

Área de Microbiología
Departamento de Biología Funcional
Universidad de Oviedo

Variabilidad intraespecífica y características del genoma del patógeno *Lactococcus garvieae*

Memoria presentada por Pilar Reimundo Díaz-Fierros
para optar al Grado de Doctor en Biología

Oviedo 2011

El trabajo descrito en la presente memoria ha sido financiado por el Ministerio de Ciencia e Innovación a través de los proyectos AGL2006-07562 y AGL-2009-07003.

Durante su realización se ha disfrutado de una Beca de Formación de Profesorado Universitario (FPU) del Ministerio de Ciencia e Innovación.

A mi padre

Agradecimientos

Muchos sois los que me habéis ayudado durante la realización de la presente Tesis Doctoral. Vuestra aportación, tanto a nivel profesional como personal, ha sido determinante para que este trabajo haya salido adelante con éxito y por ello os expreso aquí mi más sincero agradecimiento.

Quiero dar las gracias de forma muy especial a mi director de tesis, el Dr. José Agustín Guijarro, por haber confiado en mí de forma inquebrantable para llevar a cabo esta investigación así como por haberme ofrecido su paciencia, su apoyo y sus consejos cada una de las veces en que las circunstancias se tornaron adversas.

Gracias al Departamento de Microbiología y Parasitología del Instituto de Acuicultura de la Universidad de Santiago de Compostela, principalmente a los Dres. Manuel L. Lemos y Carlos R. Osorio y a su equipo por su generosidad al permitirme desarrollar allí parte del presente trabajo y por su colaboración en el mismo.

Asimismo, gracias a todo el personal del Área de Genómica y Salud del Centro Superior de Investigación en Salud Pública de Valencia por su inmensa hospitalidad y en concreto a los Dres. Andrés Moya, Miguel Pignatelli, Luis David Alcaraz y Giuseppe D'Auria por la valiosa ayuda prestada a lo largo de mi estancia allí en relación al análisis genómico así como de forma posterior.

Gracias a mis compañeros de laboratorio, a los que ya se fueron y en especial a los que aún están, por haberme brindado su ayuda cada vez que la necesité y por haber conseguido entre todos que el laboratorio sea mucho más que un lugar de trabajo.

Gracias al resto de grupos de investigación del Área de Microbiología así como de otras Áreas y concretamente al Dr. Álvaro J. Obaya por haberme ofrecido siempre su colaboración desinteresada.

Finalmente, muchas gracias a todos los que estáis a mi lado y formáis parte de mí por hacer que nunca me sienta sola y por haberme apoyado de forma incondicional en esta y todas las etapas de mi vida.

Resumen

Lactococcus garvieae es el agente etiológico de la lactococosis, una importante patología en acuicultura. Esta bacteria es ubicua y ha adquirido relevancia como agente zoonótico en los últimos años. A pesar de ello, los conocimientos que se tienen sobre la biología, la variabilidad entre cepas procedentes de diferentes hospedadores, los mecanismos de patogenicidad, etc., de este microorganismo son limitados.

Con el fin de aportar nuevos datos que ayuden a mejorar esta situación, en la presente Tesis Doctoral se han abordado un conjunto de estudios que han permitido, en primer lugar, la caracterización del sistema de incorporación de D-alanina a los ácidos teicoicos y lipoteicoicos de la pared celular de *L. garvieae* poniéndose de manifiesto su implicación en virulencia. En segundo lugar, se ha evaluado la virulencia de dos aislados de la bacteria procedentes de trucha arcoíris (cepa 074) y de humano (cepa HF) en dos modelos animales. Los resultados indican que la cepa 074 es capaz de saltar la barrera de especie y producir un proceso patológico en ratón. La variabilidad genética entre las cepas 074 y HF ha sido analizada mediante la técnica denominada "hibridación sustractiva supresora" (Suppressive Subtractive Hybridization, SSH). De este modo, se han identificado diferencias génicas entre ambas cepas que han sido utilizadas para extender el análisis a una colección de cepas procedentes de diferentes ambientes y hospedadores. Los resultados confirman la existencia de una importante variabilidad genética intraespecífica. Finalmente, se ha secuenciado y analizado el genoma de la cepa 074 lo que ha conducido a la identificación de, entre otros, seis islas genómicas y numerosos elementos móviles, genes de origen fágico, elementos de inserción y secuencias repetidas. Además, se ha puesto de manifiesto la presencia de diversos genes cuyos productos posiblemente ejerzan un papel importante en los mecanismos de patogenicidad de *L. garvieae*.

En conclusión, los resultados obtenidos en este trabajo aportan nuevos conocimientos sobre este microorganismo patógeno y pueden constituir un punto de partida para la futura caracterización de las claves genéticas de su virulencia.

Abreviaturas

AFLP: Amplified Fragment Length Polymorphism (polimorfismo de la longitud de los fragmentos amplificados).

ARDRA: Amplified rDNA gene Restriction Analysis (análisis de restricción de los genes codificantes de ARN ribosómico amplificados).

ARNm: ARN mensajero.

ARNr: ARN ribosómico.

ARNt: ARN transferencia.

BBH: Best Bidirectional Hit (mejor diana bidireccional).

BHI: Brain Heart Infusion (caldo de cerebro y corazón).

BUH: Best Unidirectional Hit (mejor diana unidireccional).

CAS: CRISPR-ASsociated.

CECT: Colección Española de Cultivos Tipo.

CLSI: Clinical Laboratory Standards Institute.

CMI: Concentración Mínima Inhibitoria.

CRISPR: Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeat.

DL₅₀: Dosis Letal 50.

DO: Densidad Óptica.

EDTA: EthyleneDiamineTetraacetic Acid (ácido etiléndiaminotetracético).

G + C: Guanina más Citosina.

HMM: Hidden Markov Model (modelo oculto de Markov).

HPLC: High-Performance Liquid Chromatography (cromatografía líquida de alta resolución).

IC: Índice de Competencia.

IPLA: Instituto de Productos Lácteos de Asturias.

LILA: Laboratorio Interprofesional Lechero de Asturias.

MIRA: Mimicking Intelligent Read Assembly.

MOPS: 3-MorpholinoPropane-1-Sulfonic acid (ácido morfolinopropanosulfónico).

ORF: Open Reading Frame (pauta abierta de lectura).

pb: pares de bases.

Kb: Kilobases.

Mb: Megabases.

PBS: Phosphate-Buffered Saline (solución salina tamponada con fosfato).

PCR: Polymerase Chain Reaction (reacción en cadena de la polimerasa).

PFGE: Pulsed Field Gel Electrophoresis (electroforesis en campo pulsante).

PHRAP: PHRagment Assembly Program.

RAPD: Random Amplification of Polymorphic DNA (amplificación al azar del polimorfismo del ADN).

RFLP: Restriction Fragment Length Polymorphism (polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción).

rpm: revoluciones por minuto.

RT-PCR: Reverse Transcriptase-PCR (transcriptasa reversa-PCR).

SDS: Sodium Dodecyl Sulfate (dodecilsulfato sódico).

SERIDA: Servicio Regional de Investigación y Desarrollo Agroalimentario.

SH: Subtractive Hybridization (hibridación sustractiva).

SSH: Suppressive Subtractive Hybridization (hibridación sustractiva supresora).

STM: Signature-Tagged Mutagenesis (mutagénesis de marcaje).

Tris: Tris-2-amino-2(hidroximetil)-1,3-propanodiol.

ufc: unidades formadoras de colonias.

Índice

1.	Introducción	1
1.1	Principales patologías bacterianas en acuicultura	1
1.2.	Infecciones provocadas por bacterias Gram-positivas en acuicultura. La estreptococosis	2
1.3.	Características generales de <i>L. garvieae</i>	2
1.4.	Diversidad intraespecífica de <i>L. garvieae</i>	4
1.5.	La lactococosis	6
1.6.	Importancia de <i>L. garvieae</i> como agente patógeno oportunista y zoonótico	9
1.7.	Mecanismos de patogenicidad de <i>L. garvieae</i>	10
1.8.	Secuenciación de genomas bacterianos completos	13
2.	Objetivos	15
3.	Material y Métodos	17
3.1.	Cepas bacterianas y condiciones de cultivo empleadas	17
3.2.	Técnicas generales de manipulación de ácidos nucleicos	19
3.2.1.	Aislamiento de ADN	19
3.2.2.	Reacciones de amplificación por PCR y PCR Inversa	20
3.2.3.	Aislamiento de ARN y reacciones de transcriptasa reversa-PCR (Reverse Transcriptase-PCR, RT-PCR)	20
3.2.4.	Hibridaciones ADN-ADN tipo Southern Blot y Dot Blot	21
3.3	Secuenciación de ADN y herramientas bioinformáticas empleadas	21
3.4	Ensayos de susceptibilidad bacteriana a antimicrobianos	22
3.5	Determinación del valor de DL ₅₀ de <i>L. garvieae</i> en trucha arcoíris	22
3.6	Análisis del mutante <i>L. garvieae</i> XVIII	23
3.6.1	Amplificación y análisis de la región génica adyacente a la inserción del transposón Tn917	23
3.6.2	Estudio de la organización transcripcional de los genes <i>dlt</i> en <i>L. garvieae</i>	24
3.6.3	Caracterización fenotípica	25
3.6.3.1	Determinación del crecimiento bajo distintas condiciones de cultivo	25

3.6.3.2	Ensayo de autólisis	25
3.6.3.3	Unión del colorante catiónico azul alcian	26
3.6.3.4	Ensayo de susceptibilidad a diferentes antimicrobianos catiónicos	26
3.6.3.5	Detección y cuantificación de D-alanina mediante cromatografía líquida de alta resolución (High-performance liquid chromatography, HPLC)	26
3.6.3.6	Observación mediante microscopía electrónica de transmisión	27
3.6.4	Análisis de la virulencia de las cepas 074 y mutante XVIII de <i>L. garvieae</i> en trucha arcoíris	27
3.6.4.1	Determinación del valor de DL ₅₀	27
3.6.4.2	Ensayo de competencia <i>in vivo</i>	27
3.6.4.3	Ensayo de competencia <i>in vitro</i>	28
3.7.	Estudio de la diversidad genética intraespecífica de <i>L. garvieae</i> mediante SSH	28
3.7.1.	Análisis de la virulencia de las cepas 074 y HF en trucha arcoíris y en ratón	28
3.7.2.	Selección de fragmentos génicos específicos de las cepas HF y 074 mediante SSH	29
3.7.3.	Comprobación del número de positivos mediante Dot Blot	30
3.7.4.	Ensayo de susceptibilidad al antibiótico tetraciclina	31
3.7.5.	Análisis mediante PCR de la presencia de fragmentos génicos específicos en 25 aislados de <i>L. garvieae</i>	31
3.7.6.	Ensayo de inducción de bacteriófagos lisogénicos	32
3.7.7.	Determinación de la localización en el genoma de fragmentos específicos de la cepa HF	33
3.8.	Secuenciación y análisis del genoma de la cepa <i>L. garvieae</i> 074	33
3.8.1.	Técnica de pirosecuenciación del ADN	33
3.8.2.	Ensamblado de las lecturas de secuencia de ADN	34
3.8.3.	Técnica de extremos pareados o "paired ends"	34
3.8.4.	Reensamblado de las lecturas de secuencia de ADN	34
3.8.5.	Anotación génica del cromosoma	35
3.8.5.1.	Anotación automática	35
3.8.5.2.	Anotación manual	36
3.8.6.	Identificación de islas genómicas, elementos de inserción, secuencias repetidas y elementos CRISPRs (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats)	37
3.9.	Números de acceso de las secuencias en las bases de datos	37
4.	Resultados	39
4.1.	Análisis de mutantes obtenidos mediante STM en <i>L. garvieae</i> : mutante XVIII	39
4.1.1.	Secuenciación y análisis de la región génica adyacente a la inserción del transposón Tn917	40
4.1.2.	Organización transcripcional de los genes <i>dlt</i> en <i>L. garvieae</i>	43
4.1.3.	Caracterización fenotípica	45
4.1.3.1.	Determinación del crecimiento bajo distintas condiciones de cultivo	45
4.1.3.2.	Ensayo de autólisis	45

4.1.3.3. Unión del colorante catiónico azul alcian	46
4.1.3.4. Ensayo de susceptibilidad a diferentes antimicrobianos catiónicos	47
4.1.3.5. Cuantificación de D-alanina mediante HPLC	48
4.1.3.6. Microscopía electrónica de transmisión	49
4.1.4. Determinación de la virulencia de las cepas 074 y mutante XVIII de <i>L. garvieae</i> en trucha arcoíris	50
4.1.4.1. Determinación del valor de DL ₅₀	50
4.1.4.2. Ensayo de competencia <i>in vivo</i>	50
4.1.4.3. Ensayo de competencia <i>in vitro</i>	50
4.2. Estudio de la diversidad genética intraespecífica de <i>L. garvieae</i> mediante SSH	50
4.2.1. Determinación de la virulencia de las cepas 074 y HF de <i>L. garvieae</i> en trucha arcoíris y en ratón	51
4.2.2. Selección de fragmentos génicos específicos de las cepas HF y 074 mediante SSH	52
4.2.3. Identificación de fragmentos génicos específicos de las cepas HF y 074	53
4.2.4. Distribución de fragmentos génicos específicos de las cepas HF y 074 en 25 aislados de <i>L. garvieae</i>	55
4.2.5. Inducción de bacteriófagos lisogénicos en cepas de <i>L. garvieae</i> aisladas de trucha arcoíris	57
4.2.6. Localización en el genoma de la cepa HF de fragmentos génicos específicos	58
4.3. Secuenciación y análisis del genoma de la cepa <i>L. garvieae</i> 074	59
4.3.1. Pirosecuenciación del ADN cromosómico	59
4.3.2. Aspectos generales del genoma	59
4.3.3. Islas genómicas, elementos de inserción, secuencias repetidas y elementos CRISPRs	61
4.3.4. Localización y análisis de los genes seleccionados mediante STM y SSH	64
4.3.5. Posibles genes implicados en virulencia	65
4.3.6. Predicción de rutas metabólicas	66
5. Discusión	69
5.1. Análisis de mutantes obtenidos mediante STM en <i>L. garvieae</i> : caracterización del fenotipo y determinación de la virulencia de un mutante en el gen <i>dltA</i>	69
5.2. Diversidad genética intraespecífica de <i>L. garvieae</i>	74
5.3. Secuenciación y análisis del genoma de la cepa <i>L. garvieae</i> 074	81
6. Conclusiones	89
7. Bibliografía	91
8. Anexos	107
8.1. Anexo I: secuencia de nucleótidos de los genes <i>dlt</i> de <i>L. garvieae</i> y secuencia de aminoácidos deducida	107

- 8.2. Anexo II: Reimundo, P., Menéndez, A., Méndez, J., Pérez-Pascual, D., Navais, R., Gómez, E., Braña, A. F. & Guijarro, J. A. (2010). *dltA* gene mutation in the teichoic acids alanylation system of *Lactococcus garvieae* results in diminished proliferation in its natural host. *Vet Microbiol* 143, 434-439 111
- 8.3. Anexo III: Reimundo, P., Rivas, A. J., Osorio, C. R., Méndez, J., Pérez-Pascual, D., Navais, R., Gómez, E., Sotelo, M., Lemos, M. L. & Guijarro, J. A. (2011). Application of suppressive subtractive hybridization to the identification of genetic differences between two *Lactococcus garvieae* strains showing distinct differences in virulence for rainbow trout and mouse. *Microbiology* 157, 2106-2119 117
- 8.4. Anexo IV: Reimundo, P., Pignatelli, M., Alcaraz, L. D., D'Auria, G., Moya, A. & Guijarro, J. A. (2011). Genome sequence of *Lactococcus garvieae* UNIUD074, isolated in Italy from a lactococcosis outbreak. *J Bacteriol* 193, 3684-3685 131

1. Introducción

1. Introducción

1.1. Principales patologías bacterianas en acuicultura

La Unión Europea define la acuicultura como la cría o cultivo de organismos acuáticos con técnicas encaminadas a aumentar, por encima de las capacidades naturales del medio, la producción de los organismos en cuestión. Durante las últimas décadas esta actividad ha experimentado un crecimiento exponencial notable a nivel mundial. España, además, constituye uno de los principales países de la Unión Europea en lo que a producción de especies derivadas de la acuicultura se refiere. De acuerdo con los datos recogidos por el Ministerio de Ambiente de Medio Rural y Marino en 2009, la cría de peces tanto marina como continental supuso una cuarta parte del total de la producción de acuicultura en nuestro país y, dentro de la misma, la trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) constituyó la principal especie de cultivo. El crecimiento de la acuicultura se ha visto asociado, debido en parte a su carácter de actividad de cría animal intensiva, a un incremento en la incidencia de procesos patológicos de diversa naturaleza. Las enfermedades infecciosas, y en particular las de etiología bacteriana y vírica, son la causa mayoritaria de las pérdidas económicas debido a la elevada mortalidad de los animales, los costes de los tratamientos y el descenso de la producción. Por todo ello, la investigación de las patologías infecciosas de peces tiene una especial importancia en acuicultura.

Las bacterias causantes de enfermedades en peces se pueden agrupar en:

- **Bacilos Gram-negativos aerobios y anaerobios facultativos:** tal vez sea el grupo más extenso y que, de forma general, más problemas provoca. Incluye Enterobacteriáceas como *Yersinia ruckeri* y *Edwardsiella tarda*, Vibrionáceas como *Listonella anguillarum*, *Vibrio vulnificus* y *Photobacterium damsela*, Aeromonodáceas como *Aeromonas salmonicida* y *Aeromonas hydrophila* y Pseudomonadáceas como *Pseudomonas fluorescens* y *Pseudomonas anguilliseptica*.
- **Cocos y bacilos Gram-positivos:** grupo que cada vez adquiere más relevancia y dentro del cual podemos citar a especies como *Streptococcus iniae*, *Streptococcus parauberis*, *Lactococcus garvieae*, *Carnobacterium piscicola*, *Vagococcus salmoninarum* y *Renibacterium salmoninarum*.

Introducción

- **Micobacteriáceas y Nocardióceas:** *Mycobacterium marinum*, *Mycobacterium fortuitum*, *Mycobacterium chelonae* y *Nocardia salmonicida*.
- **Flavobacteriáceas:** *Flavobacterium psychrophilum*, *Flavobacterium columnare*, *Flavobacterium branchiophilum* y *Tenacibaculum maritimum*.

1.2. Infecciones provocadas por bacterias Gram-positivas en acuicultura.

La estreptococosis

Pese a haber adquirido una mayor relevancia durante los últimos 25-30 años, los procesos infecciosos en peces ocasionados por bacterias Gram-positivas fueron descritos por primera vez a finales de los años cincuenta en Japón, donde se produjeron los primeros casos que afectaron a trucha arcoíris (Hoshina *et al.*, 1958). Desde entonces las infecciones en peces en acuicultura provocadas por microorganismos Gram-positivos se han ido extendiendo a todos los países de importancia piscícola, especialmente los de la cuenca mediterránea, registrándose brotes en el Reino Unido, Francia, Italia, España, Israel, Sudáfrica, Corea, Japón, Australia, Taiwán y EEUU (Austin & Austin, 2007; Barnes & Ellis, 2004). A la par que se han ido expandiendo geográficamente su gravedad también ha ido en aumento, causando cada vez mayores pérdidas económicas en las piscifactorías afectadas. En concreto en España, los primeros brotes se describieron a finales de los años ochenta en los centros de maricultura del Noroeste del país y en estas últimas décadas han afectado a numerosas piscifactorías de tipo continental.

La estreptococosis ha sido descrita en múltiples especies de peces y en su etiología pueden estar implicados distintos géneros y especies de cocos y cocobacilos Gram-positivos por lo que no debe ser considerada como una entidad única sino como un conjunto de enfermedades (Ghittino, 1999).

Pueden distinguirse dos grupos principales de estreptococosis:

- **Estreptococosis de agua caliente:** causa mortandad con temperaturas del agua superiores a 15°C y cuyos agentes etiológicos son *L. garvieae*, *S. iniae*, *Streptococcus agalactiae* y *S. parauberis*.
- **Estreptococosis de agua fría:** causa mortandad con temperaturas del agua inferiores a 15°C y cuyos agentes etiológicos son *V. salmoninarum*, *Lactococcus piscium* y *C. piscicola*.

1.3. Características generales de *L. garvieae*

La primera descripción de *L. garvieae* apareció en 1983 en un trabajo de investigación en el que se aisló la bacteria como agente causante de mastitis bovina. Los autores de dicho trabajo adscribieron esta especie, bajo el nombre de *Streptococcus garvieae*, a la familia *Streptococcaceae* y al género *Streptococcus* de acuerdo con sus características morfológicas y bioquímicas (Collins *et al.*, 1983; Garvie *et al.*, 1981). Tras

establecerse en 1985 los géneros *Lactococcus* y *Enterococcus* como independientes de los géneros *Streptococcus* y *Lactobacillus*, la especie pasó a llamarse *L. garvieae* (Schleifer *et al.*, 1985). Posteriormente, Kusuda *et al.* (1991) propusieron una especie nueva denominada *Enterococcus seriolicida* para englobar un grupo de aislados bacterianos Gram-positivos responsables de importantes pérdidas económicas en la acuicultura japonesa. Sin embargo, la alta semejanza encontrada a nivel fenotípico y molecular entre esta especie y los primeros aislados de *L. garvieae* encontrados en truchas arcoíris en Europa llevó a varios autores a concluir de forma independiente que debía ser reclasificada como *L. garvieae* (Doménech *et al.*, 1993; Eldar *et al.*, 1996; Pot *et al.*, 1996; Teixeira *et al.*, 1996).

L. garvieae es una bacteria Gram-positiva perteneciente a la familia *Streptococcaceae*. La taxonomía actual reconoce siete especies dentro del género *Lactococcus*: *Lactococcus lactis* (con las subespecies *lactis*, *cremoris* y *hordniae*), *L. garvieae*, *L. piscium*, *Lactococcus plantarum*, *Lactococcus raffinolactis*, *Lactococcus chungangensis* y *Lactococcus fujiensis* (Sandine, 1988; Schleifer *et al.*, 1985; Stackebrandt & Teuber, 1988; Williams *et al.*, 1990). Son microorganismos muy ubicuos, siendo sus hábitats más comunes los vegetales, piel de los animales, leche y productos lácteos. Algunas de las especies son empleadas en la industria alimentaria para la conservación de productos cárnicos, como iniciadores en la producción de quesos y como potenciadores del sabor. Actualmente algunas de las especies son consideradas como patógenos oportunistas debido a un aumento en los casos clínicos asociados a infecciones por estos microorganismos en humanos.

Las células de *L. garvieae* son bacterias mesófilas de morfología cocoide con un diámetro de 0'5-1'5 μm , inmóviles, no formadoras de esporas y que pueden disponerse en parejas o formando cadenas cortas (Figura 1.2). Son anaerobias facultativas, tienen un metabolismo homofermentativo y producen únicamente la forma L (+) del ácido láctico. Poseen requerimientos nutricionales complejos y auxotrofia para diversos aminoácidos y vitaminas. Las células de *L. garvieae* son capaces de crecer a pH 9'6, en presencia de un 6'5% de cloruro sódico y entre 10 y 42°C; si bien su temperatura óptima de crecimiento es 30°C. No producen indol ni sulfuro de hidrógeno, dan negativo en la prueba de la catalasa y positivo en la reacción de Voges-Proskauer. Son α -hemolíticas, aunque algunos autores han definido a esta bacteria como β -hemolítica (Teixeira *et al.*, 1996). El contenido de G + C de su ADN se estima en un 38% (Vos *et al.*, 2009).

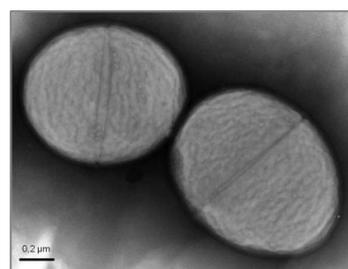


Figura 1.2. Células de *L. garvieae* observadas mediante microscopio electrónico.

1.4. Diversidad intraespecífica de *L. garvieae*

El estudio de la variabilidad intraespecífica de una bacteria proporciona información de interés no sólo para establecer una correcta clasificación taxonómica de la especie a la que pertenece sino también para lograr una mayor comprensión de la fisiología y evolución del microorganismo. El análisis de la diversidad genética intraespecífica permite además, en el caso de las bacterias patógenas, profundizar en el conocimiento de los mecanismos moleculares responsables de su virulencia. Por ello, varios autores han tratado de establecer una clasificación intraespecífica de *L. garvieae*.

Desde un punto de vista bioquímico, en los trabajos de Eldar *et al.* (1999) y Vela *et al.* (2000) se propuso la existencia de tres biotipos diferentes de la bacteria mediante los sistemas de tipificación API-20Strep y API-32Strep. Sin embargo, Ravelo *et al.* (2001) mostraron que los resultados obtenidos con estos sistemas de tipificación no se correlacionaban con los obtenidos utilizando los procedimientos clásicos de caracterización bioquímica. De este modo, aunque las cepas estudiadas presentaron diferencias para algunos caracteres no se pudo definir ninguno biotipo con valor epidemiológico. Por otra parte, Vela *et al.* (2000) propusieron una nueva clasificación intraespecífica basándose en la producción de ácido a partir de determinados azúcares (tagatosa, sacarosa, manitol y ciclodextrina) y en la presencia de los enzimas N-acetil- β -glucosaminidasa y ácido piroglutámico arilamidasa. Esta clasificación distinguió 13 biotipos de los cuales sólo seis se aislaron de peces.

También se ha puesto de manifiesto una variabilidad en *L. garvieae* desde el punto de vista serológico. Los aislados de *L. garvieae* recogidos en Japón presentaban dos serotipos asociados a la presencia (serotipo KG-) o ausencia (serotipo KG+) de cápsula (Kitao, 1982; Yoshida *et al.*, 1996; Yoshida *et al.*, 1997). Un estudio posterior indicó la existencia de tres serotipos: un serotipo capsulado japonés, un serotipo capsulado europeo y un serotipo no capsulado presente tanto en Japón como en Europa (Barnes & Ellis, 2004).

Se ha llevado a cabo una caracterización epidemiológica de aislados de *L. garvieae* procedentes de diferentes muestras animales mediante diversos métodos de tipado molecular. Entre ellos cabe destacar la amplificación al azar del polimorfismo del ADN (RAPD) (Foschino *et al.*, 2008; Ravelo *et al.*, 2003), la electroforesis en campo pulsante (PFGE) (Kawanishi *et al.*, 2006a; Vela *et al.*, 2000), la técnica de Sau-PCR (Foschino *et al.*, 2008), el polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción (RFLP) (Eldar *et al.*, 1999; Eyngor *et al.*, 2004), el análisis de restricción de los genes codificantes de ARN ribosómico amplificados (ARDRA) (Michel *et al.*, 2007) y el polimorfismo de la longitud de los fragmentos amplificados (AFLP) (Foschino *et al.*, 2008). Estos análisis permitieron establecer varios genogrupos, cada uno de ellos estrechamente relacionados con el hospedador de origen. Además, en el caso concreto de las cepas procedentes de especies acuícolas se demostró la existencia de tres clones genéticamente distintos en

función de su origen geográfico. Así, un primer clon estaría asociado a las cepas aisladas en España, Portugal, Reino Unido y Turquía, un segundo correspondería a las cepas aisladas en Francia e Italia y un tercer clon estaría a su vez constituido por las cepas procedentes de Japón (Ravelo *et al.*, 2003; Vela *et al.*, 2000).

Por otra parte, Eyngor *et al.* (2004) señalaron mediante una combinación de estudios moleculares y serológicos que en aquellas áreas donde *L. garvieae* era endémico había una homogeneidad genética y serológica proponiendo como causa una evolución clonal de la especie. Por el contrario, en las zonas donde la enfermedad era aún esporádica existía una variabilidad que podría deberse a la ausencia de un proceso evolutivo, lo que habría permitido mantener la diversidad genética de la bacteria. Asimismo, Ravelo *et al.* (2003) propusieron como factor influyente en la pérdida de diversidad genética de la bacteria la presión selectiva ejercida por las estrategias de vacunación en países con un largo historial de lactococosis.

La "hibridación sustractiva" (Subtractive Hybridization, SH) es una técnica que consiste en detraer las secuencias de ADN comunes entre dos cepas o especies bacterianas cercanas y clonar de forma selectiva las secuencias presentes de forma específica en una de las cepas. Dado que no se requiere disponer de ninguna información preliminar sobre el contenido génico de las cepas de estudio, esta técnica es especialmente útil para determinar las diferencias génicas existentes entre dos cepas de una misma especie bacteriana cuyo genoma aún no haya sido secuenciado (Winstanley, 2002). Por ello, la comparación de secuencias genómicas entre dos cepas con diferente potencial en virulencia mediante SH constituye una forma apropiada de abordar el descubrimiento de genes asociados con el proceso de patogenicidad.

La SH fue descrita por primera vez en 1990 como una estrategia para la identificación de ADN genómico ausente en mutantes de levaduras que presentaban deleciones (Straus & Ausubel, 1990). Desde entonces la técnica de SH ha sufrido diversas modificaciones (Akopyants *et al.*, 1998; Diatchenko *et al.*, 1996; Lisitsyn *et al.*, 1993; Yueqing *et al.*, 2006). De entre ellas la "hibridación sustractiva supresora" (Suppressive Subtractive Hybridization, SSH) es la alternativa de SH probablemente más utilizada en los últimos años. Descrita inicialmente por Diatchenko *et al.* (1996), la SSH fue aplicada por primera vez a bacterias por Akopyants *et al.* (1998) en un trabajo de investigación sobre *Helicobacter pylori*. Hoy en día existe un sistema comercial ("Clontech PCR-Select Bacterial Genome Subtraction Kit", BD Clontech UK, Hampshire) que convierte a la técnica en una opción sencilla y accesible para cualquier laboratorio. La SSH ha sido aplicada con éxito en bacterias patógenas de peces a la selección de factores relacionados con virulencia (Juiz-Río *et al.*, 2005; Olivares-Fuster & Arias, 2008; Pridgeon *et al.*, 2011; Wang *et al.*, 2009b; Zhang *et al.*, 2000), determinantes específicos de hospedador (Soule *et al.*, 2005) e islas genómicas (Yu *et al.*, 2005). La aplicación, pues, de la técnica de SSH al estudio de la diversidad genética en *L. garvieae* se

presenta como una alternativa sencilla y eficaz para profundizar en el conocimiento de esta bacteria y en la naturaleza de sus mecanismos de patogenicidad.

1.5. La lactococosis

La lactococosis es una forma de estreptococosis causada por *L. garvieae* que puede afectar a numerosas especies de peces de agua dulce, salobre y salada (Romalde & Toranzo, 2002; Williams *et al.*, 1990; Zlotkin *et al.*, 1998). Una de las especies más sensibles es la trucha arcoíris y los principales países afectados por esta patología son España, Italia, Francia y, en menor proporción, Reino Unido, Sudáfrica, Japón, Taiwán y Australia (Vendrell *et al.*, 2006). Constituye uno de los procesos infecciosos de mayor importancia en los últimos años en aquellos países que se dedican a la producción intensiva de trucha por lo que se considera una enfermedad emergente en salmonicultura con gran repercusión económica (Bercovier *et al.*, 1997).

La enfermedad suele cursar con cuadros septicémicos de una elevada mortalidad. Las manifestaciones externas son: oscurecimiento de la piel, aparición de áreas hemorrágicas alrededor del opérculo y del ano, letargia, anorexia y distensión abdominal; siendo el síntoma más llamativo una fuerte exoftalmia uni o bilateral con hemorragias en el globo ocular (Figura 1.1.a). Al realizar la necropsia se pueden observar hemorragias en hígado y vejiga natatoria, edema meningoencefálico, pericarditis, esplenomegalia y, de forma más característica, una enteritis hemorrágica muy acusada (Figura 1.1.b) (Eldar & Ghittino, 1999; Kusuda *et al.*, 1991; Vendrell *et al.*, 2006).

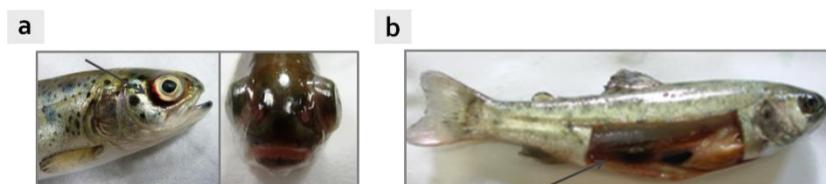


Figura 1.1. Signos clínicos observados en ejemplares de trucha arcoíris tras sufrir una infección provocada por *L. garvieae*: (a) hemorragia en globo ocular y exoftalmia bilateral manifiesta, (b) hemorragia en intestino (cortesía de A. Menéndez).

La detección de la bacteria en una piscifactoría no implica necesariamente la aparición de un brote. Hay una serie de factores que favorecen el desarrollo de un proceso infeccioso de lactococosis como son la especie hospedadora, el momento de desarrollo del pez y las condiciones ambientales. La trucha arcoíris es una especie muy sensible a este tipo de patología, la padece de forma aguda y con una tasa asociada de mortalidad superior al 50%. Si bien desde finales de los años ochenta se ha observado que las truchas de mayor tamaño son las más castigadas por esta enfermedad, tanto por el número de casos

presentados como por la gravedad de los mismos, parece que existe una tendencia a afectar a peces cada vez más pequeños. Por otro lado, la lactococosis es una patología estacional y debido a ello la aparición de brotes suele desencadenarse cuando la temperatura del agua asciende por encima de 18°C. Sin embargo, también se ha descrito su aparición a temperaturas entre 14 y 15°C (Ghittino & Múzquiz, 1998; Prieta *et al.*, 1993). Los brotes asociados a temperaturas del agua superiores a 18°C suelen producirse de forma más virulenta que a temperaturas más bajas. En este sentido, recientemente se ha planteado cómo el cambio climático, y más concretamente el consecuente ascenso de temperatura de las aguas, puede favorecer la introducción y el establecimiento de *L. garvieae* en nuevos nichos ecológicos del Norte de Europa (Marcos-López *et al.*, 2010). Finalmente, la calidad del agua de la piscifactoría es otro parámetro importante en la aparición y progresión de la infección. Así, la deficiencia de oxígeno y una excesiva concentración de amonio favorecen la severidad del proceso y la distribución del agente (Fukuda *et al.*, 1997a; Fukuda *et al.*, 1997b; Hurvitz *et al.*, 1997).

La **vía de entrada** más frecuente de la bacteria en una piscifactoría es la introducción de nuevos animales. Entre ellos pueden existir portadores asintomáticos que representan a su vez la fuente de infección principal. Por otro lado, se ha demostrado que distintos elementos del medio acuático como el barro, los sedimentos y el agua de la piscifactoría pueden actuar como reservorio de *L. garvieae* (Kitao *et al.*, 1979; Kusuda *et al.*, 1991).

La enfermedad se propaga de modo horizontal y se considera como **vía de transmisión** más importante la fecal-oral. Tanto los peces enfermos como los portadores subclínicos o asintomáticos llevan la bacteria en su microbiota intestinal y la eliminan por las heces al agua pudiendo infectar al resto de animales. Asimismo, los animales que se han recuperado de un episodio de lactococosis pueden seguir excretando la bacteria al exterior durante un cierto período de tiempo (Múzquiz *et al.*, 1999).

El **diagnóstico** de la lactococosis puede realizarse en un principio observando los signos clínicos de la enfermedad. La confirmación se consigue mediante el análisis microbiológico de los tejidos del pez, sobre todo del riñón y cerebro, aunque el agente se puede aislar también del hígado, bazo, ojos, intestino o sangre (Ghittino & Múzquiz, 1998). Este tipo de diagnóstico, aunque útil ante un proceso agudo, es insuficiente para detectar la presencia de la bacteria de forma subclínica o a partir de muestras en las que no esté presente en suficiente concentración. Por ello, debido a su alta sensibilidad y rapidez, los sistemas de diagnóstico más empleados en la actualidad son los basados en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (Aoki *et al.*, 2000; Zlotkin *et al.*, 1998) y sistemas de PCR múltiple que permiten la detección específica y simultánea de *L. garvieae* y otros patógenos responsables de enfermedades infecciosas en peces (Altinok, 2011; Baeck *et al.*, 2006; Mata *et al.*, 2004). Recientemente se ha desarrollado un sistema de PCR en tiempo real que permite la detección y cuantificación de *L. garvieae* de forma específica, reproducible y con una sensibilidad muy superior a los sistemas de PCR convencionales (Jung *et al.*, 2010).

El **tratamiento** de la lactococosis se basa en el uso de antibióticos como la oxitetraciclina, la eritromicina, la amoxicilina y la doxiciclina (Vendrell *et al.*, 2006). Sin embargo, este tipo de tratamiento quimioterápico, pese a producir buenos resultados en estudios *in vitro*, resulta a menudo poco efectivo bajo condiciones de campo. Esto es debido probablemente a la anorexia que conlleva la enfermedad (Aoki *et al.*, 1990; Bercovier *et al.*, 1997) y a la aparición constatada de resistencias a estos antibióticos en bacterias aisladas de los peces tratados, especialmente en el caso de la oxitetraciclina (Aoki *et al.*, 1990; Kawanishi *et al.*, 2005; Kim *et al.*, 2004; Maki *et al.*, 2008; Maki *et al.*, 2009; Royo *et al.*, 1999).

La **prevención** de la lactococosis debe considerar diversos aspectos:

- El mantenimiento de unas condiciones higiénico-sanitarias óptimas de las instalaciones constituyen la primera barrera para evitar la introducción de un patógeno en una piscifactoría. Para ello, es muy importante realizar un diagnóstico preventivo en los animales que llegan a la piscifactoría, mantener una baja densidad de peces por hectárea, reducir al mínimo su manipulación y establecer períodos de cuarentena evitando el contacto entre individuos infectados e individuos sanos. Asimismo, es muy conveniente establecer una vigilancia periódica de la calidad microbiológica del agua y los sedimentos así como llevar a cabo medidas de desinfección generales de los equipos y estanques con productos como el hipoclorito sódico o el peróxido de hidrógeno (Vendrell *et al.*, 2006).

- En la actualidad existen diferentes estrategias de vacunación como medidas de control de la lactococosis. Se han desarrollado autovacunas de células inactivadas con formalina (bacterinas) y bacterinas adyuvadas con aceite mineral que proporcionan un periodo de protección en torno a los tres-cinco meses aunque se observa una cierta variabilidad dependiendo de la especie de pez, de la cepa bacteriana, de la formulación de la vacuna y del empleo de adyuvantes (Bercovier *et al.*, 1997). Por otra parte, se ha demostrado que la inclusión de aceite no mineral en la formulación de la vacuna incrementa el periodo de protección en trucha arcoíris hasta los ocho meses (Ravelo *et al.*, 2005; Vendrell *et al.*, 2007). Las vacunas descritas únicamente suministran protección cuando se administran por vía intraperitoneal, lo que conlleva un incremento importante en los gastos de producción. De ahí la importancia del desarrollo y evaluación de vacunas orales como alternativa. Sin embargo, las vacunas orales desarrolladas hasta el momento no garantizan una protección completa como método de inmunización primaria, aunque sí resultan útiles como estrategia de prolongación del periodo de protección inmunitaria de los animales previamente vacunados por vía intraperitoneal frente a la lactococosis (Romalde *et al.*, 2004).

- Se han desarrollado estudios basados en la utilización de bacteriófagos como sistema alternativo y complementario en el control de la lactococosis. Así, Nakai *et al.* (1999) demostraron que la inyección intraperitoneal simultánea de un bajo número de células de *L. garvieae* y del bacteriófago PLg-16 protegía

a los peces frente a la posterior exposición a la bacteria. Del mismo modo, observaron que la administración única del bacteriófago vía oral también ejercía un efecto protector.

- Por otra parte, se ha probado el tratamiento con probióticos para controlar la patología provocada por *L. garvieae* en trucha arcoíris. La acción de los probióticos se fundamenta en la colonización rápida y focalizada del intestino, la producción de ácidos orgánicos y sustancias antimicrobianas de tipo bacteriocina y el estímulo de la inmunidad innata. Todo ello limita las capacidades de adherencia y posterior colonización del microorganismo patógeno en el hospedador. La administración como suplemento alimenticio de cepas de *Aeromonas sobria*, *Bacillus* sp., *Leuconostoc mesenteroides* y *Lactobacillus plantarum* aisladas del tracto digestivo de salmónidos sanos provocó un descenso acusado de la mortalidad por lactococosis en los grupos de peces tratados (Brunt & Austin, 2005; Brunt *et al.*, 2007; Vendrell *et al.*, 2008).

