



# Instituto Valenciano de Microbiología

Masía El Romeral  
Ctra. Bétera – San Antonio de Benagéber, Km 0,3  
46117 Bétera (Valencia)  
Tel. 96 169 17 02  
Fax 96 169 16 37  
e-mail: [ivami@ivami.com](mailto:ivami@ivami.com)  
[www.ivami.com](http://www.ivami.com)

## Pruebas con mejillón cebra Información complementaria de las pruebas realizadas

### Características generales de la prueba

Nuestro laboratorio ofrece la detección de larvas de mejillón cebra mediante técnicas moleculares en muestras suministradas por el cliente. La detección molecular, a diferencia de la detección mediante microscopía óptica, reduce el riesgo de falsos negativos, amplificando el ADN de las larvas presentes en la muestra, y es un método más rápido especialmente cuando se tienen que procesar un número elevado de muestras. El límite de detección de la prueba permite localizar una única larva en la muestra suministrada como resultado del filtrado de un volumen de agua conocido, ya que una larva es un organismo pluricelular con muchas copias de ADN diana. En este caso no es posible determinar el número de larvas presentes como hacemos con el número de UFC (unidades de colonias de bacterias o de hongos) o de virus detectados, ya que en estos casos sólo existe una copia de genoma en cada UFC o en cada virión. Nuestro sistema incluye el diseño de un control interno de la prueba elaborado con una secuencia genómica de un amplicón de mayor longitud que posee en los extremos secuencias específicas de mejillón cebra, y hemos clonado en un plásmido vector para poder replicarlo en *Escherichia coli*. Este plásmido se introduce en la muestra al comenzar la extracción del ADN y debe amplificarse simultáneamente durante la realización de la prueba de PCR doble para, en su caso, detectar la presencia de inhibidores de la prueba de PCR, y evitar los falsos negativos de la prueba.

Nuestro método ha sido diseñado a partir de las secuencias genómicas conocidas de mejillón cebra, y utilizando muestras de ADN extraídas de esta especie hemos comprobado que es completamente específico para esta especie y no posee reacciones cruzadas con otras especies de bivalvos.

### Recogida de muestras

En principio el filtrado de agua en la masa de agua objetivo lo dejamos en manos del cliente que, en el caso de embalses, puede contar con la ayuda del personal y materiales adscritos al mismo (embarcación, guardería, ...). Esto por un lado, evita los riesgos de que una compañía a nivel nacional se traslade de un embalse a otro con sus equipos, que si bien deben ser limpiados y desinfectados siguiendo los oportunos protocolos, no deja de suponer un posible foco de dispersión de la invasión del mejillón. Por otro lado, contar con la ayuda del personal adscrito a las masas de agua suele reducir los tiempos de las pruebas, ya que evita el trámite de solicitud de permisos para cada comunidad autónoma/confederación/embalse. No obstante, excepcionalmente nuestro laboratorio podría incluir la toma de muestras en los lugares que el cliente solicite.

El protocolo de filtrado es variable en función de varios aspectos: Con carácter general recomendamos que se filtren al menos de 10 a 100 litros, a través de una malla de plancton o tamiz de 50 micras de malla. En caso de una masa de agua de gran tamaño (p.ej. embalse) y disponer de embarcación, idealmente recomendamos tomar al menos dos muestras (superficial e integrada en toda la columna de agua) en al menos dos puntos de la masa de agua (p.ej., zona central del embalse y proximidades de la presa), para asegurar cierta representatividad de los datos. En caso de no disponer de embarcación, podría bombearse un volumen conocido de agua desde la orilla, de uno o varios puntos de la masa de agua.

Un aspecto importante que debe tener en cuenta el cliente es evitar la contaminación con los equipos de muestreo, ya que el método detecta ADN, y éste puede quedar depositado en los equipos de muestreo y provocar la contaminación entre muestras. Por este motivo, el material utilizado para el muestreo debe ser desechable de un solo uso. Una posibilidad alternativa es el tratamiento con hipoclorito sódico -lejía- del material de muestreo para destruir el ADN presente que hubiese podido quedar procedente de un muestreo previo.

