

## *Lactococcus garvieae*, un patógeno de peces con posible implicación en Salud Pública

A. Gibello, M.M. Blanco, M.T. Cutuli, A.I. Vela, L. Domínguez y J.F. Fernández-Garayzábal



Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense de Madrid

El gran desarrollo de la piscicultura ha supuesto un aumento de la incidencia de las enfermedades infecciosas, debido en gran medida a las propias condiciones de producción intensiva en las que actualmente se cultivan las especies de interés comercial. Nuestro grupo de la Facultad de Veterinaria, en el área de la Sanidad Animal ha contribuido, desde hace varias décadas, a la identificación de diversos microorganismos patógenos en peces cultivados: *L. garvieae* como agente causal de la lactococosis, *Pseudomonas anguilliseptica* como agente implicado en la enfermedad de invierno de la dorada, *Streptococcus phocae* y *Mycobacterium peregrinum* como patógenos de peces. También se han descrito nuevas especies bacterianas (*Flavobacterium oncorhynchi* y *Chryseobacterium shigense*) a partir de alevines de truchas con sintomatología clínica. El grupo de investigación posee, también un amplio bagaje en el diagnóstico y prevención de las enfermedades infecciosas en piscifactorías, y ha colaborado en el estudio de casos clínicos que han surgido de forma esporádica en instalaciones piscícolas. Ejemplos de esta actividad son la detección de una infestación por ácaros en tilapias, o la micosis causada por *Fusarium oxysporum*. Además, el grupo ha desarrollado diversos sistemas de diagnóstico basados en técnicas moleculares (PCR) y ha estudiado los mecanismos de resistencia a antibióticos de bacterias patógenas, como *Yersinia ruckeri*, implicada en la enfermedad de la boca roja, y diversos agentes responsables de estreptococosis en peces.

El tema principal de trabajo del grupo ha sido y sigue siendo, el estudio de la lactococosis en peces, producida por *Lactococcus garvieae*. La enfermedad se describió por primera vez en 1990 en Japón, y un año después surgieron brotes en Italia, Francia y España, principalmente en las piscifactorías de truchas. La

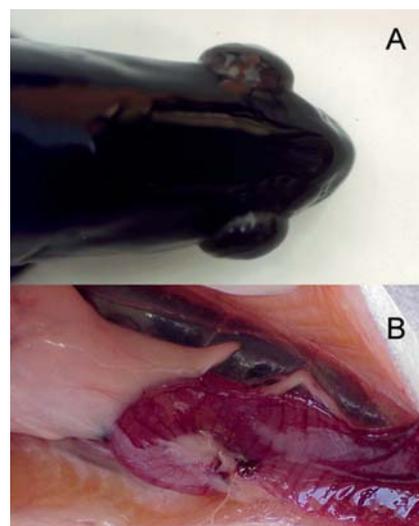
**Foto de grupo.**  
De izquierda a derecha: Alicia Gibello, Mar Blanco, Lucas Domínguez, Ana I. Vela, M.T. Cutuli y José F. Fernández-Garayzábal.



lactococosis es una enfermedad septicémica generalizada, que en la trucha se asocia al aumento de la temperatura del agua. Los animales afectados suelen presentar hiperpigmentación, exoftalmos y hemorragias oculares (Fig. 1), y a nivel interno una marcada enteritis y hepatomegalia. La lactococosis es difícil de tratar con antimicrobianos, ya que es frecuente la resistencia a quinolonas, tetraciclinas y otros antibióticos y, aunque en la actualidad existen vacunas que reducen la incidencia de esta infección, se trata de vacunas inactivadas que resultan eficaces, frente a la biovariedad predominante en un país. Hasta el momento, los estudios genotípicos y epidemiológicos de las cepas de *L. garvieae* aisladas de peces indican la existencia de grupos genéticos adaptados a distintas especies y áreas geográficas.

Aunque la mayor importancia clínica de *L. garvieae* reside en su incidencia en la acuicultura de los países de la cuenca mediterránea, desde su descripción en 1983 como agente productor de mastitis bovina, esta bacteria ha sido relacionada con infecciones en ganado bovino y porcino y con diversas infecciones en humanos. En los últimos años, ha aumentado

el número de publicaciones sobre infecciones causadas por *L. garvieae* en humanos, que en algunos casos, se han llegado a relacionar con el consumo de pescado y otros alimentos contaminados con esta bacteria. A diferen-



**Figura 1.**  
Trucha con lactococosis. A) Se aprecia la hiperpigmentación y exoftalmos; B) se aprecia una marcada enteritis.