1.6. Importancia de *L. garvieae* como agente patógeno oportunista y zoonótico

L. garvieae supone un importante factor de riesgo para la acuicultura continental de la cuenca mediterránea causando pérdidas de entre el 50 y el 80% del total de la producción (Ghittino & Prearo, 1992). Esta bacteria se caracterizó en 1983, sin embargo, como agente etiológico de mastitis bovina y desde entonces ha sido relacionada en varias ocasiones con infecciones bovinas intramamarias (Carvalho *et al.*, 1997; Collins *et al.*, 1983; Devriese *et al.*, 1999; Garvie *et al.*, 1981; Teixeira *et al.*, 1996; Vela *et al.*, 2000; Wyder *et al.*, 2010). *L. garvieae* ha sido también identificado como un componente de la microbiota intestinal en humanos (Kubota *et al.*, 2010). Además, se han descrito varios episodios infecciosos en humanos causados por la bacteria (Aubin *et al.*, 2011; Chan *et al.*, 2011; Wilbring *et al.*, 2011; Zuily *et al.*, 2011). En un principio, y debido a su escasa incidencia, se consideró un agente patógeno oportunista de baja virulencia en mamíferos capaz de infectar únicamente a hospedadores inmunodeprimidos. Sin embargo, la posterior aparición de nuevos casos clínicos demostró la capacidad de la bacteria para infectar tanto a individuos inmunodeprimidos como a individuos inmunocompetentes (Aubin *et al.*, 2011; Chan *et al.*, 2011; Wilbring *et al.*, 2011; Zuily *et al.*, 2011). Asimismo, *L. garvieae* ha sido aislado en un sorprendente número de muestras biológicas como: verduras (Kawanishi *et al.*, 2007), quesos (Alegría *et al.*, 2009; El-Baradei *et al.*, 2007; Flórez & Mayo, 2006; Fortina *et al.*, 2007), muestras de carne y leche cruda de vaca (Barakat *et al.*, 2000; Villani *et al.*, 2001), productos cárnicos procesados (Ammor *et al.*, 2004; Barakat *et al.*, 2000; Davila *et al.*, 2006; Rantsiou *et al.*, 2005), productos fermentados derivados del pescado (Kopermsub & Yunchalard, 2010; Paludan-Müller *et al.*, 2002), delfín mular (Evans *et al.*, 2006) y amígdalas de gato y perro (Pot *et al.*, 1996). Dada la distribución ubicua que presenta *L. garvieae* varios autores

destacan la importancia creciente de esta bacteria en la actualidad como potencial agente zoonótico, aunque su incidencia en este sentido aún no sido demostrada.

1.7. Mecanismos de patogenicidad de *L. garvieae*

Los conocimientos que se tienen en la actualidad sobre los mecanismos de patogenicidad de *L. garvieae* son aún muy limitados pese a ser un microorganismo patógeno de reconocida importancia en acuicultura y poseer una significancia cada vez más relevante en veterinaria y medicina clínica. Se han podido identificar en esta bacteria, sin embargo, una serie de factores relacionados con el establecimiento, la supervivencia y la capacidad invasiva de la mayor parte de microorganismos patógenos en el hospedador.

La **cápsula** es considerada un factor esencial en virulencia ya que protege a las bacterias de la fagocitosis mediada por neutrófilos y macrófagos durante el desarrollo de una respuesta inmune de tipo innato del hospedador en un proceso infeccioso (Roberts, 1996). La cápsula permite también a las bacterias evadir la acción de los antibióticos además de proporcionarles adhesión a las células del hospedador y una mayor resistencia a la desecación (Roberts, 1996). Así, la presencia de cápsula ha sido relacionada con la virulencia de diversas especies bacterianas patógenas de peces pertenecientes al género *Streptococcus* (Agnew & Barnes, 2007; González-Contreras *et al.*, 2011). De modo similar, se ha descrito que los serotipos capsulados de *L. garvieae* son más virulentos que los no capsulados debido probablemente a las propiedades anteriormente descritas que les confiere la cápsula (Barnes *et al.*, 2002; Kang *et al.*, 2004; Kawanishi *et al.*, 2007; Ooyama *et al.*, 2002). Por otra parte, el análisis inmunoproteómico de aislados capsulados y no capsulados de la bacteria puso de manifiesto la existencia de un mayor número de antígenos de superficie en los no capsulados, lo que explicaría la respuesta inmune de mayores dimensiones producida por este serotipo en el hospedador (Shin *et al.*, 2007). Pese a que se dispone de poca información acerca de la cápsula de *L. garvieae* se ha propuesto que esté compuesta básicamente por ácido hialurónico, componente común en las cápsulas de bacterias Gram-positivas (Cunningham, 2000). Esta afirmación se basa en la ausencia de aglutinación observada de los serotipos capsulados en presencia de lectinas incapaces de reconocer este carbohidrato (Barnes & Ellis, 2004).

El **hierro** es un elemento esencial para la mayoría de organismos vivos debido a su participación en numerosos procesos bioquímicos celulares (Earhart, 1996). En un proceso infeccioso el agente patógeno se ve obligado a adquirir este metal del hospedador para sobrevivir, donde los niveles de hierro libre son prácticamente inexistentes (Wandersman & Delepelaire, 2004). Por ello, los microorganismos han desarrollado dos sofisticados sistemas que permiten la captación de hierro de forma eficaz bajo estas

circunstancias. El primero de estos mecanismos es la captación de hierro mediada por moléculas de bajo peso molecular, o sideróforos, capaces de unirse a este elemento con una alta afinidad y especificidad aún cuando este se encuentre asociado a complejos insolubles o compuestos del hospedador (Ratledge & Dover, 2000). El segundo mecanismo es la adquisición de hierro mediante la interacción directa de proteínas específicas de la superficie celular bacteriana con proteínas del hospedador que transportan este metal como la transferrina, la lactoferrina y la hemoglobina (Ratledge & Dover, 2000). Además de estos dos mecanismos básicos se ha descrito que algunas bacterias patógenas pueden producir enzimas como proteasas o hemolisinas que aumentan la eficacia de estos sistemas liberando hierro y hemoglobina mediante la degradación en el hospedador de proteínas transportadoras de hierro y de eritrocitos, respectivamente (Genco & Dixon, 2001). Se ha descrito una amplia variedad de sistemas de captación de hierro dependientes e independientes de sideróforos en bacterias patógenas de peces y se ha demostrado que estos ejercen un papel relevante en la virulencia de los microorganismos (Balado *et al.*, 2009; Fernández *et al.*, 2007; Fouz *et al.*, 1994; Lemos & Osorio, 2007; López & Crosa, 2007; Magarinos *et al.*, 1994; Wang *et al.*, 2009a; Zou *et al.*, 2010). En *L. garvieae* se detectó la presencia de sideróforos de naturaleza química desconocida, lo que sugiere que dichas moléculas podrían jugar un papel importante en la captación de hierro durante el proceso infeccioso (Schmidtke & Carson, 2003). Además, aunque no existe una evidencia directa de que *L. garvieae* exprese proteínas reguladas por hierro sí se han observado variaciones en los perfiles proteicos en función de la disponibilidad de este metal en el medio de cultivo (Schmidtke & Carson, 2003).

Las **toxinas** son moléculas de naturaleza diversa producidas por las bacterias para destruir o dañar las células del hospedador. Existen toxinas de naturaleza proteica, también llamadas exotoxinas, que pueden ser secretadas al medio extracelular o ser introducidas directamente en el citoplasma de la célula huésped mediante diversos sistemas. Se ha puesto de manifiesto la importancia de este tipo de proteínas en numerosos procesos infecciosos bacterianos en peces (Baiano & Barnes, 2009; Costa-Ramos *et al.*, 2011; Wang *et al.*, 2010). Por otro lado, el peptidoglicano y el exopolisacárido extracelular de bacterias Gram-positivas son capaces de inducir una respuesta inflamatoria aguda y, como consecuencia de la misma, un shock séptico en el hospedador (Eyngor *et al.*, 2010; Milani *et al.*, 2010; Wilson *et al.*, 2002). En este sentido, se ha indicado la existencia en *L. garvieae* de productos intracelulares y extracelulares que actúan como toxinas ya que son capaces de reproducir los síntomas de la enfermedad cuando son inyectados intramuscularmente en trucha arcoíris (Kimura & Kusuda, 1982; Kusuda & Hamaguchi, 1989).

Las **bacteriocinas** son péptidos de síntesis ribosomal que ejercen una actividad antimicrobiana. La producción de este tipo de moléculas en bacterias lácticas y su aplicación como conservantes se considera de gran interés en la industria alimenticia (Gálvez *et al.*, 2007). Se ha descrito la producción de

dos tipos de bacteriocinas en *L. garvieae* llamadas Garvicina ML y Garvicina L1-5 cuyo amplio espectro de acción incluye numerosas especies de bacterias Gram-positivas así como varias cepas de *L. garvieae* pero ninguna especie de bacterias Gram-negativas (Borrero *et al.*, 2011; Villani *et al.*, 2001).

Un rasgo común a muchas bacterias patógenas es la expresión de factores de adherencia o **adhesinas** de naturaleza polisacáridica o proteica. La expresión de estos factores constituye un paso clave en el inicio del proceso infeccioso ya que permite que las bacterias se unan a receptores en los diferentes tejidos del hospedador dificultando así que éste las elimine (Wilson *et al.*, 2002). Prueba de ello son las diferentes estrategias de adhesión adoptadas por *A. salmonicida*, *S. iniae* y *E. tarda*, cuya acción favorece la colonización bacteriana del pez (Baiano & Barnes, 2009; Dacanay *et al.*, 2010; Garduño *et al.*, 2000; Sakai *et al.*, 2009). Se cree que un prerrequisito en la propagación y progresión de la infección por *L. garvieae* es la colonización de la mucosa intestinal (Kusuda & Kawai, 1982; Taniguchi, 1982). A través de un estudio reciente Vendrell *et al.* (2009) confirmaron que la bacteria posee una elevada capacidad de adhesión a las células intestinales del pez así como a las células hepáticas y epiteliales. Se ha sugerido que los glicosfingolípidos (GSL), componentes ubicuos de la membrana plasmática de las células eucariotas, actuarían como receptores bacterianos en los tejidos del hospedador (Shima *et al.*, 2006).

Hasta hace poco tiempo, y por imposibilidades técnicas, el estudio de los determinantes de virulencia de un patógeno se llevaba a cabo *in vitro*, condición que no refleja fielmente la interacción entre la bacteria y el hospedador. La técnica de “**mutagénesis de marcaje**” (Signature-Tagged Mutagenesis, STM) permite seleccionar en un modelo infectivo de interacción bacteria-hospedador cepas mutantes en genes que son esenciales durante el desarrollo del proceso infeccioso. Estos mutantes presentan por ello una ausencia o limitación del crecimiento en el hospedador y una virulencia atenuada en relación a la cepa parental (Lehoux & Levesque, 2000). Esta técnica se ha aplicado con éxito en *L. garvieae* empleando el transposón Tn917 y obteniendo como resultado 29 mutantes con un crecimiento claramente limitado en el hospedador (Menéndez *et al.*, 2007). Estos mutantes tienen interrumpidos genes implicados directa o indirectamente en el establecimiento y desarrollo de la infección y, por tanto, esenciales para avanzar en el estudio de los mecanismos de patogenicidad específicos de este microorganismo. Entre estos genes se encuentran genes que codifican una asparragina sintetasa, una quitinasa, una alfa-acetolactato sintasa, un transportador de cationes, una proteína implicada en la incorporación de residuos de D-alanina a los ácidos teicoicos y lipoteicoicos de la pared de peptidoglicano y un transportador de glutamina (Menéndez *et al.*, 2007). Más concretamente, el mutante *L. garvieae* XVIII presenta interrumpido el gen *dltA* perteneciente al operón *dlt* y encargado de incorporar D-alanina a los ácidos teicoicos y lipoteicoicos de la pared celular bacteriana (Neuhaus & Baddiley, 2003). El efecto que resulta de toda mutación en cualquiera de los genes del operón es un aumento de la carga neta polianiónica de la pared celular y esto a su vez puede tener consecuencias muy variables en la fisiología del microorganismo (Neuhaus & Baddiley, 2003).

Así, se han realizado diversos estudios que relacionan un déficit de D-alanina debido a mutaciones en uno, varios, o todos los genes del operón *dlt* con efectos fenotípicos concretos. Asimismo, se ha establecido una correlación entre virulencia y defectos en la incorporación de D-alanina a los ácidos teicoicos y lipoteicoicos de la pared celular de *Listeria monocytogenes* (Abachin *et al.*, 2002), *S. agalactiae* (Poyart *et al.*, 2003) y *Staphylococcus aureus* (Collins *et al.*, 2002).

1.8. Secuenciación de genomas bacterianos completos

Durante la última década las llamadas tecnologías de secuenciación de nueva generación han experimentado un notable desarrollo. De forma paralela ha sido necesaria la creación de programas informáticos que permitieran ensamblar de forma específica las secuencias de ADN obtenidas de este modo debido a ser mucho más numerosas y tener un tamaño menor que las producidas mediante la secuenciación tradicional de tipo Sanger. De este modo la velocidad con la que han avanzado los sistemas de secuenciación del ADN, la mejora de las herramientas bioinformáticas y la reducción del precio de la secuenciación han hecho posible que la secuenciación de genomas completos se pueda hoy llevar a cabo en un breve plazo de tiempo y con un coste asociado razonable. Como consecuencia, se ha observado un aumento exponencial en el número de genomas microbianos incorporados a las bases de datos internacionales durante los últimos años (Figura 1.3). Así, según datos oficiales de 2011 del proyecto genoma desarrollado por el National Center for Biotechnology Information (NCBI), 1508 genomas bacterianos ya han sido secuenciados por completo y 4516 se encuentran actualmente en proceso de secuenciación.

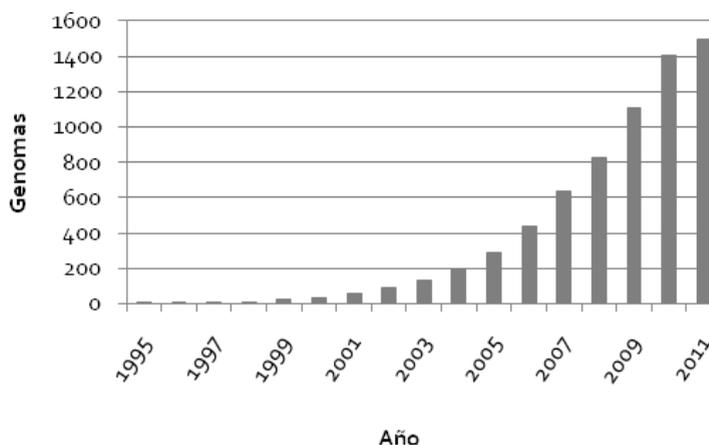


Figura 1.3. Número acumulado de genomas microbianos publicados en el NCBI durante los últimos años.

Introducción

La información obtenida mediante la secuenciación y anotación de un genoma bacteriano permite extraer conclusiones sobre aspectos relevantes de la bacteria como, por ejemplo, sus rutas metabólicas, su adaptación fisiológica a un nicho ecológico concreto o los eventos de pérdida y adquisición de genes que han transcurrido a lo largo de su proceso evolutivo (Guzmán *et al.*, 2008). Además, en el caso de bacterias patógenas el estudio de la información contenida en su genoma facilita la identificación de los genes que codifican los factores asociados con su virulencia. Esto, a su vez, posibilita que en un futuro próximo puedan desarrollarse mejores técnicas de diagnóstico, prevención y tratamiento de las principales infecciones bacterianas conocidas (Guzmán *et al.*, 2008). De modo similar, la comparación de secuencias genómicas de diferentes cepas de una misma especie o de dos especies filogenéticamente cercanas proporciona información fundamental acerca de las funciones y relaciones evolutivas de la mayoría de genes presentes en cualquier genoma. La genómica comparativa permite analizar también la distribución de elementos genéticos móviles, elementos de inserción y transposición o genes de resistencia a antibióticos entre especies bacterianas próximas (Binnewies *et al.*, 2006).

Sorprendentemente, y a pesar de la importancia que tiene *L. garvieae* en los diferentes ámbitos expuestos a lo largo de la introducción, no se conoce la secuencia genómica de ninguna cepa de la especie. La mayor fuente de información acerca de su contenido génico proviene de un estudio comparativo basado en "microarrays" de las especies *L. garvieae*, *L. lactis* subsp. *lactis* y *Streptococcus pneumoniae* en el que se consiguieron identificar 267 genes potencialmente presentes en el genoma de *L. garvieae* (Aguado-Urda *et al.*, 2010). Por ello, la secuenciación del cromosoma de *L. garvieae* y, sobre todo, el análisis de la información obtenida de este modo se presentan como estrategias adecuadas para profundizar en el conocimiento de la biología y la patogenicidad de la bacteria a la vez que para desarrollar medidas preventivas y terapéuticas adecuadas para el control de la enfermedad que produce.

2. Objetivos

2. Objetivos

L. garvieae es el agente etiológico de una grave patología en acuicultura y un potencial microorganismo zoonótico causante de diversas infecciones oportunistas en humanos. A pesar de ello, el conocimiento que existe acerca de la biología, en general, y de la variabilidad intraespecífica y los mecanismos de patogenicidad, en particular, de este microorganismo es limitado. Para tratar de aportar datos que contribuyan a paliar en parte este déficit, los objetivos propuestos para el desarrollo de este trabajo fueron los siguientes:

1. Caracterización de mutantes obtenidos mediante STM en *L. garvieae*. Estudio del mutante en el gen *dltA*.
2. Estudio de la variabilidad intraespecífica de *L. garvieae* mediante la aplicación de la técnica de SSH.
3. Secuenciación y análisis del genoma de una cepa de *L. garvieae* aislada de trucha arcoíris.

Objetivos

3. Material y Métodos

3. Material y Métodos

3.1. Cepas bacterianas y condiciones de cultivo empleadas

Las características de las cepas empleadas en este estudio se describen en la **Tabla 3.1**.

Escherichia coli se cultivó a 37°C en el medio líquido 2XTY con una agitación de 250 rpm. La composición del medio 2XTY por 1 l de agua destilada es: 16 g de triptona (Merck), 10 g de extracto de levadura (Laboratorios Conda) y 5 g de cloruro sódico (Merck). Se añadió agar al 2% (p/v) para el cultivo en medio sólido.

Las cepas de *L. garvieae* se cultivaron de forma rutinaria a 28°C en el medio "caldo de cerebro y corazón" (Brain Heart Infusion, BHI, Oxoid) y en estático. Para realizar los ensayos de inducción de bacteriófagos lisogénicos se empleó el medio de cultivo M17 (Oxoid) con glucosa (Scharlau) al 0'5% (p/v) (GM17). En la determinación de la susceptibilidad bacteriana a antimicrobianos se utilizó el medio de cultivo Mueller-Hinton (Oxoid) al que se le añadieron las sales cloruro cálcico (Scharlau) y cloruro de magnesio (Merck) (CAMHB) en unas concentraciones finales de 25 µg/ml y 12'5 µg/ml, respectivamente. Para obtener medios de cultivo sólidos y semisólidos se añadió agar al 2% y al 0'75% (p/v), respectivamente.

En los casos en que fue necesario se añadieron al medio de cultivo los antibióticos eritromicina, tetraciclina y ampicilina (Sigma Aldrich Co.) en unas concentraciones finales de 1 µg/ml, 20 µg/ml y 100 µg/ml, respectivamente.

El control del crecimiento de los cultivos se realizó midiendo la densidad óptica a 600 nm (DO_{600}) con un espectrofotómetro Perkin-Elmer a diferentes tiempos de incubación.

Tabla 3.1. Cepas bacterianas empleadas en este trabajo.

Cepa	Hospedador	Origen geográfico/Año	Fuente
<i>E. coli</i>			
DH5 α pir			Universidad de Santiago de Compostela
<i>L. garvieae</i>			
Mutante XVIII (<i>dltA</i> Δ Tn917)			(Menéndez <i>et al.</i> , 2007)
UNIUD020	Trucha arcoíris (<i>Oncorhynchus mykiss</i>)	Italia/1999	Universidad de Udine
UNIUD101	Trucha arcoíris	Italia/2004	Universidad de Udine
UNIUD028	Trucha de arroyo (<i>Salvelinus fontinalis</i>)	Italia/2000	Universidad de Udine
UNIUD074 (074)	Trucha arcoíris	Italia/ 2001	Universidad de Udine
UNIUD041	Trucha arcoíris	Italia/ 2001	Universidad de Udine
LIZ-4	Trucha arcoíris	Zaragoza (España)/2004	Universidad de Zaragoza
A3	Trucha arcoíris	Zaragoza (España)/2002	SERIDA
A1201	Trucha arcoíris	Zaragoza (España)/2001	SERIDA
A103	Trucha arcoíris	Zaragoza (España)/2002	SERIDA
BO287	Trucha arcoíris	Galicia (España)/2007	BioMar Iberia
BO123	Trucha arcoíris	Galicia (España)/2003	BioMar Iberia
BO340	Trucha arcoíris	Asturias (España)/2000	BioMar Iberia
BO165	Trucha arcoíris	Castilla y León (España)/2005	BioMar Iberia
BO242	Trucha arcoíris	Castilla la Mancha (España)/2002	BioMar Iberia
BO207	Trucha arcoíris	Castilla la Mancha (España)/2007	BioMar Iberia
BO223	Trucha arcoíris	Navarra (España)/2003	BioMar Iberia
BO222	Trucha arcoíris	Cataluña (España)/2002	BioMar Iberia
CECT 4828	Medregal del Japón (<i>Seriola quinqueradiata</i>)	Kochi, (Japón)/1974	CECT
CECT 5274	Medregal del Japón	Kochi, (Japón)/1974	CECT
HF	Humano	Paris (Francia)/2004	Hôpital Lariboisière de Paris
CECT 5073	Leche cruda	Reino Unido/1949	CECT
4AB5	Queso	Asturias (España)/2009	IPLA
T11	Queso	Asturias (España)/2009	IPLA
Q121	Queso	Asturias (España)/2009	IPLA
CECT 5074	Mastitis bovina	Reino Unido /1979	CECT
CECT 4531	Mastitis bovina	Reino Unido /1973	CECT
LILA.1	Mastitis bovina	Asturias (España)/2009	LILA

CECT: Colección Española de Cultivos Tipo LILA: Laboratorio Interprofesional Lechero de Asturias IPLA: Instituto de Productos Lácteos de Asturias SERIDA: Servicio Regional de Investigación y Desarrollo Agroalimentario.

3.2. Técnicas generales de manipulación de ácidos nucleicos

Las técnicas rutinarias de manipulación de ácidos nucleicos se llevaron a cabo según la metodología descrita por Sambrook & Russell (2001).

3.2.1. Aislamiento de ADN

La extracción de ADN cromosómico de *L. garvieae* se realizó empleando los sistemas "Gen Elute Bacterial Genomic DNA Kit" (Sigma Aldrich Co.), "Easy-DNA™ Kit" (Invitrogen, Life Technologies, Carlsbad, CA, EEUU) y "UltraClean® Mega Soil DNA" (MO BIO Laboratories, Inc.) siguiendo las instrucciones de los fabricantes.

El ADN plasmídico de las células de *E. coli* se aisló mediante el sistema "QIAprep Spin Miniprep Kit" (Quiagen, Valencia, CA, EEUU).

La purificación del ADN plasmídico de la cepa *L. garvieae* HF se llevó a cabo mediante el método de lisis descrito por O'sullivan & Klaenhammer (1993) con diversas modificaciones. Se centrifugaron 5 ml de un cultivo bacteriano en fase estacionaria de crecimiento ($DO_{600}: 1'5$) a 13.000 rpm durante 10 min y las células presentes en el sedimento se resuspendieron en 200 μ l de solución I (STE: Sacarosa 10'3%; Tris HCl pH 8, 25 mM; EDTA 25 mM; lisozima 50 mg/ml). La suspensión celular se incubó a 37°C durante 30 min y seguidamente se añadieron 400 μ l de solución II (SDS 3%; NaOH 0'4 N). Pasados 7 min se añadieron 300 μ l de solución III (Acetato potásico, 3M, pH 4'8) fría y la muestra se mantuvo durante 5 min en hielo. Esta solución se centrifugó a 13.000 rpm durante 10 min y se recogió el sobrenadante. Tras añadir RNAsa en una concentración final de 40 μ g/ml, la suspensión se incubó a 37°C durante 30 min. A continuación se añadieron 800 μ l de fenol-cloroformo (1:1) y la mezcla se centrifugó a 13.000 rpm durante 5 min tras los cuales se recogió el sobrenadante. Después de repetir este paso dos veces se añadieron 800 μ l de cloroformo-isoamilalcohol (24:1) y la mezcla se centrifugó a 13.000 rpm durante 5 min. El ADN presente en el sobrenadante recogido en este último paso se precipitó mediante la adición de 800 μ l de isopropanol durante 30 min a -20°C. Finalmente, se centrifugó la muestra a 13.000 rpm durante 10 min, se eliminó el sobrenadante y se realizó un lavado con 200 μ l de etanol 70% (v/v) mediante centrifugación. El ADN precipitado se secó en un concentrador por vacío y centrifugación (Labconco) durante 5 min y se resuspendió en un volumen final de 20 μ l de agua miliQ estéril.

3.2.2. Reacciones de amplificación por PCR y PCR Inversa

Las reacciones de amplificación por PCR se llevaron a cabo empleando 100 ng de ADN cromosómico como molde y los reactivos enzima ADN Taq polimerasa, tampón de reacción y didesoxinucleósidos trifosfato (KAPA Biosystems, Ciudad del Cabo, Sudáfrica; Biotools BB&M Labs. S.A.) en las concentraciones recomendadas por los fabricantes.

Con el fin de amplificar regiones adyacentes a una secuencia de ADN conocida se realizaron reacciones de amplificación por PCR inversa (Figura 3.1). Para ello, 3 µg de ADN cromosómico se digirieron con la correspondiente enzima de restricción durante 5 h a 37°C y los fragmentos de ADN obtenidos se sometieron a la acción del enzima T₄ ADN ligasa durante 12 h a 16°C. La mezcla de ligación se utilizó como ADN molde en una reacción de PCR en la que se empleó el sistema "Certamp Kit for Long Amplifications" de Biotools BB&M Labs. S.A. Las enzimas de restricción se adquirieron en las casas comerciales Takara Bio Inc. y New Englands BioLab, y el enzima ADN ligasa del fago T₄ en Roche Diagnostics.

3.2.3. Aislamiento de ARN y reacciones de transcriptasa reversa-PCR (Reverse Transcriptase-PCR, RT-PCR)

La extracción del ARN total de las cepas de *L. garvieae* se realizó a partir de 2 ml de un cultivo en fase estacionaria de crecimiento (DO_{600} : 1'5). El ARN se extrajo siguiendo las instrucciones del sistema "RNeasy Mini Kit" (Quiagen, Valencia, CA, EEUU) y fue posteriormente sometido a tratamiento con la enzima DNasa libre de actividad RNasa "DNase I-RNase-free" (Ambion Inc.) para eliminar posibles trazas de ADN. Las reacciones control de PCR se llevaron a cabo con la enzima ADN polimerasa "Taq Platinum 2" (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, EEUU) para confirmar que el ARN estaba libre de ADN contaminante. Las reacciones de RT-PCR se realizaron con el sistema "Superscript One-Step Kit" (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, EEUU) con la enzima ADN polimerasa "Taq Platinum 2" y en cada reacción se emplaron 70 ng de ARN como molde. Además, se incluyeron controles negativos en cada reacción en los que se omitió únicamente el paso de transcripción reversa, lo que permite detectar la presencia de trazas de ADN.

Las reacciones de amplificación por PCR, PCR inversa y RT-PCR se realizaron en un termociclador GeneAmp PCR System 9700 (PE Applied Biosystems) y los oligonucleótidos empleados como iniciadores en ellas se diseñaron mediante el programa informático Primer 3 versión 0.4.0 (Rozen & Skaletsky, 2000) y se sintetizaron en Sigma Aldrich Co. En cada ensayo se indican los iniciadores y condiciones específicos utilizados en la reacción. Los productos de amplificación obtenidos se analizaron mediante electroforesis

en gel de agarosa al 0'75% o al 1'5% (p/v) en función del tamaño esperado y se purificaron mediante los sistemas "QIAquick PCR Purification Kit" (Quiagen, Valencia, CA, EEUU) y "GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit" (GE Healthcare Limited) cuando fue necesario su uso en aplicaciones posteriores.

3.2.4. Hibridaciones ADN-ADN tipo Southern Blot y Dot Blot

En las hibridaciones de tipo Southern Blot las muestras de ADN se separaron por electroforesis en un gel de agarosa al 0'75% (p/v) y, posteriormente, se transfirieron a una membrana de nylon "Amersham Hybond-N" (GE Healthcare Limited). Seguidamente, el ADN transferido se fijó a la membrana mediante su exposición durante 3 min a luz UV en un transiluminador Gel Doc XR System (Bio-Rad Laboratories) y a continuación se hibridó con la sonda de ADN. La sonda utilizada en cada experimento se generó mediante una reacción de amplificación por PCR en la que se emplearon los desoxinucleósidos trifosfato marcados con digoxigenina "PCR DIG labelling mix" (Roche Diagnostics). La detección de los ácidos nucleicos marcados con digoxigenina se realizó empleando el anticuerpo antidigoxigenina conjugado con la enzima fosfatasa alcalina "Anti-Digoxigenin-AP Fab fragments" de Roche Diagnostics. El revelado se llevó a cabo por quimioluminiscencia utilizando el sustrato luminiscente de la fosfatasa alcalina "CDP-Star" de Roche Diagnostics y la película para radiografías "Amersham Hyperfilm MP" (GE Healthcare Limited).

En las hibridaciones de tipo Dot Blot las muestras de ADN se desnaturalizaron e inmediatamente después se transfirieron a una membrana de nylon "Amersham Hybond-N" (GE Healthcare Limited) previamente activada con 5 ml de 2XSSC (cloruro sódico 0'3 M, citrato de sodio 0'03 M, pH 7) mediante un aparato Minifoldus II (Schleicher & Schuell, Dassel, Alemania). El ADN transferido se expuso a luz UV durante 2 min en un aparato UV-crosslinker (Linus) para ser fijado a la membrana y, a continuación, se hibridó con la sonda de ADN. El marcado de la sonda y los tratamientos a los que fueron sometidas las membranas se realizaron siguiendo las instrucciones del sistema "ECL Direct Nucleic Acid Labelling and Detection System" (GE Healthcare Limited).

3.3. Secuenciación de ADN y herramientas bioinformáticas empleadas

La secuenciación de los productos de amplificación por PCR y PCR inversa se llevó a cabo siguiendo el método de terminación de la cadena por didesoxinucleótidos con un kit de secuenciación "DR Terminator Taq FS" (PE Applied Biosystems) en un secuenciador de ADN automático ABI-PRISM 310A (PE Applied Biosystems) perteneciente al servicio de secuenciación de la Universidad de Oviedo.

Los plásmidos obtenidos en los experimentos de SSH fueron secuenciados mediante el método de terminación de la cadena por didesoxinucleótidos en un secuenciador de ADN automático CEQ 8000 (Beckman Coulter, Inc. CA, EEUU) perteneciente al Instituto de Acuicultura de la Universidad de Santiago

de Compostela. Para llevar a cabo las reacciones de secuenciación se empleó el kit "GenomeLab DTCS Quick Start" (Beckman Coulter, Inc. CA, EEUU) y el iniciador "M13 Forward" (Promega, Madison, WI, EEUU).

Todas las secuencias obtenidas fueron editadas y examinadas con el programa informático BioEdit versión 7.0.5 (Hall, 1999). Los productos resultantes de la traducción de cada hipotético ORF se analizaron en busca de homologías con proteínas a través del programa informático BlastX (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>) del NCBI y de homologías con familias de dominios proteicos a través de la aplicación Pfam (<http://pfam.sanger.ac.uk>) del Instituto Sanger. El punto isoeléctrico y la masa molecular teóricos de los productos proteicos deducidos a partir de las secuencias obtenidas se calcularon mediante la aplicación Compute pI/Mw (Gasteiger *et al.*, 2005). La predicción de la posible localización celular de las proteínas deducidas se realizó mediante el programa PSORTb (Yu *et al.*, 2010) y la posible presencia de hélices transmembrana y de péptido señal en las mismas se determinó con los programas TMHMM (Krogh *et al.*, 2001) y SignalP (Bendtsen *et al.*, 2004), respectivamente.

3.4. Ensayos de susceptibilidad bacteriana a antimicrobianos

La determinación de la susceptibilidad bacteriana a un agente antimicrobiano determinado se llevó a cabo siguiendo las normas establecidas por el CLSI (Clinical Laboratory Standards Institute) (Clinical, 2006). El agente antimicrobiano se diluyó de forma seriada a la mitad en el medio de cultivo líquido CAMHB y se dispusieron 95 µl de cada dilución, por triplicado, en placas tipo microtiter de 96 pocillos con fondo en forma de U. El inóculo bacteriano se preparó diluyendo 10 veces una suspensión 0'5 McFarland (10^8 ufc/ml) de un cultivo en fase exponencial de crecimiento (DO_{600} : 0'5) en el medio CAMHB. Cinco µl de la suspensión celular resultante se añadieron a cada pocillo, de forma que la cantidad final de bacteria por pocillo fue 5×10^4 ufc, y las placas se incubaron en estático a 28°C durante 24 h. En cada ensayo se incluyeron dos pocillos control sin antibiótico y sin inóculo bacteriano. Se determinó la concentración mínima inhibitoria (CMI) de cada antibiótico y cada ensayo se realizó tres veces de forma independiente.

3.5. Determinación del valor de DL_{50} de *L. garvieae* en trucha arcoíris

El valor de DL_{50} se determinó a través de ensayos con truchas arcoíris adquiridas en una piscifactoría comercial con un peso medio de entre 10 y 15 g que se mantuvieron en tanques con 60 l de agua declarada y a 18 °C. A partir de un cultivo en fase exponencial de crecimiento (DO_{600} : 0'5 = 10^8 ufc/ml) se prepararon diluciones seriadas con base 10 y, seguidamente, las células se centrifugaron 5 min a 13.000 rpm, se lavaron mediante centrifugación con el tampón PBS y se resuspendieron finalmente en el mismo

tampón. Se inyectaron intraperitonealmente o'1 ml de cada dilución a grupos de 10 peces cada uno. El control del ensayo consistió en un grupo de peces a los que se les inyectó o'1 ml del tampón PBS. Durante todo el experimento se anotaron y retiraron los peces que iban muriendo y el valor de DL₅₀ se calculó de acuerdo con el método de Reed & Muench (1938). El experimento se realizó por duplicado. Se comprobó que los ejemplares muertos presentasen signos clínicos típicamente asociados con la lactococosis (Austin & Austin, 2007) y además se recogieron muestras de hígado y bazo de los peces muertos y se sembraron en placas del medio BHI. Las colonias que crecieron en este medio se analizaron por PCR (Zlotkin *et al.*, 1998) con el fin de confirmar que eran de *L. garvieae*. En la **Tabla 3.2** se detallan los iniciadores y las condiciones empleados en la reacción de PCR.

Tabla 3.2. Iniciadores y condiciones empleados en la reacción de PCR de detección de *L. garvieae*.

Iniciadores				
Gen	Secuencia 5'-3'	Gen	Secuencia 5'-3'	
ARNr 16S	pLG1: CATAACAATGAGAATCGC	ARNr 16S	pLG2: GCACCCTCGCGGGTTG	
Condiciones de reacción				
Desnaturalización inicial 1 ciclo		Amplificación 25 ciclos		Extension final 1 ciclo
94°C 10:00 min		94°C 1:00 min	52°C 1:00 min	72°C 10:00 min
			72°C 1:30 min	

3.6. Análisis del mutante *L. garvieae* XVIII

3.6.1. Amplificación y análisis de la región génica adyacente a la inserción del transposón Tn917

El ADN adyacente a la inserción del transposón Tn917 se obtuvo, para su posterior secuenciación, mediante la técnica de PCR inversa. Para ello, en un primer paso se realizó una hibridación de tipo Southern Blot en la que se enfrentaron 3 µg de ADN cromosómico de la cepa *L. garvieae* UNIUDO74, en adelante o74, digerido durante 5 h a 37°C con las enzimas de restricción *Clal*, *HindIII*, *PstI*, *Sall*, *XbaI* y *XhoI*, a una sonda de 144 pb correspondiente al gen *dltA*. En la reacción de generación de la sonda se emplearon los iniciadores *dltA*₁ y *dltA*₂ (**Tabla 3.3**). El objetivo era identificar así un enzima de restricción cuyas dianas delimitaran un fragmento de ADN en el que estuviera incluido el gen *dltA* y que tuviera un tamaño lo suficientemente grande como para asegurar que en su secuenciación se incluirían el gen *dltA* y los genes adyacentes a este. Tras seleccionar un enzima de restricción adecuado se llevó a cabo una reacción de PCR inversa en la que se utilizaron los iniciadores *dltA*₃ y *dltA*₄ (**Tabla 3.3**). La secuenciación del producto de amplificación obtenido y el análisis de la secuencia de ADN correspondiente se realizaron del modo descrito en el apartado 3.3. Los iniciadores *dltA*₃ y *dltA*₄ se emplearon como iniciadores en la reacción de

secuenciación y a partir de la secuencia de ADN obtenida se diseñaron nuevos iniciadores que permitieron finalizar la secuenciación de la agrupación génica *dlt*.

Los iniciadores *dltA1* y *dltA2*, *dltA3* y *dltA4*, fueron diseñados a partir de la secuencia de ADN conocida contigua a la inserción del transposón Tn₉₁₇ (Menéndez *et al.*, 2007). Las condiciones específicas empleadas en las reacciones de amplificación se recogen en la **Tabla 3.3**.

Tabla 3.3. Iniciadores y condiciones empleados en la reacción de amplificación por PCR para sintetizar la sonda del gen *dltA* y en la reacción de amplificación por PCR inversa.

Iniciadores					
Gen	Secuencia 5'-3'		Gen	Secuencia 5'-3'	
<i>dltA</i>	dltA1:	GACTATAAGCGCTTGCTA	<i>dltA</i>	dltA2:	AGCTCATAGAAGACTTCT
<i>dltA</i>	dltA3:	GTTCCACCCGTTGTCAA	<i>dltA</i>	dltA4:	GCTATCACAAGTATTCA
Condiciones de reacción					
Sonda gen <i>dltA</i>					
Desnaturalización inicial 1 ciclo		Amplificación 35 ciclos		Extension final 1 ciclo	
94°C 10:00 min	94°C 1:00 min	50°C 1:00 min	72°C 00:30 min	72°C 10:00 min	
PCR inversa					
Desnaturalización inicial 1 ciclo		Amplificación 35 ciclos		Extension final 1 ciclo	
94°C 10:00 min	94°C 1:00 min	45°C 1:00 min	72°C 10:00 min	72°C 10:00 min	

3.6.2. Estudio de la organización transcripcional de los genes *dlt* en *L. garvieae*

La técnica de RT-PCR se empleó con el objetivo de determinar si la inserción del transposón Tn₉₁₇ en el gen *dltA* de *L. garvieae* ejercía un efecto polar sobre los genes adyacentes y si todos ellos constituían un operón entre sí. La purificación del ARN total de las cepas 074 y mutante XVIII de *L. garvieae* así como las reacciones de RT-PCR se llevaron a cabo del modo descrito en el apartado 3.2.3. En la **Tabla 3.4** se recogen los iniciadores y las condiciones empleados en las reacciones de RT-PCR. Los iniciadores utilizados fueron diseñados de modo que hibridaran con los extremos 3' del gen o de los genes cuyo ARNm se quería detectar.

Tabla 3.4. Iniciadores y condiciones empleados en las reacciones de RT-PCR.

Iniciadores			
Gen	Secuencia 5'-3'	Gen	Secuencia 5'-3'
<i>dltA</i>	1F: GTAACGGGATTGATAGCGGTC	<i>dltB</i>	1R: CGGAAACGATCAATTGGCCC
<i>dltB</i>	2F: GGTGTTTATCATGCCTGTCTG	<i>dltD</i>	2R: TGTTGAGTTTCAGAAGAGCCT
<i>dltA</i>	3F: AGCCAAGAGGAGACAACG	<i>dltA</i>	3R: CAACTCGATTCTAAAACC
<i>dltB</i>	4F: GCTCTACGCGCACTATCGAA	<i>dltB</i>	4R: CAGACAGGCATGATAAACACC

Condiciones de reacción				
Transcripción reversa 1 ciclo	Desnaturalización inicial 1 ciclo	Amplificación 35 ciclos		Extension final 1 ciclo
50°C 30 min	94°C 2:00 min	94°C 15 s	60°C 30 s	72°C 1:00 min
			72°C 1:00 min	72°C 7:00 min

3.6.3. Caracterización fenotípica

3.6.3.1. Determinación del crecimiento bajo distintas condiciones de cultivo

Para valorar el crecimiento de las cepas 074 y mutante XVIII de *L. garvieae* se inocularon 20 ml del medio BHI con 200 µl de un cultivo bacteriano en fase exponencial de crecimiento (DO_{600} : 1) y se determinó la DO_{600} cada 2 horas durante las primeras 10 horas y cada 4 horas a partir de las 24 horas.

Las condiciones ensayadas, con base en la bibliografía consultada acerca de mutantes en genes *dlt* de otras especies de bacterias Gram-positivas (Neuhaus & Baddiley, 2003), fueron:

- **Acidez:** el pH del medio se ajustó a un valor de 6 añadiendo el tampón MES (pKa 6'15) en una concentración final de 0'1 M.
- **Presencia de lisozima:** se añadió la enzima al medio en una concentración de 600 µg/ml.
- **Presencia de detergente:** se añadió el detergente aniónico SDS al 0'005% (p/v) al medio.
- **Presencia de agente oxidante:** se añadió peróxido de hidrógeno al 0'02% (v/v) al medio.

Los experimentos se realizaron tres veces de forma independiente y en todos los casos se utilizó a modo de control el medio BHI.

