://www.mispecies.com/estudios/2003/tro-uw-sind-inv.pdf>