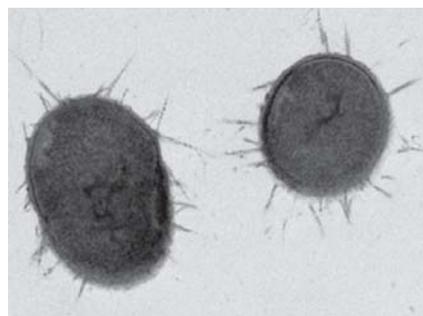
cia de lo que ocurre con otros patógenos de peces, algunas cepas de *L. garvieae* se aíslan de leche cruda y productos lácteos, como quesos artesanales, en los que contribuye a sus características organolépticas. Por este motivo, nuestros últimos trabajos se han centrado en la comparación genética de aislados procedentes de muestras clínicas de peces, humanas y de alimentos, mediante MLST. Por primera vez se ha observado que existe un complejo clonal que reúne aislados de infecciones humanas y algunas cepas procedentes de peces y alimentos. Sin embargo, los estudios para determinar el carácter patógeno de esta bacteria están poco desarrollados. Uno de los marcadores distintivos propuestos entre las cepas aisladas de peces y de productos lácteos es la capacidad de metabolizar la lactosa en estos últimos, pero hemos observado que existen cepas lactosa positivas aisladas de carnes y de muestras clínicas en otras especies animales, incluido el hombre.

Entre los factores de patogenicidad, la presencia de cápsula resulta importante para resistir la fagocitosis, pero en el caso de *L. garvieae*, las cepas no capsuladas también son patógenas para las truchas. De hecho, nuestro grupo se ha centrado en la caracterización de la cepa epidémica de la lactococosis en trucha en España desde 2004, y esta cepa carece de cápsula. La  $DL_{50}$  en infecciones experimentales mediante inyección intraperitoneal se ha determinado en torno a  $10^2$ - $10^3$  UFC/pez. Esta  $DL_{50}$  es similar a la de las cepas de *L. garvieae* italianas de truchas y ligeramente superior a la de las cepas japonesas que afectan a otros peces. Uno de los hallazgos más significativos de la cepa con la que trabajamos, es su capacidad para adherirse e internalizarse en células no fagocíticas. Estos estudios de adherencia e internalización se han realizado en cultivos celulares *in vitro*, e *in vivo* en el modelo de pez cebra.

El desarrollo de las tecnologías de secuenciación masiva durante los últimos años ha llevado a la publicación de los genomas completos de 15 cepas de *L. garvieae*, que incluyen dos cepas japonesas aisladas casos clínicos en jurel y tres de truchas en Italia y España. El análisis *in silico* de estos genomas indica la existencia de genes potencialmente implicados en virulencia (hemolisinas, adhesinas, colagenasas, ...). En este sentido, los mutantes en el gen de la Sortasa C y/o en los genes adyacentes que codifican proteí-

nas con dominios pilina y LPxTG, presentan menor virulencia. Así pues, tal y como sucede en otros patógenos, las fimbrias o pili que presentan algunas cepas de *L. garvieae* aisladas de peces (Fig. 2), podrían estar implicadas en la adhesión y colonización de los tejidos durante la infección. También, los genes implicados en el metabolismo bacteriano a la temperatura a la que suceden los brotes pueden ser importantes ya que, por ejemplo, mutantes de *L. garvieae* en los genes que intervienen en el transporte de glutamina presentan menor virulencia. En este contexto, nuestros estudios sobre el efecto que tiene la temperatura en el transcriptoma de *L. garvieae* mediante microarrays, indican que genes que codifican la Glutamina sintetasa, están sobreexpresados a la temperatura a la que suceden los brotes.