3.6.3.2. Ensayo de autólisis

El efecto de autólisis bacteriana provocado por el detergente Triton X-100 se analizó bajo condiciones de ausencia de crecimiento en las cepas 074 y mutante XVIII de *L. garvieae*. Para ello se siguió el protocolo descrito por Perea Vélez *et al.* (2007). Se centrifugaron 20 ml de un cultivo en fase

estacionaria de crecimiento (DO_{600} : 1'5) a 4.000 rpm durante 20 min a 4°C. Las células presentes en el sedimento se resuspendieron en 20 ml de tampón fosfato (10 mM, pH 6'5) y se centrifugaron en las mismas condiciones. Tras repetir dos veces el paso anterior las células se resuspendieron en un volumen final de 20 ml de tampón fosfato (200 mM, pH 6'5) que contenía el detergente Triton X-100 al 0'05% (v/v). La suspensión celular se incubó a 28°C en agitación durante 10 h y se valoró la autólisis bacteriana mediante la medida cada hora del descenso de la DO_{600} . El ensayo se realizó tres veces de forma independiente.

3.6.3.3. Unión del colorante catiónico azul alcían

La unión del colorante azul alcían a las células de las cepas 074 y mutante XVIII de *L. garvieae* se determinó utilizando el protocolo descrito por Chan *et al.* (2007). Dos ml de un cultivo en fase exponencial de crecimiento (DO_{600} : 0'4) se centrifugaron durante 5 min a 13.000 rpm. Las células presentes en el sedimento se resuspendieron en 2 ml de tampón ácido morfolinopropanosulfónico 20 mM (MOPS, Sigma Aldrich Co.) y se centrifugaron bajo las mismas condiciones. Las células se resuspendieron finalmente en 2 ml del mismo tampón y se añadió el colorante azul alcían (Sigma Aldrich Co.) en una concentración final de 250 µg/ml. Las muestras se agitaron suavemente a temperatura ambiente y pasados 10 min se centrifugaron durante 5 min a 13.000 rpm. Como control del experimento se empleó un tubo que contenía 2 ml de tampón MOPS y el colorante azul alcían en una concentración de 250 µg/ml. La DO_{615} de los sobrenadantes se midió y la cantidad de colorante unido a las bacterias se calculó como $(DO_{615}$ de sobrenadante control - DO_{615} de sobrenadante muestra) / DO_{615} de sobrenadante control. El experimento se realizó tres veces de forma independiente.

3.6.3.4. Ensayo de susceptibilidad a diferentes antimicrobianos catiónicos

El efecto de antimicrobianos peptídicos de tipo catiónico sobre el crecimiento de las cepas 074 y mutante XVIII de *L. garvieae* se determinó mediante ensayos de susceptibilidad en ambas cepas a nisina (0'0156–16 µg/ml), vancomicina (0'0156–16 µg/ml) y colistimetato de sodio (16–4096 µg/ml) (Sigma Aldrich Co) del modo descrito en el apartado 3.4.

3.6.3.5. Detección y cuantificación de D-alanina mediante cromatografía líquida de alta resolución (High-performance liquid chromatography, HPLC)

La cantidad de D-alanina presente en los ácidos teicoicos y lipoteicoicos de la pared celular de las cepas 074 y mutante XVIII de *L. garvieae* se valoró utilizando el protocolo descrito por Kovacs *et al.* (2006). Se realizó una hidrólisis alcalina suave de 10 mg de células procedentes de un cultivo en fase estacionaria

de crecimiento ($DO_{600}:1'5$) y el sobrenadante se derivatizó con reactivo de Marfey (1-fluoro-2,4-dinitrofenil-5-L-alanina amida, Sigma Aldrich Co.). La separación de los derivados aminoácidos se llevó a cabo usando una columna de fase reversa C18 (Hypersil ODS; 3 μ m; 125 mm x 4.6 mm; Bischoff Chromatography, Leonberg, Alemania) en un sistema de HPLC Beckman-Coulter a 30 °C y con un flujo de 1 ml/min. La cromatografía se desarrolló mediante una elución por gradiente lineal de 0 a 50% de acetonitrilo en un tampón de acetato sódico (20 mM; pH 4) durante 10 min seguida de una elución isocrática de acetonitrilo al 50% en un tampón de acetato sódico (20 mM; pH 4) durante 3 min. La cantidad y el tiempo de retención de los derivados de D-alanina se determinaron tras haber cromatografiado en las mismas condiciones controles con cantidades conocidas del aminoácido (Sigma Aldrich Co.). El ensayo se realizó tres veces de forma independiente.

3.6.3.6. Observación mediante microscopía electrónica de transmisión

La morfología celular de las cepas 074 y mutante XVIII de *L. garvieae* se observó con un microscopio electrónico de transmisión MET JEOL-2000 EX-II perteneciente a los Servicios Científico-Técnicos de la Universidad de Oviedo. Para ello, 1'5 ml de un cultivo en fase estacionaria de crecimiento ($DO_{600}:1'5$) se centrifugaron durante 5 min a 13.000 rpm y las células presentes en el sedimento se resuspendieron en 1'5 ml de tampón Tris-HCl (0'1M, pH 7'5). Tras repetir el paso anterior la suspensión celular resultante se mantuvo a 4°C hasta su utilización. Para observar las muestras con microscopio electrónico de transmisión se depositaron 15 μ l de cada una de ellas en una rejilla de cobre (FF200-Cu, Aname) y se dejaron secar al aire. Después, se añadieron 15 μ l de acetato de uranilo al 4% y tras un minuto se observaron las muestras con el microscopio.

3.6.4. Análisis de la virulencia de las cepas 074 y mutante XVIII de *L. garvieae* en trucha arcoíris

3.6.4.1. Determinación del valor de DL_{50}

El experimento de determinación de los valores de DL_{50} de las cepas 074 y mutante XVIII de *L. garvieae* en trucha arcoíris se llevó a cabo del modo detallado en el apartado 3.5. El experimento tuvo una duración de siete días y las concentraciones de bacteria ensayadas en el mismo estuvieron en el rango de 10^2 - 10^7 ufc. El valor de DL_{50} se determinó al tercer día de acuerdo con el método de Reed & Muench (1938).

3.6.4.2. Ensayo de competencia *in vivo*

El ensayo de competencia *in vivo* se llevó a cabo mezclando 2 ml de cultivo en fase exponencial de crecimiento ($DO_{600}: 0'5 = 10^8$ ufc/ml) de la cepa 074 con 2 ml de la cepa mutante XVIII de *L. garvieae* en las

mismas condiciones. Con la suspensión resultante se prepararon diluciones seriadas que se sembraron en placas que contenían el medio BHI, para determinar el número total de ufc, y el medio BHI con eritromicina, para determinar el número de ufc de la cepa mutante *XVIII* debido a que esta posee una resistencia al antibiótico de 1µg/ml (Menéndez *et al.*, 2007). Así se calculó la proporción entre el número de células de las cepas 074 y mutante *XVIII* presentes en la suspensión. De la mezcla cepa 074-cepa mutante *XVIII* se usaron 10^4 ufc en 0.1 ml para infectar grupos de tres truchas arcoíris. Al cabo de 72 horas los animales se sacrificaron y se diseccionaron. Se les extirparon el hígado, el bazo y el intestino para posteriormente ser homogeneizados en el medio BHI durante 2 min mediante un homogeneizador de tejidos modelo Stomacher®80 (Seward Medical. Co.). La mezcla así obtenida y que contenía las bacterias se sembró en placas del medio BHI con y sin eritromicina para determinar la proporción entre el número de células de la cepa mutante y el número de células de la cepa parental presentes al cabo de 72 horas en el animal. El **índice de competencia *in vivo*** se definió como: $(C_{cm}/C_{cp}) \text{ pez} / (C_{cm}/C_{cp}) \text{ inóculo}$, siendo C_{cm} = ufc cepa mutante *XVIII* y C_{cp} = ufc cepa 074. El experimento se realizó tres veces de forma independiente.

3.6.4.3. Ensayo de competencia *in vitro*

El ensayo de competencia *in vitro* se realizó mezclando 2 ml de cultivo en fase exponencial de crecimiento (DO_{600} : 0.5 = 10^8 ufc/ml) de la cepa 074 con 2 ml de la cepa mutante *XVIII* de *L. garvieae* en las mismas condiciones. La mezcla cepa 074-cepa mutante *XVIII* se utilizó para inocular 5 ml del medio BHI de modo 1:100 y el cultivo se incubó a 20 °C durante 18 horas. La proporción existente entre el número de células de las cepas 074 y mutante *XVIII* presentes en el cultivo, antes y después de su incubación, se determinó preparando diluciones seriadas del mismo en ambas condiciones y sembrándolas en placas del medio BHI y el medio BHI con eritromicina. El **índice de competencia *in vitro*** se calculó de modo semejante a como se describió en el apartado anterior. El experimento se realizó tres veces de forma independiente.

3.7. Estudio de la diversidad genética intraespecífica de *L. garvieae* mediante SSH

3.7.1. Análisis de la virulencia de las cepas 074 y HF en trucha arcoíris y ratón

La virulencia de las cepas 074 y HF de *L. garvieae* en trucha arcoíris se analizó mediante la determinación de los valores de DL_{50} del modo explicado en el apartado 3.5. El experimento tuvo una duración de 12 días y las concentraciones de bacteria ensayadas estuvieron en el rango 10^2 – 10^6 ufc. El valor de DL_{50} se calculó el doceavo día según el método de Reed & Muench (1938).

Para estudiar la virulencia en ratón de las cepas *L. garvieae* 074 y HF se llevaron a cabo ensayos de infección en ratones Swiss de seis semanas de edad del Bioterio de la Universidad de Oviedo. Los animales se mantuvieron bajo condiciones estándar de temperatura ($23 \pm 3^\circ\text{C}$) y humedad ($65 \pm 1\%$) y se empleó un ciclo de 12 h de luz y 12 h de oscuridad. Los animales fueron alimentados con una dieta normal y tuvieron libre acceso a agua durante todo el experimento. A partir de un cultivo en fase exponencial de crecimiento ($\text{DO}_{600}: 0,5 = 10^8$ ufc/ml) se prepararon diluciones seriadas con base 10, se lavaron mediante centrifugación con el tampón PBS y se resuspendieron en el mismo tampón. Se inyectaron intraperitonealmente 0,3 ml de cada dilución a grupos de cuatro ratones cada uno de modo que las cantidades ensayadas de bacteria comprendían el rango de 10^3 - 10^9 ufc. El control del ensayo consistió en un grupo de cuatro ratones a los que se les inyectó 0,3 ml del tampón PBS. De forma paralela dos grupos de cuatro ratones fueron inyectados con 0,3 ml de las cepas *L. garvieae* 074 y HF inactivadas con formalina. Para ello se centrifugaron 10 ml de un cultivo en fase exponencial de crecimiento ($\text{DO}_{600}: 1 = 10^8$ ufc/ml) durante 10 min a 8.000 rpm y las células presentes en el sedimento (10^9 ufc) se resuspendieron en formalina al 10% en PBS. Las suspensiones celulares se incubaron a temperatura ambiente durante 24 h y pasado ese tiempo se lavaron dos veces mediante centrifugación con el tampón PBS para finalmente ser resuspendidas en 0,3 ml del mismo tampón. Se sembraron alícuotas de dichas suspensiones celulares en placas de BHI y se incubaron durante 24 h para comprobar que todas las células hubieran sido inactivadas. Durante 14 días se observó la aparición de signos clínicos en los ratones y se anotó el número de ejemplares muertos. Estos últimos fueron diseccionados y se recogieron muestras de hígado, riñón y bazo para, seguidamente, sembrarlas en placas del medio BHI y determinar la presencia de *L. garvieae* como se ha indicado previamente en el apartado 3.5.1. Una vez finalizado el periodo de 14 días de duración del experimento los ratones que sobrevivieron se sacrificaron y algunos de ellos fueron diseccionados para determinar la presencia de la bacteria en hígado, riñón y bazo. Además, se realizó un examen histológico de los órganos internos de aquellos ratones a los que se les inyectaron 10^9 ufc de las cepas 074 y HF de *L. garvieae*. Para ello se tomaron muestras de hígado, riñón y bazo que posteriormente fueron teñidas con los colorantes hematoxilina y eosina y sometidas a análisis histopatológico mediante microscopio óptico. Cada ensayo se realizó dos veces de forma independiente.

3.7.2. Selección de fragmentos génicos específicos de las cepas HF y 074 mediante SSH

Los experimentos de sustracción del genoma bacteriano se realizaron siguiendo las indicaciones de los sistemas "PCR-Select Bacterial Genome Subtraction Kit" y "Advantage cDNA Polymerase Kit" (Clontech, Palo Alto, CA, EEUU). Se denominó **cepa problema** a aquella de cuyo genoma queríamos seleccionar fragmentos específicos y **cepa referencia** a aquella cuyo genoma se enfrentó al de la

problema. Se llevaron a cabo dos experimentos independientes de SSH. En el primer experimento (SSH I) se empleó como cepa problema la cepa HF y como cepa referencia la cepa 074 de *L. garvieae* mientras que en el segundo experimento (SSH II) se empleó como cepa problema la cepa 074 y como cepa referencia la cepa HF de *L. garvieae*.

De forma resumida, en cada experimento se aisló el ADN genómico total de ambas cepas y se digirieron 2 µg del mismo con la enzima de restricción *RsaI* durante 10 min a 37°C. A continuación el ADN de la cepa problema se dividió en dos porciones y cada una de ellas se ligó a uno de los dos adaptadores incluidos en el kit. Seguidamente se realizaron dos hibridaciones consecutivas. En la primera se añadió ADN de la cepa referencia en exceso a cada una de las porciones de ADN de la cepa problema con adaptadores ligados a sus extremos para posteriormente desnaturalizar las muestras por calor y permitir que hibridaran entre sí. En la segunda hibridación las muestras que provenían de la primera se mezclaron y, sin desnaturalizarlas previamente por calor, se permitió que hibridaran entre sí. La mezcla resultante de esta segunda hibridación se empleó como ADN molde en una reacción de PCR con el objetivo de amplificar secuencias específicas del genoma de la cepa problema. La genoteca de productos secundarios generados en la reacción de PCR fue clonada en el vector comercial pGEM-T siguiendo las indicaciones del sistema "pGEM-T Easy TA Cloning Kit" (Promega, Madison, WI, EEUU). Los productos de clonación fueron transformados mediante choque térmico en células competentes de *E. coli* DH5α siguiendo la metodología de preparación química de células competentes y de transformación de las mismas descrita por Sambrook & Russell (2001). Aquellos clones que contenían el vector pGEM-T y eran portadores de fragmentos de la cepa problema fueron identificados mediante selección en placas de medio 2XTY al que se le añadió ampicilina (100 µg/ml), IPTG (100 µg/ml) y X-Gal (40 µg/ml) (Sigma Aldrich Co., Spain). Se llevaron a cabo todos los controles sugeridos por el fabricante y todos ellos produjeron un resultado positivo.

3.7.3. Comprobación del número de positivos mediante Dot Blot

Con el fin de identificar aquellos clones que contuvieran secuencias específicas de la cepa problema en los experimentos SSH I y SSH II se realizaron hibridaciones de tipo Dot Blot. Para ello, el ADN plasmídico de cada clon seleccionado se aisló y 200 ng del mismo se desnaturalizaron a 100°C durante 10 min. Inmediatamente después el ADN se transfirió por duplicado a dos membranas de nylon que se hibridaron por separado con dos sondas constituidas por 2 µg de ADN genómico de las cepas problema y referencia, previamente digeridos con la enzima de restricción *RsaI* durante 10 min a 37°C. La transferencia del ADN, el marcado de las sondas y los tratamientos a los que fueron sometidas las membranas se llevaron a cabo del modo descrito en el apartado 3.2.4. El resultado esperable en el caso de

los clones que contuvieran secuencias específicas de la cepa problema era que su ADN plasmídico hibridase con la sonda de ADN genómico de la cepa problema pero no lo hiciera con la sonda de ADN genómico de la cepa referencia.

3.7.4. Ensayo de susceptibilidad al antibiótico tetraciclina

La determinación de los valores de CMI del antibiótico tetraciclina (0'125 – 256 µg/ml) en las cepas 074 y HF de *L. garvieae* se realizó como se detalla en el apartado 3.4, siguiendo las normas establecidas por el CLSI (Institute, 2006).

3.7.5. Análisis mediante PCR de la presencia de fragmentos génicos específicos en 25 aislados de *L. garvieae*

Para amplificar regiones internas de los clones SSHI.2, SSHI.5, SSHI.9, SSHI.12, SSHI.14, SSHI.21, SSHI.23 (a), SSHI.44, SSHI.49, SSHI.55, SSHI.58, SSHI.59, SSHII.1, SSHII.7 (a, b), SSHII.15, SSHII.21, SSHII.26, SSHII.36, SSHII.43 (a, b), SSHII.44, SSHII.48, SSHII.56 y SSHII.61 se diseñaron oligonucleótidos específicos (Tabla 3.5). Estos fueron empleados como iniciadores en un análisis mediante amplificación por PCR de la presencia/ausencia de los fragmentos seleccionados en el ADN de 25 cepas de *L. garvieae* procedentes de diferentes orígenes y hospedadores. Las reacciones de amplificación se realizaron bajo las condiciones recogidas en la Tabla 3.5. Los productos de amplificación obtenidos fueron analizados mediante electroforesis en gel de agarosa al 1'5% (p/v) y se consideró como resultado positivo la presencia de un producto del tamaño esperado. Por cada cepa analizada se incluyeron a modo de controles positivo y negativo dos reacciones de PCR en las que se usaron como iniciadores los oligonucleótidos pLG1 y pLG2 (Tabla 3.3) bajo presencia y ausencia de ADN cromosómico, respectivamente. Se llevaron a cabo tres ensayos independientes para asegurar la reproducibilidad de los resultados.

Tabla 3.5. Iniciadores y condiciones empleados en las reacciones de amplificación por PCR para determinar la presencia/ausencia de fragmentos génicos específicos obtenidos en los experimentos SSHI y SSHII en el genoma de 25 cepas de *L. garvieae* procedentes de distintos orígenes.

Iniciadores				
Nº clon SSH	Secuencia 5'-3'	Nº clon SSH	Secuencia 5'-3'	
SSHI.2	2A.F.ATCGGCATTGAGTCAGT 2A.R.TTGAAGCATCGTTGACG	SSHII.1	1B.F.AATCCAGCAGTAGCAGC 1B.R.ACGTTAGATTTTACCCC	
SSHI.5	5A.F.ACATGAAGAATTTTTGAGAAGC 5A.R.GCGAATCCACATAATAC	SSHII.7 (a, b)	7B.F.TAGCGAATACATCTCTT 7B.R.AAGGTTGAGAGAGTTTG	
SSHI.9	9A.F.TGTTATCCTAATACGTGTGCCATA 9A.R.CATTTGCTAAAAACGCTTAATGT	SSHII.15	15B.F.TTCGCAGAGTTCAATAC 15B.R.TGAGGACTTATCTGAGG	
SSHI.12	12A.F.ATCTGGTGCTTGCGTTTC 12A.R.TGAACCAGGACGCTATCG	SSHII.21	21B.F.GAGACATGGTGATAGCC 21B.R.ATGAGTAGCACAAGGCA	
SSHI.14	14A.F.TGCCAGTCAGCTTAAGTA 14A.R.TTGGGGTGATAAGAGTCA	SSHII.26	26B.F.AACCATTTCATCACAAA 26B.R.AATGTGGACGACTGGCT	
SSHI.21	21A.F.TTCGTCCAATCACTCAAG 21A.R.TCTTGCCGAAGTATTGTC	SSHII.36	36B.F.AACCGTACCAGTCATCA 36B.R.CAATTGTTCCCTATGCC	
SSHI.23 (a)	23A.F.AGCATTACTGATAACCGC 23A.R.GGAATACATCTTTGACCA	SSHII.43 (a, b)	43B.F.AGTTCAGTATATTCGTCT 43B.R.TGTTCCCACTCAATATG	
SSHI.44	44A.F.CTTATCTATCTGGCGTAA 44A.R.CATTGAATATTGCAGAAC	SSHII.44	44B.F.TAGTGGCATTGTGTGTC 44B.R.AAGCCATCAATATAGTC	
SSHI.49	49A.F.TTCGCTCCGCATCAACTT 49A.R.TCGTAATGATGAGAACAC	SSHII.48	48B.F.ACGACTCCAAAGGCTGT 48B.R.AAGTATCTCTGGTTGTG	
SSHI.55	55A.F.ACAAGTGAAACCAAGTCC 55A.R.TCTAAAGGTCGTTGCTGG	SSHII.56	56B.F.TAAGAGGGAAGGGCAAT 56B.R.TTCAATCCATGGCTGTG	
SSHI.58	58A.F.TTATGGCCGCTATTGAAG 58A.R.ATCGCCAGTTAGCATGAC	SSHII.61	61B.F.ATCTGACGTGGTGTAAAT 61B.R.TGAATTTAACTGGTACG	
SSHI.59	59A.F.TAGTTCCTTGAGCTGTTC 59A.R.ATTCATGGTCAAGTTGCT			
Condiciones de reacción				
Desnaturalización inicial 1 ciclo		Amplificación 25 ciclos		Extension final 1 ciclo
94°C		94°C	50°C	72°C
10:00 min		1:00 min	1:00 min	10:00 min

3.7.6. Ensayo de inducción de bacteriófagos lisogénicos

Las cepas UNIUD020, UNIUD101, UNIUD028, 074, UNIUD041 y A1201 de *L. garvieae* fueron sometidas a un ensayo de inducción de bacteriófagos lisogénicos mediante el agente mutagénico mitomicina C. Se seleccionaron las cepas LIZ-4, A3, A103, BO287, BO123, BO340, BO165, BO242, BO207, BO223 y BO222 de *L. garvieae* como posibles cepas hospedadoras. El sobrenadante de cada cultivo bacteriano sometido a tratamiento con mitomicina C fue enfrentado a cada una de las hipotéticas cepas

hospedadoras de *L. garvieae*. Para ello, 5 ml del medio BHI se inocularon en la proporción 1:100 con un cultivo en fase exponencial de crecimiento (DO_{600} : 1) de cada cepa bacteriana que iba a ser inducida. El cultivo se incubó a 28° C hasta que alcanzó una DO_{600} de 0'4 y en ese momento se añadió la mitomicina C en una concentración final de 1 µg/ml. Tras prolongar la incubación durante 18 h el cultivo se centrifugó a 13.000 rpm durante 5 min y se recogió el sobrenadante, que se mantuvo a 4°C hasta su utilización. Seguidamente se mezclaron 2'5 ml del medio semisólido GM17, al que se le añadieron las sales cloruro cálcico y sulfato de magnesio en una concentración final 10mM (Scharlau), con 30 µl de un cultivo en fase exponencial de crecimiento (DO_{600} : 1) de la cepa bacteriana seleccionada como posible hospedadora. La mezcla resultante se vertió rápidamente sobre una placa del medio sólido GM17 y pasados 10 min se depositó una gota del sobrenadante del cultivo bacteriano que había sido previamente inducido con mitomicina C. La placa se incubó a 28°C durante 24 h y transcurrido ese plazo de tiempo se determinó en ella la presencia de un halo de lisis o de un halo de inhibición del crecimiento bacteriano.

3.7.7. Determinación de la localización en el genoma de fragmentos específicos de la cepa HF

Con el fin de averiguar si los fragmentos seleccionados en el experimento SSHI: SSHI.9, SSHI.12, SSHI.55 y SSHI.59 se localizaban en el cromosoma o en el plásmido de la cepa *L. garvieae* HF, se llevaron a cabo cuatro hibridaciones de tipo Southern Blot. En ellas, 200 ng de ADN plasmídico y de ADN cromosómico de la cepa HF de *L. garvieae* fueron enfrentados de forma paralela a una sonda interna de cada uno de los fragmentos. Los iniciadores empleados en la reacción de generación de las sondas fueron los mismos que se utilizaron en la detección por PCR de estos fragmentos en 25 cepas de *L. garvieae* procedentes de distintos orígenes (Tabla 3.5). La transferencia del ADN, el marcado de las sondas y los tratamientos a los que fueron sometidas las membranas se realizaron del modo descrito en el apartado 3.2.4.

3.8. Secuenciación y análisis del genoma de la cepa *L. garvieae* 074

3.8.1. Técnica de pirosecuenciación del ADN

La secuenciación de ADN cromosómico mediante la técnica de pirosecuenciación exige partir de una muestra de ADN de elevada concentración y pureza. Por ello, el ADN de la cepa *L. garvieae* 074 se aisló a partir de 50 ml de un cultivo en fase estacionaria de crecimiento (DO_{600} : 1'5), mediante el sistema "UltraClean® Mega Soil DNA Kit" (MO BIO Laboratories, Inc.). La pureza y concentración del ADN extraído fue determinada en un espectrofotómetro Nanodrop ND-1000 (Nanodrop Technologies, EEUU). Diez µg de ADN de alta calidad (relación DO_{260}/DO_{280} = 1'89) se enviaron a la empresa Lifesequencing S.L. Dicha empresa llevó a cabo la pirosecuenciación del ADN mediante la plataforma de secuenciación de

segunda generación Genome Sequencing FLX en un secuenciador GS-FLX Titanium (454 Life Sciences, Roche Diagnostics Corp.).

3.8.2. Ensamblado de las lecturas de secuencia de ADN

Se recurrió a herramientas informáticas de ensamblado para alinear el conjunto de lecturas de secuencia de ADN obtenidas, definir su secuencia consenso y localizar zonas de solapamiento parcial entre ellas con el objetivo de definir secuencias de mayor tamaño o "contigs" que permitieran reconstruir la molécula de ADN cromosómico original. Los programas de ensamblado empleados fueron: Newbler (454 Life Sciences, Roche Diagnostics Corp.), MIRA (Mimicking Intelligent Read Assembly)(Chevreux, 2005), Celera (Myers *et al.*, 2000) y PHRAP (PHRagment Assembly Program) (Gordon, 2003).

Los programas Newbler, MIRA y Celera se utilizaron para obtener tres ensamblados independientes a partir del conjunto total de lecturas de secuencia de ADN obtenidas en la pirosecuenciación del ADN cromosómico de la cepa *L. garvieae* 074. El programa PHRAP, en cambio, se empleó en la generación de un ensamblado híbrido a partir de los ensamblados obtenidos previamente mediante los programas Celera y Newbler.

3.8.3. Técnica de extremos pareados o "paired ends"

Con el fin de reducir el número de "contigs" al mínimo posible así como de conocer la orientación y posición relativa de los mismos para organizarlos en secuencias de mayor tamaño llamadas "scaffolds", se llevó a cabo la construcción de una genoteca de "paired ends" en la modalidad de 3 Kb por la empresa DNAVision S.A. Mediante esta técnica se posibilitó la obtención, a partir de 10 µg de ADN, de parejas de pequeños fragmentos de ADN (150 pb aproximadamente) que originariamente estaban situados a 3 Kb de distancia en el cromosoma de la cepa *L. garvieae* 074. Seguidamente, este conjunto de fragmentos de ADN se pirosecuenció mediante la plataforma de secuenciación de segunda generación Genome Sequencing FLX en un secuenciador GS-FLX Titanium (454 Life Sciences, Roche Diagnostics Corp.).

3.8.4. Reensamblado de las lecturas de secuencia de ADN

Las lecturas de secuencia de ADN obtenidas en la pirosecuenciación del cromosoma de la cepa *L. garvieae* 074 y de la genoteca de "paired ends" se emplearon como punto de partida para realizar un nuevo ensamblado independiente mediante el programa informático Celera (Myers *et al.*, 2000).

3.8.5. Anotación génica del cromosoma

3.8.5.1. Anotación automática

La predicción de los posibles ORFs en cada "contig" así como la asignación de la función más probable a sus productos deducidos de la traducción se llevaron a cabo mediante el paquete informático de anotación automática RAST (Rapid Annotation using Subsystem Technology) (Aziz *et al.*, 2008). Dicho programa emplea como base de datos de proteínas las familias FIG (Fellowship for Interpretation of Genomes).

Los análisis realizados a través de esta aplicación fueron los siguientes:

- Detección de ARNt mediante el programa tRNAscan-SE (Lowe & Eddy, 1997) y de ARNr mediante la aplicación "search_for_RNAs" desarrollada por Niels Larsen.
- Predicción de ORFs mediante el programa informático GLIMMER2 (Delcher *et al.*, 2007).
- Establecimiento de contexto filogenético: los ORFs identificados se analizaron en busca de homologías con un grupo definido de genes que codifican proteínas altamente conservadas en organismos procariotas. Seguidamente, los productos proteicos deducidos de estos genes se analizaron en busca de homologías con proteínas a través del programa informático BlastP del NCBI con el fin de localizar los organismos filogenéticamente más cercanos a *L. garvieae*.
 - Búsqueda dirigida de familias FIG de proteínas: el conjunto de productos proteicos deducidos se examinó en busca de homologías con las familias FIG de proteínas presentes en los 10 organismos más próximos filogenéticamente a *L. garvieae*.
 - Definición de los ORFs cuyos productos proteicos deducidos presentaron homologías con las familias FIG de proteínas.
 - Búsqueda completa de familias FIG de proteínas: las proteínas deducidas a partir de los ORFs que no pudieron ser definidas en los pasos anteriores fueron analizadas en busca de homologías con todas y cada una de las 100.000 proteínas descritas en las familias FIG.
 - Análisis de los ORFs sin definir en busca de conflictos: las proteínas hipotéticas deducidas que no presentaron homologías con ninguna de las proteínas incluidas en las familias FIG fueron analizadas en busca de posibles sucesos de solapamiento que resolver o codones de inicio que redefinir. Asimismo, estas proteínas se analizaron a través del programa informático BlastP en busca de homologías con la base de datos de proteínas no redundante (NR) disponible en el NCBI con el objetivo de emplear esta información en la resolución de los conflictos anteriormente descritos.
 - Definición de los ORFs remanentes: se asignaron nombre y función a los ORFs cuyos productos proteicos deducidos presentaron homologías en el paso anterior y se definieron como proteínas

hipotéticas a aquellos productos proteicos deducidos que no presentaron ningún tipo de homología durante todo el proceso de análisis.

- Búsqueda de mejores dianas bidireccionales (Best Bidirectional Hit, BBH) y mejores dianas unidireccionales (Best Unidirectional Hit, BUH): se entiende que dos genes son ortólogos cuando presentan una similitud entre sí, cuya significación estadística puede ser evaluada por algoritmos como el de BLAST, fruto de una ascendencia común. Se asume que dos genes ortólogos tienen la misma función y, por lo general, se equiparan a los llamados BBH (Overbeek *et al.*, 1999). Con base en esto, se empleó el programa RAST para identificar los mejores BBH y BUH de los productos proteicos deducidos de *L. garvieae* en el conjunto de proteínas de las cepas *L. lactis* subsp. *lactis* IL1403 y *Streptococcus pyogenes* SS1-I debido a pertenecer a las dos especies filogenéticamente más próximas a *L. garvieae*.

- Reconstrucción metabólica: a través del programa RAST se empleó la aplicación Model SEED para determinar las homologías existentes entre las proteínas deducidas de *L. garvieae* y las proteínas depositadas en la base de datos de rutas metabólicas bacterianas KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) (www.genome.jp/kegg). Asimismo, esta base de datos se utilizó en la identificación de las proteínas deducidas de *L. garvieae* con papeles funcionales en rutas metabólicas según el método de BBH (Overbeek *et al.*, 1999). Con los resultados obtenidos se generaron los mapas correspondientes a dichas rutas metabólicas.

3.8.5.2. Anotación manual

La concordancia existente entre la anotación automática de cada ORF y la anotación de sus BBH y BUH en las cepas *L. lactis* subsp. *lactis* IL1403 y *S. pyogenes* SS1-I se examinó de forma manual. Así, se asumió que la anotación automática no necesitaba ser corregida para aquellos genes en los que la función asignada por el programa RAST y la función de sus BBH o BUH en las cepas *L. lactis* subsp. *lactis* IL1403 y *S. pyogenes* SS1-I coincidieron. Sin embargo, los ORFs para los que se observaron discrepancias junto a aquellos cuyos productos proteicos deducidos se anotaron como proteínas hipotéticas fueron sometidos a los siguientes análisis adicionales con el fin de obtener más información sobre ellos y poder definir su función más probable:

- Búsqueda de homologías con las proteínas presentes en la base de datos NR del NCBI a través del programa informático BlastP.

- Búsqueda de homologías basadas en modelos ocultos de Markov (Hidden Markov Models, HMMs) con las familias de dominios proteicos presentes en la base de datos Pfam a través de la aplicación Pfam del Instituto Sanger.

- Búsqueda de homologías basadas en HMMs con las familias de dominios proteicos presentes en la base de datos Pfam a través del programa informático HMMR (<http://hmmer.janelia.org/>).
- Búsqueda de homologías con las proteínas presentes en la base de datos de factores de virulencia VFDB (Chen *et al.*, 2005) a través del programa informático BlastP del NCBI.

3.8.6. Identificación de islas genómicas, elementos de inserción, secuencias repetidas y elementos CRISPRs (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats)

La presencia de elementos genéticos susceptibles de haber sido adquiridos por transferencia horizontal, tales como islas genómicas o secuencias de inserción, se determinó en el cromosoma de la cepa *L. garvieae* 074. La identificación de islas genómicas se realizó a través de la página web <http://www.pathogenomics.sfu.ca/islandviewer/> en la que se utilizaron los programas Sigi-HMM (Waack *et al.*, 2006) y IslandPathDIMOB (Hsiao *et al.*, 2003). Las predicciones realizadas por estos programas sobre la existencia de islas genómicas han sido definidas como las más precisas posibles (Langille *et al.*, 2008). Por otro lado, la posible existencia de secuencias de inserción se determinó mediante la aplicación IS finder (Siguier *et al.*, 2006). La aplicación IR finder (Benson, 1999) se utilizó para identificar posibles secuencias de ADN repetidas en tándem en el genoma de la cepa *L. garvieae* 074. Finalmente, se llevó a cabo una predicción de la existencia de posibles elementos CRISPRs a través de la aplicación CRISPRs finder (Grissa *et al.*, 2007). Estos se constituyen por secuencias repetidas de ADN que se separan entre sí mediante una secuencia espaciadora no repetida.

3.9. Números de acceso de las secuencias en las bases de datos

Las secuencias de ADN correspondientes a los genes *dltA*, *dltB*, *dltC* y *dltD* se depositaron en la base de datos GenBank con el número FJ973474. Las secuencias de ADN relativas a los clones obtenidos en los experimentos SSHI y SSHII se corresponden con los números HM852546 a HM852568 y HM989024 a HM989034, respectivamente. Las secuencias de ADN de los 25 "contigs" correspondientes al genoma de la cepa *L. garvieae* 074 se depositaron con el número AFHF00000000 en las bases de datos DDBJ/EMBL/GenBank.

4. Resultados

4. Resultados

4.1. Análisis de mutantes obtenidos mediante STM en *L. garvieae*: mutante XVIII

La aplicación de la técnica de STM utilizando el transposón Tng17 en la cepa *L. garvieae* 074 permitió obtener 29 mutantes con crecimiento limitado en trucha arcoíris como hospedador (Menéndez *et al.*, 2007). De entre ellos se seleccionaron, para ser analizados con detalle, los mutantes que se describen en la Tabla 4.1.

Tabla 4.1. Relación de los mutantes obtenidos mediante STM en *L. garvieae* que fueron seleccionados para su estudio en profundidad.

Mutante	Homología con base de datos NCBI	Función deducida	e valor
III	Quitinasa (<i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> KF147)	Actividad quitinasa	1e-16
IV	Acetolactato sintasa (<i>L. lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> MG1363)	Alfa-acetolactato sintasa	2e-170
VI	Regulador transcripcional de familia MerR (<i>Enterococcus faecalis</i> TX4244)	Regulación transcripcional	2e-51
XIII	ATPasa de transporte de cationes de tipo P (<i>Enterococcus italicus</i> DSM 15952)	Transporte de cationes	3e-49
XVIII	Ligasa transportadora de D-alanina--D-alanil (<i>L. lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> SK11)	Incorporación de D-alanina a pared celular	5e-05
XXIII	Proteína hipotética (<i>Enterococcus casseliflavus</i> ATCC 12755)	Proteína hipotética	7e-06

Para cada uno de estos mutantes se diseñaron experimentos específicos con el fin de estudiar su fenotipo como, por ejemplo, evaluación de actividad quitinasa en medio de cultivo con glicol quitina (mutante III), producción de acetoína bajo diferentes condiciones metabólicas (mutante IV), determinación de CMI de distintos metales (mutante VI) y de antimicrobianos de tipo peptídico (mutante XVIII), crecimiento en presencia de agentes quelantes de cationes (mutante XIII) y ensayos de adhesión a células de salmón y a los componentes de la matriz extracelular colágeno, laminina y fibronectina (mutante XXIII). En la mayoría de los casos no fue posible establecer una relación entre la mutación y un fenotipo específico y diferencial bajo las condiciones ensayadas. Sin embargo, el análisis inicial del

Resultados

mutante *XVIII*, que presenta interrumpido un gen implicado en la incorporación de D-alanina a la pared celular, reveló diferencias fenotípicas en relación a la cepa parental. Por ello, este mutante se estudió en mayor profundidad.

4.1.1. Secuenciación y análisis de la región génica adyacente a la inserción del transposón Tn917

Las regiones de ADN que flanquean la zona de inserción del transposón Tn917 en el mutante *L. garvieae XVIII* se amplificaron mediante la técnica de PCR inversa empleando para ello el enzima de

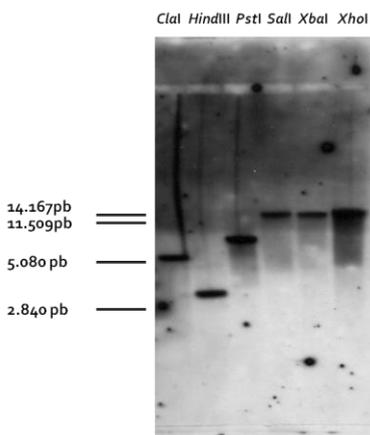


Figura 4.1. Perfil de bandas de ADN de *L. garvieae* 074 digerido con diferentes enzimas de restricción que hibridaron con la sonda correspondiente a un fragmento interno del gen *dltA*.

restricción *PstI* (Figura 4.1). De este modo, se generó un fragmento de ADN de 8 Kb aproximadamente cuya posterior secuenciación permitió la identificación de **cuatro** ORFs que se transcriben en la misma hebra de ADN. El análisis de los productos deducidos de la traducción en la base de datos del NCBI reveló que existen homologías entre ellos y los productos proteicos de los genes *dltA*, *dltB*, *dltC* y *dltD* de diversas especies bacterianas de los géneros *Lactococcus*, *Lactobacillus* y *Enterococcus* (Tabla 4.2).

El primer ORF codifica una proteína de 500 aminoácidos que muestra una similitud del 79% con DltA de *L. lactis* subsp. *cremoris* MG1363. Contiguo a ella se encuentra un locus que codifica una proteína de 404 aminoácidos que presenta una similitud del 84% con DltB de *L. lactis* subsp. *lactis* KF147. A continuación un tercer ORF codifica una proteína de 80 aminoácidos que muestra un 92% de similitud con DltC de *L. lactis* subsp. *lactis* IL1403 y, finalmente, el último locus codifica una proteína de 431 aminoácidos que tiene un 69% de similitud con DltD de *L. lactis* subsp. *lactis* IL1403. Con base en las similitudes observadas los cuatro loci recibieron los nombres de *dltA*, *dltB*, *dltC* y *dltD* de *L. garvieae*. La inserción del transposón Tn917 tuvo lugar dentro del gen *dltA*, concretamente en la posición correspondiente a la secuencia que codifica el aminoácido 363 (Anexo I). Así pues, la inserción del transposón precede a dos de las tres regiones propuestas por Heaton & Neuhaus (1992) como esenciales en la funcionalidad de la proteína DltA (Anexo I).

Tabla 4.2. Homologías de los productos proteicos deducidos a partir de los genes *dlt* de *L. garvieae* con proteínas de la base de datos del NCBI.

Proteína	Homología con base de datos NCBI	Nº acceso	Identidad (%)	Similitud (%)	e valor
DltA	<i>L. lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> MG1363 DltA	YP_001032528.1	63	79	3e-174
	<i>L. lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> SK11 DltA	YP_809317.1	63	79	3e-174
	<i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> KF147 DltA	YP_003353760.1	61	78	4e-170
	<i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> IL1403 DltA	NP_267417.1	61	77	3e-169
	<i>Enterococcus gallinarum</i> EG2 DltA	ZP_05650402.1	46	65	5e-115
DltB	<i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> KF147 DltB	YP_003353759.1	70	84	1e-169
	<i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> IL1403 DltB	NP_267416.1	70	84	3e-169
	<i>L. lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> MG1363 DltB	YP_001032529.1	70	84	3e-169
	<i>L. lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> SK11 DltB	YP_809316.1	70	84	1e-168
	<i>Lactobacillus salivarius</i> UCC118 DltB	YP_535784.1	53	72	6e-116
DltC	<i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> IL1403 DltC	NP_267415.1	81	92	3e-29
	<i>L. lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> SK11 DltC	YP_809315.1	80	92	4e-29
	<i>Enterococcus faecium</i> DO DltC	ZP_00603934.1	49	80	2e-14
	<i>E. faecium</i> Com15 DltC	ZP_05678830.1	49	78	3e-14
	<i>E. faecium</i> TX1330 DltC	ZP_03980466.1	49	78	7e-14
DltD	<i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> IL1403 DltD	NP_267414.1	50	69	4e-123
	<i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> KF147 DltD	YP_003353757.1	51	69	5e-123
	<i>L. lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> SK11 DltD	YP_809314.1	50	69	9e-120
	<i>L. lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> MG1363 DltD	AAC45503.1	49	70	4e-85
	<i>L. salivarius</i> ATCC11741 DltD	ZP_04008697.1	38	57	5e-75

La búsqueda de homologías entre las proteínas Dlt de *L. garvieae* y las familias de dominios proteicos depositadas en la base de datos Pfam del Instituto Sanger (Tabla 4.3) reveló que la proteína DltA muestra homología con la familia PF00501, que incluye enzimas responsables de unirse a las moléculas de AMP, mientras que DltB es homóloga a la familia de O-aciltransferasas de membrana PF03062. La proteína DltC, por su parte, presenta homología con la familia PF00550, la cual engloba aquellas proteínas encargadas de transportar grupos acilo mediante un dominio de unión constituido por residuos de fosfopanteteína. Por último, DltD tiene homología con las familias PF04915, PF04918 y PF04914, correspondientes a las regiones N-terminal, central y C-terminal, respectivamente, de las proteínas DltD.

