

Primera descripción de septicemia causada por *Lactococcus garvieae* en lubina de acuicultura en España

Carlos Zarza¹, Evelyn Carballada Carrasco², Javier Barriga-Cuartero³, Belén Fouz³, Ysabel Santos²

¹Skretting España. Carretera de la estación s/n, Cojóbar (Burgos)

²Instituto Análisis Químicos y Biológicos, *Constantino Candeira s/n, 15705 Santiago de Compostela (A Coruña)*

³Instituto Universitario en Biomedicina y Biotecnología. Universitat de València, 46100, Burjassot (València)

Abstract

This work represents the first description of *Lactococcus garvieae* as a causative agent of lactococcosis in farmed sea bass, *Dicentrarchus labrax* (L.), in Spain. Affected sea bass from two marine farms showed clinical signs of haemorrhagic septicaemia, compatible with lactococcosis. Standardised pathogen detection tests (bacteriological, virological and parasitological examinations) showed the presence of Gram-positive bacteria in internal organ imprints. Bacterial isolates were identified as *Lactococcus garvieae* by phenotypic and molecular approaches and were sensitive to the antibiotics oxytetracycline, florfenicol and erythromycin. Pathogenicity assays showed that they were virulent for sea bass.

Resumen

Este trabajo representa la primera descripción de *Lactococcus garvieae* como agente causal de lactococosis en lubina de acuicultura, *Dicentrarchus labrax* (L.), en España. Las lubinas afectadas procedentes de dos granjas marinas mostraban signos clínicos de septicemia hemorrágica, compatibles con lactococosis. Las pruebas estandarizadas de detección de agentes patógenos, (análisis bacteriológicos, virológicos y exámenes parasitológicos) demostraron la presencia de bacterias Gram positivas en improntas de órganos internos. Las cepas aisladas se identificaron como *Lactococcus garvieae* mediante aproximaciones fenotípicas y moleculares y resultaron sensibles a los antibióticos oxitetraciclina, florfenicol y eritromicina. Los ensayos de patogenicidad demostraron que las bacterias aisladas eran virulentas para lubina

Introducción

La bacteria Gram positiva *Lactococcus garvieae* es el agente responsable de la lactococosis, una patología septicémica que causa importantes pérdidas económicas en acuicultura marina y de agua dulce, fundamentalmente en estaciones cálidas. El número de especies susceptibles (incluido el ser humano), es elevado, siendo la trucha arco-iris una de las más afectadas (Meyburg y col. 2017). Además, su espectro de hospedadores está en aumento, de ahí que en la actualidad se le considere un patógeno emergente oportunista. Recientemente se describió un episodio de lactococosis en lubina (*Dicentrarchus labrax*) en Italia (Salogni y col., 2024), uno de los principales países productores de esta especie en Europa junto con España y Turquía. En el presente estudio, se describen brotes de infecciones septicémicas en granjas de lubina en España, compatibles con lactococosis, ocurridos en otoño de 2023 (Tª del agua: 25°C). La mortalidad fue moderada-baja, debido probablemente al tratamiento precoz con pienso medicamentoso y a la bajada brusca de temperatura del agua. Esta patología puede suponer una nueva amenaza para el sector y prevenir su aparición debe ser una prioridad. El objetivo principal del trabajo ha sido caracterizar las cepas responsables de los brotes infecciosos en lubina y demostrar su potencial patógeno para la especie.

Material y métodos

Peces. Las lubinas enfermas (peso: 150-700 g) mostraron anorexia, letargia y natación errática, así como hemorragia periocular, exoftalmia, pérdida de ojos y prolapso anal. Internamente, se observaron hemorragias fuertes e inflamación en órganos internos (cerebro, corazón, hígado, bazo, riñón, vejiga natatoria e intestinos).

Análisis patológicos. Se realizaron pruebas estandarizadas de detección de agentes patógenos: improntas de órganos internos, análisis bacteriológicos, virológicos (Betanodavirus) y exámenes parasitológicos.