En cualquier caso, para evitar la contaminación de las muestras, nuestro laboratorio tiene diseñado un equipo sencillo para realizar la filtración del agua a través de un sistema con una malla desechable, y que prepararíamos y suministraríamos al cliente, en caso de que nos lo solicite, lo que evitaría tener que recurrir al uso de mangas de plancton de coste elevado.

Lo más importante es disponer de un filtrado de una masa de agua del mayor volumen posible, siempre y cuando las condiciones de la masa de agua lo permitan (dependiendo de la concentración de material particulado). En cualquier caso, disponer de un mayor volumen de filtrado (p.ej, 100 a 200 litros) no incrementa apenas el esfuerzo de recogida de las muestras y permite, como precaución añadida, preservar una parte de la muestra para análisis por microscopía en caso de que se quisiera contrastar un resultado negativo obtenido por técnicas moleculares.

#### Conservación y transporte de muestras

Nuestro laboratorio, a menos que el cliente lo solicite de otra forma, suministra al cliente todo lo necesario para la conservación y el transporte de las muestras tomadas por ellos: frascos para depositar las muestras de agua de pequeños volúmenes, así como acumuladores de frío y contenedor de poliestireno expandido para asegurar la llegada de las muestras refrigeradas a nuestro laboratorio (ver ejemplo adjunto). No obstante, estas recomendaciones y diseño del equipo de toma de muestras y remisión son generales, y se personalizan en función de las necesidades del cliente, pudiendo incluso suministrar mallas de filtrado para uso único y evitar así el riesgo de contaminación entre muestreos.

La entrega y recogida del material necesario, como se indica en el ejemplo adjunto, se realiza a través de una empresa de mensajería contratada por nosotros.

#### Tiempo de respuesta

En cuanto al tiempo de respuesta, si son muestras negativas, puede tener los resultados en 3 ó 4 días, y si son positivas y requieren secuenciación para corroborar que se trata de secuencia de mejillón cebra unos 10 días (estos son tiempos máximos en las condiciones habituales de trabajo de nuestro laboratorio).

## Coste de las pruebas

El coste de las pruebas depende de varios factores como el número de muestras que se soliciten, de las condiciones de recogida o de recepción de la muestra filtrada en nuestro laboratorio, del volumen de la muestra que recibiésemos, de la necesidad de suministrar el material para filtrar el agua, de la realización únicamente de pruebas de PCR dobles, o de la comprobación por secuenciación de ADN en caso de ser positivas las pruebas de PCR, etc. Una vez concretados estos aspectos puede elaborarse un presupuesto detallado según las necesidades del cliente.

Le enviamos el coste de las pruebas (sujeto a posible variación en función de los factores comentados previamente) y las instrucciones generales de recogida de muestras. En el texto de imágenes aparecen frascos de 1 litro de capacidad que son los que utilizamos habitualmente para aguas, pero en ellos pueden depositarse las muestras de menor volumen con los filtros. Aunque en la imagen varios frascos, y se enviarían al cliente, no es obligado utilizarlos todos a menos que el número de muestras lo precise.

## Investigaciones que avalan la prueba

Existen varias referencias en la literatura que avalan la detección de mejillón cebra por métodos moleculares, de las que le indicamos a continuación algunas de ellas. Nuestro procedimiento está basado en una doble PCR, utilizando cebadores (primers) elegidos por nosotros seguido, en caso de obtenerse amplificación, de la secuenciación directa del amplicón obtenido, y de la realización de un BLAST de nucleótidos de la secuencia del amplicón obtenido, con las secuencias de mejillón cebra depositadas en GenBank. No tenemos noticias, al menos nosotros, de que otro laboratorio haya puesto aún en marcha este procedimiento en España.