Resultados

Tabla 4.3. Homologías de los productos proteicos deducidos a partir de los genes *dlt* de *L. garvieae* con familias de dominios proteicos de la base de datos Pfam del Instituto Sanger.

Proteína	Homología con base de datos Pfam	e valor	Familia Pfam
DltA	Familia de enzimas de unión a AMP	2e-79	PF00501
DltB	Familia de O-aciltransferasas de membrana (MBOAT)	8e-66	PF03062
DltC	Familia de proteínas transportadoras de grupos acilo con dominio fosfopanteteínico de unión	5e-12	PF00550
	Familia de región N-terminal de proteína DltD	1e-17	PF04915
DltD	Familia de región central de proteína DltD	2e-45	PF04918
	Familia de región C-terminal de proteína DltD	1e-46	PF04914

Las características generales de las proteínas DltA, DltB, DltC y DltD de *L. garvieae* fueron analizadas a través de los programas Compute pI/Mw, PSORTb, TMHMM y SignalP. Las predicciones realizadas por dichos programas se recogen en la **Tabla 4.4**.

Tabla 4.4. Estimación mediante programas bioinformáticos de las características generales de las proteínas DltA, DltB, DltC y DltD de *L. garvieae*.

Proteína	Nº AA	Pi	Masa	Hélices transmembrana	Localización celular	Péptido señal
			molecular (kD)			
DltA	500	5'01	56'44	Ninguna	Citoplasma	No
DltB	404	9'61	47'28	Nueve	Membrana plasmática	Sí: aminoácidos 1-25
DltC	80	4'09	9'33	Ninguna	Citoplasma	No
DltD	431	8'76	49'52	Una	Membrana plasmática	Sí: aminoácidos 1-32

A destacar la asignación de nueve hélices transmembrana a la proteína DltB y una a la proteína DltD (**Figura 4.2**) así como la posible presencia de péptido señal en ambas.

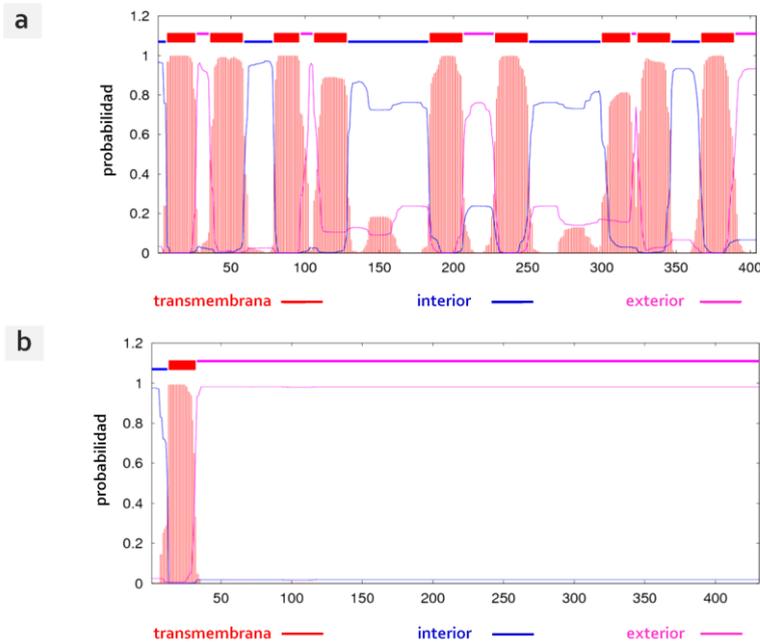


Figura 4.2. Gráficos correspondientes a las predicciones realizadas por el programa THMM sobre las proteínas (a) DltB y (b) DltD de *L. garvieae*. En ellas se muestra la probabilidad de que un segmento esté en la región transmembrana/interna/externa de la hélice. En la parte superior de ambos gráficos (entre 1 y 1'2) se indica la mejor predicción.

4.1.2. Organización transcripcional de los genes *dlt* en *L. garvieae*

El análisis del contexto de los genes *dlt* de *L. garvieae* permitió identificar dos posibles terminadores de la transcripción situados antes y después de esta agrupación (Anexo I). El estudio de la organización génica reveló que los genes *dltB* y *dltC* están separados por 24 pares de bases mientras que el codón de inicio del gen *dltB* se superpone en un par de bases con el codón de parada del gen *dltA* y el principio del gen *dltD* se superpone en 14 pares de bases con el final del gen *dltC*. Además, precediendo a los codones de inicio de los genes *dltA* (GGAG), *dltB* (GGAGG), *dltC* (GAAG) y *dltD* (GGA) se detectaron posibles secuencias de unión del ribosoma (Anexo I).

La identificación de dos posibles terminadores de la transcripción flanqueando los loci *dltA* y *dltD* así como el reducido número de nucleótidos de las zonas intergénicas sugiere que los cuatro genes podrían transcribirse como una sola unidad. La transcripción de esta única molécula de ARNm podría estar regida por una posible secuencia promotora localizada antes de los genes *dltABCD* que incluye las secuencias -10 "TTTAAT" y -35 "AAGACA" (Anexo I). Para confirmar la posible cotranscripción de los genes *dltABCD* se ensayaron dos reacciones de RT-PCR empleando ARN total de la cepa *L. garvieae* 074. El diseño de las estrategias de RT-PCR llevadas a cabo se representa en la Figura 4.3.a y los productos obtenidos se muestran en las Figuras 4.3.b y 4.3.c. Las reacciones de RT-PCR ensayadas generaron

Resultados

productos de amplificación correspondientes a las regiones comprendidas entre los genes *dltA-dltB* y *dltB-dltD* del tamaño esperado (703 y 706 pb), lo cual indica la presencia de un ARNm para los genes *dltABCD* y, por tanto, la organización de estos genes en un operón.

Para comprobar que la inserción del transposón Tn917 en la región codificante del gen *dltA* impedía su transcripción y determinar si se producía transcripción génica de las zonas de ADN situadas tras la inserción del transposón, se llevaron a cabo reacciones de RT-PCR empleando ARN total de la cepa mutante *L. garvieae XVIII* como molde. Los resultados mostraron la ausencia de amplificación del gen *dltA*, lo que confirma la inserción del transposón Tn917 en el mismo y la interrupción de su transcripción (Figura 4.3.c). Por el contrario, sí se obtuvieron productos de amplificación del tamaño esperado de los genes situados en sentido 3' del gen *dltA* (Figura 4.3.c). Esto significa que existe transcripción del ADN a partir del extremo 3' del gen *dltA* en la cepa mutante *L. garvieae XVIII*.

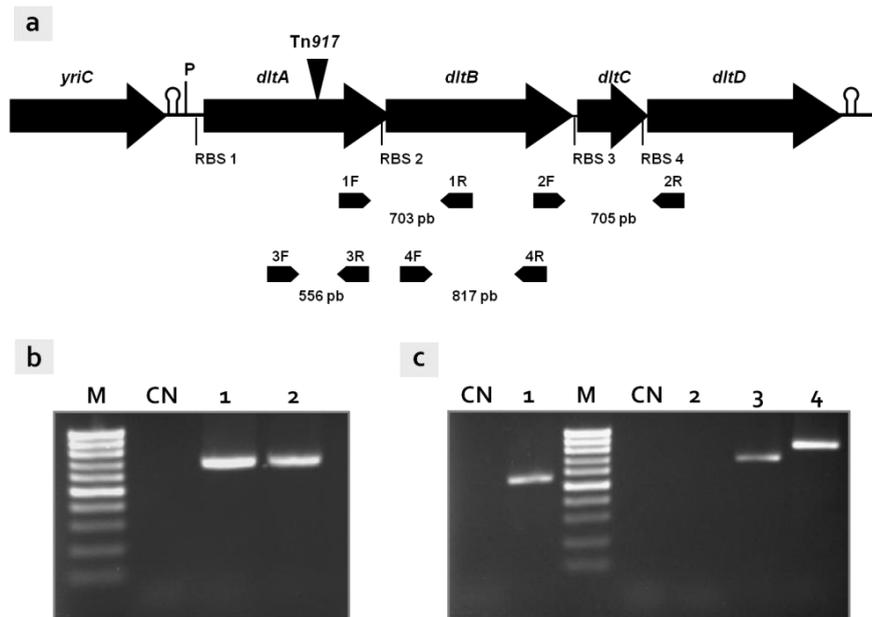


Figura 4.3. Análisis mediante RT-PCR de la organización transcripcional de los genes *dltABCD* de *L. garvieae*. (a) Se muestra la orientación de los genes y la localización de los iniciadores empleados en las reacciones de RT-PCR. P: posible región promotora, RBS: posible lugar de unión del ribosoma, Ω : posible terminador de la transcripción. Se indica el punto de inserción del transposón Tn917 en el locus *dltA* de la cepa mutante XVIII. (b) Reacción de RT-PCR empleando como molde ARN de la cepa *L. garvieae* 074 y los iniciadores 1F-1R (calle 1) y 2F-2R (calle 2). (c) Reacción de RT-PCR empleando como molde ARN de las cepas *L. garvieae* 074 (calle 1) y mutante XVIII (calle 2) y los iniciadores 3F-3R para confirmar la interrupción del locus *dltA* por el transposón Tn917 en la cepa mutante XVIII. Reacción de RT-PCR empleando como molde ARN de la cepa mutante *L. garvieae XVIII* y los iniciadores 1F-1R (calle 3) y 4F-4R (calle 4) para determinar si la mutación del locus *dltA* tiene un efecto polar. Las calles M (b, c) corresponden a un marcador de peso molecular de 100-1000 pb en incrementos de 100 pb. Las calles CN (b, c) corresponden a los controles.

4.1.3. Caracterización fenotípica

4.1.3.1. Determinación del crecimiento bajo distintas condiciones de cultivo

El crecimiento de las cepas 074 y mutante XVIII de *L. garvieae* se siguió bajo las siguientes condiciones de cultivo: pH ácido (pH: 6), presencia de: lisozima (600 µg/ml), SDS (0'005%, p/v) y peróxido de hidrógeno (0'02%, v/v). Como se observa en la Figura 4.4 no se encontraron diferencias entre el crecimiento de ambas cepas bajo ninguna de las condiciones ensayadas.

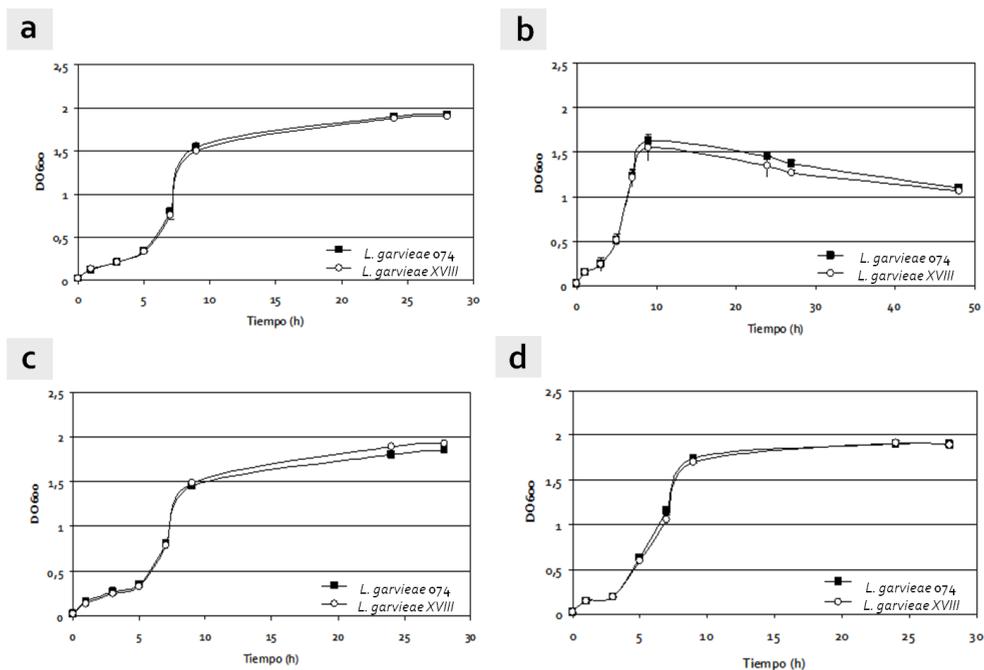


Figura 4.4. Curvas de crecimiento de las cepas 074 y mutante XVIII de *L. garvieae* bajo condiciones de (a) pH ácido, (b) presencia de lisozima, (c) presencia del detergente SDS y (d) presencia del agente oxidante peróxido de hidrógeno.

4.1.3.2. Ensayo de autólisis

Las cepas mutantes en algunos de los genes *dlt* de diversas especies bacterianas presentan un aumento de la capacidad autolítica (Perea Vélez *et al.*, 2007). Para determinar este fenotipo, se realizó un experimento en el que se valoró el efecto de la lisis bacteriana provocada por el detergente Triton X-100 en las cepas 074 y mutante XVIII de *L. garvieae* bajo condiciones de ausencia de crecimiento. Los resultados obtenidos se representan en la Figura 4.5, en la que puede observarse que no hay diferencias en el proceso de autólisis entre ambas cepas.

Resultados

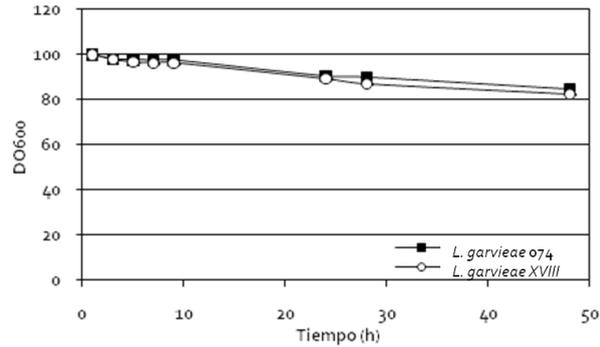


Figura 4.5. Representación gráfica de la autólisis bacteriana provocada por el detergente Tritón X-100 (0'05%, v/v) en la cepa 074 y la cepa mutante XVIII de *L. garvieae*.

4.1.3.3. Unión del colorante catiónico azul alción

La D-alanilación de los ácidos teicoicos y lipoteicoicos de la pared celular bacteriana ejerce un papel importante en la modificación de la carga neta de la superficie celular ya que la incorporación de grupos amino aumenta el número de cargas positivas presentes en dichos ácidos (Neuhaus & Baddiley, 2003). Con el fin de evaluar la carga neta de la superficie celular en la cepa 074 y la cepa mutante XVIII de *L. garvieae*, se realizó un ensayo de unión del colorante catiónico azul alción a las células de ambas cepas. La cantidad de colorante unido a las células de las cepas 074 y mutante XVIII fue $80'48\% \pm 4'22$ y $89'9\% \pm 1'99$, respectivamente (Figura 4.6).

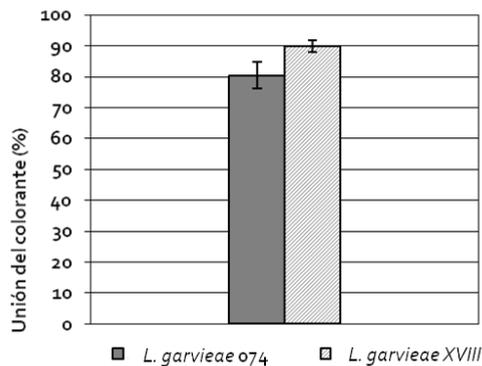


Figura 4.6. Histograma que representa la unión del colorante azul alción (%) a las células de las cepas 074 y mutante XVIII de *L. garvieae*.

4.1.3.4. Ensayo de susceptibilidad a diferentes antimicrobianos catiónicos

Los defectos en el proceso de incorporación de D-alanina a los ácidos teicoicos y lipoteicoicos de la pared celular bacteriana conllevan, en algunas bacterias, una mayor sensibilidad a los antimicrobianos catiónicos de tipo peptídico (Cao & Helmann, 2004; Chan *et al.*, 2007; Perea Vélez *et al.*, 2007). En este contexto, se valoró la resistencia a antimicrobianos catiónicos de la cepa parental *L. garvieae* 074 en relación a la cepa mutante *L. garvieae* XVIII. Las CMI de nisina, vancomicina y colistimetato de sodio determinadas para ambas cepas se muestran en la **Tabla 4.4**.

Tabla 4.4. Valores de la CMI ($\mu\text{g/ml}$) de antimicrobianos catiónicos para las cepas 074 y mutante XVIII de *L. garvieae*.

Antimicrobiano catiónico	CMI cepa <i>L. garvieae</i> 074 ($\mu\text{g/ml}$)	CMI cepa mutante <i>L. garvieae</i> XVIII ($\mu\text{g/ml}$)
Nisina	16	8
Vancomicina	0'5	0'5
Colistimetato de sodio	4096	4096

No se observaron diferencias en los valores de CMI de vancomicina y colistimetato de sodio entre las dos cepas. Por el contrario, los valores de CMI de nisina fueron diferentes para ambas cepas por lo que se realizó un seguimiento de su crecimiento en medio BHI, a modo de control, y en medio BHI con nisina en una concentración final de $4 \mu\text{g/ml}$ (**Figura 4.7**). Las curvas de crecimiento obtenidas muestran que al estar presente el antibiótico en el medio de cultivo ambas cepas ven retrasado el inicio de su fase exponencial unas 20 h y la cepa mutante, además, ve disminuido su crecimiento de forma relevante en relación a la cepa 074.

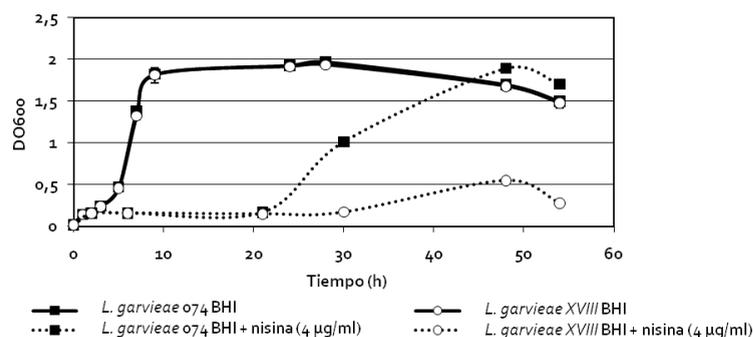


Figura 4.7. Curvas de crecimiento de la cepa 074 y la cepa mutante XVIII de *L. garvieae* en medio BHI y en medio BHI con el antimicrobiano nisina ($4 \mu\text{g/ml}$).

4.1.3.5. Cuantificación de D-alanina mediante HPLC

La D-alanina liberada en el sobrenadante de 10 mg de células de las cepas 074 y mutante XVIII de *L. garvieae* se cuantificó tras una hidrólisis alcalina suave con el fin de determinar si la cepa mutante contenía una cantidad menor de D-alanina que la cepa 074 en la pared celular (Figura 4.8).

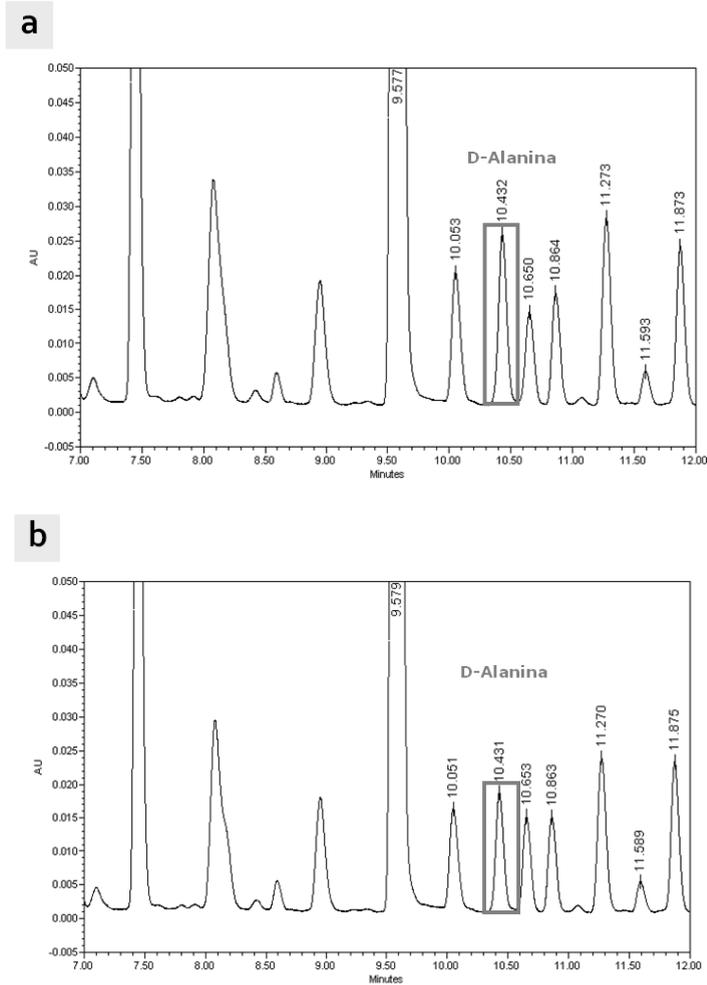


Figura 4.8. Cromatogramas obtenidos mediante HPLC tras la hidrólisis alcalina de 10 mg de células de (a) la cepa *L. garvieae* 074 y (b) la cepa mutante *L. garvieae* XVIII. Remarcado se presenta el pico correspondiente al tiempo de retención de los derivados de D-alanina (10'43 min). El tiempo de retención de los mismos fue determinado previamente mediante la cromatografía de cantidades conocidas del aminoácido (datos no presentados). AU: unidades de absorbancia.

La cantidad de D-alanina liberada fue $0'51 \mu\text{g} \pm 0,07$ para la cepa 074 y $0'33 \mu\text{g} \pm 0'03$ para la cepa mutante XVIII (Figura 4.9).

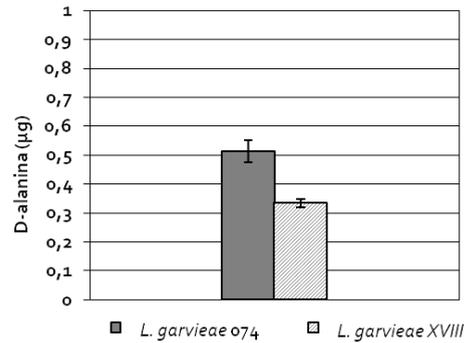


Figura 4.9. Histograma que muestra la cantidad de D-alanina liberada tras la hidrólisis alcalina de 10 mg de células de las cepas 074 y mutante XVIII de *L. garvieae*.

4.1.3.6. Microscopía electrónica de transmisión

Los resultados obtenidos tras analizar la morfología celular de las cepas 074 y mutante XVIII de *L. garvieae* mediante microscopio electrónico de transmisión indicaron que en las poblaciones de la cepa mutante existían células que presentaban formas irregulares en lugar de la forma típicamente cocoide de *L. garvieae*. Sin embargo, no puede considerarse un fenómeno generalizado ya que el grueso de la población celular de las dos cepas tenía el mismo aspecto. Por ello, se concluyó que no existen diferencias morfológicas relevantes entre ellas (Figura 4.10).

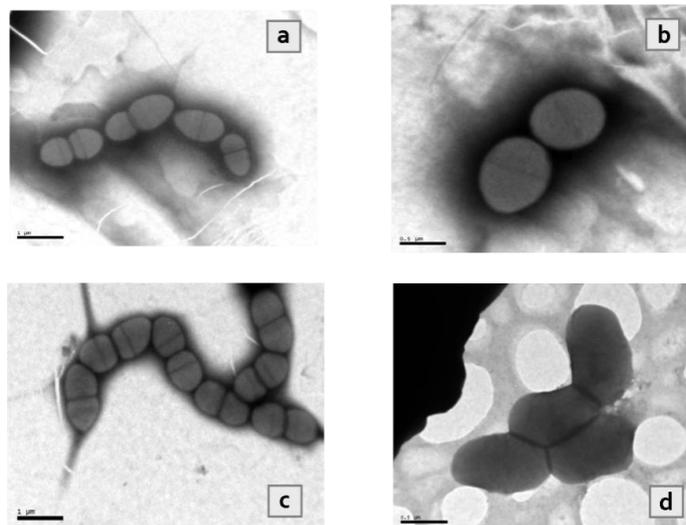


Figura 4.10. Fotografías de células de la cepa 074 y la cepa mutante XVIII de *L. garvieae* obtenidas mediante microscopía electrónica de transmisión. (a) cadena de células de la cepa 074 con morfología normal, (b) células de la cepa 074 con morfología cocoide típica, (c) cadena de células de la cepa mutante XVIII con morfología normal y (d) células de la cepa mutante XVIII con morfología anómala. Valores de barra de escala (a, c): 1 µm, (b, d): 0'5 µm.

Resultados

4.1.4. Determinación de la virulencia de las cepas 074 y mutante XVIII de *L. garvieae* en trucha arcoíris

Con el objetivo de determinar el papel específico que ejerce la incorporación de D-alanina a los ácidos teicoicos y lipoteicoicos de la pared celular bacteriana en la virulencia de *L. garvieae*, se llevaron a cabo diversos experimentos empleando como modelo animal la trucha arcoíris.

4.1.4.1. Determinación del valor de DL₅₀

Células de las cepas 074 y mutante XVIII de *L. garvieae* en un rango de 10^2 - 10^7 ufc fueron inyectadas a grupos de diez truchas arcoíris. Tres días después de la inyección se determinaron los valores de DL₅₀ de ambas cepas y se obtuvieron unos valores de DL₅₀ por pez de $5'2 \times 10^3$ ufc para la cepa 074 y de $4'2 \times 10^6$ ufc para la cepa mutante XVIII.

4.1.4.2. Ensayo de competencia *in vivo*

Con el fin de determinar si la cepa mutante XVIII de *L. garvieae* presenta alguna dificultad de crecimiento en la trucha arcoíris como hospedador en relación a la cepa 074 de *L. garvieae*, se realizó un ensayo de competencia *in vivo* con ambas cepas. El valor del índice de competencia *in vivo* obtenido en este ensayo fue $0'082 \pm 0'1$.

4.1.4.3. Ensayo de competencia *in vitro*

Este ensayo tenía como finalidad determinar si la cepa mutante XVIII de *L. garvieae* presenta diferencias en el perfil de crecimiento *in vitro* en relación al de la cepa 074 de *L. garvieae*. El valor obtenido del índice de competencia *in vitro* fue $0'53 \pm 0'09$.

4.2. Estudio de la diversidad genética intraespecífica de *L. garvieae* mediante SSH

Con el fin de profundizar en el conocimiento de la patogenicidad y la variabilidad intraespecífica de *L. garvieae* se planteó, en primer lugar, estudiar la virulencia de las cepas 074 y HF aisladas de trucha arcoíris y de un humano afectado de endocarditis causada por la bacteria, respectivamente. Para ello se emplearon trucha arcoíris y ratón como modelos animales para la infección. En segundo lugar, se propuso la identificación de diferencias génicas entre ambas cepas mediante la técnica de SSH. De este modo, en el experimento SSHI se seleccionaron secuencias génicas específicas de la cepa HF mientras que en el experimento SSHII se seleccionaron fragmentos génicos presentes de forma específica en la cepa 074.

4.2.1. Determinación de la virulencia de las cepas 074 y HF en trucha arcoíris y en ratón

En los experimentos de DL_{50} realizados en trucha arcoíris con la cepa 074 se obtuvo un valor de $2'1 \times 10^2$ ufc por pez. Los peces muertos por la infección presentaron signos característicos de la enfermedad tanto a nivel externo como en los órganos internos siendo los más notables exoftalmia, hemorragias en el globo ocular e intestino y distensión abdominal. Asimismo, se determinó mediante PCR que la bacteria estaba presente en el hígado y el bazo de los peces diseccionados. Sin embargo, no fue posible calcular el valor de DL_{50} en el caso de la cepa HF ya que no se recogieron datos relevantes de mortalidad durante el experimento.

La inyección de células de la cepa HF en ratones en un rango de 10^3 - 10^9 ufc no produjo ningún signo clínico visible de enfermedad en los animales a lo largo de los 14 días del experimento. Al diseccionar estos no se observaron daños ni alteraciones histológicas relevantes en los órganos internos (Figura 4.11). Del mismo modo, no se detectó la presencia de la bacteria en el hígado, bazo o riñón.

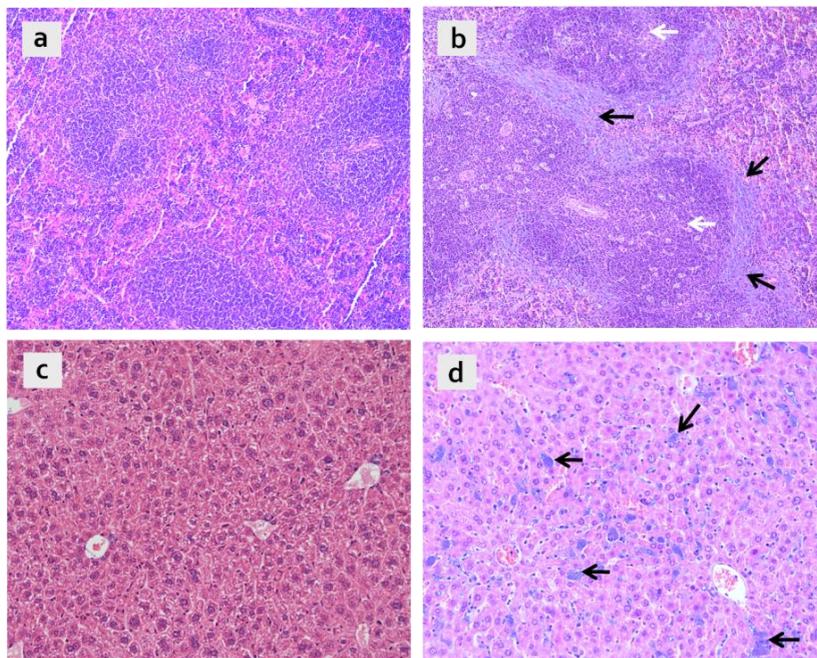


Figura 4.11. Cortes histológicos de (a, b) bazo e (c, d) hígado de ratones a los que se les inyectaron 10^9 ufc de las cepas (a, c) HF y (b, d) 074 de *L. garvieae*. La técnica de tinción empleada fue la de hematoxilina-eosina. (b) Se observa hiperplasia de la pulpa blanca (flechas blancas) y presencia de acúmulos bacterianos alrededor de la misma (flechas negras) en el bazo de los ratones a los que se les inyectaron 10^9 ufc de la cepa 074 de *L. garvieae*. (d) Se puede ver también la presencia de numerosas colonias bacterianas (flechas negras) en los espacios sinusoidales del hígado de estos ratones.

Resultados

Las mismas observaciones se registraron en el caso de los ratones a los que se les inyectaron células de la cepa 074 en un rango de 10^3 - 10^8 ufc. Por el contrario, aquellos ratones a los que se les inyectaron 10^9 ufc de esta cepa presentaron signos clínicos característicos de un proceso infeccioso durante las 24-48 h posteriores a haber sido inyectada la bacteria. Los animales mostraron fatiga, astenia, ojos semicerrados y recubiertos de una supuración blanquecina. Los ratones murieron durante el periodo referido anteriormente y al realizar su disección se observó que los órganos internos estaban inflamados. Además, el examen histológico puso de manifiesto que el bazo presentaba hiperplasia de la pulpa blanca y que esta se encontraba rodeada de acúmulos de bacterias (Figura 4.11). El tejido hepático no mostraba daño de los hepatocitos aunque se determinó la presencia de abundantes colonias bacterianas localizadas en los espacios sinusoidales (Figura 4.11). El riñón se encontraba por lo general preservado observándose focos de depósito de microorganismos en glomérulos aislados de la corteza y, puntualmente, en espacios intertubulares de la médula. La presencia de la bacteria en estos tres órganos fue confirmada mediante PCR.

4.2.2. Selección de fragmentos génicos específicos de las cepas HF y 074 mediante SSH

Como resultado de la aplicación de la técnica de SSH al estudio de las diferencias génicas entre las cepas HF y 074 de *L. garvieae* se obtuvo una serie de fragmentos de ADN amplificados por PCR específicos de cada cepa. Dichos productos de amplificación fueron introducidos mediante transformación por choque térmico en células competentes de la cepa *E. coli* DH5 α . Las genotecas resultantes se sembraron en placas de medio 2XTY suplementadas con ampicilina, IPTG y X-Gal, lo que permitió la selección de 58 clones portadores de fragmentos de ADN de la cepa HF y de 45 clones portadores de fragmentos génicos de la cepa 074. El tamaño del inserto de ADN de los clones no fue en ningún caso superior a 1 Kb. Todos los clones se sometieron a dos hibridaciones en paralelo tipo Dot Blot en las cuales se usaron como sondas el ADN genómico de las cepas problema y referencia empleadas en los experimentos. El objetivo de este análisis era discriminar los insertos génicos positivos, que hibridarían únicamente con el ADN de la cepa problema, de los falsos positivos, que hibridarían con el ADN de las cepas problema y referencia. Treinta de los 58 clones obtenidos en el experimento SSHI se confirmaron como positivos al hibridar únicamente con la sonda de ADN genómico marcado de la cepa HF mientras que 28 clones resultaron ser falsos positivos ya que hibridaron con el ADN genómico marcado de las cepas HF y 074 (Figura 4.12). Del mismo modo, 15 de los 45 clones obtenidos en el experimento SSHII resultaron ser positivos ya que hibridaron de forma única con la sonda de ADN genómico marcado de la cepa 074 y 30 clones fueron identificados como falsos positivos ya que hibridaron con el ADN genómico marcado de las cepas HF y 074 de *L. garvieae* (Figura 4.12).

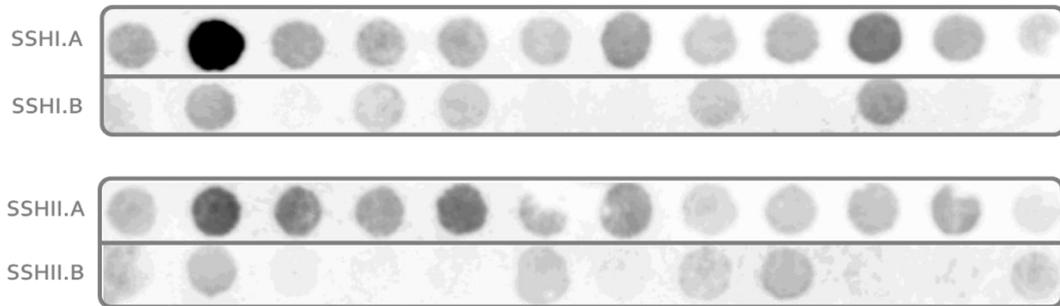


Figura 4.12. Hibridaciones tipo Dot Blot realizadas con fragmentos génicos de las cepas HF y 074 de *L. garvieae* obtenidos mediante SSH. Los fragmentos de la cepa HF se enfrentaron en paralelo a ADN marcado de la cepa HF (SSHI.A) y la cepa 074 (SSHI.B) con el fin de identificar aquellos que fueran específicos de la cepa HF. Asimismo, los fragmentos seleccionados de la cepa 074 se hibridaron con ADN marcado de la cepa 074 (SSHII.A) y la cepa HF (SSHII.B) para determinar las secuencias presentes exclusivamente en la cepa 074.

4.2.3. Identificación de fragmentos génicos específicos de las cepas HF y 074

Los insertos de ADN de los clones positivos y específicos de las cepas HF y 074 de *L. garvieae* fueron secuenciados para, posteriormente, determinar el número de posibles ORFs en cada uno de ellos. Se identificaron 34 y 19 hipotéticos ORFs específicos de las cepas HF y 074 de *L. garvieae*, respectivamente, de entre las cuales 26 y 13 eran diferentes ya que algunos se encontraban presentes en más de un clon. Los productos resultantes de la traducción de cada ORF se analizaron en busca de homologías con proteínas y con familias de dominios proteicos (Tablas 4.5 y 4.6). Tras analizar la relación de homologías encontradas las secuencias parciales de las proteínas se distribuyeron en tres grupos diferentes. En el **Grupo 1** se incluyeron las secuencias que presentaron homología con proteínas de función conocida en otras especies bacterianas: a este grupo se atribuyeron 13 secuencias específicas de la cepa HF y ocho de la cepa 074. En el **Grupo 2** se incluyeron aquellas secuencias que mostraron homología con proteínas de función desconocida: pertenecen a esta categoría cuatro secuencias propias de la cepa HF y dos de la cepa 074. Finalmente, se incluyeron en el **Grupo 3** las secuencias que no presentaron homología con ninguna proteína de entre las depositadas en las bases de datos consultadas: nueve y tres fragmentos específicos de las cepas HF y 074, respectivamente, se incluyeron en este grupo.

Resultados

Tabla 4.5. Relación de proteínas homólogas a los productos proteicos deducidos a partir de las secuencias génicas específicas de la cepa *L. garvieae* HF seleccionadas en el experimento SSHI.

Nº clon	Tamaño inserto (pb)	Nº acceso	Homología con base de datos NCBI	Identidad (%)	e valor	Nº acceso homólogo
SSHI.2	537	HM852546	Proteína de unión a mucus de <i>Leuconostoc citreum</i>	91	3e-88	YP_001727229.1
SSHI.3	479	HM852547	Sin homologías significativas	-	-	-
SSHI.4	462	HM852548	Sin homologías significativas	-	-	-
SSHI.5	389	HM852549	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> putative glycosyl/glycerophosphate transferase EpsJ	34	2e-08	NP_053024.1
SSHI.9	374	HM852550	Sin homologías	-	-	-
SSHI.12	373	HM852551	Proteína de unión a peptidoglicano de <i>Listeria monocytogenes</i>	42	5e-10	NP_463692.1
SSHI.14	418	HM852552	Proteína relacionada con la ATPasa FtsK/SpoIIIE de segregación del ADN de <i>L. lactis</i> subsp. <i>cremoris</i>	71	3e-49	YP_796565.1
SSHI.15	439	HM852553	Endolisina del fago gp053a de <i>Lactococcus</i> sp.	37	3e-09	YP_001469051.1
SSHI.17	514	HM852554	Sin homologías significativas	-	-	-
SSHI.20	515	HM852555	a. ATPasa de transporte de cationes de <i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> b. Sin homologías	96 -	3e-09 -	YP_003354951.1 -
SSHI.21	468	HM852556	Sistema de restricción-modificación LlaBIII de <i>L. lactis</i>	67	1e-52	AAM02924.1
SSHI.23	743	HM852557	a. Proteína de superficie de <i>L. lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> b. Proteína hipotética de <i>L. lactis</i> subsp. <i>cremoris</i>	29 46	1e-12 0.085	YP_001031586.1 YP_001031588.1
SSHI.25	288	HM852558	Posible regulador transcripcional de <i>Streptococcus mutans</i>	30	2e-05	YP_003485719.1
SSHI.27	121	HM852559	Sin homologías	-	-	-
SSHI.33	349	HM852560	Sin homologías significativas	-	-	-
SSHI.34	268	HM852561	a. Transportador de iones metálicos CorA de la familia MIT de <i>Lactobacillus rhamnosus</i> b. Proteína hipotética de <i>L. lactis</i>	100 100	2e-14 0.12	ZP_04442597.1 NP_053443.1
SSHI.44	414	HM852562	Proteína de resistencia a tetraciclina de <i>L. garvieae</i>	100	2e-71	ABF72533.1
SSHI.45	935	HM852563	Proteína conservada hipotética de <i>Streptococcus oralis</i>	36	3e-26	EFE56793.1
SSHI.46	280	HM852564	Sin homologías significativas	-	-	-
SSHI.49	711	HM852565	Proteína hipotética de <i>Lactobacillus fermentum</i>	42	7e-45	ZP_05864696.1
SSHI.52	357	HM852566	Sin homologías significativas	-	-	-
SSHI.55	435	HM852567	Exonucleasa de reparación del ADN de <i>L. lactis</i> subsp. <i>cremoris</i>	63	2e-43	YP_809376.1
SSHI.59	549	HM852568	Proteína del sistema PTS de <i>Enterococcus faecium</i>	55	3e-36	ZP_05668408.1

Tabla 4.6. Relación de proteínas homólogas a los productos proteicos deducidos a partir de las secuencias génicas específicas de la cepa *L. garvieae* 074 seleccionadas en el experimento SSHII.