Identificación bacteriana. Se emplearon las siguientes aproximaciones:

-Fenotípica, mediante pruebas estándar y el sistema multiprueba Rapid ID 32 Strep (BioMérieux, Madrid).
 -Genética, mediante PCR con cebadores universales (616V and 699R) y secuenciación parcial del gen rRNA 16S así como PCR convencional dúplex (Saticioglu et al., 2023).
 -Proteómica, por espectrometría de masas MALDI-TOF, empleando el software MALDI BioTyper 3.1.
 Las cepas de referencia *Lactococcus garvieae* (Lg) CECT5274 y *L. petauri* (Lp) CP-1 fueron incluidas.
Susceptibilidad a antimicrobianos. Se evaluó mediante el test de difusión en agar empleando los antibióticos oxitetraciclina (30 µg), florfenicol (30 µg), trimetoprim-sulfametoxazol (25 µg) y eritromicina (30 µg).
Ensayos de infección *in vivo*. Ejemplares de lubina (40 ± 5 g) se infectaron con diferentes concentraciones de cepas seleccionadas mediante inyección intracelómica. La dosis letal que causa una mortalidad del 50% (DL₅₀) se calculó según el procedimiento de Reed & Muench (1938).

Resultados y discusión

El diagnóstico presuntivo de la enfermedad, basado inicialmente en la historia clínica, observación de lesiones y presencia de bacterias Gram positivas en improntas de órganos internos, se ha confirmado mediante análisis complementarios. Los resultados muestran que las bacterias aisladas de bazo y riñón de los peces afectados por septicemia hemorrágica pertenecen a la especie *L. garvieae*. Con excepción del sistema API (perfiles no concluyentes), las pruebas fenotípicas y moleculares empleadas en el proceso de identificación así lo han corroborado (Tabla 1). El test de sensibilidad a antibióticos ha puesto de manifiesto que tres de los utilizados presentan actividad frente a las cepas estudiadas, concretamente la oxitetraciclina, el florfenicol y la eritromicina.

Tabla 1. Resultados de la identificación de los aislados bacterianos de lubinas afectadas por septicemia.

Aislados de brotes	Perfil API rapid ID 32 Strep	PCR + secuenciación rARN16S	MALDI-TOF ²	PCR convencional ²
1	30020420000	<i>Lactococcus garvieae</i> (99,9%)	<i>L. garvieae</i> (2,27±0,042)	<i>L. garvieae</i>
2	30020600020	<i>L. garvieae</i> (99,9%)	<i>L. garvieae</i> (2,20±0,032)	<i>L. garvieae</i>

¹ Valores ≥2 indican identificación de especie. ²PCR dúplex para *L. garvieae* y *L. petauri* (Saticioglu et al. 2023)

Las cepas seleccionadas de *L. garvieae* han demostrado ser virulentas para lubina en las condiciones de ensayo, presentando valores de DL₅₀ entre 10⁶ y 10⁷ ufc/pez. Es importante destacar que en los peces infectados experimentalmente se han reproducido los signos clínicos observados en los brotes originales. En conclusión, se describen por primera vez brotes de lactococosis en lubina de cría en España, confirmándose como una patología emergente para la especie en el escenario actual de cambio climático. Debido a la condición de anorexia de los peces enfermos y a la posibilidad de aparición de resistencias, los tratamientos con pienso medicamentoso pueden resultar insuficientemente eficaces, de ahí la necesidad de prevenir su impacto empleando estrategias de vacunación sistemática como se hace en trucha arco-iris.

Palabras clave: Acuicultura, *Lactococcus garvieae*, lubina, patología emergente

Bibliografía

Meyburgh, C.M., Bragg, R.R., Boucher, C.E. 2017. *Lactococcus garvieae*: An emerging bacterial pathogen of fish. *Dis. Aquat. Org.* 123, 67–79.
 Reed, L.J.; Muench, H. (1938). "A simple method of estimating fifty percent endpoints". *The American Journal of Hygiene* 27, 493–497.
 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 septicemic disease in farmed Sea bass (*Dicentrarchus labrax*, Linnaeus 1758) in Italy. *Pathogens*, 13, 49.

Agradecimientos: Proyecto THINKINAZUL/2021/027 con fondos de la Unión Europea NextGeneration EU (PRTR-C17.I1) y Generalitat Valenciana. J. Barriga-Cuartero recibió fondos de PRE2021-099708

Correo del autor: belen.fouz@uv.es