Otros estudios que hemos abordado incluyen la caracterización de proteínas de *L. garvieae* que inducen una respuesta humoral. Los ensayos experimentales realizados por otros investigadores indican que algunas de estas proteínas inmunógenas confieren protección y podrían utilizarse en el desarrollo de nuevas vacunas. Además, nuestro grupo ha conseguido la purificación y caracterización de una bacteriocina producida por una cepa de *L. garvieae*, aislada de una infección en humanos, que es totalmente específica para inhibir el crecimiento de otras cepas de *L. garvieae*. La actividad y especificidad de esta Garvicina A hace pensar en su futura utilización en piscicultura. Nuestro trabajo actual consiste en el estudio de las proteínas del surfoma en las cepas de *L. garvieae*, con el fin de conocer las proteínas implicadas en la interacción patógeno-hospedador durante los primeros momen-



**Figura 2.**

Imagen de Microscopía Electrónica de Transmisión en la que se observa las fimbrias o pili de un aislado clínico de *L. garvieae* procedente de jurel.

tos de la infección (adhesión y colonización) y conocer la respuesta inmunitaria de la trucha frente a la infección de esta bacteria.

## REFERENCIAS

- Aguado-Urda M, Cutuli MT, Blanco MM, Aspiroz C, Tejedor JL, Fernández-Garayzábal JF y Gibello A.** (2010). Utilization of lactose and presence of the phosphor- $\beta$ -galactosidase (*lacG*) gene in *Lactococcus garvieae* isolates from different sources. *Int Microbiol* 13: 189-193.
- Aguado-Urda M, López-Campos GH, Gibello A, Fernández-Garayzábal JF, Cutuli MT, Aspiroz C, López-Alonso V y Blanco M.** (2011). Genome sequence of *Lactococcus garvieae* 8831, isolated from a rainbow trout lactococcosis in Spain. *J Bacteriol* 193: 4263-4264.
- Aguado-Urda M, Rodríguez-Bertos A, delas Heras AI, Blanco MM, Acosta F, Cid R, Fernández-Garayzábal JF y Gibello A.** (2014). Experimental *Lactococcus garvieae* infection in zebrafish and first evidence of its ability to invade non-phagocytic cells. *Vet Microbiol* 171: 248-54.
- Aguado-Urda M, Gibello A, Blanco MM, Fernández-Garayzábal JF, López-Alonso V, López-Campos GH.** (2013). Global transcriptome analysis of *Lactococcus garvieae* strains in response to temperature. *PLoS One* 8: 11.
- Fortina MG, Ricci G y Borgo F.** (2009). A study of lactose metabolism in *Lactococcus garvieae* reveals a genetic marker for distinguishing between dairy and fish biotypes. *J Food Prot* 72: 1248-1254.
- Gibello A, Díaz de Alba P, Blanco MM, Machuca J, Cutuli MT y Rodríguez-Martínez JM.** (2014). *Lactococcus garvieae* carries a chromosomally encoded pentapeptide repeat protein that confers reduced susceptibility to quinolones in *Escherichia coli* producing a cytotoxic effect. *Res Microbiol* 165: 590-599.
- Maldonado-Barragán A, Cárdenas N, Martínez B, Ruiz-Barba JL, Fernández-Garayzábal JF, Rodríguez JM y Gibello A.** (2013). Garvicin A, a novel class IIb bacteriocin from *Lactococcus garvieae* that inhibits septum formation in *L. garvieae* strains. *Appl Environ Microbiol* 9: 4336-46.
- Menéndez A, Fernández L, Reimundo P y Guijarro JA.** (2007). Genes required for *Lactococcus garvieae* survival in a fish host. *Microbiology* 153: 3286-3294.
- Reguera-Brito M, Galán-Sánchez F, Blanco MM, Rodríguez-Iglesias M, Domínguez L, Fernández-Garayzábal JF y Gibello A.** (2016). Genetic analysis of human clinical isolates of *Lactococcus garvieae*: Relatedness with isolates from foods. *Infect Genet Evol* 37: 185-191.
- Tejedor JL, Vela AI, Gibello A, Casamayor A, Domínguez L y Fernández-Garayzábal JF.** (2011). A genetic comparison of pig, cow and trout isolates of *Lactococcus garvieae* by PFGE analysis. *Lett Appl Microbiol* 53: 614-619.
- Vela AI, Vázquez J, Gibello A, Blanco MM, Moreno M, Liébana P, Albendea C, Alcalá B, Mendez A, Domínguez L y Fernández-Garayzábal JF.** (2000). Phenotypic and genetic characterization of *Lactococcus garvieae* isolated in Spain from lactococcosis outbreaks and comparison with isolates of other countries and sources. *J Clin Microbiol* 38: 3791-3795.