Nº clon	Tamaño inserto (pb)	Nº acceso	Homología con base de datos NCBI	Identidad (%)	e valor	Nº acceso homólogo
SSHII.1	830	HM989024	Proteína con dominio SLT de <i>L. lactis</i> subsp. <i>cremoris</i>	72	5e-76	YP_811682.1
SSHII.7	794	HM989025	a. Orf20 del fago TP901-1 de <i>Lactococcus</i> sp.	69	2e-17	NP_112683.1
			b. Orf27 del fago bIL286 de <i>Lactococcus</i> sp.	35	5e-10	NP_076661.1
SSHII.15	768	HM989026	Proteína de transferencia conjugativa de <i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	44	2e-56	YP_003354632.1
SSHII.21	340	HM989027	Sin homologías	-	-	-
SSHII.26	959	HM989028	Posible primasa del bacteriofago phi31 de <i>Lactococcus</i> sp.	97	6e-157	CAC04163.1
SSHII.36	376	HM989029	Proteína hipotética de <i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	30	0.36	NP_267513.1
SSHII.43	738	HM989030	a. Proteína conservada hipotética de <i>Mollicutes</i> sp.	66	4e-23	ZP_04563139.1
			b. Proteína integral de membrana de <i>Acholeplasma laidlawii</i>	71	7e-21	YP_001621364.1
SSHII.44	575	HM989031	Sin homologías significativas	-	-	-
SSHII.48	851	HM989032	Proteína viral de inclusión de tipo A de <i>Trichomonas vaginalis</i>	20	9e-07	XP_001579765.1
SSHII.56	666	HM989033	Orf45 del fago bIL285 de <i>Lactococcus</i> sp.	72	2e-91	NP_076617.1
SSHII.61	609	HM989034	Sin homologías significativas	-	-	-

4.2.4. Distribución de fragmentos génicos específicos de las cepas HF y 074 en 25 aislados de *L. garvieae*

De entre los 39 ORFs específicos de las cepas HF y 074 se seleccionaron 12 y 13 ORFs, respectivamente, y se determinó mediante PCR su presencia en el genoma de una colección de 25 cepas de la bacteria procedentes de diferentes ambientes y orígenes geográficos. Los resultados obtenidos se muestran en las tablas 4.7 y 4.8.

Resultados

Tabla 4.7. Distribución de 12 ORFs específicos de la cepa HF en 25 cepas de *L. garvieae* procedentes de diferentes ambientes y orígenes geográficos.

Origen del aislado	Cepa	Número clon SSHI											
		2	5	9	12	14	21	23a	44	49	55	58	59
Trucha arcoíris, Italia	UNIUD020	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	UNIUD101	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	UNIUD041	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	UNIUD074 (074)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Trucha de arroyo, Italia	UNIUD028	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Trucha arcoíris, España	LIZ-4	-	-	+	+	-	-	-	-	-	+	-	+
	A3	-	-	+	+	-	-	-	-	-	+	-	+
	A1201	-	-	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-
	A103	-	-	+	+	-	-	-	-	-	+	-	+
	BO287	-	-	+	+	-	-	-	-	-	+	-	+
	BO123	-	-	+	+	-	-	-	-	-	+	-	+
	BO340	-	-	+	+	-	-	-	-	-	+	-	+
	BO165	-	-	+	+	-	-	-	-	-	+	-	+
	BO242	-	-	+	+	-	-	-	-	-	+	-	+
	BO207	-	-	+	+	-	-	-	-	-	+	-	+
	BO223	-	-	+	+	-	-	-	-	-	+	-	+
BO222	-	-	+	+	-	-	-	-	-	+	-	+	
Medregal del Japón, Japón	CECT 4828	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
	CECT 5274	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Humano, Francia	HF	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Leche cruda, Reino Unido	CECT 5073	-	+	+	+	-	-	-	-	-	+	-	+
Queso, España	4AB5	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	-	+
	T11	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
	Q121	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Mastitis bovina, Reino Unido y España	CECT 5074	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	+
	CECT 4531	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	LILA.1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-

Tabla 4.8. Distribución de 13 ORFs específicos de la cepa 074 en 25 cepas de *L. garvieae* procedentes de diferentes ambientes y orígenes geográficos.

Origen del aislado	Cepa	Número clon SSHII										
		1	7a,b	15	21	26	36	43a,b	44	48	56	61
Trucha arcoíris, Italia	UNIUD020	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+
	UNIUD101	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	UNIUD041	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	UNIUD074 (074)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Trucha de arroyo, Italia	UNIUD028	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+
Trucha arcoíris, España	LIZ-4	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-
	A3	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-
	A1201	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	A103	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
	BO287	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	BO123	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
	BO340	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
	BO165	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	BO242	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
	BO207	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
	BO223	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
BO222	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	
Medregal del Japón, Japón	CECT 4828	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-
	CECT 5274	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-
Humano, Francia	HF	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Leche cruda, Reino Unido	CECT 5073	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-
Queso, España	4AB5	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
	T11	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+
	Q121	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+
Mastitis bovina, Reino Unido y España	CECT 5074	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	CECT 4531	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-
	LILA.1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

4.2.5. Inducción de bacteriófagos lisogénicos en cepas de *L. garvieae* aisladas de trucha arcoíris

Los productos proteicos deducidos a partir de los ORFs: SSHII.1, SSHII.7a, SSHII.7b, SSHII.26, SSHII.56 y SSHII.48 muestran homología con diversas proteínas fágicas. Las cepas italianas y la cepa española A1201 de *L. garvieae*, aisladas de trucha arcoíris, contienen estas seis secuencias de origen viral (Tabla 4.8). Por ello, en dichas cepas se llevó a cabo un ensayo de inducción fágica con mitomicina C con el fin de determinar, en primer lugar, si contenían un fago lisogénico y, en segundo lugar, si podía relacionarse la presencia del mismo con las secuencias fágicas referidas. Los resultados mostraron que ninguno de los sobrenadantes de los cultivos bacterianos inducidos produjo halos de inhibición o placas de lisis en los cultivos de las cepas empleadas como posibles hospedadoras.

4.2.6. Localización en el genoma de la cepa HF de fragmentos génicos específicos

Los fragmentos génicos SSHI.9, SSHI.12, SSHI.55 y SSHI.59 se detectaron en todas las cepas españolas de *L. garvieae* aisladas de trucha arcoíris excepto el fragmento SSHI.59 que no está presente en la cepa A1201. En todos los casos se observó que la presencia en una cepa de uno de estos fragmentos génicos parecía determinar la presencia de los otros tres, lo que sugería que estas cuatro secuencias pudieran estar contenidas en un elemento genético móvil como, por ejemplo, un plásmido. Para comprobarlo se llevó a cabo una extracción de ADN plasmídico con la cepa HF. Como resultado se aisló un plásmido de aproximadamente 45 Kb, según se dedujo del número y tamaño de los fragmentos generados en la digestión del ADN con diversas enzimas de restricción (Figura 4.13.a). Seguidamente se realizó un análisis por hibridación tipo Southern Blot en el que se enfrentaron de forma paralela el ADN plasmídico y cromosómico de la cepa HF a cuatro sondas internas de los fragmentos SSHI.9, SSHI.12, SSHI.55 y SSHI.59. En todos los casos se observaron bandas de hibridación únicamente en la calle correspondiente al ADN cromosómico lo que indica que los cuatro fragmentos génicos están localizados en el cromosoma de la cepa HF de *L. garvieae* (Figura 4. 13.b).

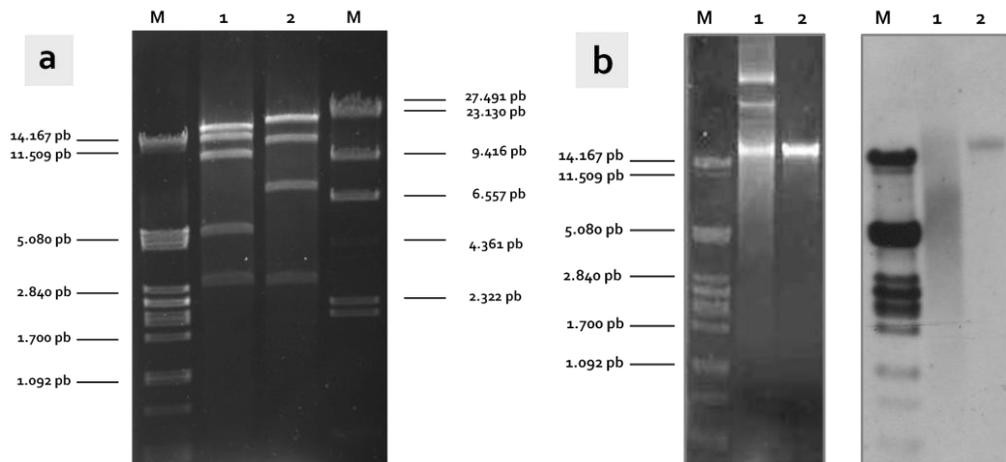


Figura 4.13. (a) Perfil de bandas de ADN plasmídico de la cepa HF de *L. garvieae* digerido con las enzimas de restricción *Bgl*II (calle 1) y *Pst*I (calle 2). (b) Hibridación tipo Southern Blot en la que se enfrentaron ADN plasmídico (calle 1) y ADN genómico (calle 2) de la cepa HF de *L. garvieae* a una sonda interna del fragmento SSHI.9. Las calles M (a, b) corresponden al ADN del fago λ digerido con la enzima *Pst*I.

4.3. Secuenciación y análisis del genoma de la cepa *L. garvieae* 074

4.3.1. Pirosecuenciación del ADN cromosómico

El tamaño del genoma de *L. garvieae* se estimó en 2'3-2'5 Mb por ser este el rango de tamaño del genoma de las subespecies pertenecientes a su pariente filogenéticamente más cercano, *L. lactis*. Como resultado de la generación y posterior pirosecuenciación de una genoteca de fragmentos de ADN cromosómico de la cepa *L. garvieae* 074, se obtuvo un total de 395.244 secuencias con una longitud media de 400 pb cada una. De este modo, las lecturas obtenidas supondrían una cobertura de 60-70 veces la información genómica de *L. garvieae*. Tras la realización de un ensamblado con el programa Newbler del conjunto de las secuencias obtenidas, se obtuvieron 108 "contigs" con un tamaño total de 2'08 Mb. Asimismo, los ensamblados llevados a cabo con los programas MIRA y Celera produjeron como resultado 729 y 146 "contigs", respectivamente. Adicionalmente se realizó un ensamblado híbrido con el programa PHRAP a partir de los generados previamente con los programas Newbler y Celera que generó 59 "contigs".

Con el objetivo de reducir el número de "contigs" y de conocer su orientación y posición relativa para poder organizarlos en secuencias de mayor tamaño definidas por el término "scaffolds", se construyó una genoteca de "paired ends" y se secuenciaron los fragmentos de ADN incluidos en ella mediante pirosecuenciación. De este modo, se obtuvieron 79.811 secuencias con un tamaño total de 10 Mb. El ensamblado con el programa Celera de estas nuevas secuencias junto a las obtenidas previamente mediante la pirosecuenciación del ADN cromosómico produjo como resultado 25 "contigs" que representan 2'17 Mb de secuencia del cromosoma de *L. garvieae* 074.

4.3.2. Aspectos generales del genoma

El ADN cromosómico de *L. garvieae* 074 tiene al menos 2'17 Mb y un contenido medio en G+C de 38'7%. Sus características generales se detallan en la **Tabla 4.9**. Según las predicciones realizadas el cromosoma de la bacteria tiene como mínimo 60 ARNt cargados con todos los aminoácidos excepto la serina, seis pseudo-ARNt y cinco operones de ARNr, cada uno de los cuales está formado por tres genes de copia única que codifican los ARNr correspondientes a las subunidades 23S, 16S y 5S del ribosoma.

Resultados

Tabla 4.9. Características principales del genoma de la cepa *L. garvieae* 074.

ADN cromosómico	Valor o porcentaje
Tamaño	2'17 Mb
Contenido G+C	38'7%
ORFs	2101
Pseudogenes	6
Elementos de inserción	9
Secuencias repetidas	246
Repeticiones CRISPRs	5
Islas genómicas	6
Genes ARN r	5 (16S+23S+5S)
Genes ARN t	60

En el cromosoma de la cepa *L. garvieae* 074 existen al menos 2.101 ORFs de los cuales el 78'15% codifica proteínas con una función definida en otras especies bacterianas mientras que el 21'85% codifica proteínas hipotéticas. Además, un 43% de los ORFs identificados fueron incluidos en subsistemas RAST (Figura 4.14) los cuales están constituidos por genes que codifican productos proteicos funcionalmente relacionados (Aziz *et al.*, 2008).

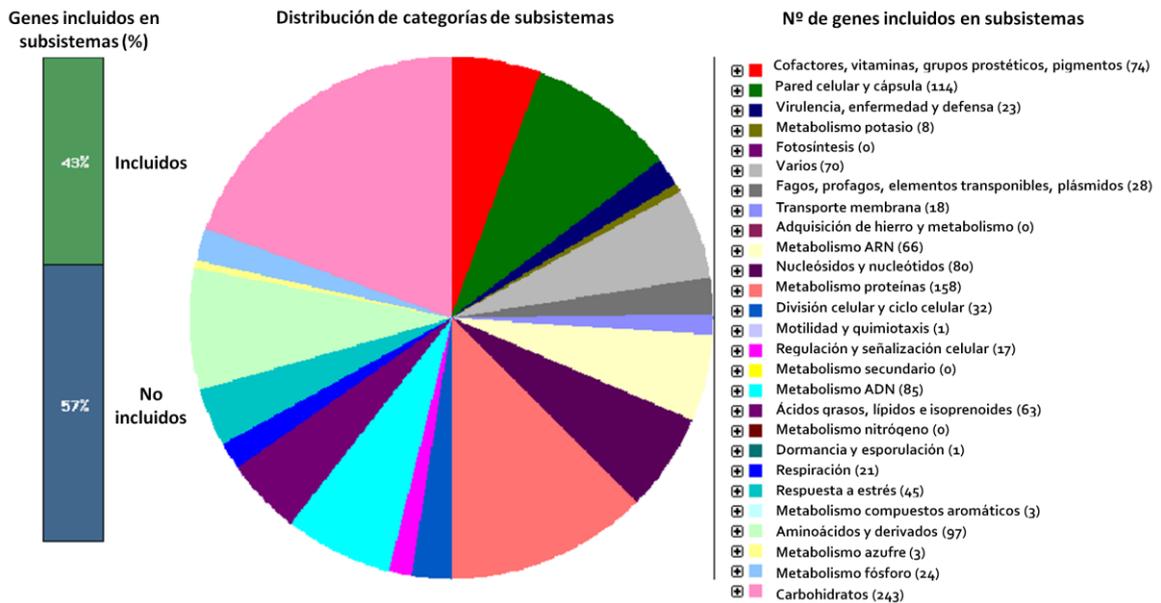


Figura 4.14. Esquema del número de genes de la cepa *L. garvieae* 074 incluidos en subsistemas RAST y su distribución.

El análisis mediante el programa RAST de las homologías existentes entre un pequeño número de familias de proteínas de presencia universal en procariotas y sus representantes en *L. garvieae* 074 determinó que las dos especies bacterianas filogenéticamente más cercanas a esta bacteria son *L. lactis* y *S. pyogenes*. Tras realizar una comparación entre los productos proteicos deducidos a partir del genoma de *L. garvieae* 074 y las proteínas de la cepa *L. lactis* subsp. *lactis* IL1403, se concluyó que el 81'5% de los genes de *L. garvieae* presentan homología con genes de *L. lactis* mientras que el 18'5% restante son genes específicos de *L. garvieae* (Figura 4.15). El 61% de estos últimos codifican proteínas sin una función conocida. Del mismo modo, la comparación entre los productos proteicos deducidos a partir del genoma de *L. garvieae* 074 y las proteínas de la cepa *S. pyogenes* SS1-1 reveló que el 61'5% de los genes de *L. garvieae* presentan homología con genes de *S. pyogenes* mientras que el 38'5% restante son genes específicos de *L. garvieae* (Figura 4.15).



Figura 4.15. Representación de los porcentajes de identidad existentes entre las proteínas de *L. garvieae* y sus homólogas en *L. lactis* subsp. *lactis* IL1403 (anillo externo) y *S. pyogenes* SS1-1 (anillo interno).

4.3.3. Islas genómicas, elementos de inserción, secuencias repetidas y elementos CRISPRs

En los 25 "contigs" de la cepa *L. garvieae* 074 se identificaron varias copias de nueve elementos de inserción diferentes. Estos elementos presentan homologías con elementos de inserción de diversas especies bacterianas de los géneros *Lactococcus*, *Streptococcus* y *Actinobacillus* (Tabla 4.10). También se determinó la presencia de 246 repeticiones directas en tándem distribuidas a lo largo de los "contigs" y constituidas por una secuencia consenso cuyo tamaño oscila entre 2 y 272 pb y que se repite entre 1'9 y 87'5 veces.

Resultados

Tabla 4.10. Elementos de inserción que presentaron homología significativa con la secuencia cromosómica de la cepa *L. garvieae* 074.

Elemento de inserción	Familia	Grupo	Homología con base de datos NCBI	Nº copias	e valor
ISLL6	IS ₃	IS ₃	<i>L. lactis</i>	7 completas	0.0
ISSag5	IS ₃	IS ₁₅₀	<i>Streptococcus agalactiae</i>	21 incompletas	6e-38
ISSpn4	IS ₃	-	<i>Streptococcus pneumonia</i>	6 incompletas	3e-15
ISSmu1	IS ₃	IS ₁₅₀	<i>Streptococcus mutans</i>	8 incompletas	1e-14
IS861	IS ₃	IS ₁₅₀	<i>S. agalactiae COH-I</i>	4 incompletas	2e-13
ISSpn1	IS ₃	IS ₃	<i>S. pneumonia</i>	2 incompletas	7e-13
ISSth6	IS ₃	-	<i>Streptococcus thermophilus</i>	8 incompletas	4e-11
ISAp13	IS ₃	IS ₁₅₀	<i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i>	2 incompletas	4e-08
ISAp12	IS ₃	IS ₁₅₀	<i>A. pleuropneumoniae</i>	2 incompletas	1e-05

Se identificaron 21 genes que codifican proteínas de tipo transposasa o integrasa y 81 que codifican proteínas fágicas. Asimismo, se determinó la existencia de seis islas genómicas cuyo contenido génico se recoge en la **Tabla 4.11**. Un 32% de los genes pertenecientes a las mismas no poseen representantes homólogos en las cepas *L. lactis* IL1403 y *S. pyogenes* SS1-I. Además, varios de los loci que codifican proteínas de tipo transposasa, integrasa y de origen fágico se encuentran incluidos en estas islas genómicas.

Tabla 4.11. Islas genómicas detectadas en la secuencia cromosómica de la cepa *L. garvieae* 074.

Isla genómica	Programa responsable de la predicción	Nº acceso "contig"	Tamaño (pb)	Productos proteicos deducidos
IG.1	IslandPath-DIMOB SIGI-HMM	AFHF 01000023.1	8.202	Subunidad β del componente E1 de la acetoina-deshidrogenasa Componente E2 acetiltransferasa dihidrolipoamida del complejo acetoina-deshidrogenasa Dihidrolipoamida-deshidrogenasa de la acetoina-deshidrogenasa Proteína de reparación y recombinación del ADN Recombinasa sitio-específica Posible proteína con dominio catalítico GIY-YIG Proteína hipotética Posible pirofosfohidrolasa de nucleótidos MazG
IG.2	IslandPath-DIMOB	AFHF 01000002.1	4.758	Posible enzima hidroxilasa de anillos aromáticos involucrada en el ensamblado de complejos Fe-S Posible integrasa Proteína hipotética Proteína hipotética Proteína hipotética Proteína hipotética Posible proteína de membrana Histidin-kinasa VraS

Continuación Tabla 4.11.

Isla genómica	Programa responsable de la predicción	Nº acceso "contig"	Tamaño (pb)	Productos proteicos deducidos
IG.3	SIGI-HMM	AFHF 01000005.1	13.792	Proteína hipotética Posible proteína de la familia flavodoxina Proteína hipotética Proteína hipotética Posible proteína fágica Posible proteína fágica con dominio XRE Proteína hipotética Posible proteína fágica Proteína hipotética Posible proteína fágica Posible proteína fágica Proteína hipotética Proteína hipotética Proteína hipotética Posible proteína fágica Proteína hipotética Proteína hipotética Posible proteína de la familia Q de antiterminadores fágicos Proteína hipotética Posible proteína con dominio SMC Proteína hipotética
IG.4	SIGI-HMM	AFHF 01000016.1	4.670	Transposasa TnpA Proteína hipotética Proteína hipotética Proteína integral de membrana Proteína hipotética
IG.5	SIGI-HMM	AFHF 01000003.1	5.648	6-fosfofructokinasa Piruvato kinasa L-lactato deshidrogenasa Posible proteína con dominio regulador de la transcripción Rgg
IG.6	IslandPath-DIMOB	AFHF 01000021.1	4.424	Proteína hipotética Posible proteína fágica Represor fágico Proteína hipotética Integrasa Componente IIA del sistema PTS de celobiosa Componente IIB del sistema PTS de celobiosa

Finalmente, se predijo la presencia de 5 posibles elementos CRISPRs en los 25 "contigs" de la cepa *L. garvieae* 074. Las secuencias repetidas y espaciadoras identificadas en cada uno de ellos se representan en la **Figura 4.14**. Los productos proteicos deducidos a partir de los genes localizados en los extremos 5' y 3' de cada repetición CRISPR (CRISPRs-Associated, CAS) se recogen en la **Tabla 4.12**.

Resultados

CRISPR_Lgo74.1	TTCAATCGGGAAAAAGCTTGGCTTTTCTTTAACCGAT ACGAGCGAAGATTTTCTTAAGAAAATCCCTATTGACGA TTCAATCGGGAAAAAGCTTGGCTTTTCTTTAACCGAT
CRISPR_Lgo74.2	AGCAAATTAGAATGATAATACGCAGGGAGCGAAGCGAG TTGTGAACACCATAAAATCTTTTGGCTTT AGCAAATTAGAATGATAATACGCAGGGAGCGAAGCGAG
CRISPR_Lgo74.3	GGAGCGAAGCGAGTTGTGAACCT CCCGTCTTCTTTCTGGTTTAGCAGATTAGAATGATAATACGCAG GGAGCGAAGCGAGTTGTGAACCT
CRISPR_Lgo74.4	GAGCTTGACTCAGAAAGAGTTTCTGATAAAGATTCAGAACTAGAGAT CGATTGGAGTCCGAAATTGATTCCGAGCTAGACTCAGAAAGAGTTTCT GATAAAGATTCAGAACTAGAGATTGACTGTGAGTCCGAAAGTTGATTCT GAGCTTGACTCAGAAAGTGTCTCTGATAAATGATTACGATACGGATTCT
CRISPR_Lgo74.5	CATGCATAACAGTCCACAGAACTGTTATTAACGCATGTTCT TTCTTGTACGGCTTGGCCCTACGCGTCAATTGCTCT CATGCATAACAGTCCACAGGACTGTTATTAACGCATGTTCT

Figura 4.14. Secuencias repetidas (negro) y espaciadoras (gris) en sentido 5'-3' de los cinco elementos CRISPRs identificados en la secuencia cromosómica de la cepa *L. garvieae* 074.

Tabla 4.12. Productos proteicos deducidos de los genes CAS localizados en los extremos 5' y 3' de los elementos CRISPRs.

CRISPR	Producto proteico deducido extremo 5' CRISPR	Producto proteico deducido extremo 3' CRISPR
CRISPR_Lgo74.1	Proteína de unión a ATP de transportador tipo ABC	Proteína hipotética
CRISPR_Lgo74.2	Proteína hipotética	Regulador de la transcripción
CRISPR_Lgo74.3	UDP-N-acetilmuramoilalanil-D-glutamil-2,6-diaminopimelato--D-alanil-D-alanina ligasa	Proteína periplásmica de unión a oligopéptidos OppA
CRISPR_Lgo74.4	Proteína anclada a la membrana tipo SasA (motivo LPXTG)	Proteína anclada a la membrana tipo SasA (motivo LPXTG)
CRISPR_Lgo74.5	Proteína ribosomal L2op de la subunidad mayor del ribosoma	Proteína ribosomal L35p de la subunidad mayor del ribosoma

4.3.4. Localización y análisis de los genes seleccionados mediante STM y SSH

La ubicación de los genes seleccionados mediante la técnica de STM como esenciales para el crecimiento de *L. garvieae* en la trucha arcoíris como hospedador (Menéndez *et al.*, 2007) fue determinada en los 25 "contigs" de la cepa 074 de *L. garvieae*. De este modo, se observó que un 37% de ellos se localiza en una zona del cromosoma de aproximadamente 20 Kb y un 17% se encuentra agrupado en otra región de aproximadamente 9 Kb. Por tanto, más de la mitad de los genes seleccionados en el ensayo de STM se localizan en sólo dos pequeñas regiones del cromosoma de *L. garvieae*. En el mismo análisis se pudo comprobar que el locus en el cual se produjo la inserción del transposón Tn917 en el mutante V y que

codifica la proteína hipotética EF450032, se halla incluido en la isla genómica IG_Lg074.4. Además, se concluyó que un 20% de los loci seleccionados mediante STM están presentes de forma exclusiva en el genoma de *L. garvieae* y ausentes en el de las cepas *L. lactis* subsp. *lactis* IL1403 y *S. pyogenes* SS1-I.

Por otro lado, la determinación de la localización de los genes específicos de la cepa 074 de *L. garvieae* seleccionados mediante SSH reveló que el 61% de ellos se encontraban agrupados en sólo tres regiones del cromosoma de la cepa *L. garvieae* 074. Además, se comprobó que el 50% de las secuencias identificadas de este modo están presentes de forma específica en el cromosoma de *L. garvieae* y ausentes en el de *L. lactis* subsp. *lactis* IL1403 y *S. pyogenes* SS1-I.

4.3.5. Posibles genes implicados en virulencia

El análisis de las homologías existentes entre las proteínas deducidas del cromosoma de la cepa *L. garvieae* 074 y las depositadas en las bases de datos consultadas condujo a la identificación de varios genes homólogos a otros de microorganismos patógenos que pueden dotar a la bacteria de capacidades esenciales a la hora de desarrollar un proceso infeccioso en el hospedador (Tabla 4.13).

Tabla 4.13. Genes y productos proteicos potencialmente relacionados con los mecanismos de patogenicidad de *L. garvieae*.

Mecanismo de patogenicidad	Número de genes implicados
Síntesis de polisacáridos capsulares	
<i>rmlA, rmlB, rmlC, rmlD</i>	4
<i>rgpA, rgpB, rgpC, rgpD, rgpF, rgpG</i>	6
Posible piruvil-transferasa de polisacárido	1
Glicosiltransferasas, familia GT1	3
Glicosiltransferasas, familia GT2	2
Glicosiltransferasas, familia GTA	1
Proteína exportadora implicada en biosíntesis de polisacárido	1
UDP-glucosa 4-epimerasa	1
Colin-fosfotransferasa LicD1 de lipopolisacárido	1
Resistencia a compuestos tóxicos	
Bombas de eflujo de múltiples fármacos	10
Factores de resistencia a beta-lactámicos	7
Familia ArsC de proteínas reductasas de arsénico y derivados	12
Familia Spx de reguladores de la transcripción de proteínas de la familia ArsC	5
Superfamilia MFS de proteínas de resistencia a antibióticos	3
Proteína resistencia a bleomicina	2
Proteína resistencia a telurio	1
Proteína resistencia a zinc y cadmio	2
Proteína resistencia a compuestos de amonio cuaternario	1
Proteína resistencia a peróxido de hidrogeno	1
Adquisición de hierro	
<i>fhuD, fhuB, fhuG, fhuC</i>	4
<i>feoA, feoB</i>	2
<i>sitA, sitB, sitD, mntR, mntH</i>	5

Resultados

Continuación Tabla 4.13.

Mecanismo de patogenicidad	Número de genes implicados
Metabolismo de hierro	
Ferroxidasa	1
Oxidasa de coproporfirinógeno III independiente de oxígeno	1
Ferroquelatasa	1
<i>sufB, sufE, sufS, sufD, sufC</i>	5
Proteasas	
Proteasas tipo Clp	6
Metaloproteasas dependientes de Zinc	3
Proteasa DegP/HtrA rica en residuos de serina	1
Proteasa tipo Lon con dominio PDZ	1
Proteasa con extremo amino CAAX	1
Posible proteasa de membrana YbbK	1
Proteínas de estrés	
Reguladores de la transcripción de respuesta a estrés	3
Familia universal de proteínas de estrés	12
Proteínas de respuesta a estrés debido a choque térmico por frío	4
Proteínas de respuesta a estrés debido a choque térmico por calor	7
Proteínas de respuesta a estrés debido a pH alcalino	2
Hemolisinas y proteínas relacionadas	
Proteínas con dominios tipo CBS	5
Posible proteína con dominios tipo Cna-B y tipo factor Von Willebrand A	1
Adhesión a tejidos del hospedador	
Proteínas con dominios de unión a colágeno	3
Proteínas con dominios de unión a fibronectina o fibrinógeno	2
Degradación de tejidos del hospedador	
Posible hialuronidasa fágica	1
Antígenos	
Proteínas antigénicas tipo PcsB/GbpB/SagA	3
Proteína antigénica de reacción cruzada con miosina	1
Metabolismo de sales biliares	
Hidrolasa de ácidos biliares conjugados	1
Proteína transportadora de ácidos biliares de tipo sódico	1
Proteínas con dominios EAL/GGDEF	
Proteínas con dominios tipo EAL	4
Proteínas con dominios tipo GGDEF	3
Proteínas de superficie	
Proteínas con dominios LPXTG homólogas a la familia internalina	5
Sortasas LPXTG-específicas	4
Sistema accesorio de secreción Sec	
<i>secY2, secA2, asp1, asp2, asp3, gtfA, gtfB</i>	7
Proteínas ricas en residuos de serina con dominios LPXTG	2

4.3.6. Predicción de rutas metabólicas

La aplicación del programa Model SEED al análisis de la información del cromosoma de la cepa *L. garvieae* 074 ha permitido realizar una predicción de las rutas metabólicas de esta bacteria. Así, se definió la existencia de, al menos, seis pseudo-ARNt y 6o ARNt correspondientes a todos los aminoácidos excepto la serina. Se atribuyen carencias enzimáticas importantes en las rutas de biosíntesis de los aminoácidos:

lisina, alanina, valina, leucina e isoleucina; triptófano, fenilalanina, tirosina, histidina y metionina. La bacteria posee, en cambio, rutas de síntesis de los aminoácidos: glutamato y glutamina; arginina y prolina; aspartato y asparragina; serina, glicina y treonina; y cisteína.

En cuanto a la síntesis de vitaminas, la presencia de los genes responsables de codificar los enzimas de síntesis del folato o vitamina B indican que *L. garvieae* podría generar este compuesto, necesario en la biosíntesis de nucleótidos y las reacciones de metilación dependientes de metionina. Asimismo, la bacteria parece tener la propiedad de generar terpenoides mediante la vía del ácido mevalónico, una amplia clase de compuestos derivados del isopreno fundamentales para el metabolismo y entre los que se encuentra terpenos, carotenos, vitaminas y esteroides. Por el contrario, las rutas encargadas del metabolismo de las vitaminas tiamina y riboflavina carecen de varios de los genes implicados en ellas.

El genoma dispone de genes pertenecientes al sistema PTS que posibilitan la translocación a través de la membrana bacteriana de beta-glucósidos, glucosa, maltosa, sacarosa, fructosa, manosa, manitol, trehalosa, celobiosa. Además, el producto deducido de uno de estos genes codifica un transportador PTS de N-acetilglucosamina. Según las predicciones realizadas la bacteria podría obtener energía mediante la oxidación de los azúcares glucosa, maltosa, galactosa, fructosa, manosa y manitol.

Los genes correspondientes a la ruta de las pentosas fosfato fueron también identificados. Mediante esta ruta se utiliza glucosa para generar ribosa, la cual será empleada en las rutas de síntesis de las bases nitrogenadas purinas y pirimidinas, que también posee la bacteria.

Por último, el genoma de la cepa *L. garvieae* 074 posee los genes que codifican sintetasas de ácidos grasos, involucradas en la ruta metabólica de formación de ácidos grasos a partir de los precursores acetil-CoA y malonil-CoA.

Resultados

5. Discusión

5. Discusión

La importancia de *L. garvieae* como agente etiológico de una seria patología en acuicultura y su creciente relevancia en veterinaria y medicina clínica no se corresponden con los conocimientos que se tienen sobre este microorganismo. Por ello, en la elaboración de esta Tesis Doctoral se planteó como objetivo estudiar diferentes aspectos relacionados con la virulencia y la variabilidad genética intraespecífica de la bacteria. Además, y dadas las escasas nociones que se tienen del contenido génico de *L. garvieae*, se propuso secuenciar su genoma y poder así disponer de una valiosa fuente de información para ahondar en el estudio de esta bacteria.

5.1. Análisis de mutantes obtenidos mediante STM en *L. garvieae*: caracterización del fenotipo y determinación de la virulencia de un mutante en el gen *dltA*

El estudio de seis mutantes obtenidos mediante STM en *L. garvieae* (Menéndez *et al.*, 2007) únicamente permitió establecer una relación clara entre el gen interrumpido y la presencia de un fenotipo diferencial que sirviera como punto de partida de un análisis más profundo en el caso del mutante XVIII. El análisis de las regiones de ADN contiguas a la inserción del transposón Tn917 en el mutante XVIII de *L. garvieae* determinó que se había interrumpido el gen *dltA* (Menéndez *et al.*, 2007). Adyacentes al mismo se identificaron los loci *dltB*, *dltC* y *dltD*. Las secuencias de aminoácidos deducidas a partir de ellos muestran identidades de entre el 38 y el 81% con las proteínas DltA, DltB, DltC y DltD de diversas especies bacterianas filogenéticamente cercanas y pertenecientes a los géneros *Lactococcus*, *Lactobacillus* y *Enterococcus*. Del mismo modo, presentan homologías con familias de proteínas cuyos papeles funcionales se corresponden con los descritos para cada una de las proteínas Dlt en otras bacterias Gram-positivas (Neuhaus & Baddiley, 2003). Así, las predicciones realizadas para las proteínas Dlt de *L. garvieae* atribuyeron una localización citoplasmática a las proteínas DltA y DltC, lugar donde ambas proteínas llevan a cabo la activación y transporte de las moléculas de D-alanina (Figura 5.1). Se atribuyó una

localización de membrana, nueve hélices transmembrana y la presencia de péptido señal a la proteína DltB; resultados que se ajustan al papel que ejerce como canal transmembrana de los complejos formados por moléculas de D-alanina activada y proteínas DltC (Figura 5.1). Asimismo, la membrana plasmática se predijo como localización celular más probable del producto proteico del gen *dltD*, al que se atribuyó además, la existencia de una hélice transmembrana y de péptido señal. Esto se debe a que la proteína DltD, pese a ejercer su función de proporcionar sitios específicos de unión para la formación de los complejos de moléculas de D-alanina y proteínas DltC en el citoplasma, se encuentra anclada a la membrana plasmática mediante su extremo N-terminal hidrofóbico (Figura 5.1).

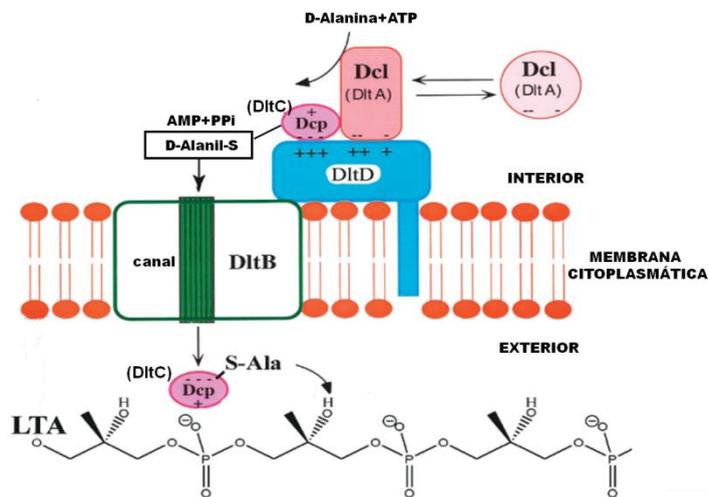


Figura 5.1. Representación del proceso de incorporación de D-alanina a los ácidos lipoteicoicos de la pared celular en bacterias Gram-positivas. Imagen tomada y modificada de Neuhaus & Baddiley (2003). La proteína DltD proporciona sitios de unión a las proteínas DltA y DltC en la cara citoplasmática de la membrana celular. La proteína DltB constituye un posible canal de transporte responsable de la secreción de los complejos DltC-D-alanina hacia el periplasma, donde tiene lugar la D-alanilación.

La inserción del transposón Tn₉₁₇ en el codón correspondiente al aminoácido 363 de un total de 500 codificados por el gen *dltA* podría dar lugar a una proteína DltA funcional. No obstante, esta posibilidad puede descartarse ya que la inserción del transposón precede a dos de las tres regiones propuestas por Heaton & Neuhaus (1992) como fundamentales para la correcta actividad de esta proteína. Es más, se ha demostrado recientemente que la sustitución de un único aminoácido en la proteína DltA de *Bacillus cereus* es suficiente para producir como resultado una proteína inactiva (Osman *et al.*, 2009).

La superposición observada entre los codones de terminación e inicio de los genes *dltA* y *dltB* así como entre los de los genes *dltC* y *dltD* parece indicar la existencia de un mecanismo de acoplamiento de la traducción o “translational coupling” en el operón *dlt* de *L. garvieae* del mismo modo que se ha descrito en los operones *dlt* de otras especies bacterianas (Neuhaus & Baddiley, 2003). Esto provocaría que se

llevarse a cabo una traducción coordinada e interdependiente de las proteínas funcionalmente relacionadas DltA y DltB, DltC y DltD. Las posibles secuencias Shine-Dalgarno identificadas delante de los genes *dltB* y *dltD* podrían constituir, por tanto, sitios de baja eficiencia de unión del ribosoma (Govantes *et al.*, 1998) o bien resultar inaccesibles para este debido a la formación de plegamientos del ARNm cuando no se produce la traducción de las proteínas precedentes (Rex *et al.*, 1994). Ambas situaciones justificarían la existencia de un mecanismo de acoplamiento de la traducción.

El análisis mediante RT-PCR de la organización transcripcional de la agrupación génica *dlt* en *L. garvieae* determinó que la transcripción de los cuatro genes produce un solo ARNm policistrónico y que, por tanto, constituyen un operon. Además, se confirmó en el mutante la interrupción del ARNm correspondiente al gen *dltA* debido a la inserción en el mismo del transposón Tn917. Sin embargo, se puso de manifiesto que la mutación generada no tiene un efecto polar sobre el resto de genes del operón ya que se detectó la presencia de ARNm correspondiente a la parte final de la secuencia del gen *dltA* y a la secuencia del gen *dltB*. La inserción del transposón Tn917 se produjo de manera que el sentido de la transcripción de sus genes y el del gen *dltA* coinciden, lo que permitiría que se produjese la transcripción a través del transposón de los genes situados por debajo de su punto de inserción en el cromosoma bacteriano. Este fenómeno ya ha sido descrito para este transposón por Dobinsky *et al.* (2002) en *Staphylococcus epidermidis*.

De acuerdo a los resultados obtenidos en nuestro estudio no existen diferencias entre el crecimiento de las cepas 074 y mutante XVIII de *L. garvieae* en presencia del detergente aniónico SDS, de lisozima, del agente oxidante peróxido de hidrógeno ni bajo condiciones de pH ácido. Tampoco se observaron diferencias entre la capacidad autolítica de ambas cepas. Las mutaciones en los genes *dlt* pueden tener consecuencias muy variables en la fisiología de los microorganismos. Así, existen ejemplos en la literatura de mutaciones en algunos de los genes *dlt* que provocan una disminución de la tasa de crecimiento de la cepa mutante frente a la cepa parental (Clemans *et al.*, 1999; Palumbo *et al.*, 2006), una mayor capacidad para crecer en presencia del detergente aniónico SDS (Perea Vélez *et al.*, 2007), un incremento en la susceptibilidad a la acción lítica de la lisozima (Giaouris *et al.*, 2008; Herbert *et al.*, 2007; Kristian *et al.*, 2005), un aumento de la sensibilidad a condiciones de pH ácido (Boyd *et al.*, 2000; Kristian *et al.*, 2005; Walter *et al.*, 2007) o un aumento en la capacidad autolítica (Perea Vélez *et al.*, 2007; Walter *et al.*, 2007). Sin embargo, en otros estudios se han descrito mutantes en genes *dlt* que no presentan diferencias con la cepa parental en los parámetros señalados (Fabretti *et al.*, 2006; Kovacs *et al.*, 2006).

En este punto del trabajo era importante identificar alguna característica que indicara que la mutación del gen *dltA* en *L. garvieae* producía alteraciones constatables en su fisiología. La D-alanilación de los ácidos teicoicos y lipoteicoicos de la pared celular bacteriana ejerce un papel importante en la modificación de la carga neta de la superficie celular. Esto es debido a que la incorporación de grupos

amino cargados de forma positiva a dichos ácidos antagoniza de forma parcial la carga negativa de sus grupos fosfato (Neuhaus & Baddiley, 2003). Por ello, las alteraciones en la D-alanilación conllevan un aumento relativo del número de cargas negativas en la pared celular bacteriana. Este hecho se confirmó a través del ensayo de unión del colorante catiónico azul alcian a las células de las cepas 074 y mutante XVIII de *L. garvieae* ya que el colorante se unió un 10% más a las células de la cepa mutante. Se registraron valores similares en un ensayo de las mismas características realizado con una cepa mutante en el gen *dltA* de *Streptococcus gordonii* (Chan *et al.*, 2007). De igual modo, el ensayo de unión del citocromo C llevado a cabo por Wecke *et al.* (1997) con cepas mutantes en genes *dlt* de *Bacillus subtilis* reveló que se había incrementado el número de puntos aniónicos de unión de esta proteína, lo que es indicativo de que la carga neta de la superficie celular había sido modificada.