Algunas de las citas bibliográficas que han servido para orientar nuestro procedimiento son las siguientes:

- Baldwin BS y col. A diagnostic molecular marker for zebra mussels (*Dreissena polymorpha*) and potentially co-occurring bivalves: mitochondrial COI. *Mol Mar Biol Biotechnol* 1996, 5 (1): 9-14.
- Boeger WA, y col. Testing a molecular protocol to monitor the presence of golden mussel larvae (*Limnoperna fortunei*) in plankton samples. *J Plankton Res.* 2007, 29: 1015-1019.
- Claxton WT y col. A new molecular technique for identifying field collections of zebra mussel (*Dreissena polymorpha*) and quagga mussel (*Dreissena bugensis*) veliger larvae applied to eastern lake Erie, Lake Ontario, and Lake Simcoe. *Can J Zool* 1998, 76: 194-198.
- Frischer ME y col. Development of an *Argopecten*-Specific 18S rRNA targeted genetic probe. *Mar. Biotechnol.* 2000, 2: 11-20.
- Frischer ME, y col. Specific amplification of the 18S rRNA gene as a method to detect zebra mussel (*Dreissena polymorpha*) larvae in plankton samples. *Hydrobiología* 2002, 487: 33-44.
- May GE, y col. Molecular ecology of zebra mussel invasions. *Molecular Ecology* 2006, 15: 1021-1031.

- Wang S, y col. A new strategy for species identification of planktonic larvae: PCR-RFLP analysis of the internal transcriber spacer region of ribosomal DNA detected by agarosa gel electrophoresis or DHPLC. J Plankton Res 2006, 28: 375-384.

#### Experiencia de nuestro laboratorio:

Nuestro laboratorio comenzó su actividad en 1995, y se dedica únicamente a pruebas de Microbiología, siendo algunas de las líneas preferentes la realización de pruebas de diagnóstico molecular y de Virología. Este laboratorio está acreditado por ENAC (Entidad Nacional de Acreditación) según las normas UNE-EN ISO 17025 (laboratorios de ensayo) y UNE-EN ISO 15189 (laboratorios clínicos). Entre los procedimientos que tenemos actualmente acreditados se encuentran la identificación por métodos de secuenciación de ADN de especies de bacterias y de hongos. Los alcances de nuestras acreditaciones, puede obtenerlos de la página web de ENAC (Entidad Nacional de Acreditación) ([www.enac.es](http://www.enac.es)), en laboratorios de ensayo y en laboratorios clínicos, e incluyen pruebas de aguas para detección de Legionella por cultivo y pruebas de PCR, determinación de varias actividades biocidas de antisépticos y desinfectantes (bactericidas, micobactericida, esporicidas, fungicidas, y virucida), determinación de endotoxinas en aguas, algunas pruebas de diagnóstico de micobacterias, Bacteriología, antimicrobianos, Micología, Virología, y Serología.

Bétera (Valencia), 1 de septiembre de 2009.

Encarnación Esteban  
Director Técnico



# Instituto Valenciano de Microbiología

Masía El Romeral  
Ctra. Bétera – San Antonio de Benagéber, Km 0,3  
46117 Bétera (Valencia)  
Tel. 96 169 17 02  
Fax 96 169 16 37  
e-mail: [ivami@ivami.com](mailto:ivami@ivami.com)  
[www.ivami.com](http://www.ivami.com)

**Referencia del cliente:** 95277/8  
**Nº de muestra de IVAMI:** 4032346  
**Centro:** Laboratorios Cicap S.L.  
**Tipo de muestra:** Agua filtrada  
**Condiciones de recepción:** Refrigerada  
**Fecha y hora de recepción:** 18/11/2009, 14:00

## **Detección genómica de larvas de *Dreissena polymorpha* mediante PCR** (Procedimiento MICROMOL-7188)

La amplificación genómica mediante oligonucleótidos específicos de *Dreissena polymorpha* ha resultado:

Negativa

Bétera (Valencia) a 30 de noviembre de 2009.

Fdo. José Luis Juan Bañón  
Técnico responsable

Encarnación Esteban  
Director Técnico



# Instituto Valenciano de Microbiología

Masía El Romeral  
Ctra. Bétera – San Antonio de Benagéber, Km 0,3  
46117 Bétera (Valencia)  
Tel. 96 169 17 02  
Fax 96 169 16 37  
e-mail: [ivami@ivami.com](mailto:ivami@ivami.com)  
[www.ivami.com](http://www.ivami.com)

**Referencia del cliente:** 95273/8  
**Nº de muestra de IVAMI:** 4032343  
**Centro:** Laboratorios Cicap S.L.  
**Tipo de muestra:** Agua filtrada  
**Condiciones de recepción:** Refrigerada  
**Fecha y hora de recepción:** 18/11/2009, 14:00

