

Lactococosis marina y continental: caracterización genética y resistencia antibiótica.

Daniel González Martín¹, Celia Sanz Tejero¹, Elena Planas Callao², Silvia del Caso Yagüe¹, Gema Chacón Pérez¹, José Luis Arnal Bernal¹

¹Exopol S.L., laboratorio veterinario de diagnóstico y autovacunas

²Veterinaria, Biofarm West Med, Biomar Iberia, S.A.

Resumen

Lactococcus garvieae y *L. petauri* son los agentes etiológicos de la lactococosis, una importante enfermedad de los peces de distribución mundial tanto de agua dulce como salada. En nuestro entorno, tradicionalmente se ha detectado en producciones de trucha arcoíris. El pasado verano se detectó en una granja de lubinas en Italia y, desde entonces, se ha diagnosticado en más países mediterráneos. En este estudio, se ha valorado la variabilidad genética y fenotípica de aislamientos de ambas especies de *Lactococcus* obtenidos de brotes en granjas continentales y marinas mediante la técnica MLST y su resistencia antimicrobiana. Genéticamente, se han confirmado brotes de *L. garvieae* en lubina y atún rojo atlántico, perteneciendo las cepas de ambas especies hospedadoras a dos complejos clonales (CC) diferentes. Se destaca que las cepas de *L. garvieae* de lubina pertenecieron a la misma secuencia tipo (ST) que aquellas descritas en un brote del mismo año de Italia y anteriormente en Japón. Sobre los aislamientos de atún, se ha comprobado que pertenecieron a un ST de nueva descripción. Por otro lado, según el alcance de la técnica empleada, los brotes causados de *L. petauri* en trucha arcoíris bajo estudio presentaron homología genética. Al analizar la sensibilidad antibiótica, se comprobó como las cepas de ambas especies presentaban resistencias antimicrobianas. Las cepas de *L. garvieae* presentaron una CMI90 considerada como sensible para amoxicilina, oxitetraciclina y florfenicol, mientras que en los resultados de *L. petauri* solo ocurrió con amoxicilina. Se considera necesario ampliar el tamaño muestral para confirmar los resultados obtenidos.

Introducción

La lactococosis es una importante enfermedad septicémica y zoonótica de peces marinos y continentales de distribución mundial. En Europa, afecta gravemente explotaciones continentales de trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) y, recientemente, se ha detectado en una granja italiana de lubina (*Dicentrarchus labrax*), caracterizándola como una patología emergente en el mar Mediterráneo. Inicialmente, *Lactococcus garvieae* fue considerada como único agente causal aunque en análisis retrospectivos se comprobó que la mayoría de casos de lactococosis continentales fueron realmente causados por *L. petauri*. Ambas bacterias pueden ser resistentes a antibióticos de gran importancia en acuicultura, por lo que es necesario su estudio previo al tratamiento de brotes. Para un óptimo diagnóstico se han desarrollado técnicas moleculares mediante qPCR. Además, la caracterización genética mediante MLST ha sido implementada en otros países para el estudio de la estructura poblacional.

Material y métodos

Para el estudio genético se seleccionaron 17 cepas de *Lactococcus* sp. aisladas de casos clínicos de granjas acuícolas de países mediterráneos entre los años 2021 y 2024. Las especies hospedadoras marinas fueron: lubina (*Dicentrarchus labrax*) (n=7) y atún rojo del Atlántico (*Thunnus thynnus*) (n=2). Por otro lado, los aislados de acuicultura continental fueron en su totalidad procedentes de trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) (n=4). Por último, 4 cepas se clasificaron como de origen desconocido.

La identificación específica se realizó mediante análisis PCR en tiempo real (qPCR) utilizando los kits comerciales de la serie EXOone (Exopol, España) específicos de *L. garvieae* y *L. petauri*, verificando los resultados mediante secuenciación Sanger siguiendo un método descrito (Stoppani et al., 2023). La caracterización genética mediante MLST siguió el protocolo descrito por Ferrario et al. 2013. Las secuencias de las partes conservadas de 7 genes constitucionales (als, atpA, tuf, gapC, gyrB, rpoC y galP) fueron estudiadas mediante secuenciación Sanger y contrastadas con el repositorio “PubMLST.org” para la determinación de los respectivos alelos de cada uno de los loci estudiados.

En cuanto a la valoración de sensibilidad antibiótica, se realizó mediante la técnica de concentración mínima inhibitoria (CMI). Se empleó el medio de cultivo Mueller Hinton suplementado con sangre lacada de caballo al 2,5-5% v/v y se incubó en una estufa a 35°C con CO₂ al 5% (Smith, 2019). Los antibióticos testados fueron: oxitetraciclina, florfenicol, flumequina, amoxicilina y trimetoprima-sulfametoxazol.