Asimismo, este aumento de la carga negativa de la superficie celular bacteriana debido a defectos en el proceso de D-alanilación de los ácidos teicoicos y lipoteicoicos conlleva que las células se unan con mayor avidez a compuestos cargados positivamente, como es el caso de los antimicrobianos catiónicos de tipo peptídico (Abi Khattar *et al.*, 2009; Kovacs *et al.*, 2006; Kristian *et al.*, 2005; McBride & Sonenshein, 2011; Perea Vélez *et al.*, 2007; Peschel *et al.*, 1999). Los valores de CMI de nisina determinados en la cepa 074 y en el mutante XVIII revelaron que, en el caso de *L. garvieae*, la interrupción del gen *dltA* produce un incremento en la susceptibilidad de la bacteria a este antibiótico. En este sentido, también se ha descrito que la ausencia de D-alanilación en *S. aureus* resulta en un incremento en la susceptibilidad de la bacteria a nisina (Peschel *et al.*, 1999), algo que en cambio no ha podido ser demostrado en *Listeria monocytogenes* (Davies *et al.*, 1996) o en *Streptococcus bovis* (Mantovani & Russell, 2001). Sin embargo, no ocurrió lo mismo en el caso de los antimicrobianos vancomicina y colistimetato de sodio. El elevado valor de CMI de colistimetato de sodio obtenido en las cepas 074 y mutante XVIII puede ser explicado por el efecto protector que ejerce la pared celular frente a este y otros antibióticos de tipo polimixina en bacterias Gram-positivas en relación a bacterias Gram-negativas. Además, junto a la incorporación de residuos de D-alanina a los ácidos teicoicos y lipoteicoicos existen otros procesos que pueden intervenir en la determinación de la carga neta de la superficie celular bacteriana y, con ello, en la resistencia de las bacterias a los antimicrobianos catiónicos. Así, existen procesos como la deacetilación de los residuos de hexosamina en el peptidoglicano de *Streptococcus pneumoniae* (Vollmer & Tomasz, 2000) y la modificación de los lípidos aniónicos de membrana mediante la incorporación de L-lisina en *S. aureus* (Peschel *et al.*, 2001) que también contribuyen a aumentar el número de cargas positivas en la pared bacteriana.

La cuantificación mediante HPLC de la D-alanina liberada por células de ambas cepas tratadas con una hidrólisis alcalina suave indicó que el mutante XVIII sufre un déficit del 35% en la cantidad presente del aminoácido en relación a la cepa 074. Así, en la cepa mutante XVIII no existe una ausencia

total de D-alanilación como ha sido descrita en mutantes *dltA* de otras bacterias (Kovacs *et al.*, 2006) por lo que quizás en *L. garvieae* existan mecanismos adicionales a los del operón *dlt* para incorporar D-alanina a los ácidos teicoicos y lipoteicoicos de la pared celular. Este resultado podría también explicar por qué no existen diferencias significativas entre la cepa 074 y el mutante XVIII de *L. garvieae* en algunos de los ensayos realizados.

La observación de las células de las cepas 074 y mutante XVIII de *L. garvieae* mediante microscopía electrónica de transmisión no reflejó la existencia de diferencias morfológicas relevantes entre ellas ya que, pese a haberse observado ciertas irregularidades en la morfología de algunas células de la cepa mutante, no se pudo detectar la presencia de este fenómeno en todas las células de la población. Varios estudios en microorganismos Gram-positivos han puesto de manifiesto que mutaciones en uno o varios de los genes *dlt* provocan alteraciones morfológicas evidentes como perforaciones en la envuelta celular y defectos en la división (Palumbo *et al.*, 2006), pérdida de matriz extracelular (Boyd *et al.*, 2000) o aumento de la longitud celular (Perea Vélez *et al.*, 2007). Sin embargo, existen trabajos sobre mutantes en estos genes de otras bacterias Gram-positivas en los que no se han observado alteraciones morfológicas (Fabretti *et al.*, 2006; Fittipaldi *et al.*, 2008; Kovacs *et al.*, 2006).

En definitiva podemos concluir que, pese a que las alteraciones en la expresión del operón *dlt* conllevan a menudo consecuencias muy relevantes en los microorganismos, no parecen existir efectos fenotípicos que se repitan invariablemente en los mutantes de las distintas especies bacterianas estudiadas.

A pesar de no haberse registrado modificaciones fisiológicas o morfológicas relevantes debidas a la inactivación del gen *dltA* de *L. garvieae*, los experimentos realizados con trucha arcoíris permitieron evaluar el papel específico de la D-alanilación de los ácidos teicoicos y lipoteicoicos de la pared celular en la virulencia de esta bacteria. El valor obtenido de índice de competencia *in vitro* indica que la mutación en el gen *dltA* de *L. garvieae* implica defectos en el crecimiento de la cepa mutante en relación a la cepa 074 bajo estas condiciones. Resulta especialmente interesante el bajo valor de índice de competencia *in vivo* ya que revela que la cepa mutante XVIII de *L. garvieae* presenta dificultades importantes para crecer en la trucha arcoíris en relación a la cepa 074. Tres días después de inyectar las cepas 074 y mutante XVIII de *L. garvieae* en trucha arcoíris se obtuvo un valor de DL_{50} para la cepa mutante tres órdenes mayor que el obtenido para la cepa 074. Sin embargo al finalizar el experimento, el séptimo día, dejaron de apreciarse estas diferencias. Estos datos apuntan a que la interrupción del gen *dltA* de *L. garvieae* no conlleva una atenuación en virulencia sino un retraso significativo en la aparición del proceso patológico. Podría aventurarse que esta se deba a una mayor susceptibilidad de la cepa mutante a los antibióticos peptídicos de tipo catelicidina producidos en trucha arcoíris y salmón atlántico (*Salmo salar*) y relacionados con los

mecanismos de inmunidad innata del pez (Chang *et al.*, 2006). Asimismo, mutaciones en los genes *dlt* de diferentes patógenos Gram-positivos han sido relacionadas con un aumento en la susceptibilidad de las bacterias a la muerte mediada por macrófagos y/o neutrófilos (Abachin *et al.*, 2002; Chan *et al.*, 2007; Kristian *et al.*, 2005; Poyart *et al.*, 2003; Weidenmaier *et al.*, 2005), una disminución en la capacidad de formación de biofilm (Gross *et al.*, 2001) y de expresión de ciertos factores de virulencia (Cox *et al.*, 2009) o en la adherencia (Abachin *et al.*, 2002; Kristian *et al.*, 2005). Además, se ha demostrado mediante ensayos de infección *in vivo* que la D-alanilación de los ácidos teicoicos y lipoteicoicos de la pared celular contribuye a la virulencia de varias especies de bacterias Gram-positivas (Abachin *et al.*, 2002; Abi Khattar *et al.*, 2009; Collins *et al.*, 2002; Fittipaldi *et al.*, 2008; Poyart *et al.*, 2003; Weidenmaier *et al.*, 2005). Por tanto, es posible que la incorporación de D-alanina a los ácidos teicoicos y lipoteicoicos de la pared celular de *L. garvieae* esté involucrada en la virulencia de la bacteria mediante una acción combinada, interfiriendo con los mecanismos de inmunidad innata del hospedador y facilitando la penetración de la bacteria a través de las barreras de este.

En resumen, puede concluirse que la mutación en el gen *dltA* de *L. garvieae* no conlleva una alteración drástica en la fisiología ni en la morfología de la bacteria aunque este gen sí parece ser determinante para su crecimiento en el hospedador. Por ello, sería de gran interés estudiar con más detalle el papel de esta agrupación génica en el establecimiento y colonización de *L. garvieae* en la trucha arcoíris.

5.2. Diversidad genética intraespecífica de *L. garvieae*

L. garvieae ha sido aislado en muestras naturales procedentes de una amplia variedad de animales y ambientes. Por ello, la especificidad de hospedador de esta bacteria ha sido estudiada en diversas ocasiones a través de ensayos de infección *in vivo* en los que se han empleado diferentes animales como modelos para la infección. En este trabajo se propuso como objetivo estudiar la patogenicidad de las cepas 074 y HF de *L. garvieae*, aisladas de un brote de lactococosis en trucha arcoíris y de un hombre afectado de un proceso de endocarditis provocado por la bacteria, respectivamente, empleando trucha arcoíris y ratón como modelos animales para la infección.

El valor de DL_{50} obtenido para la cepa 074 de *L. garvieae* en los experimentos realizados con trucha arcoíris se ajusta a lo esperado ya que se trata de una cepa virulenta aislada de un brote de lactococosis. Por el contrario, no fue posible determinar un valor de DL_{50} para la cepa HF en trucha arcoíris ya que la mortalidad de los animales registrada a lo largo del experimento no fue relevante. La ausencia de virulencia en trucha arcoíris de cepas de *L. garvieae* procedentes de otros animales y de ambiente terrestre

ha sido descrita de forma previa a este trabajo por Kawanishi *et al.* (2006b) y Kawanishi *et al.* (2007). Estos autores sugirieron que los mecanismos de virulencia de la bacteria podrían ser diferentes entre las cepas aisladas de peces y las cepas aisladas de otros ambientes, existiendo una especificidad cepa-hospedador en cuanto a la capacidad de producir un proceso patológico. Dado que no ha podido ser demostrado que la cepa HF de *L. garvieae* sea virulenta en trucha arcoíris, nuestros resultados concuerdan con la hipótesis propuesta por dichos autores.

Los ensayos de patogenicidad con las cepas 074 y HF de *L. garvieae* se realizaron también empleando ratones Swiss como modelo animal para la infección. Los resultados fueron concluyentes y permitieron establecer que la cepa HF es avirulenta para ratón. Sin embargo, la dosis de 10^9 ufc de la cepa 074 ocasionó signos clínicos característicos de infección, un conjunto de alteraciones en tejidos y órganos que confirman que la cepa había dado lugar a un proceso infeccioso así como la muerte de los animales. Es importante destacar que la muerte de los ratones no fue consecuencia de una hiperactivación de los mecanismos de defensa del hospedador al interactuar con antígenos de superficie específicos de la cepa 074 puesto que los animales inyectados con el mismo número de células de esta cepa inactivadas con formalina no presentaron ningún signo clínico. Asimismo, se debe señalar que hasta la fecha no ha sido descrito el hecho de que una cepa de *L. garvieae* sea capaz de ocasionar mortalidad en ratones. Esto cuestiona la hipótesis planteada por Kawanishi *et al.* (2006b), Kawanishi *et al.* (2007) en cuanto a la especificidad de hospedador. Por ello, es aventurado afirmar que los mecanismos de patogenicidad de la bacteria difieren entre cepas aisladas de peces y cepas aisladas de muestras naturales de diferente origen. En consecuencia, la existencia de una relación específica cepa-hospedador en cuanto a patogenicidad queda en entredicho. Probablemente sea la presencia de determinantes génicos específicos lo que posibilite que una cepa de *L. garvieae* desarrolle un proceso patológico en un hospedador concreto. De hecho, que la bacteria posea un rango de hospedador más bien amplio concuerda con la relevancia que ha adquirido como posible patógeno zoonótico debido al aumento en el número de casos clínicos descritos en los últimos años.

La aplicación de la técnica de SSH a la identificación de diferencias génicas entre las cepas HF y 074 permitió la identificación de un total de 26 y 13 ORFs específicos, respectivamente. El análisis de las homologías encontradas entre las secuencias de aminoácidos deducidas y las bases de datos consultadas permitió establecer, con base en el papel funcional de las proteínas, tres grupos diferentes:

Grupo 1

- **Proteínas con dominios de unión a factores del hospedador:** la proteína deducida a partir del fragmento SSHI.2 presenta un dominio MucBP. Este tipo de dominios se encuentran ampliamente distribuidos en las bacterias lácticas y se consideran implicados en la adherencia de estas al mucus del intestino así como en las interacciones microorganismo-hospedador (Boekhorst *et al.*, 2006). La adhesión representa un factor fundamental en los estadios iniciales de las infecciones provocadas por muchas bacterias patógenas por lo que esta proteína podría ejercer un papel importante en la colonización de los tejidos del hospedador por *L. garvieae*. Esta proteína está presente en la cepa HF, aislada de humano, pero ausente en todas las cepas aisladas de trucha arcoíris incluidas en el estudio, lo que podría explicarse debido a diferencias en la composición de las mucosas gastrointestinales en ambos hospedadores y a la necesidad, por tanto, de proteínas específicas de unión a los tejidos en cada caso. La secuencia SSHI.12 codifica una proteína homóloga a un polipéptido presente en la superficie de *L. monocytogenes*. Posee además, un dominio proteico característico de unión al colágeno (Deivanayagam *et al.*, 2000). La capacidad de las bacterias para unirse al colágeno o a otros componentes de la matriz extracelular se considera un factor importante en bacterias patógenas ya que permite la adherencia del microorganismo a los tejidos del hospedador y facilita de este modo el progreso de la infección (Foster & Hook, 1998; Speziale *et al.*, 1986). Por ello, esta proteína podría ejercer un papel relevante y específico en la infección provocada por esta cepa en el hombre. Sin embargo, la amplia distribución observada del gen que la codifica en las cepas analizadas de *L. garvieae* no parece apoyar esta posibilidad.

- **Proteínas relacionadas con la modificación y segregación del ADN:** el fragmento SSHI.14 codifica una proteína homóloga a otra de *L. lactis* subsp. *cremoris* SK11 de segregación del ADN de tipo FtsK/SpoIIIE que posee un dominio ATPasa. Se ha descrito que los genes ortólogos de *ftsK/spoIIIE* están involucrados en la conjugación bacteriana y relacionados con un posible sistema de secreción en bacterias Gram-positivas del que forman parte las proteínas con dominios ESAT-6 y Yuka (Llosa *et al.*, 2002; Parsons *et al.*, 2007). Las proteínas que presentan estas dominios se consideran importantes en la virulencia de bacterias patógenas y en la adquisición de inmunidad protectora en el hospedador (Pallen, 2002). Este fragmento demostró estar presente de forma única en la cepa HF por lo que podría ejercer un papel relevante en la capacidad de *L. garvieae* de producir un proceso patológico en el hombre. La proteína deducida a partir de la secuencia SSHI.55 presenta un dominio conservado SbcD de tipo exonucleasa involucrado en la replicación, recombinación y reparación del ADN. Este dominio ha sido también relacionado con la represión de la formación de cápsula de tipo 5 como parte de la respuesta SOS en *S. aureus* (Chen *et al.*, 2007). Este fragmento se encuentra ampliamente distribuido en las cepas de *L. garvieae* estudiadas con la excepción de las cepas italianas aisladas de trucha arcoíris y las cepas japonesas

aisladas de medregal del Japón (*Seriola quinqueradiata*) pudiendo constituir en las primeras un mecanismo de respuesta a condiciones ambientales de estrés.

- **Proteínas implicadas en la restricción y modificación del ADN:** el producto de la traducción de la secuencia SSHI.21 es homólogo a una proteína del sistema de restricción/modificación del ADN LlaBIII identificada en un plásmido de la cepa *L. lactis* subsp. *cremoris* W56 (Kong *et al.*, 2001). Esta proteína está relacionada con la resistencia de la bacteria frente a infecciones fágicas (Kong & Josephsen, 2002), característica común en las bacterias lácticas. La presencia de este gen de forma exclusiva en la cepa HF podría estar relacionada con un escaso número de secuencias fágicas integradas en el cromosoma de esta cepa. Esta hipótesis vendría apoyada a su vez por el bajo número de las mismas que se obtuvo en el experimento SSHI en relación al experimento SSHII.

- **Proteínas relacionadas con la resistencia a antimicrobianos:** la proteína deducida a partir del fragmento SSHI.44 muestra una elevada homología con la denominada CAJog686.1, presente en *L. garvieae* e implicada en conferir a la bacteria resistencia a tetraciclina (Huys *et al.*, 2006). Dicha resistencia se puso de manifiesto en la cepa HF mediante los ensayos de susceptibilidad a tetraciclina que adjudicaron a las cepas 074 y HF unos valores de CMI de 2 µg/ml y 128 µg/ml, respectivamente. La presencia de la secuencia SSHI.44 se determinó únicamente en la cepa HF. El hecho de que esta secuencia esté ausente en el genoma de todas las cepas de *L. garvieae* aisladas de peces incluidas en el estudio cuestiona la teoría de que el amplio uso de la tetraciclina en las piscifactorías como quimioterápico para el tratamiento de determinados procesos infecciosos ha provocado el aumento de bacterias portadoras de genes de resistencia a tetraciclina (Kim *et al.*, 2004; Nonaka *et al.*, 2007). No obstante, hasta la fecha se han descrito hasta 41 genes diferentes de resistencia a la tetraciclina (Thaker *et al.*, 2010) por lo que sería necesario realizar un estudio más extenso en la colección de cepas analizadas, tanto de susceptibilidad al antibiótico como de presencia/ausencia de estos otros genes que confieren resistencia.

- **Proteínas de membrana y superficie:** la secuencia SSHI.23.a codifica una proteína homóloga a otra de *L. lactis* subsp. *cremoris* presente en la superficie celular y de función desconocida. Esta secuencia está solamente presente en la cepa HF. Al formar parte de las proteínas de superficie de la bacteria puede ser un factor relevante en la interacción con las células del hospedador por lo que resultaría interesante profundizar en su estudio. Por su parte, el producto de la traducción de la ORF SSHII.43.b es homólogo a una proteína integral de membrana de *A. laidlawii* a la que se le atribuyen siete hélices transmembrana y está presente en numerosos organismos unicelulares.

- **Proteínas involucradas en el transporte:** el fragmento SSHI.20.a codifica una proteína homóloga a otra de *L. lactis* subsp. *lactis* que posee un dominio característico de ATPasas de tipo P transportadoras de metales pesados como cobre y cadmio. Este tipo de proteínas forman parte de los mecanismos específicos de resistencia a estos metales, que son tóxicos para la bacteria. Además, también

han sido relacionadas con la virulencia de diversos microorganismos (Chan *et al.*, 2010; Yatime *et al.*, 2009). El producto de la traducción de la secuencia SSHI.34.a presenta un nivel de homología del 100% con la proteína CorA perteneciente a la familia de transportadores de iones metálicos MIT, considerada como la principal responsable de los sistemas de adquisición de Mg^{2+} en bacterias y arqueas (Niegowski & Eshaghi, 2007). Se ha demostrado, además, que la proteína CorA ejerce un papel decisivo en la expresión de numerosas rutas metabólicas así como en la virulencia de *Salmonella enterica* serovar Typhimurium (Papp-Wallace & Maguire, 2008). La proteína deducida a partir del fragmento SSHI.59 es homóloga a otra de *Enterococcus faecium* perteneciente al sistema fosfotransferasa de transporte de azúcares (PTS). Este controla no solo la fosforilación de azúcares sino también una amplia variedad de procesos metabólicos así como la expresión de diversos genes (Saier & Reizer, 1994). De hecho, se ha descrito una relación entre este sistema y la expresión de la respuesta a choque térmico por frío en *L. casei* (Monedero *et al.*, 2007). También ha sido vinculado con varias proteínas relacionadas con la virulencia de diferentes especies de bacterias patógenas (Poncet *et al.*, 2009). Es interesante destacar que esta secuencia es una de las más ampliamente distribuidas en el genoma de las cepas de *L. garvieae* analizadas.

- **Proteínas relacionadas con procesos biosintéticos:** el fragmento SSHI.5 presentó homología con una transferasa EpsJ de tipo glicosil/glicerofosfato de *L. lactis* subsp. *cremoris* involucrada en la biosíntesis de los ácidos teicoicos (Swoboda *et al.*, 2010). Sorprendentemente, la secuencia de nucleótidos que codifica esta proteína no está presente en todas las cepas de *L. garvieae* analizadas sino que se solo se encontró en las cepas aisladas de humano, leche cruda y queso. Por tanto, es posible que el proceso de síntesis y modificación de los ácidos teicoicos de la pared celular de la bacteria presente algunas diferencias entre cepas aisladas de diferentes orígenes.

- **Proteínas reguladoras de la transcripción:** la secuencia SSHI.25 codifica una proteína homóloga a otra descrita como un posible regulador de la transcripción de la cepa *Streptococcus mutans* NN2025. Esta adscripción se fundamenta, además, en la presencia de un dominio conservado característico de los reguladores de la transcripción de genes implicados en el transporte de compuestos tóxicos pertenecientes a la superfamilia MerR. Bajo condiciones de estrés estos sistemas de transporte se encargan de expulsar al exterior celular determinadas sustancias tóxicas y antibióticos a modo de estrategia de supervivencia en diversas especies de bacterias patógenas (Grkovic *et al.*, 2002; Martínez & Baquero, 2002).

- **Proteínas implicadas en procesos de conjugación:** el producto de la traducción del fragmento SSHI.15 presenta homología con una proteína de *L. lactis* subsp. *lactis* relacionada con la transferencia de material genético mediante conjugación. La conjugación en bacterias se considera un componente relevante de los mecanismos de transferencia génica horizontal (Zechner *et al.*, 2000) y estos, a su vez, se

consideran la principal causa de la adquisición de genes que codifican sistemas de resistencia a antibióticos y factores de virulencia en bacterias.

- **Secuencias fágicas:** en varias ocasiones se ha demostrado la existencia en bacterias de factores asociados con la patogenicidad codificados por secuencias de origen fágico, probablemente consecuencia de un proceso de conversión fágica (Boyd & Brussow, 2002). Además, la presencia de secuencias fágicas en los genomas bacterianos se encuentra a menudo asociada con la variabilidad genética intraespecífica (Hueck, 1998). Se identificaron una y seis secuencias específicas de las cepas HF y 074 de *L. garvieae*, respectivamente, que presentaron homologías con diversas proteínas fágicas. Así, el producto deducido a partir del fragmento SSH1.1 es homólogo a una proteína que contiene un dominio de origen fágico de tipo lisozima. Este dominio está presente de forma frecuente en enzimas responsables de hidrolizar polisacáridos unidos por enlaces beta 1-4, como las denominadas transglicosilasas líticas solubles. Varios miembros de esta familia de proteínas han sido además propuestos como factores asociados con la virulencia de diversas bacterias patógenas de plantas y animales (Mushegian *et al.*, 1996). Las seis secuencias de posible origen fágico específicas de la cepa 074 están presentes en las cepas de *L. garvieae* italianas y en la cepa española A1201, aisladas de trucha arcoíris. Esta amplia presencia sugería que estas cepas podrían portar un profago del que estas secuencias formarían parte. Sin embargo, los experimentos de inducción con el agente mutagénico mitomicina C parecen descartar esta posibilidad puesto que no se observó inducción de ningún fago lisogénico. Esto puede deberse a que estas secuencias formen parte de un fago defectivo sin capacidad para llevar a cabo el ciclo lítico o bien a no haber seleccionado para el ensayo las cepas adecuadas como posibles hospedadoras.

Grupo 2 y Grupo 3

Los productos deducidos de 18 de los 39 ORFs seleccionadas en los experimentos de SSH son homólogos a proteínas teóricas carentes de dominios definidos o bien no presentaron homologías significativas con las proteínas depositadas en las bases de datos consultadas. El estudio de este tipo de genes resulta por lo general muy difícil ya que no se dispone de información alguna sobre ellos. No obstante, la caracterización de proteínas teóricas sin función conocida puede permitir la identificación de factores determinantes en los procesos infecciosos causados por bacterias patógenas (Hernández *et al.*, 2009). Por ello, la realización de estudios de caracterización de estas proteínas y de su papel funcional en *L. garvieae* sería de vital importancia para aumentar el conocimiento sobre la biología y los mecanismos relacionados con la virulencia de esta bacteria.

Mediante amplificación por PCR se determinó la presencia o ausencia de 12 y 13 de los fragmentos específicos de las cepas HF y 074, respectivamente, en 25 cepas de *L. garvieae* aisladas de trucha arcoíris, trucha de arroyo (*Salvelinus fontinalis*), medregal del Japón, leche cruda, queso y procesos de mastitis bovina. Ninguna de los 12 ORFs específicas de la cepa HF está presente en el genoma de las cepas italianas aisladas de trucha arcoíris. Este perfil común indica, además de un diferencial, una alta homogeneidad genética entre ellas al menos en lo que a la ausencia de los fragmentos génicos seleccionados se refiere. Por otra parte, todas las cepas españolas de *L. garvieae* aisladas de trucha arcoíris presentan los fragmentos génicos SSHI.9, SSHI.12, SSHI.55 y SSHI.59 con la excepción de la cepa A1201 cuyo genoma no contiene el fragmento SSHI.59. Esto indica que las cepas españolas aisladas de trucha arcoíris tienen, al igual que las cepas italianas, un perfil génico común en relación a la presencia/ausencia de los genes específicos de la cepa HF. La presencia en las cepas españolas de *L. garvieae* aisladas de trucha arcoíris de estas cuatro secuencias asociadas sugirió la posibilidad de que todas ellas estuviesen incluidas en un elemento genético móvil de tipo plasmídico. La extracción de un plásmido de aproximadamente 45 Kb hasta ahora no descrito en la cepa HF apoyaba esta eventualidad, que finalmente se descartó tras cuatro hibridaciones tipo Southern Blot que indican claramente que estos fragmentos se localizan en el cromosoma. El resto de cepas de la colección muestran un perfil génico heterogéneo. Así, los fragmentos SSHI.2, SSHI.5, SSHI.9, SSHI.12, SSHI.49, SSHI.55, SSHI.58 y SSHI.59 se amplificaron con éxito a partir del ADN de varias de ellas pero no se pudo definir un patrón común. Merece la pena destacar que las secuencias SSHI.14, SSHI.21, SSHI.23a y SSHI.44 están presentes únicamente en el genoma de la cepa HF. La búsqueda de estas secuencias en el genoma de más aislados clínicos de *L. garvieae* podría determinar si están de algún modo relacionadas con el proceso infeccioso provocado por la bacteria en el hombre y si pueden ser de utilidad como marcadores génicos específicos de este tipo de cepas.

Los 13 ORFs específicos de la cepa 074 están presentes en el genoma de todas las cepas italianas aisladas de trucha arcoíris con la excepción del fragmento SSHII.56 que no se encuentra en las cepas UNIUD020 y UNIUD028. Estos resultados confirman la estrecha relación y la elevada similitud en el contenido génico que existe entre estas cepas, lo que hace pensar que todas ellas pueden haber derivado de un único ancestro común. La cepa española A1201 aislada de trucha arcoíris también contiene estas secuencias en su genoma, hecho que la relaciona con las cepas italianas. La mayoría de estos fragmentos no están presentes en el genoma del resto de cepas involucradas en el estudio por lo que no pudo definirse un patrón común. Las secuencias SSHII.36 y SSHII.44 son las que están presentes en un mayor número de cepas y, sin embargo, es difícil extraer conclusiones sobre su posible función ya que codifican una proteína teórica y una proteína de función desconocida, respectivamente.

Parece pues existir una elevada diversidad intraespecífica en *L. garvieae* que afecta principalmente a las cepas aisladas de diferentes hospedadores ya que sólo fue posible observar un perfil

génico común en el caso de las cepas aisladas de trucha arcoíris procedentes de Italia y de España. Prueba de esta diversidad es que ninguno de los fragmentos génicos identificados está presente en la totalidad de la colección de cepas analizada y, más concretamente, que algunos de los fragmentos específicos de la cepa HF no están en ninguna otra cepa.

5.3. Secuenciación y análisis del genoma de la cepa *L. garvieae* 074

El ensamblado de las secuencias obtenidas mediante la pirosecuenciación del genoma completo de la cepa 074 de *L. garvieae* condujo a la obtención de 25 “contigs” con un tamaño conjunto de 2’17 Mb y a la identificación de un total de 2.101 ORFs. Esto puso de manifiesto que, pese a las semejanzas existentes entre ambas especies, el tamaño del genoma de *L. garvieae* es inferior al de los genomas secuenciados de las subespecies pertenecientes a su pariente filogenéticamente más cercano, *L. lactis*. El análisis de los productos proteicos deducidos a partir de estos ORFs en relación a los de *L. lactis* subsp. *lactis* IL1403 permitió establecer que el 18’5% del genoma de *L. garvieae* es específico de la especie mientras que el 81’5% restante podría constituir el “genoma núcleo” del género *Lactococcus*. Parece lógico, pues, pensar que la búsqueda de proteínas asociadas con virulencia ha de centrarse en este grupo de proteínas específicas. Sin embargo, más de la mitad de los productos proteicos son homólogos a proteínas teóricas lo que podría indicar que en *L. garvieae* no exista un número elevado de factores clásicos, ya definidos, asociados con patogenicidad. Así, estas proteínas necesitan ser estudiadas con mayor profundidad para determinar su función e implicación exactas en la virulencia de la bacteria.

La transferencia horizontal de genes es un evento determinante en la generación de diversidad genética en un microorganismo. Así, un genoma bacteriano puede adquirir mediante este proceso elementos de inserción o elementos transponibles, proteínas de origen fágico, proteínas relacionadas con patogenicidad, proteínas de resistencia a antibióticos, o varios estos elementos en una misma isla genómica (Guzmán *et al.*, 2008). La identificación de islas genómicas en bacterias patógenas es, pues, un hecho relevante debido a que frecuentemente codifican proteínas involucradas en funciones específicas que confieren al microorganismo un elevado potencial de adaptación a diferentes nichos ecológicos en un periodo muy breve de tiempo a nivel evolutivo (Langille *et al.*, 2008). El estudio del contenido del genoma de la cepa 074 de *L. garvieae* mostró una fuente notable de variabilidad genética al identificarse varios de los elementos referidos y seis islas genómicas que incluyen diversas proteínas hipotéticas, metabólicas y de origen fágico. Además, y de forma interesante, en una de estas islas se encuentra el gen EF450032 que codifica la proteína de función desconocida ABO37808 y cuya interrupción ocasiona que la bacteria tenga un crecimiento limitado *in vivo* en trucha arcoíris (Menéndez *et al.*, 2007). El papel concreto de estas islas

genómicas en la biología de la bacteria así como su presencia diferencial a nivel de especie y de género ha de ser determinado en *L. garvieae*.

La teoría propuesta sobre la existencia de al menos una “zona caliente” de inserción en el cromosoma de la bacteria donde el transposón Tn₉₁₇ se integre con una frecuencia mayor (Menéndez, 2007) se confirmó al observar que más de la mitad de los mutantes obtenidos mediante STM están localizados en dos regiones cromosómicas. De modo similar, se comprobó que un gran número de las secuencias fágicas presentes en las cepas italianas y la española A1201 aisladas de trucha arcoíris de acuerdo a los resultados del experimento SSHII, están ubicadas en sólo tres zonas del cromosoma. Estas zonas se caracterizan por codificar un elevado número de proteínas de origen viral y podrían haber derivado de un mismo proceso de infección fágica, hecho que relacionaría a estas cepas nuevamente entre sí de forma evolutiva.

Los elementos genéticos CRISPRs son secuencias repetidas idénticas o casi idénticas separadas por secuencias espaciadoras diferentes (Sorek *et al.*, 2008). Las repeticiones CRISPRs han sido identificadas en aproximadamente un 40% y un 90% de genomas de Bacterias y Arqueas, respectivamente (Grissa *et al.*, 2007). En un principio se pensó que las repeticiones CRISPRs carecían de una función concreta. Sin embargo, recientemente se ha demostrado que estos elementos y los genes CAS asociados a ellos pueden proteger a las bacterias frente a la integración de secuencias de origen fágico en su genoma, considerándose por ello una especie de sistema inmune en procariontes (Terns & Terns, 2011). Por tanto, las cinco probables repeticiones CRISPRs identificadas en el genoma de la cepa *L. garvieae* 074 pueden representar un sistema de protección de la bacteria frente a infecciones por fagos.

El análisis del genoma también ha permitido identificar secuencias que codifican proteínas con **potencial implicación en la virulencia** puesto que han sido reconocidas como tal en otras especies de bacterias patógenas:

- **Proteínas implicadas en la síntesis de la cápsula:** un total de 20 loci homólogos a genes implicados en la síntesis de la cápsula bacteriana fueron identificados, entre los que destacan los genes *rmlACBD* y *rgpABCDGF* así como varias glicosiltransferasas. La cepa *L. garvieae* 074 había sido descrita como capsulada de forma previa a este trabajo, característica a la que probablemente se deban su elevada virulencia y su bajo valor de DL₅₀ ya que se considera un factor determinante en la virulencia de bacterias patógenas (Roberts, 1996). La elevada virulencia de cepas capsuladas ha sido, además, puesta de manifiesto en *L. garvieae* en más de una ocasión (Barnes *et al.*, 2002; Kang *et al.*, 2004; Kawanishi *et al.*, 2007; Ooyama *et al.*, 2002). Sin embargo, actualmente no se conoce la composición exacta de la cápsula de esta especie bacteriana. Con base en los genes identificados en este trabajo proponemos que la

composición de la cápsula de *L. garvieae* incluiría, además de diversas glicoproteínas, polisacáridos capsulares formados por moléculas de ramnosa y glucosa (Rhamnose Glucose Polysaccharides, RGP).

- **Resistencia a compuestos tóxicos:** cuarenta y cuatro genes que codifican posibles proteínas de resistencia a diversos fármacos y compuestos tóxicos fueron identificados. Siete de estas proteínas deducidas presentan homologías con proteínas de la superfamilia β -lactamasa. Estas proteínas proporcionan resistencia a los antibióticos β -lactámicos y son producidas de forma común por Enterobacterias y bacterias Gram-positivas (Llarrull *et al.*, 2010). Por otra parte, los productos deducidos de 17 genes son homólogos a proteínas reductoras de compuestos derivados del arsénico y proteínas reguladoras de su transcripción. Estos polipéptidos son responsables de la resistencia de diversas especies bacterianas al arsénico (Cervantes *et al.*, 1994) pudiendo ejercer la misma función en *L. garvieae*.

- **Sistemas de adquisición y metabolismo de hierro:** los productos deducidos de 11 genes muestran homología con proteínas relacionadas con la adquisición de hierro. Cuatro de ellos son homólogos a los genes *fhuDBGC* que forman parte de los sistemas de captación de hierro en varias especies bacterianas (Clancy *et al.*, 2006; Jin *et al.*, 2006; Sebulsky *et al.*, 2000). Las proteínas codificadas por estos genes son capaces de unirse a sideróforos de tipo hidroxamato, como el ferricromo, cargados con iones Fe^{+3} y transportarlos al interior de la bacteria (Ratledge & Dover, 2000). Varios genes relacionados con sistemas de transporte de tipo ABC de cationes metálicos divalentes fueron también localizados. Entre ellos destacan los loci *feoAB* que constituyen un sistema de transporte de iones Fe^{+2} hacia el citoplasma de la bacteria (Ratledge & Dover, 2000) y los genes *sitABD* y *mntRH*, responsables de transportar prioritariamente iones manganeso y de forma secundaria iones hierro (Sabri *et al.*, 2008). En *L. garvieae* se ha propuesto la existencia de proteínas quelantes de hierro pero su caracterización no ha sido posible (Schmidtke & Carson, 2003). A la vista de los genes identificados en el presente trabajo, la bacteria podría captar hierro mediante un **mecanismo dependiente de sideróforos** exógenos. Esta es una estrategia muy común en bacterias y debido a la baja disponibilidad de hierro libre en los tejidos y fluidos fisiológicos del hospedador probablemente resulte decisiva en la virulencia de *L. garvieae*. Además, la bacteria dispondría de **sistemas de adquisición de hierro independiente de sideróforos** que posibilitarían el transporte del metal en ambientes ácidos como el que existe en estómago e intestino delgado o anaerobios como el que existe en el colon y en los cuales el hierro está presente de forma predominante como iones Fe^{2+} .

Por otro lado, varios genes cuyos productos proteicos deducidos son homólogos a proteínas involucradas en el metabolismo del hierro fueron identificados. Destacan una proteína de tipo ferroxidasa a la que se ha atribuido la capacidad de adquirir hierro bajo condiciones aerobias en algunas especies bacterianas (Huston *et al.*, 2002) y las proteínas oxidasa de coproporfirinógeno III independiente de oxígeno y ferroquelatasa HemH. Estas proteínas participan en el metabolismo del grupo hemo, lo que

sugiere que *L. garvieae* podría utilizarlas para obtener hierro a partir de proteínas del hospedador como la hemoglobina. Además, se detectaron cinco genes homólogos a los genes *sufBESDC* cuya presencia en bacterias se considera relevante en virulencia ya que preserva la biosíntesis de proteínas con centros Fe-S durante el proceso infeccioso, en el que las bacterias se ven sometidas a condiciones de estrés oxidativo y de limitación de hierro (Fontecave *et al.*, 2005). Así, estos genes podrían contribuir a una eficiente adquisición de hierro en *L. garvieae* al igual que los sistemas de transporte previamente descritos.

- **Proteasas:** los productos deducidos a partir de 13 genes del cromosoma de la cepa *L. garvieae* 074 presentaron similitudes con diversos tipos de proteasas entre las cuales destacan tres metaloproteasas dependientes de zinc y seis proteasas de tipo Clp. La actividad de determinadas proteasas ha sido relacionada con la virulencia de numerosos microorganismos infecciosos (Ingmer & Brondsted, 2009). Las metaloproteasas dependientes de zinc representan un importante factor de virulencia de acción sinérgica entre cuyos efectos se incluyen enterotoxicidad, aumento de la permeabilidad vascular, daño tisular, citotoxicidad y facilitación de la invasividad bacteriana (Miyoshi & Shinoda, 2000). Es interesante destacar que los sistemas proteolíticos Clp se consideran esenciales en la adhesión, los sistemas de secreción de tipo III y la expresión de factores de virulencia extracelulares en diversas especies de bacterias patógenas (Ingmer & Brondsted, 2009). Por tanto, la existencia de estas proteasas en el genoma de *L. garvieae* puede suponer un factor esencial en el desarrollo del proceso patológico del que es responsable.

- **Proteínas relacionadas con estrés:** veintiocho genes cuyos productos proteicos son homólogos a proteínas implicadas en respuesta a estrés, a estrés debido a choque térmico por frío o calor y a estrés debido a pH alcalino fueron identificados. Este tipo de proteínas justificaría la capacidad de *L. garvieae* para colonizar un rango tan amplio de nichos ecológicos y hospedadores así como para sobrevivir a fluctuaciones de la temperatura ambiental en rangos tan dispares como los encontrados en el hombre o en los ecosistemas acuáticos.

- **Hemolisinas:** cinco genes de *L. garvieae* son homólogos a genes que codifican hemolisinas con dominios conservados de tipo CBS. Estas proteínas posibilitarían que la bacteria produzca la lisis de los eritrocitos, leucocitos y plaquetas del hospedador mediante la formación de poros en la membrana (Rowe & Welch, 1994), algo determinante en la septicemia hemorrágica que causa. Además, un hecho interesante fue la identificación de un gen que codifica una proteína con un dominio de unión al colágeno de tipo CnaB y un dominio típico del factor Von Willebrand de tipo A de humanos, responsable de la agregación plaquetaria en los vasos sanguíneos dañados. Esta proteína podría facilitar que la bacteria se adhiera al colágeno y a la matriz subepitelial tras haberse producido un daño vascular, lo que a su vez provocaría la formación de trombos en los vasos sanguíneos del hospedador (Chiu *et al.*, 2005; Wang *et al.*, 2009a).

- **Proteínas de adhesión:** varios genes que codifican proteínas posiblemente involucradas en la adhesión de *L. garvieae* a diferentes factores del hospedador fueron identificados. Concretamente, los productos deducidos de cinco loci son homólogos a proteínas de unión a fibrinógeno o fibronectina y a colágeno, componentes habituales de la matriz extracelular y el plasma de los seres vivos. La capacidad de adhesión a la matriz extracelular ha sido descrita como esencial en la virulencia de diversas bacterias patógenas (Westerlund & Korhonen, 1993) y concretamente la unión a fibrinógeno, debido a la activación plaquetaria que genera, se considera muy importante en los casos de endocarditis infecciosa producidos por bacterias de los géneros *Staphylococcus* y *Streptococcus* (Rivera *et al.*, 2007). La presencia de estas proteínas podría resultar, pues, determinante en la colonización de los tejidos dañados del hospedador por parte de *L. garvieae* así como en el desarrollo de los procesos de endocarditis que puede causar en humanos (Chan *et al.*, 2011).

- **Proteínas de degradación de ácido hialurónico:** se observó que el producto deducido de uno de los genes identificados es homólogo a una hialuronidasa de origen fágico a la que se le atribuye la capacidad de degradar el ácido hialurónico, un componente esencial del tejido conjuntivo. En los estreptococos del grupo A se ha propuesto que esta proteína, mediante la degradación de los tejidos del hospedador, proporciona nutrientes a la bacteria a la vez que permite la difusión de sus productos extracelulares durante el proceso infeccioso (Starr & Engleberg, 2006). Del mismo modo, esta proteína podría representar un factor implicado en la virulencia de *L. garvieae*.