## **Detección genómica de larvas de *Dreissena polymorpha* mediante PCR** (Procedimiento MICROMOL-7188)

La amplificación genómica mediante oligonucleótidos específicos de *Dreissena polymorpha* ha resultado:

Negativa

**Comentarios:** en el informe preliminar se emitió un resultado "indeterminado" debido a la presencia de una banda de amplicón de características similares a la que se obtiene con *Dreissena polymorpha*, junto otras bandas de amplicones mayores y menores que aquella. La banda de características similares ha sido purificada del gel y se ha secuenciado, no correspondiendo a *Dreissena polymorpha*. La presencia de bandas inespecíficas se atribuye a la excesiva cantidad de solutos y materia sólida en suspensión en las muestras recibidas.

Bétera (Valencia) a 9 de diciembre de 2009.

Fdo. José Luis Juan Bañón  
Técnico responsable

Encarnación Esteban  
Director Técnico

INFORME FINAL



# Instituto Valenciano de Microbiología

Masía El Romeral  
Ctra. Bétera – San Antonio de Benagéber, Km 0,3  
46117 Bétera (Valencia)  
Tel. 96 169 17 02  
Fax 96 169 16 37  
e-mail: [ivami@ivami.com](mailto:ivami@ivami.com)  
[www.ivami.com](http://www.ivami.com)

**Referencia del cliente:** 95274/8  
**Nº de muestra de IVAMI:** 4032344  
**Centro:** Laboratorios Cicap S.L.  
**Tipo de muestra:** Agua filtrada  
**Condiciones de recepción:** Refrigerada  
**Fecha y hora de recepción:** 18/11/2009, 14:00

## **Detección genómica de larvas de *Dreissena polymorpha* mediante PCR** (Procedimiento MICROMOL-7188)

La amplificación genómica mediante oligonucleótidos específicos de *Dreissena polymorpha* ha resultado:

Negativa

**Comentarios:** en el informe preliminar se emitió un resultado "indeterminado" debido a la presencia de una banda de amplicón de características similares a la que se obtiene con *Dreissena polymorpha*, junto otras bandas de amplicones mayores y menores que aquella. La banda de características similares ha sido purificada del gel y se ha secuenciado, no correspondiendo a *Dreissena polymorpha*. La presencia de bandas inespecíficas se atribuye a la excesiva cantidad de solutos y materia sólida en suspensión en las muestras recibidas.

Bétera (Valencia) a 9 de diciembre de 2009.

Fdo. José Luis Juan Bañón  
Técnico responsable

Encarnación Esteban  
Director Técnico

INFORME FINAL



# Instituto Valenciano de Microbiología

Masía El Romeral  
Ctra. Bétera – San Antonio de Benagéber, Km 0,3  
46117 Bétera (Valencia)  
Tel. 96 169 17 02  
Fax 96 169 16 37  
e-mail: [ivami@ivami.com](mailto:ivami@ivami.com)  
[www.ivami.com](http://www.ivami.com)

**Nº de muestra de IVAMI:** 4032345  
**Referencia del cliente:** 95276/8  
**Centro:** Laboratorios Cicap S.L.  
**Tipo de muestra:** Agua filtrada  
**Condiciones de recepción:** Refrigerada  
**Fecha y hora de recepción:** 18/11/2009, 14:00

## **Detección genómica de larvas de *Dreissena polymorpha* mediante PCR** (Procedimiento MICROMOL-7188)

La amplificación genómica mediante oligonucleótidos específicos de *Dreissena polymorpha* ha resultado:

Negativa

**Comentarios:** en el informe preliminar se emitió un resultado "indeterminado" debido a la presencia de una banda de amplicón de características similares a la que se obtiene con *Dreissena polymorpha*, junto otras bandas de amplicones mayores y menores que aquella. La banda de características similares ha sido purificada del gel y se ha secuenciado, no correspondiendo a *Dreissena polymorpha*. La presencia de bandas inespecíficas se atribuye a la excesiva cantidad de solutos y materia sólida en suspensión en las muestras recibidas.

Bétera (Valencia) a 9 de diciembre de 2009.

Fdo. José Luis Juan Bañón  
Técnico responsable

Encarnación Esteban  
Director Técnico

INFORME FINAL