Resultados y discusión

Todos los aislamientos fueron identificados específicamente y se confirmó mediante secuenciación. Los aislamientos de origen marino resultaron *L. garvieae*, mientras que los de origen continental o desconocido fueron *L. petauri*. Todos los aislamientos identificados como *L. petauri* resultaron Sequence Type 14 (ST14), englobados en el Clonal Complex 14 (CC14). Este ST ha sido anteriormente descrito en procesos de trucha en España, Italia y Estados Unidos, así como en Francia.

Por otro lado, las cepas de *L. garvieae* cuyo hospedador era lubina resultaron invariablemente ST95. Este mismo ST había sido previamente descrito en lubina en Italia en el año 2023 (Salogni et al., 2024), aunque su primera detección documentada fue en el año 2021 en Japón en una explotación de seriola japonesa. A su vez, los dos aislamientos marinos de *L. garvieae* de atún rojo Atlántico resultaron un ST de nueva descripción: ST139. La secuencia nucleotídica del gen *als* no coincidía con ninguno de los alelos descritos hasta la fecha y se incorporó en el repositorio PubMLST (*als79*). Estos aislamientos se incluyen en el CC17, el cual se había registrado antes en especies marinas en Japón y Corea del Sur, tilapia en Brasil e infecciones humanas en China y España, confirmando su carácter zoonótico. Teniendo en cuenta el pequeño tamaño muestral y la información limitada asociada a los brotes, no es posible establecer los potenciales orígenes de los brotes de lactococosis marina que preocupan al sector.

En cuanto a las pruebas de sensibilidad antibiótica realizadas, las cepas analizadas de *L. garvieae* presentaron una CMI90 considerada como sensible para amoxicilina, oxitetraciclina y florfenicol, sin embargo, en los resultados de *L. petauri* solo ocurrió con amoxicilina. En el caso de oxitetraciclina, el 92 % de las cepas de *L. garvieae* fueron sensibles, sin embargo, solo el 14 % de *L. petauri* lo fueron. Además, la mayoría de las cepas analizadas fueron sensibles al florfenicol (92% de *L. garvieae* y 86% de *L. petauri*), pero es recomendable realizar un seguimiento de la evolución de las resistencias ya que en el caso de *L. petauri* la CMI90 sería considerada resistente. Por otro lado, existe un alto porcentaje de cepas resistentes de ambas especies bacterianas a la combinación de trimetoprima con sulfametoxazol (83% de *L. garvieae* y 86% de *L. petauri*). Frente a la flumequina todas las cepas analizadas resultaron resistentes. Se considera necesario analizar un mayor número de cepas para confirmar los resultados obtenidos.

Conclusiones

Este trabajo ha evidenciado las diferencias genéticas entre los aislamientos analizados de origen continental y marino causantes de lactococosis en explotaciones acuícolas de nuestro entorno. *L. petauri* se ha aislado exclusivamente en explotaciones continentales, sin variabilidad genética entre cepas de diferentes procedencias. Por otro lado, *L. garvieae* se ha detectado únicamente en muestras de origen marino presentando diferentes complejos clonales, perteneciendo los aislados de lubina al mismo ST que los aislados detectados en el brote de Italia. En cuanto a los resultados de CMI obtenidos, se han detectado resistencias antimicrobianas en ambas especies. Las cepas de *L. garvieae* presentaron mejores resultados de sensibilidad a los antibióticos analizados que *L. petauri*. Amoxicilina y florfenicol son los antibióticos que han obtenido un mayor porcentaje de cepas sensibles, mientras que todas las cepas analizadas fueron resistentes a flumequine.

Palabras clave

Lactococcus garvieae, *L. petauri*, lubina, trucha

Bibliografía

- Ferrario, C., Ricci, G., Milani, C., Lugli, G.A., Ventura, M., Eraclio, G., Borgo, F. y Fortina, M.G., 2013. *Lactococcus garvieae*: Where Is It From? A First Approach to Explore the Evolutionary History of This Emerging Pathogen. PLoS ONE 8 (12), e84796.
- Salogni, C., Bertasio, C., Accini, A., Gibelli, L.R., Pigoli, C., Susini, F., Podavini, E., Scali, F., Varisco, G., Alborali, G.L., 2024. The Characterisation of *Lactococcus garvieae* Isolated in an Outbreak of Septicaemic Disease in Farmed Sea Bass (*Dicentrarchus labrax*, Linnaeus 1758) in Italy. Pathogens 13, no. 1: 49.
- Smith, P. 2019. The performance of antimicrobial susceptibility testing programmes relevant to aquaculture and aquaculture products. FAO Fisheries and Aquaculture Circular No. 1191. Rome, FAO.
- Stoppani, N., Colussi, S., Pastorino, P., Prearo, M., Sciuto, S., Altinok, I., Öztürk, R.Ç., Ture, M., Vela, A.I., Blanco, M.D.M., y et al. 2023. 16S-23S rRNA Internal Transcribed Spacer Region (ITS) Sequencing: A Potential Molecular Diagnostic Tool for Differentiating *Lactococcus garvieae* and *L. petauri*. Microorganisms 11 (5) 1320.