- **Proteínas antigénicas:** cuatro genes presentes en el cromosoma de *L. garvieae* son homólogos a otros que codifican antígenos secretados de tipo PcsB/GbpB/SagA y un antígeno de reacción cruzada con miosina. Estas proteínas han sido descritas en diferentes especies de bacterias Gram-positivas y se consideran antígenos de elevado poder inmunogénico que confieren a la bacteria protección frente al estrés así como capacidades de supervivencia en sangre, adherencia e internalización (Giefing *et al.*, 2008; Giefing-Kroll *et al.*, 2011; Rosberg-Cody *et al.*, 2011; Volkov *et al.*, 2010). Además, se ha demostrado que los antígenos PcsB confieren inmunidad frente a los procesos de sepsis y neumonía provocados por *S. pneumoniae* proponiéndose su inclusión en la formulación de una nueva vacuna (Giefing *et al.*, 2008). Estos antígenos pueden facilitar mediante una interacción directa entre *L. garvieae* y el hospedador la supervivencia del patógeno y el progreso del proceso infeccioso. Por ello, su papel en virulencia y su capacidad para conferir protección inmunitaria han de ser estudiados en *L. garvieae*.

- **Proteínas relacionadas con ácidos biliares:** los productos deducidos de dos genes son homólogos a una hidrolasa que actúa sobre ácidos biliares conjugados y a una proteína transportadora implicada en el simporte de ácidos biliares de tipo sódico. *L. garvieae* debe resistir, ya sea como microorganismo patógeno o como parte de la microbiota, el efecto nocivo de las sales biliares para lograr infectar y colonizar el tracto gastrointestinal del hospedador (Begley *et al.*, 2005). Este hecho,

posiblemente determinante en la infección, es sin embargo poco conocido en lo que a los mecanismos moleculares que lo propician se refiere.

- **Proteínas con dominios EAL/GGDEF:** tres loci que codifican proteínas con dominios de tipo GGDEF fueron localizados al analizar el cromosoma de *L. garvieae*. Además, los tres tenían genes adyacentes cuyos productos deducidos presentan un dominio de tipo EAL. La asociación de proteínas que presentan estos dos dominios está implicada en la síntesis (GGDEF) y degradación (EAL) de diguanosina monofosfato cíclico. Esta molécula se define como un segundo mensajero involucrado en numerosas actividades celulares en bacterias entre las que se encuentran funciones como la motilidad y la adherencia (Cotter & Stibitz, 2007), que podrían estar relacionadas con la virulencia de *L. garvieae*. Curiosamente, todos estos genes están presentes de forma exclusiva en el cromosoma de esta bacteria y ausentes en el de las especies bacterianas comparadas *L. lactis* subsp. *lactis* IL1403 y *S. pyogenes* SS1-I, lo que los convierte en blanco para su estudio. El hecho de que un mutante de *L. garvieae* en uno de los genes referidos que codifica una proteína con un dominio EAL tenga un crecimiento limitado en trucha arcoíris (Menéndez *et al.*, 2007) apoya la importancia de estos loci en la virulencia de la bacteria.

- **Proteínas de superficie:** cuatro productos proteicos homólogos a proteínas de tipo sortasa fueron identificados. Las sortasas se encargan de anclar las proteínas de superficie en bacterias Gram-positivas a la pared de peptidoglicano a través del procesamiento de su dominio común LPXTG (Clancy *et al.*, 2010). Un mutante de *L. garvieae* en uno de estos genes ha sido descrito como un mutante con crecimiento limitado en la trucha arcoíris como hospedador (Menéndez *et al.*, 2007), por lo que puede estar involucrado en la virulencia de la bacteria. Además, se localizaron cinco posibles proteínas con dominios LPXTG y homólogas a otras de la familia internalina. Esta familia proteica está implicada en la adhesión de *Listeria monocytogenes* al mucus del intestino y en la internalización de la bacteria en las células del hospedador (Bierne *et al.*, 2007; Linden *et al.*, 2008; Sabet *et al.*, 2008). Esta bacteria es capaz de atravesar la barrera intestinal produciendo infecciones de tipo sistémico asociadas a elevadas tasas de mortalidad. Así, sería interesante comprobar si estas proteínas de superficie ejercen un papel similar durante la infección causada por *L. garvieae*.

- **Sistema accesorio de secreción Sec:** se localizaron en el genoma nueve genes que codifican siete proteínas homólogas a las denominadas SecY2, SecA2, Asp1, Asp2, Asp3, GtfA y GtfB, que forman parte del sistema accesorio de secreción Sec en bacterias Gram-positivas (Rigel & Braunstein, 2008); y dos proteínas ricas en residuos de serina con dominios LPXTG. Este sistema es responsable de la secreción de proteínas glicosiladas ricas en residuos de serina que han sido caracterizadas como adhesinas con un papel decisivo en la patogenicidad de diversas especies bacterianas de los géneros *Staphylococcus* y *Streptococcus* (Mistou *et al.*, 2009; van Sorge *et al.*, 2009; Xiong *et al.*, 2008). Así, el sistema accesorio de

secreción Sec podría estar implicado en la adhesión de *L. garvieae* a los tejidos y órganos del hospedador posibilitando el desarrollo de los diferentes procesos patológicos que ocasiona en animales y en humanos.

El conjunto de rutas metabólicas de *L. garvieae* era hasta ahora desconocido. Según las predicciones realizadas la bacteria es capaz de transportar al interior celular un elevado número de azúcares y obtener energía a partir de los mismos. Es de destacar la existencia de un transportador PTS de N-acetilglucosamina, compuesto al que *L. garvieae* podría acceder mediante la degradación del ácido hialurónico del hospedador gracias a la acción de la hialuronidasa que codifica. Los resultados obtenidos atribuyen diversas carencias a la bacteria relativas a la síntesis de determinados aminoácidos y vitaminas. La reducción del tamaño del genoma es una característica común en bacterias patógenas siendo una de sus principales causas el hecho de que estas pueden obtener numerosos metabolitos a partir de los tejidos del hospedador y, por tanto, prescindir de las correspondientes rutas y genes de biosíntesis (Moran, 2002). Esto sugiere que *L. garvieae* utilice estos compuestos del hospedador y como consecuencia de una adaptación haya perdido funcionalmente estas rutas metabólicas, lo que además viene en parte apoyado por el hecho de que alguna de las rutas está incompleta y de otras quedan solamente unos pocos genes. Sin embargo, esto no implica que el metabolismo de *L. garvieae* no incluya funciones metabólicas diferentes a las predichas ya que al disponer de 25 "contigs" y no de la secuencia cromosómica completa es posible, aunque poco probable, que no se haya analizado toda la información génica relativa al metabolismo bacteriano. Por otra parte, el conocimiento obtenido a través de esta predicción bioinformática debe ser confirmado con experimentos *in vitro* que evalúen el perfil enzimático y, en consecuencia, el metabolismo funcional de *L. garvieae*.

Debe ser indicado que de forma simultánea al depósito del presente trabajo se publicaron dos nuevas secuencias genómicas de *L. garvieae* correspondientes a una cepa aislada de un paciente humano que sufrió un proceso septicémico causado por la bacteria (Aguado-Urda *et al.*, 2011a) y a una cepa aislada de trucha arcoíris afectada de lactococosis (Aguado-Urda *et al.*, 2011b).

Los conocimientos sobre la biología de *L. garvieae*, su información genética y los factores relacionados con los procesos patológicos que ocasiona en diferentes hospedadores son escasos. En la presente Tesis Doctoral se ha determinado que la alteración del sistema de incorporación de D-alanina a los ácidos teicoicos y lipoteicoicos de la pared celular en *L. garvieae* afecta al proceso infeccioso puesto que ocasiona un retraso significativo en la aparición del proceso patológico. El papel de este sistema en la virulencia de la bacteria puede estar relacionado con la resistencia a los mecanismos de respuesta inmune no específica del hospedador y con la adhesión a los tejidos del mismo. Sin embargo, este mecanismo no

Discusión

es imprescindible para que se desarrolle la enfermedad lo que indica que la patogenicidad en *L. garvieae* es un proceso en el que la confluencia de varios factores hacen posible la progresión de la infección. Mediante ensayos *in vivo* con dos cepas procedentes de trucha arcoíris (cepa 074) y humano (cepa HF) se ha demostrado que la bacteria es capaz de atravesar la barrera de especie y producir un proceso patológico en ratón y en trucha arcoíris como hospedadores. Además, con base en las diferencias génicas identificadas entre varias cepas de la bacteria se ha puesto de manifiesto una elevada diversidad intraespecífica en *L. garvieae*, especialmente en el caso de cepas procedentes de diferentes hospedadores. Por otra parte, la secuenciación y posterior análisis del genoma de *L. garvieae* ha permitido determinar la presencia de numerosos elementos génicos susceptibles de haber sido adquiridos mediante mecanismos de transferencia horizontal indicando que estos representan un proceso importante en la bacteria y probablemente en su virulencia como en el caso de muchos microorganismos patógenos. Asimismo, se han identificado diversos genes cuyos productos proteicos están posiblemente involucrados en la patogenicidad de *L. garvieae*. Todo ello abre nuevas posibilidades de estudio para un mejor conocimiento de los mecanismos de virulencia de esta bacteria así como para el desarrollo de medidas efectivas de control de la enfermedad que produce.

6. Conclusiones

6. Conclusiones

Las conclusiones extraídas a partir del trabajo desarrollado son:

1. Los genes *dltA*, *dltB*, *dltC* y *dltD* constituyen un operón implicado en el proceso de incorporación de D-alanina a los ácidos teicoicos y lipoteicoicos de la pared celular de *L. garvieae*, lo que determina un aumento del número relativo de cargas positivas.
2. La mutación del gen *dltA* de *L. garvieae* no produce alteraciones drásticas de tipo fisiológico o morfológico pero sí conlleva un retraso significativo en la aparición del proceso patológico en la trucha arcoíris, por lo que este gen está involucrado en el proceso infeccioso.
3. La cepa 074 de *L. garvieae*, aislada de trucha arcoíris con lactococosis, es virulenta también en ratón y produce un proceso patológico que conlleva la muerte en ambos hospedadores. Este hecho indica que la bacteria puede romper la barrera de especie y aumentar así su rango de hospedador. Esto podría explicar el potencial zoonótico que, cada vez más, se atribuye a este microorganismo.
4. La identificación mediante la técnica de SSH de genes específicos de las cepas HF y 074 de *L. garvieae* aisladas de humano y trucha arcoíris, respectivamente, no permitió detectar genes potencialmente relacionados con la patogenicidad de la cepa 074.
5. Los análisis de presencia/ausencia de los genes identificados mediante SSH en una colección de aislados de *L. garvieae* revelan una elevada heterogeneidad genética entre cepas de la bacteria procedentes de diferentes hospedadores. Sin embargo, las cepas aisladas de trucha arcoíris en España parecen poseer un perfil génico común al igual que las aisladas en Italia, lo que podría ser consecuencia de un proceso de evolución clonal en ambas poblaciones.

Conclusiones

6. El genoma de *L. garvieae*, de 2'17 Mb aproximadamente, tiene un tamaño inferior al de los genomas secuenciados de las cepas pertenecientes a su pariente filogenéticamente más cercano *L. lactis*, constituyendo hasta el momento el genoma más pequeño dentro del género *Lactococcus*.
7. El 81'5% de las proteínas deducidas a partir del genoma de *L. garvieae* 074 son homólogas a las de *L. lactis* subsp. *lactis* IL1403 pudiendo el 21'5% restante representar los genes que distinguen a *L. garvieae* dentro del género *Lactococcus*.
8. Un 54% de los genes interrumpidos en los mutantes obtenidos mediante STM en *L. garvieae* se encuentran localizados en dos regiones del genoma, lo que sugiere la existencia en el mismo de al menos dos "zonas calientes" de inserción del transposón Tng17.
9. La detección de seis islas genómicas, varias copias de elementos de inserción y secuencias repetidas, elementos repetidos CRISPRs, elementos transponibles y genes de origen fágico muestran que la adquisición de genes mediante mecanismos de transferencia horizontal ha supuesto un evento frecuente en *L. garvieae*.
10. La identificación en el genoma de *L. garvieae* de numerosos genes relacionados con los mecanismos de patogenicidad en diversas especies bacterianas como, por ejemplo, genes de la cápsula, mecanismos de adquisición de hierro, mecanismos de resistencia a antibióticos, hemolisinas y proteínas de adhesión; abre la posibilidad de caracterizar las bases moleculares de la virulencia de esta bacteria.
11. La predicción realizada de las rutas metabólicas de *L. garvieae* atribuyen a la bacteria carencias enzimáticas en las vías de síntesis de diversos aminoácidos como lisina, alanina, valina, leucina, triptófano e histidina y de vitaminas como tiamina y riboflavina. Esto podría ser consecuencia de una adaptación en la que el patógeno habría perdido las rutas metabólicas de síntesis de estos elementos debido a poder adquirirlos de los tejidos del hospedador.

7. Bibliografía

7. Bibliografía

- Abachin, E., Poyart, C., Pellegrini, E., Milohanic, E., Fiedler, F., Berche, P. & Trieu-Cuot, P. (2002). Formation of D-alanyl-lipoteichoic acid is required for adhesion and virulence of *Listeria monocytogenes*. *Mol Microbiol* **43**, 1-14.
- Abi Khattar, Z., Rejasse, A., Destoumieux-Garzon, D. & other authors (2009). The *dlt* operon of *Bacillus cereus* is required for resistance to cationic antimicrobial peptides and for virulence in insects. *J Bacteriol* **191**, 7063-7073.
- Agnew, W. & Barnes, A. C. (2007). *Streptococcus iniae*: an aquatic pathogen of global veterinary significance and a challenging candidate for reliable vaccination. *Vet Microbiol* **122**, 1-15.
- Aguado-Urda, M., López-Campos, G. H., Fernández-Garayzabal, J. F., Martín-Sánchez, F., Gibello, A., Domínguez, L. & Blanco, M. M. (2010). Analysis of the genome content of *Lactococcus garvieae* by genomic interspecies microarray hybridization. *BMC Microbiol* **10**, 79.
- Aguado-Urda, M., López-Campos, G. H., Blanco, M. M., Fernández-Garayzabal, J. F., Cutuli, M. T., Aspiroz, C., López-Alonso, V. & Gibello, A. (2011a). Genome Sequence of *Lactococcus garvieae* 21881, Isolated in a Case of Human Septicemia. *J Bacteriol* **193**, 4033-4034.
- Aguado-Urda, M., López-Campos, G. H., Gibello, A., Cutuli, M. T., López-Alonso, V., Fernández-Garayzabal, J. F. & Blanco, M. M. (2011b). Genome sequence of *Lactococcus garvieae* 8831, isolated from rainbow trout lactococcosis outbreaks in Spain. *J Bacteriol*.
- Akopyants, N. S., Fradkov, A., Diatchenko, L., Hill, J. E., Siebert, P. D., Lukyanov, S. A., Sverdlov, E. D. & Berg, D. E. (1998). PCR-based subtractive hybridization and differences in gene content among strains of *Helicobacter pylori*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 13108-13113.
- Alegria, A., Alvarez-Martín, P., Sacristán, N., Fernández, E., Delgado, S. & Mayo, B. (2009). Diversity and evolution of the microbial populations during manufacture and ripening of Casín, a traditional Spanish, starter-free cheese made from cow's milk. *Int J Food Microbiol* **136**, 44-51.
- Altinok, I. (2011). Multiplex PCR assay for detection of four major bacterial pathogens causing rainbow trout disease. *Dis Aquat Organ* **93**, 199-206.
- Ammor, S., Yaakoubi, K., Chevallier, I. & Dufour, E. (2004). Identification by fluorescence spectroscopy of lactic acid bacteria isolated from a small-scale facility producing traditional dry sausages. *J Microbiol Methods* **59**, 271-281.
- Aoki, T., Takami, K. & Kitao, T. (1990). Drug resistance in a non-hemolytic *Streptococcus* sp. isolated from yellowtail *Seriola quinqueradiata*. *Dis Aquat Org* **8**, 171-177.
- Aoki, T., Park, C. I., Yamashita, H. & Hirono, I. (2000). Species-specific polymerase chain reaction primers for *Lactococcus garvieae*. *J Fish Dis* **23**, 1-6.

Bibliografia

- Aubin, G., Bémer, P., Guillouzouic, A. & other authors (2011).** First report of a hip prosthetic and joint infection caused by *Lactococcus garvieae* in a woman fishmonger. *J Clin Microbiol*.
- Austin, B. & Austin, D. A. (2007).** *Bacterial Fish Pathogens: Disease of Farmed and Wild Fish*, 4th edn: Godalming: Springer Praxis.
- Aziz, R. K., Bartels, D., Best, A. A. & other authors (2008).** The RAST Server: rapid annotations using subsystems technology. *BMC Genomics* **9**, 75.
- Baeck, G. W., Kim, J. H., Gomez, D. K. & Park, S. C. (2006).** Isolation and characterization of *Streptococcus* sp. from diseased flounder (*Paralichthys olivaceus*) in Jeju Island. *J Vet Sci* **7**, 53-58.
- Baiano, J. C. & Barnes, A. C. (2009).** Towards control of *Streptococcus iniae*. *Emerg Infect Dis* **15**, 1891-1896.
- Balado, M., Osorio, C. R. & Lemos, M. L. (2009).** FvtA is the receptor for the siderophore vancomycin in *Vibrio anguillarum*: utility as a route of entry for vancomycin analogues. *Appl Environ Microbiol* **75**, 2775-2783.
- Barakat, R., Griffiths, M. & Harris, L. (2000).** Isolation and characterization of *Carnobacterium*, *Lactococcus*, and *Enterococcus* spp. from cooked, modified atmosphere packaged, refrigerated, poultry meat. *Int J Food Microbiol* **62**, 83-94.
- Barnes, A. C., Guyot, C., Hansen, B. G., Horn, M. T. & Ellis, A. E. (2002).** Antibody increases phagocytosis and killing of *Lactococcus garvieae* by rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, L.) macrophages. *Fish Shellfish Immunol* **12**, 181-186.
- Barnes, A. C. & Ellis, A. E. (2004).** Role of capsule in serotypic differences and complement fixation by *Lactococcus garvieae*. *Fish Shellfish Immunol* **16**, 207-214.
- Begley, M., Gahan, C. G. & Hill, C. (2005).** The interaction between bacteria and bile. *FEMS Microbiol Rev* **29**, 625-651.
- Bendtsen, J. D., Nielsen, H., von Heijne, G. & Brunak, S. (2004).** Improved prediction of signal peptides: SignalP 3.0. *J Mol Biol* **340**, 783-795.
- Benson, G. (1999).** Tandem repeats finder: a program to analyze DNA sequences. *Nucleic Acids Res* **27**, 573-580.
- Bercovier, H., Ghittino, C. & Eldar, A. (1997).** Immunization with bacterial antigens: infections with streptococci and related organisms. *Dev Biol Stand* **90**, 153-160.
- Bierne, H., Sabet, C., Personnic, N. & Cossart, P. (2007).** Internalins: a complex family of leucine-rich repeat-containing proteins in *Listeria monocytogenes*. *Microbes Infect* **9**, 1156-1166.
- Binnewies, T. T., Motro, Y., Hallin, P. F. & other authors (2006).** Ten years of bacterial genome sequencing: comparative-genomics-based discoveries. *Funct Integr Genomics* **6**, 165-185.
- Boekhorst, J., Helmer, Q., Kleerebezem, M. & Siezen, R. J. (2006).** Comparative analysis of proteins with a mucus-binding domain found exclusively in lactic acid bacteria. *Microbiology* **152**, 273-280.
- Borrero, J., Brede, D. A., Skaugen, M., Diep, D. B., Herranz, C., Nes, I. F., Cintas, L. M. & Hernández, P. E. (2011).** Characterization of garvicin ML, a novel circular bacteriocin produced by *Lactococcus garvieae* DCC43, isolated from mallard ducks (*Anas platyrhynchos*). *Appl Environ Microbiol* **77**, 369-373.
- Boyd, D. A., Cvitkovitch, D. G., Bleiweis, A. S., Kiriukhin, M. Y., Debabov, D. V., Neuhaus, F. C. & Hamilton, I. R. (2000).** Defects in D-alanyl-lipoteichoic acid synthesis in *Streptococcus mutans* results in acid sensitivity. *J Bacteriol* **182**, 6055-6065.
- Boyd, E. F. & Brussow, H. (2002).** Common themes among bacteriophage-encoded virulence factors and diversity among the bacteriophages involved. *Trends Microbiol* **10**, 521-529.

- Brunt, J. & Austin, B. (2005).** Use of a probiotic to control lactococcosis and streptococcosis in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). In *J Fish Dis*, pp. 693-701. England.
- Brunt, J., Newaj-Fyzul, A. & Austin, B. (2007).** The development of probiotics for the control of multiple bacterial diseases of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). *J Fish Dis* **30**, 573-579.
- Cao, M. & Helmann, J. D. (2004).** The *Bacillus subtilis* extracytoplasmic-function sigmaX factor regulates modification of the cell envelope and resistance to cationic antimicrobial peptides. *J Bacteriol* **186**, 1136-1146.
- Carvalho, M. G., Vianni, M. C., Elliott, J. A., Reeves, M., Facklam, R. R. & Teixeira, L. M. (1997).** Molecular analysis of *Lactococcus garvieae* and *Enterococcus gallinarum* isolated from water buffalos with subclinical mastitis. *Adv Exp Med Biol* **418**, 401-404.
- Cervantes, C., Ji, G., Ramirez, J. L. & Silver, S. (1994).** Resistance to arsenic compounds in microorganisms. *FEMS Microbiol Rev* **15**, 355-367.
- Chan, H., Babayan, V., Blyumin, E. & other authors (2010).** The p-type ATPase superfamily. *J Mol Microbiol Biotechnol* **19**, 5-104.
- Chan, J. F., Woo, P. C., Teng, J. L., Lau, S. K., Leung, S. S., Tam, F. C. & Yuen, K. Y. (2011).** Primary infective spondylodiscitis caused by *Lactococcus garvieae* and a review of human *L. garvieae* infections. *Infection*.
- Chan, K. G., Mayer, M., Davis, E. M., Halperin, S. A., Lin, T. J. & Lee, S. F. (2007).** Role of D-alanylation of *Streptococcus gordonii* lipoteichoic acid in innate and adaptive immunity. *Infect Immun* **75**, 3033-3042.
- Chang, C. I., Zhang, Y. A., Zou, J., Nie, P. & Secombes, C. J. (2006).** Two cathelicidin genes are present in both rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and atlantic salmon (*Salmo salar*). *Antimicrob Agents Chemother* **50**, 185-195.
- Chen, L., Yang, J., Yu, J., Yao, Z., Sun, L., Shen, Y. & Jin, Q. (2005).** VFDB: a reference database for bacterial virulence factors. *Nucleic Acids Res* **33**, D325-328.
- Chen, Z., Luong, T. T. & Lee, C. Y. (2007).** The *sbcDC* locus mediates repression of type 5 capsule production as part of the SOS response in *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol* **189**, 7343-7350.
- Chevreux, B. (2005).** MIRA: An Automated Genome and EST Assembler. Tesis Doctoral, The Medical Faculty of Heidelberg: The Ruprecht-Karls-University.
- Chiu, C. H., Tang, P., Chu, C., Hu, S., Bao, Q., Yu, J., Chou, Y. Y., Wang, H. S. & Lee, Y. S. (2005).** The genome sequence of *Salmonella enterica* serovar Choleraesuis, a highly invasive and resistant zoonotic pathogen. *Nucleic Acids Res* **33**, 1690-1698.
- Clancy, A., Loar, J. W., Speziali, C. D., Oberg, M., Heinrichs, D. E. & Rubens, C. E. (2006).** Evidence for siderophore-dependent iron acquisition in group B *Streptococcus*. *Mol Microbiol* **59**, 707-721.
- Clancy, K. W., Melvin, J. A. & McCafferty, D. G. (2010).** Sortase transpeptidases: insights into mechanism, substrate specificity, and inhibition. *Biopolymers* **94**, 385-396.
- Clemans, D. L., Kolenbrander, P. E., Debarov, D. V., Zhang, Q., Lunsford, R. D., Sakone, H., Whittaker, C. J., Heaton, M. P. & Neuhaus, F. C. (1999).** Insertional inactivation of genes responsible for the D-alanylation of lipoteichoic acid in *Streptococcus gordonii* DL1 (Challis) affects intragenetic coaggregations. *Infect Immun* **67**, 2464-2474.
- Clinical Laboratory Standards Institute (2006).** Methods for Broth Dilution Susceptibility Testing of Bacteria Isolated from Aquatic Animal. CLSI, Waune, PA, USA.
- Collins, L. V., Kristian, S. A., Weidenmaier, C., Faigle, M., Van Kessel, K. P., Van Strijp, J. A., Gotz, F., Neumeister, B. & Peschel, A. (2002).** *Staphylococcus aureus* strains lacking D-alanine modifications of teichoic acids are highly susceptible to human neutrophil killing and are virulence attenuated in mice. *J Infect Dis* **186**, 214-219.

Bibliografia

- Collins, M. D., Farrow, J. A., Phillips, B. A. & Kandler, O. (1983). *Streptococcus garvieae* sp. nov. and *Streptococcus plantarum* sp. nov. *J Gen Microbiol* **129**, 3427-3431.
- Costa-Ramos, C., Vale, A., Ludovico, P., Dos Santos, N. M. & Silva, M. T. (2011). The bacterial exotoxin AIP₅₆ induces fish macrophage and neutrophil apoptosis using mechanisms of the extrinsic and intrinsic pathways. *Fish Shellfish Immunol* **30**, 173-181.
- Cotter, P. A. & Stibitz, S. (2007). c-di-GMP-mediated regulation of virulence and biofilm formation. *Curr Opin Microbiol* **10**, 17-23.
- Cox, K. H., Ruiz-Bustos, E., Courtney, H. S. & other authors (2009). Inactivation of DltA modulates virulence factor expression in *Streptococcus pyogenes*. *PLoS One* **4**, e5366.
- Cunningham, M. W. (2000). Pathogenesis of group A streptococcal infections. *Clin Microbiol Rev* **13**, 470-511.
- Dacanay, A., Boyd, J. M., Fast, M. D., Knickle, L. C. & Reith, M. E. (2010). *Aeromonas salmonicida* Type I pilus system contributes to host colonization but not invasion. *Dis Aquat Organ* **88**, 199-206.
- Davies, E. A., Falahee, M. B. & Adams, M. R. (1996). Involvement of the cell envelope of *Listeria monocytogenes* in the acquisition of nisin resistance. *J Appl Bacteriol* **81**, 139-146.
- Davila, E., Zamora, L. M., Pla, M., Carretero, C. & Pares, D. (2006). Identification and antagonistic activity of lactic acid bacteria occurring in porcine blood from industrial slaughterhouses--a preliminary study. *Int J Food Microbiol* **107**, 207-211.
- Deivanayagam, C. C., Rich, R. L., Carson, M., Owens, R. T., Danthuluri, S., Bice, T., Hook, M. & Narayana, S. V. (2000). Novel fold and assembly of the repetitive B region of the *Staphylococcus aureus* collagen-binding surface protein. *Structure* **8**, 67-78.
- Delcher, A. L., Bratke, K. A., Powers, E. C. & Salzberg, S. L. (2007). Identifying bacterial genes and endosymbiont DNA with Glimmer. *Bioinformatics* **23**, 673-679.
- Devriese, L. A., Hommez, J., Laevens, H., Pot, B., Vandamme, P. & Haesebrouck, F. (1999). Identification of aesculin-hydrolyzing streptococci, lactococci, aerococci and enterococci from subclinical intramammary infections in dairy cows. *Vet Microbiol* **70**, 87-94.
- Diatchenko, L., Lau, Y. F., Campbell, A. P. & other authors (1996). Suppression subtractive hybridization: a method for generating differentially regulated or tissue-specific cDNA probes and libraries. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 6025-6030.
- Dobinsky, S., Bartscht, K. & Mack, D. (2002). Influence of Tn₉₁₇ insertion on transcription of the *icaADBC* operon in six biofilm-negative transposon mutants of *Staphylococcus epidermidis*. *Plasmid* **47**, 10-17.
- Doménech, A., Prieta, J., Fernández-Garayzábal, J. F., Collins, M. D., Jones, D. & Domínguez, L. (1993). Phenotypic and phylogenetic evidence for a close relationship between *Lactococcus garvieae* and *Enterococcus seriolicida*. *Microbiología* **9**, 63-68.
- Earhart, C. F. (1996). Uptake and metabolism of iron and molybdenum. In *Escherichia coli and Salmonella: Cellular and Molecular Biology*, pp. 1075-1090. Washington, DC: ASM Press.
- El-Baradei, G., Delacroix-Buchet, A. & Ogier, J. (2007). Biodiversity of bacterial ecosystems in traditional Egyptian Domiati cheese. *Appl Environ Microbiol* **73**, 1248-1255.
- Eldar, A., Ghittino, C., Asanta, L., Bozzetta, E., Gorla, M., Prearo, M. & Bercovier, H. (1996). *Enterococcus seriolicida* is a junior synonym of *Lactococcus garvieae*, a causative agent of septicemia and meningoencephalitis in fish. *Curr Microbiol* **32**, 85-88.

- Eldar, A. & Ghittino, C. (1999). *Lactococcus garvieae* and *Streptococcus iniae* infections in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*: similar, but different diseases. *Dis Aquat Organ* **36**, 227-231.
- Eldar, A., Gorla, M., Ghittino, C., Zlotkin, A. & Bercovier, H. (1999). Biodiversity of *Lactococcus garvieae* strains isolated from fish in Europe, Asia, and Australia. *Appl Environ Microbiol* **65**, 1005-1008.
- Evans, J. J., Pasnik, D. J., Klesius, P. H. & Al-Ablani, S. (2006). First report of *Streptococcus agalactiae* and *Lactococcus garvieae* from a wild bottlenose dolphin (*Tursiops truncatus*). *J Wildl Dis* **42**, 561-569.
- Eyngor, M., Zlotkin, A., Ghittino, C., Prearo, M., Douet, D. G., Chilmonczyk, S. & Eldar, A. (2004). Clonality and diversity of the fish pathogen *Lactococcus garvieae* in Mediterranean countries. *Appl Environ Microbiol* **70**, 5132-5137.
- Eyngor, M., Lublin, A., Shapira, R., Hurvitz, A., Zlotkin, A., Tekoah, Y. & Eldar, A. (2010). A pivotal role for the *Streptococcus iniae* extracellular polysaccharide in triggering proinflammatory cytokines transcription and inducing death in rainbow trout. *FEMS Microbiol Lett* **305**, 109-120.
- Fabretti, F., Theilacker, C., Baldassarri, L., Kaczynski, Z., Kropec, A., Holst, O. & Huebner, J. (2006). Alanine esters of enterococcal lipoteichoic acid play a role in biofilm formation and resistance to antimicrobial peptides. *Infect Immun* **74**, 4164-4171.
- Fernández, L., Méndez, J. & Guijarro, J. A. (2007). Molecular virulence mechanisms of the fish pathogen *Yersinia ruckeri*. *Vet Microbiol* **125**, 1-10.
- Fittipaldi, N., Sekizaki, T., Takamatsu, D. & other authors (2008). D-alanylation of lipoteichoic acid contributes to the virulence of *Streptococcus suis*. *Infect Immun* **76**, 3587-3594.
- Flórez, A. B. & Mayo, B. (2006). Microbial diversity and succession during the manufacture and ripening of traditional, Spanish, blue-veined Cabrales cheese, as determined by PCR-DGGE. *Int J Food Microbiol* **110**, 165-171.
- Fontecave, M., Choudens, S. O., Py, B. & Barras, F. (2005). Mechanisms of iron-sulfur cluster assembly: the SUF machinery. *J Biol Inorg Chem* **10**, 713-721.
- Fortina, M. G., Ricci, G., Foschino, R., Picozzi, C., Dolci, P., Zeppa, G., Cocolin, L. & Manachini, P. L. (2007). Phenotypic typing, technological properties and safety aspects of *Lactococcus garvieae* strains from dairy environments. *J Appl Microbiol* **103**, 445-453.
- Foschino, R., Nucera, D., Volponi, G., Picozzi, C., Ortoffi, M. & Bottero, M. T. (2008). Comparison of *Lactococcus garvieae* strains isolated in northern Italy from dairy products and fishes through molecular typing. *J Appl Microbiol* **105**, 652-662.
- Foster, T. J. & Hook, M. (1998). Surface protein adhesins of *Staphylococcus aureus*. *Trends Microbiol* **6**, 484-488.
- Fouz, B., Toranzo, A. E., Biosca, E. G., Mazoy, R. & Amaro, C. (1994). Role of iron in the pathogenicity of *Vibrio damsela* for fish and mammals. *FEMS Microbiol Lett* **121**, 181-188.
- Fukuda, Y., Maita, M., Satoh, K. & Okamoto, N. (1997a). Influence of dissolved oxygen concentration on the mortality of yellowtail experimentally infected with *Enterococcus seriolicida*. *Fish Pathol* **32**, 129-130.
- Fukuda, Y., Maita, M., Satoh, K., Yamamoto, H., Okamoto, N. & Ikeda, Y. (1997b). Effects of dissolved oxygen concentration on experimental horizontal transmission of induced by artificial infection with *Enterococcus seriolicida* in yellowtail. *Fish Pathol* **32**, 43-49.
- Gálvez, A., Abriouel, H., López, R. L. & Ben Omar, N. (2007). Bacteriocin-based strategies for food biopreservation. *Int J Food Microbiol* **120**, 51-70.
- Garduño, R. A., Moore, A. R., Olivier, G., Lizama, A. L., Garduño, E. & Kay, W. W. (2000). Host cell invasion and intracellular residence by *Aeromonas salmonicida*: role of the S-layer. *Can J Microbiol* **46**, 660-668.

- Garvie, E. I., Farrow, J. A. E. & Phillips, B. A. (1981).** A taxonomic study of some strains of streptococci which grow at 10 C but not at 45 C including *Streptococcus lactis* and *Streptococcus cremoris*. *Zbl Bakteriol Hyg Abt I Orig C2*, 151-165.
- Gasteiger, E., Hoogland, C., Gattiker, A., Duvaud, S., Wilkins, M. R., Appel, R. D. & Bairoch, A. (2005).** Protein Identification and Analysis Tools on the ExPASy Server. In *The Proteomics Protocol Handbooks*. Edited by J. M. Walker: Humana Press.
- Genco, C. A. & Dixon, D. W. (2001).** Emerging strategies in microbial haem capture. *Mol Microbiol* **39**, 1-11.
- Ghittino, C. & Prearo, M. (1992).** Report of streptococcosis in rainbow trout (*O. mykiss*) in Italy: preliminary note. *Boll Soc It Patol Ittica* **8**, 4-11.
- Ghittino, C. & Múzquiz, J. L. (1998).** La estreptococosis de la trucha arco iris en España. Reunión de Piscicultores. Zaragoza. *Rev Aquatic* **2**.
- Giaouris, E., Briandet, R., Meyrand, M., Courtin, P. & Chapot-Chartier, M. P. (2008).** Variations in the degree of D-Alanylation of teichoic acids in *Lactococcus lactis* alter resistance to cationic antimicrobials but have no effect on bacterial surface hydrophobicity and charge. *Appl Environ Microbiol* **74**, 4764-4767.
- Giefing, C., Meinke, A. L., Hanner, M. & other authors (2008).** Discovery of a novel class of highly conserved vaccine antigens using genomic scale antigenic fingerprinting of pneumococcus with human antibodies. *J Exp Med* **205**, 117-131.
- Giefing-Kroll, C., Jelencsics, K. E., Reipert, S. & Nagy, E. (2011).** Absence of pneumococcal PcsB is associated with overexpression of LysM domain containing proteins. *Microbiology*.
- González-Contreras, A., Magarinos, B., Godoy, M., Irgang, R., Toranzo, A. E. & Avendano-Herrera, R. (2011).** Surface properties of *Streptococcus phocae* strains isolated from diseased Atlantic salmon, *Salmo salar* L. *J Fish Dis* **34**, 203-215.
- Gordon, D. (2003).** Viewing and editing assembled sequences using Consed. *Curr Protoc Bioinformatics* **Chapter 11**, Unit11 12.
- Govantes, F., Andujar, E. & Santero, E. (1998).** Mechanism of translational coupling in the *nifLA* operon of *Klebsiella pneumoniae*. *EMBO J* **17**, 2368-2377.
- Grissa, I., Vergnaud, G. & Pourcel, C. (2007).** CRISPRFinder: a web tool to identify clustered regularly interspaced short palindromic repeats. *Nucleic Acids Res* **35**, W52-57.
- Grkovic, S., Brown, M. H. & Skurray, R. A. (2002).** Regulation of bacterial drug export systems. *Microbiol Mol Biol Rev* **66**, 671-701, table of contents.
- Gross, M., Cramton, S. E., Gotz, F. & Peschel, A. (2001).** Key role of teichoic acid net charge in *Staphylococcus aureus* colonization of artificial surfaces. *Infect Immun* **69**, 3423-3426.
- Guzmán, E., Romeu, A. & Garcia-Vallve, S. (2008).** Completely sequenced genomes of pathogenic bacteria: a review. *Enferm Infecc Microbiol Clin* **26**, 88-98.
- Hall, T. A. (1999).** Bioedit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. In *Nucleic Acids Symposium*, pp. pp. 95-98.
- Heaton, M. P. & Neuhaus, F. C. (1992).** Biosynthesis of D-alanyl-lipoteichoic acid: cloning, nucleotide sequence, and expression of the *Lactobacillus casei* gene for the D-alanine-activating enzyme. *J Bacteriol* **174**, 4707-4717.
- Herbert, S., Bera, A., Nerz, C., Kraus, D., Peschel, A., Goerke, C., Meehl, M., Cheung, A. & Gotz, F. (2007).** Molecular basis of resistance to muramidase and cationic antimicrobial peptide activity of lysozyme in staphylococci. *PLoS Pathog* **3**, e102.

- Hernández, S., Gómez, A., Cedano, J. & Querol, E. (2009). Bioinformatics annotation of the hypothetical proteins found by omics techniques can help to disclose additional virulence factors. *Curr Microbiol* **59**, 451-456.
- Hoshina, T., Sano, T. & Morimoto, Y. (1958). A *Streptococcus* pathogenic to fish. *J Tokyo Univ Fish* **44**, 57-58.
- Hsiao, W., Wan, I., Jones, S. J. & Brinkman, F. S. (2003). IslandPath: aiding detection of genomic islands in prokaryotes. *Bioinformatics* **19**, 418-420.
- Hueck, C. J. (1998). Type III protein secretion systems in bacterial pathogens of animals and plants. *Microbiol Mol Biol Rev* **62**, 379-433.
- Hurvitz, A., Bercovier, H. & Van Rijn, J. (1997). Effect of ammonia on the survival and the immune response of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) vaccinated against *Streptococcus iniae*. *Fish Shellfish Immunol* **7**, 45-53.
- Huston, W. M., Jennings, M. P. & McEwan, A. G. (2002). The multicopper oxidase of *Pseudomonas aeruginosa* is a ferroxidase with a central role in iron acquisition. *Mol Microbiol* **45**, 1741-1750.
- Huys, G., D'Haene, K. & Swings, J. (2006). Genetic basis of tetracycline and minocycline resistance in potentially probiotic *Lactobacillus plantarum* strain CCUG 43738. *Antimicrob Agents Chemother* **50**, 1550-1551.
- Ingmer, H. & Brondsted, L. (2009). Proteases in bacterial pathogenesis. *Res Microbiol* **160**, 704-710.
- Jin, B., Newton, S. M., Shao, Y., Jiang, X., Charbit, A. & Klebba, P. E. (2006). Iron acquisition systems for ferric hydroxamates, haemin and haemoglobin in *Listeria monocytogenes*. *Mol Microbiol* **59**, 1185-1198.
- Juiz-Río, S., Osorio, C. R., de Lorenzo, V. & Lemos, M. L. (2005). Subtractive hybridization reveals a high genetic diversity in the fish pathogen *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*: evidence of a SXT-like element. *Microbiology* **151**, 2659-2669.
- Jung, M. Y., Chang, Y. H. & Kim, W. (2010). A real-time PCR assay for detection and quantification of *Lactococcus garvieae*. *J Appl Microbiol* **108**, 1694-1701.
- Kang, S. H., Shin, G. W., Shin, Y. S. & other authors (2004). Experimental evaluation of pathogenicity of *Lactococcus garvieae* in black rockfish (*Sebastes schlegeli*). *J Vet Sci* **5**, 387-390.
- Kawanishi, M., Kojima, A., Ishihara, K., Esaki, H., Kijima, M., Takahashi, T., Suzuki, S. & Tamura, Y. (2005). Drug resistance and pulsed-field gel electrophoresis patterns of *Lactococcus garvieae* isolates from cultured *Seriola* (yellowtail, amberjack and kingfish) in Japan. *Lett Appl Microbiol* **40**, 322-328.
- Kawanishi, M., Yoshida, T., Yagashiro, S., Kijima, M., Yagyu, K., Nakai, T., Murakami, M., Morita, H. & Suzuki, S. (2006). Differences between *Lactococcus garvieae* isolated from the genus *Seriola* in Japan and those isolated from other animals (trout, terrestrial animals from Europe) with regard to pathogenicity, phage susceptibility and genetic characterization. *J Appl Microbiol* **101**, 496-504.
- Kawanishi, M., Yoshida, T., Kijima, M. & other authors (2007). Characterization of *Lactococcus garvieae* isolated from radish and broccoli sprouts that exhibited a KG+ phenotype, lack of virulence and absence of a capsule. *Lett Appl Microbiol* **44**, 481-487.
- Kim, S. R., Nonaka, L. & Suzuki, S. (2004). Occurrence of tetracycline resistance genes tet(M) and tet(S) in bacteria from marine aquaculture sites. *FEMS Microbiol Lett* **237**, 147-156.
- Kimura, H. & Kusuda, R. (1982). Studies on the pathogenesis of streptococcal infection in cultured yellowtail: effect of crude exotoxins fractions from cell-free culture on experimental streptococcal infection. *Bull Eur Ass Fish Pathol*, **9-10**.
- Kitao, T., Aoki, T. & Iwata, K. (1979). Epidemiological study on streptococcosis of cultured yellowtail. Distribution of *Streptococcus* spp. in sea water and mud around yellowtails farms. *Bull Jpn Soc Sci Fish* **45**, 567-572.

Bibliografia

- Kitao, T. (1982).** The methods for detection of *Streptococcus* sp. causative bacteria of streptococcal disease of culture yellowtail (*Seriola quinqueradiata*). *Fish Pathol*, **17**, 26.
- Kong, J., Jytte, J. & Ma, G. R. (2001).** Cloning and structure analysis of a restriction and modification system, LlaBIII from *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* W56. *Sheng Wu Gong Cheng Xue Bao* **17**, 663-668.
- Kong, J. & Josephsen, J. (2002).** The ability of the plasmid-encoded restriction and modification system LlaBIII to protect *Lactococcus lactis* against bacteriophages. *Lett Appl Microbiol* **34**, 249-253.
- Kopermsub, P. & Yunchalard, S. (2010).** Identification of lactic acid bacteria associated with the production of plaasom, a traditional fermented fish product of Thailand. *Int J Food Microbiol* **138**, 200-204.
- Kovacs, M., Halfmann, A., Fedtke, I., Heintz, M., Peschel, A., Vollmer, W., Hakenbeck, R. & Bruckner, R. (2006).** A functional *dlt* operon, encoding proteins required for incorporation of d-alanine in teichoic acids in gram-positive bacteria, confers resistance to cationic antimicrobial peptides in *Streptococcus pneumoniae*. *J Bacteriol* **188**, 5797-5805.
- Kristian, S. A., Datta, V., Weidenmaier, C., Kansal, R., Fedtke, I., Peschel, A., Gallo, R. L. & Nizet, V. (2005).** D-alanylation of teichoic acids promotes group A *Streptococcus* antimicrobial peptide resistance, neutrophil survival, and epithelial cell invasion. *J Bacteriol* **187**, 6719-6725.
- Krogh, A., Larsson, B., von Heijne, G. & Sonnhammer, E. L. (2001).** Predicting transmembrane protein topology with a hidden Markov model: application to complete genomes. *J Mol Biol* **305**, 567-580.
- Kubota, H., Tsuji, H., Matsuda, K., Kurakawa, T., Asahara, T. & Nomoto, K. (2010).** Detection of human intestinal catalase-negative, Gram-positive cocci by rRNA-targeted reverse transcription-PCR. *Appl Environ Microbiol* **76**, 5440-5451.
- Kusuda, K. & Hamaguchi, M. (1989).** Determination of the median lethal dose of cell-associated toxins from *Streptococcus* sp. in the yellowtail. *Bull Eur Ass Fish Pathol*, **117-118**.
- Kusuda, R. & Kawai, K. (1982).** Characteristics of *Streptococcus* sp. pathogenic to yellowtail. *Fish Pathology* **17**, 11-16.
- Kusuda, R., Kawai, K., Salati, F., Banner, C. R. & Fryer, J. L. (1991).** *Enterococcus seriolicida* sp. nov., a fish pathogen. *Int J Syst Bacteriol* **41**, 406-409.
- Langille, M. G., Hsiao, W. W. & Brinkman, F. S. (2008).** Evaluation of genomic island predictors using a comparative genomics approach. *BMC Bioinformatics* **9**, 329.
- Lehoux, D. E. & Levesque, R. C. (2000).** Detection of genes essential in specific niches by signature-tagged mutagenesis. *Curr Opin Biotechnol* **11**, 434-439.
- Lemos, M. L. & Osorio, C. R. (2007).** Heme, an iron supply for vibrios pathogenic for fish. *Biometals* **20**, 615-626.
- Linden, S. K., Bierne, H., Sabet, C., Png, C. W., Florin, T. H., McGuckin, M. A. & Cossart, P. (2008).** *Listeria monocytogenes* internalins bind to the human intestinal mucin MUC2. *Arch Microbiol* **190**, 101-104.
- Lisitsyn, N. A., Rosenberg, M. V., Launer, G. A., Wagner, L. L., Potapov, V. K., Kolesnik, T. B. & Sverdlov, E. D. (1993).** A method for isolation of sequences missing in one of two related genomes. *Mol Gen Mikrobiol Virusol*, 26-29.
- Llarrull, L. I., Testero, S. A., Fisher, J. F. & Mobashery, S. (2010).** The future of the beta-lactams. *Curr Opin Microbiol* **13**, 551-557.
- Llosa, M., Gomis-Ruth, F. X., Coll, M. & de la Cruz Fd, F. (2002).** Bacterial conjugation: a two-step mechanism for DNA transport. *Mol Microbiol* **45**, 1-8.
- Lowe, T. M. & Eddy, S. R. (1997).** tRNAscan-SE: a program for improved detection of transfer RNA genes in genomic sequence. *Nucleic Acids Res* **25**, 955-964.

- López, C. S. & Crosa, J. H. (2007). Characterization of ferric-anguibactin transport in *Vibrio anguillarum*. *Biometals* **20**, 393-403.
- Magarinos, B., Romalde, J. L., Lemos, M. L., Barja, J. L. & Toranzo, A. E. (1994). Iron uptake by *Pasteurella piscicida* and its role in pathogenicity for fish. *Appl Environ Microbiol* **60**, 2990-2998.
- Maki, T., Hirono, I., Kondo, H. & Aoki, T. (2008). Drug resistance mechanism of the fish-pathogenic bacterium *Lactococcus garvieae*. *J Fish Dis* **31**, 461-468.
- Maki, T., Santos, M. D., Kondo, H., Hirono, I. & Aoki, T. (2009). A transferable 20-kilobase multiple drug resistance-conferring R plasmid (pKL0018) from a fish pathogen (*Lactococcus garvieae*) is highly homologous to a conjugative multiple drug resistance-conferring enterococcal plasmid. *Appl Environ Microbiol* **75**, 3370-3372.
- Mantovani, H. C. & Russell, J. B. (2001). Nisin resistance of *Streptococcus bovis*. *Appl Environ Microbiol* **67**, 808-813.
- Marcos-López, M., Gale, P., Oidtmann, B. C. & Peeler, E. J. (2010). Assessing the impact of climate change on disease emergence in freshwater fish in the United Kingdom. *Transbound Emerg Dis* **57**, 293-304.
- Martínez, J. L. & Baquero, F. (2002). Interactions among strategies associated with bacterial infection: pathogenicity, epidemics, and antibiotic resistance. *Clin Microbiol Rev* **15**, 647-679.
- Mata, A. I., Gibello, A., Casamayor, A., Blanco, M. M., Dominguez, L. & Fernandez-Garayzabal, J. F. (2004). Multiplex PCR assay for detection of bacterial pathogens associated with warm-water Streptococcosis in fish. *Appl Environ Microbiol* **70**, 3183-3187.
- McBride, S. M. & Sonenshein, A. L. (2011). The *dlt* operon confers resistance to cationic antimicrobial peptides in *Clostridium difficile*. *Microbiology* **157**, 1457-1465.
- Menéndez, A., Fernandez, L., Reimundo, P. & Guijarro, J. A. (2007). Genes required for *Lactococcus garvieae* survival in a fish host. *Microbiology* **153**, 3286-3294.
- Menéndez, A. (2007). Caracterización de mutantes atenuados de *Lactococcus garvieae* seleccionados mediante mutagénesis de marcaje (Signature-tagged mutagenesis, STM). Tesis Doctoral, Departamento de Biología Funcional, Área de Microbiología. Oviedo: Universidad de Oviedo.
- Michel, C., Pelletier, C., Boussaha, M., Douet, D. G., Lautraite, A. & Tailliez, P. (2007). Diversity of lactic acid bacteria associated with fish and the fish farm environment, established by amplified rRNA gene restriction analysis. *Appl Environ Microbiol* **73**, 2947-2955.
- Milani, C. J., Aziz, R. K., Locke, J. B., Dahesh, S., Nizet, V. & Buchanan, J. T. (2010). The novel polysaccharide deacetylase homologue Pdi contributes to virulence of the aquatic pathogen *Streptococcus iniae*. *Microbiology* **156**, 543-554.
- Mistou, M. Y., Dramsi, S., Brega, S., Poyart, C. & Trieu-Cuot, P. (2009). Molecular dissection of the *secA2* locus of group B *Streptococcus* reveals that glycosylation of the Srr1 LPXTG protein is required for full virulence. *J Bacteriol* **191**, 4195-4206.
- Miyoshi, S. & Shinoda, S. (2000). Microbial metalloproteases and pathogenesis. *Microbes Infect* **2**, 91-98.
- Monedero, V., Maze, A., Boel, G., Zuniga, M., Beaufils, S., Hartke, A. & Deutscher, J. (2007). The phosphotransferase system of *Lactobacillus casei*: regulation of carbon metabolism and connection to cold shock response. *J Mol Microbiol Biotechnol* **12**, 20-32.
- Moran, N. A. (2002). Microbial minimalism: genome reduction in bacterial pathogens. *Cell* **108**, 583-586.
- Mushegian, A. R., Fullner, K. J., Koonin, E. V. & Nester, E. W. (1996). A family of lysozyme-like virulence factors in bacterial pathogens of plants and animals. *Proc Natl Acad Sci US A* **93**, 7321-7326.

Bibliografía

- Myers, E. W., Sutton, G. G., Delcher, A. L. & other authors (2000). A whole-genome assembly of *Drosophila*. *Science* **287**, 2196-2204.
- Múzquiz, J. L., Royo, F. M., Ortega, C., de Blas, I., Ruiz, I. & Alonso, J. L. (1999). Pathogenicity of streptococcosis in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): dependence of age of diseased fish. *Bull Eur Ass Fish Pathol* **19**, 114-119.
- Nakai, T., Sugimoto, R., Park, K. H., Matsuoka, S., Mori, K., Nishioka, T. & Maruyama, K. (1999). Protective effects of bacteriophage on experimental *Lactococcus garvieae* infection in yellowtail. *Dis Aquat Organ* **37**, 33-41.
- Neuhaus, F. C. & Baddiley, J. (2003). A continuum of anionic charge: structures and functions of D-alanyl-teichoic acids in gram-positive bacteria. *Microbiol Mol Biol Rev* **67**, 686-723.
- Niegowski, D. & Eshaghi, S. (2007). The CorA family: structure and function revisited. *Cell Mol Life Sci* **64**, 2564-2574.
- Nonaka, L., Ikeno, K. & Suzuki, S. (2007). Distribution of tetracycline resistance gene, *tet^M*, in Gram-positive and Gram-negative bacteria isolated from sediment and seawater at a coastal aquaculture site in Japan. *Microbes Environ* **22**, 355-364.
- O'sullivan, D. J. & Klaenhammer, T. R. (1993). Rapid Mini-Prep Isolation of High-Quality Plasmid DNA from *Lactococcus* and *Lactobacillus* spp. *Appl Environ Microbiol* **59**, 2730-2733.
- Olivares-Fuster, O. & Arias, C. R. (2008). Use of suppressive subtractive hybridization to identify *Flavobacterium columnare* DNA sequences not shared with *Flavobacterium johnsoniae*. *Lett Appl Microbiol* **46**, 605-612.
- Ooyama, T., Hirokawa, Y., Minami, T., Yasuda, H., Nakai, T., Endo, M., Ruangpan, L. & Yoshida, T. (2002). Cell-surface properties of *Lactococcus garvieae* strains and their immunogenicity in the yellowtail *Seriola quinqueradiata*. *Dis Aquat Organ* **51**, 169-177.
- Osman, K. T., Du, L., He, Y. & Luo, Y. (2009). Crystal structure of *Bacillus cereus* D-alanyl carrier protein ligase (DltA) in complex with ATP. *J Mol Biol* **388**, 345-355.
- Overbeek, R., Fonstein, M., D'Souza, M., Pusch, G. D. & Maltsev, N. (1999). Use of contiguity on the chromosome to predict functional coupling. *In Silico Biol* **1**, 93-108.
- Pallen, M. J. (2002). The ESAT-6/WXG100 superfamily -- and a new Gram-positive secretion system? *Trends Microbiol* **10**, 209-212.
- Paludan-Müller, C., Madsen, M., Sophanodora, P., Gram, L. & Møller, P. (2002). Fermentation and microflora of plaasom, a Thai fermented fish product prepared with different salt concentrations. *Int J Food Microbiol* **73**, 61-70.
- Palumbo, E., Deghorain, M., Cocconcelli, P. S., Kleerebezem, M., Geyer, A., Hartung, T., Morath, S. & Hols, P. (2006). D-alanyl ester depletion of teichoic acids in *Lactobacillus plantarum* results in a major modification of lipoteichoic acid composition and cell wall perforations at the septum mediated by the Acm2 autolysin. *J Bacteriol* **188**, 3709-3715.
- Papp-Wallace, K. M. & Maguire, M. E. (2008). Regulation of CorA Mg²⁺ channel function affects the virulence of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *J Bacteriol* **190**, 6509-6516.
- Parsons, J. A., Bannam, T. L., Devenish, R. J. & Rood, J. I. (2007). TcpA, an FtsK/SpoIIIE homolog, is essential for transfer of the conjugative plasmid pCW₃ in *Clostridium perfringens*. *J Bacteriol* **189**, 7782-7790.
- Perea Vélez, M., Verhoeven, T., Draing, C. & other authors (2007). Functional analysis of D-alanylation of lipoteichoic acid in the probiotic strain *Lactobacillus rhamnosus* GG. *Appl Environ Microbiol* **73**, 3595-3604.
- Peschel, A., Otto, M., Jack, R. W., Kalbacher, H., Jung, G. & Gotz, F. (1999). Inactivation of the *dlt* operon in *Staphylococcus aureus* confers sensitivity to defensins, protegrins, and other antimicrobial peptides. *J Biol Chem* **274**, 8405-8410.

- Peschel, A., Jack, R. W., Otto, M. & other authors (2001). *Staphylococcus aureus* resistance to human defensins and evasion of neutrophil killing via the novel virulence factor MprF is based on modification of membrane lipids with l-lysine. *J Exp Med* **193**, 1067-1076.
- Poncet, S., Milohanic, E., Maze, A. & other authors (2009). Correlations between carbon metabolism and virulence in bacteria. *Contrib Microbiol* **16**, 88-102.
- Pot, B., Devriese, L. A., Ursi, D., Vandamme, P., Haesebrouck, F. & Kersters, K. (1996). Phenotypic identification and differentiation of *Lactococcus* strains isolated from animals. *Syst Appl Microbiol* **19**, 213-222.
- Poyart, C., Pellegrini, E., Marceau, M., Baptista, M., Jaubert, F., Lamy, M. & Trieu-Cuot, P. (2003). Attenuated virulence of *Streptococcus agalactiae* deficient in D-alanyl-lipoteichoic acid is due to an increased susceptibility to defensins and phagocytic cells. *Mol Microbiol* **49**, 1615-1625.
- Pridgeon, J. W., Klesius, P. H., Mu, X., Carter, D., Fleming, K., Xu, D., Srivastava, K. & Reddy, G. (2011). Identification of unique DNA sequences present in highly virulent 2009 Alabama isolates of *Aeromonas hydrophila*. *Vet Microbiol*: Published by Elsevier B.V.
- Prieta, J., Doménech, A. M., Fernández-Garaizabal, J. F., Collins, M. D., Rodríguez, U. M., Jones, D. & al., e. (1993). Lactococcosis de la trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*). *Med Vet* **10**, 367-373.
- Rantsiou, K., Urso, R., Iacumin, L., Cantoni, C., Cattaneo, P., Comi, G. & Cocolin, L. (2005). Culture-dependent and -independent methods to investigate the microbial ecology of Italian fermented sausages. *Appl Environ Microbiol* **71**, 1977-1986.
- Ratledge, C. & Dover, L. G. (2000). Iron metabolism in pathogenic bacteria. *Annu Rev Microbiol* **54**, 881-941.
- Ravelo, C., Magariños, B., Toranzo, A. E. & Romalde, J. L. (2001). Conventional versus miniaturized systems for the phenotypic characterization of *Lactococcus garvieae* strains. *Bulletin of the European Association of Fish Pathologists* **21**, 136-144.
- Ravelo, C., Magarinos, B., López-Romalde, S., Toranzo, A. E. & Romalde, J. L. (2003). Molecular fingerprinting of fish-pathogenic *Lactococcus garvieae* strains by random amplified polymorphic DNA analysis. *J Clin Microbiol* **41**, 751-756.
- Ravelo, C., Magariños, B., Herrero, M. C., Costa, L., Toranzo, A. E. & Romalde, J. L. (2005). Use of adjuvanted vaccines to lengthen the protection against lactococcosis in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture* **251**, 153-158.
- Reed, L. J. & Muench, S. (1938). A simple method of estimating fifty percent end point. *American Journal of Hygiene*. 493-497.
- Rex, G., Surin, B., Besse, G., Schneppe, B. & McCarthy, J. E. (1994). The mechanism of translational coupling in *Escherichia coli*. Higher order structure in the atpHA mRNA acts as a conformational switch regulating the access of de novo initiating ribosomes. *J Biol Chem* **269**, 18118-18127.
- Rigel, N. W. & Braunstein, M. (2008). A new twist on an old pathway--accessory Sec [corrected] systems. *Mol Microbiol* **69**, 291-302.
- Rivera, J., Vannakambadi, G., Hook, M. & Speziale, P. (2007). Fibrinogen-binding proteins of Gram-positive bacteria. *Thromb Haemost* **98**, 503-511.
- Roberts, I. S. (1996). The biochemistry and genetics of capsular polysaccharide production in bacteria. *Annu Rev Microbiol* **50**, 285-315.
- Romalde, J. L. & Toranzo, A. E. (2002). Molecular approaches for the study and diagnosis of salmonid streptococcosis. In *Molecular diagnosis of salmonid diseases*, pp. 211-233. Edited by C. O. Cunningham.

- Romalde, J. L., Luzardo-Alvarez, A., Ravelo, C., Toranzo, A. E. & Blanco-Mendez, J. (2004). Oral immunization using alginate microparticles as a useful strategy for booster vaccination against fish lactococcosis. *Aquaculture* **236**, 119-129.
- Rosberg-Cody, E., Liavonchanka, A., Gobel, C., Ross, R. P., O'Sullivan, O., Fitzgerald, G. F., Feussner, I. & Stanton, C. (2011). Myosin-cross-reactive antigen (MCRA) protein from *Bifidobacterium breve* is a FAD-dependent fatty acid hydratase which has a function in stress protection. *BMC Biochem* **12**, 9.
- Rowe, G. E. & Welch, R. A. (1994). Assays of hemolytic toxins. *Meth Enzymol* **235**, 657-667.
- Royo, F., Ortega, C., Múzquiz, J. L., de Blas, I. & Fernández, A. (1999). Caracterización epidemiológica de la estreptococosis, *Lactococcus garvieae*, en trucha arco iris, implicaciones en su virulencia y patogenicidad. *Congreso Nacional de Acuicultura*. Las Palmas de Gran Canaria.
- Rozen, S. & Skaletsky, H. (2000). Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. *Methods Mol Biol* **132**, 365-386.
- Sabet, C., Toledo-Arana, A., Personnic, N. & other authors (2008). The *Listeria monocytogenes* virulence factor InlJ is specifically expressed in vivo and behaves as an adhesin. *Infect Immun* **76**, 1368-1378.
- Sabri, M., Caza, M., Proulx, J., Lymberopoulos, M. H., Bree, A., Moulin-Schouleur, M., Curtiss, R., 3rd & Dozois, C. M. (2008). Contribution of the SitABCD, MntH, and FeoB metal transporters to the virulence of avian pathogenic *Escherichia coli* O78 strain chi7122. *Infect Immun* **76**, 601-611.
- Saier, M. H., Jr. & Reizer, J. (1994). The bacterial phosphotransferase system: new frontiers 30 years later. *Mol Microbiol* **13**, 755-764.
- Sakai, T., Matsuyama, T., Sano, M. & Iida, T. (2009). Identification of novel putative virulence factors, adhesin AIDA and type VI secretion system, in atypical strains of fish pathogenic *Edwardsiella tarda* by genomic subtractive hybridization. *Microbiol Immunol* **53**, 131-139.
- Sambrook, J. & Russell, D. W. (2001). Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory: Cold Spring Harbor, NY.
- Sandine, W. E. (1988). New nomenclature of the non-rod-shaped lactic acid bacteria. *Biochimie* **70**, 519-521.
- Schleifer, K. H., Graus, J., Dvorak, C., Kilpper-Bälz, R., Collins, M. D. & Fischer, W. (1985). Transfer of *Streptococcus lactis* and related streptococci to the genus *Lactococcus* gen. nov. *Syst Appl Microbiol* **6**, 183-195.
- Schmidtke, L. & Carson, J. (2003). Antigen recognition by rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) of whole cell proteins expressed by *Lactococcus garvieae* when obtained directly from fish and under iron limited culture conditions. *Vet Microbiol* **93**, 63-71.
- Sebulsky, M. T., Hohnstein, D., Hunter, M. D. & Heinrichs, D. E. (2000). Identification and characterization of a membrane permease involved in iron-hydroxamate transport in *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol* **182**, 4394-4400.
- Shima, T., Kodama, H., Iwasaki, T., Watarai, S. & Asagi, M. (2006). Adherence of *Lactococcus garvieae* to the intestinal and brain gangliosides of the yellowtail, *Seriola quinqueradiata* Temminck and Schlegel. *J Fish Dis* **29**, 249-253.
- Shin, G., Palaksha, K., Kim, Y., Nho, S., Cho, J., Heo, N., Heo, G., Park, S. & Jung, T. (2007). Immunoproteomic analysis of capsulate and non-capsulate strains of *Lactococcus garvieae*. *Vet Microbiol* **119**, 205-212.
- Siguié, P., Perochon, J., Lestrade, L., Mahillon, J. & Chandler, M. (2006). ISfinder: the reference centre for bacterial insertion sequences. *Nucleic Acids Res* **34**, D32-36.
- Sorek, R., Kunin, V. & Hugenholtz, P. (2008). CRISPR--a widespread system that provides acquired resistance against phages in bacteria and archaea. *Nat Rev Microbiol* **6**, 181-186.

- Soule, M., Cain, K., LaFrentz, S. & Call, D. R. (2005). Combining suppression subtractive hybridization and microarrays to map the intraspecies phylogeny of *Flavobacterium psychrophilum*. *Infect Immun* **73**, 3799-3802.
- Speziale, P., Raucchi, G., Visai, L., Switalski, L. M., Timpl, R. & Hook, M. (1986). Binding of collagen to *Staphylococcus aureus* Cowan 1. *J Bacteriol* **167**, 77-81.
- Stackebrandt, E. & Teuber, M. (1988). Molecular taxonomy and phylogenetic position of lactic acid bacteria. *Biochimie* **70**, 317-324.
- Starr, C. R. & Engleberg, N. C. (2006). Role of hyaluronidase in subcutaneous spread and growth of group A *Streptococcus*. *Infect Immun* **74**, 40-48.
- Straus, D. & Ausubel, F. M. (1990). Genomic subtraction for cloning DNA corresponding to deletion mutations. *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**, 1889-1893.
- Swoboda, J. G., Campbell, J., Meredith, T. C. & Walker, S. (2010). Wall teichoic acid function, biosynthesis, and inhibition. *ChemBiochem* **11**, 35-45.
- Taniguchi, M. (1982). Experiment on peroral inoculation via food to induce yellowtail streptococcosis. *Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries* **48**, 1717-1720.
- Teixeira, L. M., Merquior, V. L., Vianni, M. C., Carvalho, M. G., Fracalanza, S. E., Steigerwalt, A. G., Brenner, D. J. & Facklam, R. R. (1996). Phenotypic and genotypic characterization of atypical *Lactococcus garvieae* strains isolated from water buffalos with subclinical mastitis and confirmation of *L. garvieae* as a senior subjective synonym of *Enterococcus seriolicida*. *Int J Syst Bacteriol* **46**, 664-668.
- Terns, M. P. & Terns, R. M. (2011). CRISPR-based adaptive immune systems. *Curr Opin Microbiol*.
- Thaker, M., Spanogiannopoulos, P. & Wright, G. D. (2010). The tetracycline resistome. *Cell Mol Life Sci* **67**, 419-431.
- van Sorge, N. M., Quach, D., Gurney, M. A., Sullam, P. M., Nizet, V. & Doran, K. S. (2009). The group B streptococcal serine-rich repeat 1 glycoprotein mediates penetration of the blood-brain barrier. *J Infect Dis* **199**, 1479-1487.
- Vela, A. I., Vázquez, J., Gibello, A. & other authors (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.
- Vendrell, D., Balcazar, J. L., Ruiz-Zarzuela, I., de Blas, I., Girones, O. & Múzquiz, J. L. (2006). *Lactococcus garvieae* in fish: a review. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* **29**, 177-198.
- Vendrell, D., Balcazar, J. L., Ruiz-Zarzuela, I., de Blas, I., Girones, O. & Múzquiz, J. L. (2007). Safety and efficacy of an inactivated vaccine against *Lactococcus garvieae* in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Prev Vet Med* **80**, 229-229.
- Vendrell, D., Balcazar, J. L., de Blas, I., Ruiz-Zarzuela, I., Girones, O. & Luis Múzquiz, J. (2008). Protection of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) from lactococcosis by probiotic bacteria. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* **31**, 337-345.
- Vendrell, D., Balcazar, J. L., Calvo, A. C., de Blas, I., Ruiz-Zarzuela, I., Girones, O. & Múzquiz, J. L. (2009). Quantitative analysis of bacterial adhesion to fish tissue. *Colloids Surf B Biointerfaces* **71**, 331-333.
- Villani, F., Aponte, M., Blaiotta, G., Mauriello, G., Pepe, O. & Moschetti, G. (2001). Detection and characterization of a bacteriocin, garviecin L1-5, produced by *Lactococcus garvieae* isolated from raw cow's milk. *J Appl Microbiol* **90**, 430-439.

- Volkov, A., Liavonchanka, A., Kamneva, O., Fiedler, T., Goebel, C., Kreikemeyer, B. & Feussner, I. (2010). Myosin cross-reactive antigen of *Streptococcus pyogenes* M49 encodes a fatty acid double bond hydratase that plays a role in oleic acid detoxification and bacterial virulence. *J Biol Chem* **285**, 10353-10361.
- Vollmer, W. & Tomasz, A. (2000). The *pgdA* gene encodes for a peptidoglycan N-acetylglucosamine deacetylase in *Streptococcus pneumoniae*. *J Biol Chem* **275**, 20496-20501.
- Vos, P., Garrity, G., Jones, D., Krieg, N. R., Ludwig, W., Rainey, F. A., Schleifer, K.-H. & Whitman, W. B. (Eds.). (2009). *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology: Volume 3: The Firmicutes*, 2nd edn. Springer.
- Waack, S., Keller, O., Asper, R., Brodag, T., Damm, C., Fricke, W. F., Surovcik, K., Meinicke, P. & Merkl, R. (2006). Score-based prediction of genomic islands in prokaryotic genomes using hidden Markov models. *BMC Bioinformatics* **7**, 142.
- Walter, J., Loach, D., Alqumber, M., Rockel, C., Hermann, C., Pfitzenmaier, M. & Tannock, G. (2007). D-alanyl ester depletion of teichoic acids in *Lactobacillus reuteri* 100-23 results in impaired colonization of the mouse gastrointestinal tract. *Environ Microbiol* **9**, 1750-1760.
- Wandersman, C. & Delepelaire, P. (2004). Bacterial iron sources: from siderophores to hemophores. *Annu Rev Microbiol* **58**, 611-647.
- Wang, Q., Yang, M., Xiao, J. & other authors (2009a). Genome sequence of the versatile fish pathogen *Edwardsiella tarda* provides insights into its adaptation to broad host ranges and intracellular niches. *PLoS One* **4**, e7646.
- Wang, Y., Xu, Z., Jia, A., Chen, J., Mo, Z. & Zhang, X. (2009b). Genetic diversity between two *Vibrio anguillarum* strains exhibiting different virulence by suppression subtractive hybridization. *Wei Sheng Wu Xue Bao* **49**, 363-371.
- Wang, X., Wang, Q., Xiao, J., Liu, Q., Wu, H. & Zhang, Y. (2010). Hemolysin EthA in *Edwardsiella tarda* is essential for fish invasion in vivo and in vitro and regulated by two-component system EsrA-EsrB and nucleoid protein HhaEt. *Fish Shellfish Immunol* **29**, 1082-1091.
- Wecke, J., Madela, K. & Fischer, W. (1997). The absence of D-alanine from lipoteichoic acid and wall teichoic acid alters surface charge, enhances autolysis and increases susceptibility to methicillin in *Bacillus subtilis*. *Microbiology*. 2953-2960.
- Weidenmaier, C., Peschel, A., Xiong, Y., Kristian, S., Dietz, K., Yeaman, M. & Bayer, A. (2005). Lack of wall teichoic acids in *Staphylococcus aureus* leads to reduced interactions with endothelial cells and to attenuated virulence in a rabbit model of endocarditis. *J Infect Dis* **191**, 1771-1777.
- Westerlund, B. & Korhonen, T. K. (1993). Bacterial proteins binding to the mammalian extracellular matrix. *Mol Microbiol* **9**, 687-694.
- Wilbring, M., Alexiou, K., Reichenspurner, H., Matschke, K. & Tugtekin, S. M. (2011). *Lactococcus garvieae* causing zoonotic prosthetic valve endocarditis. *Clin Res Cardiol*.
- Williams, A. M., Fryer, J. L. & Collins, M. D. (1990). *Lactococcus piscium* sp. nov. a new *Lactococcus* species from salmonid fish. *FEMS Microbiol Lett* **56**, 109-113.
- Wilson, J. W., Schurr, M. J., LeBlanc, C. L., Ramamurthy, R., Buchanan, K. L. & Nickerson, C. A. (2002). Mechanisms of bacterial pathogenicity. *Postgrad Med J* **78**, 216-224.
- Winstanley, C. (2002). Spot the difference: applications of subtractive hybridisation to the study of bacterial pathogens. *J Med Microbiol* **51**, 459-467.
- Wyder, A. B., Boss, R., Naskova, J., Kaufmann, T., Steiner, A. & Graber, H. U. (2010). *Streptococcus* spp. and related bacteria: Their identification and their pathogenic potential for chronic mastitis - A molecular approach. *Res Vet Sci*.

- Xiong, Y. Q., Bensing, B. A., Bayer, A. S., Chambers, H. F. & Sullam, P. M. (2008). Role of the serine-rich surface glycoprotein GspB of *Streptococcus gordonii* in the pathogenesis of infective endocarditis. *Microb Pathog* **45**, 297-301.
- Yatime, L., Buch-Pedersen, M. J., Musgaard, M. & other authors (2009). P-type ATPases as drug targets: tools for medicine and science. *Biochim Biophys Acta* **1787**, 207-220.
- Yoshida, T., Eshima, T., Wada, Y., Yamada, Y., Kakizaki, E., Sakai, M., Kitao, T. & Inglis, V. (1996). Phenotypic variation associated with an antiphagocytic factor in the bacterial fish pathogen *Enterococcus seriolicida*. *Dis Aquat Org*, 81-86.
- Yoshida, T., Endo, M., Sakai, M. & Inglis, V. (1997). A cell capsule with possible involvement in resistance to opsonophagocytosis in *Enterococcus seriolicida* isolated from yellowtail *Seriola quinqueradiata*. *Dis Aquat Org*, 233-235.
- Yu, H. B., Zhang, Y. L., Lau, Y. L., Yao, F., Vilches, S., Merino, S., Tomas, J. M., Howard, S. P. & Leung, K. Y. (2005). Identification and characterization of putative virulence genes and gene clusters in *Aeromonas hydrophila* PPD134/91. *Appl Environ Microbiol* **71**, 4469-4477.
- Yu, N. Y., Wagner, J. R., Laird, M. R. & other authors (2010). PSORTb 3.0: improved protein subcellular localization prediction with refined localization subcategories and predictive capabilities for all prokaryotes. *Bioinformatics* **26**, 1608-1615.
- Yueqing, C., Zhengbo, H., Zhongkang, W., Youping, Y., Guoxiong, P. & Yuxian, X. (2006). Hybridization monitor: a method for identifying differences between complex genomes. *J Microbiol Methods* **64**, 305-315.
- Zechner, E. L., de la Cruz, F., Eisenbrandt, R., Grahn, A. M., Koraimann, G., Lanka, E. & al., e. (2000). Conjugative DNA transfer processes. En *The Horizontal Gene Pool: Bacterial Plasmids and Gene Spread*, pp. pp. 87-174. Edited by H. A. Publishers. Amsterdam: Thomas, C.M.
- Zhang, Y. L., Ong, C. T. & Leung, K. Y. (2000). Molecular analysis of genetic differences between virulent and avirulent strains of *Aeromonas hydrophila* isolated from diseased fish. *Microbiology* **146**, 999-1009.
- Zlotkin, A., Eldar, A., Ghittino, C. & Bercovier, H. (1998). Identification of *Lactococcus garvieae* by PCR. *J Clin Microbiol* **36**, 983-985.
- Zou, L., Wang, J., Huang, B., Xie, M. & Li, A. (2010). A solute-binding protein for iron transport in *Streptococcus iniae*. *BMC Microbiol* **10**, 309.
- Zuily, S., Mami, Z. & Meune, C. (2011). *Lactococcus garvieae* endocarditis. *Arch Cardiovasc Dis* **104**, 138-139.

Bibliografia

8. Anexos

Secuencia de nucleótidos del gen *dltA* de *L. garvieae* y secuencia de aminoácidos deducida

```

.....CTTACTAAAATGTAAGTTTACAGACA
ATTTAATTATGGTACAAATCACATATTATGAATAGAAAATATAAAAAATTATTCATCTTTT
TTGGA [AAGACA] CTGTTTTACTTTGCAGTGAT [TTAAT] CCTACTTTACCTTTACTC
CTACAGTAAAACGGGAGGCGCACACTTTATCTACAACGAATTTTGA (AAGGA) GATGTC
1  M N I F Q E I L S G A T K Y P E R L A I
1  ATGAACATTTTTCAAGAAATTTTATCCGGAGCAACAAAATACCCGGAACGTTTAGCGATA
21  V E H D Q D Y T Y R Q L L D A A S Q V A
61  GTCGAACACGATCAAGATTATACCTTATCGTCAATTGCTTGATGCTGCATCACAGGTAGCT
41  K I I S E L P I S Q R P I I V F G L N G
121  AAAAAATATCTGAATTGCCATCTCCCAACGGCCAATTATTGTGTTGGTAAAAATGGA
61  F L S L A A L L G V S L T G R A Y I P V
181  TTTTATCATTAGCTGCACTGCTCGGTGTTTCACTTACAGGTAGAGCCTATATTCCTGTA
81  D A H T P F E R T Q L I M Q A A N P S L
241  GACGCGCATACACCTTTTGAGAGAACGCGAGCTGATCATGCAAGCCGCAATCCATCTTTG
101  V I H T V E L E E N F S Q L F T S R I S
301  GTCATACATACAGTAGAAGTGAAGAAAATTTTCCAGCTTTTACATCAAGAAATATCT
121  Y I E Y Q E N T G F D F S Q I D S R Q A
361  TATATAGAATACCAAGAAAATACTGGTTTTGATTTTTCAAAATTGATAGTCGCTCAAGCT
141  V A G D D I N Y I I Y T S G T T G L P K
421  GTTGGCGGAGATGATATCAACTACATTATCTATACTTCGGGCACAACGGGGCTTCCAAAA
161  G V A V T H N N L L S F T E W M N K D F
481  GGTGTAGCAGTAACACACAATAACTTACTTAGCTTCACTGAATGGATGAATAAGGATTTT
181  S I I E N N H F L S Q A L Y S F D L S I
541  TCGATAATCGAAAACAATCACTTCTCTCCAGGCATTATATAGTTTTGATTTATCCATT
201  F S L Y P S L T T G G T L I S L S Q E E
601  TTCAGCTTGTATCCTAGCTTGACAACGGGTGGAACCTTGATTTCACTTAGCCAAGAGGAG
221  T T N F K K L F E R L N S S T I N T W V
661  ACAACGAATTTCAAAAACCTTTTGAACGATTGAATTCAGTACAATCAATACCTGGGTT
241  S T P S F I E I C L L D P S F V E E N H
721  TCTAGCCATCGTTTATCGAAATCTGTTTTGCTTGATCCATCATTGTTGAGGAAAATCAT
261  Q E L Q Q F I F C G E E L P H K T A S K
781  CAAGAGTTACAACAATTCATTTTTGTGGCGAGGAATTACCGCACAAAACAGCATCCAAG
281  L L D K F P H A K V W N T Y G P T E A T
841  CTGCTCGACAAGTCCCACATGCAAAAGTTTGGATACTTATGGTCCAACCGCAAGCTACG
301  G A I T S I Q I D E R I L Q D Y K R L P
901  GGTGCTATCACAAGTATTCAAATTGATGAAAGAATTCTTCAAGACTATAAGCGCTTGCCCT
321  I G T A K P G V E I Q I I D D E I I I I
961  ATTGGCACTGCCAAGCCTGGAGTGGAAATCCAAATCATTGATGATGAAATTATTATTATT
341  G D S V A Q G Y L E N A E K T A E V F Y
1021  GGTGATTCGCTCGCACAAAGGATATTTGGAAAATGCGGAGAAGACAGCAGAAGTCTTCTAT
361  E L E G R K A Y H T G D S G Y F D E K S
1081  GAGTAGAAGGAAGAAAGGCTTATCATACAGGAGATTCAGGTTATTTGATGCAAAAGTCA
381  V L N Y N G R I D F Q V K F N G F R I E
1141  GTCCTGAATATAATGGTCAATCGATTTTCAAGTGAAGTTTAAATGGTTTTAGAATCGAG
401  L Q D I E A H L Y E I A E I E K A L V V
1201  TTGCAAGATATCGAAGCTCATTATATGAAATTGCTGAGATTGAAAAGCATTAGTGGTT
421  P Q E N D A H K V T G L I A V L H C S L
1261  CCTCAAGAAAATGATGCCATAAAGTAACGGGATTGATAGCGGTCCTTCATGTCTTTG
441  D F A N K A E E R A F N K K I K A Q L S
1321  GATTTGCAAATAAGGCTGAAGAACGTCATTTAATAAAAAATTAAGGCACAACCTTCA
461  N T I M E Y M M P T K F I Y L D D F P L
1381  AATACGATTATGGAATATATGATGCCACTAAGTTCATTTATCTTGATGATTTTCCGCTT
481  T P N G K I D R K A L T K Q V L G G K N
1441  ACTCCTAATGAAAAATTGACCGTAAAGCTTTAACCAAGCAAGTCCTT (GGAGG) TAAGAAC
501  -
1501  TAG

```

Los nucleótidos correspondientes al lazo en horquilla y la cola de timinas del terminador de la transcripción identificado se representan en negrita y color gris. Las secuencias -10 y -35 del posible promotor de la transcripción detectado aparecen entre corchetes. Asimismo, las secuencias teóricas de unión al ribosoma se incluyen entre

paréntesis. Los codones de iniciación y terminación de la traducción están resaltados y subrayados en gris, respectivamente. Los dominios descritos como esenciales en la funcionalidad de la proteína DltA (Heaton & Neuhaus, 1992) aparecen en negrita y color negro y se indica mediante una flecha gris el punto de inserción del transposón Tn917.

Secuencia de nucleótidos del gen *dltB* de *L. garvieae* y secuencia de aminoácidos deducida

```

1  V E P Y A T P F Y F V I L G L A L L P L
1  STGGAAACCATATGCAACACCTTTTACTTTGTGATTTTAGGGTTAGCGCTGCTTCCACTT
21  I M A H A Y G E K W M G Y Q V I L T I A
61  ATCATGGCACACGCCTACGGCGAAAAATGGATGGGCTATCAAGTCATCTTAAACCATTGCC
41  F L W I S F G G K V S L W S L L G F G V
121  TTTCTCTGGATCAGTTTCGGTGGTAAAGTCAGTCTTTGGTCCCTTCTGGGTTTCGGGGTT
61  F E T T L I K L Y A H Y R K L Q N K T W
181  TTTGAAACCACCTTTGATTAAGCTCTACGCGCACTATCGAAAACCTCAAAAACAAAACCTTGG
81  V F V L A V L A S L L P L I I V K V T P
241  GTGTTTCGTTTTAGCAGTGCCTTGCATCGTTGTTACCGTTAATAATCGTAAAGGTGACGCCA
101  L L D P M H P Q S I L G F L G I S Y V T
301  CTATTGGATCCGATGCATCCACAATCTATCCTTGGTTTTTTTAGGGATATCGTATGTGACC
121  F K T V S V I L E L R D G L I K E V P L
361  TTTAAAACCGTAAGTGTAATCCTTGAGTTACGTGATGGCCTGATTAAGAAGTTCGCCTTA
141  K E Y L Y F L Y F F P T I S S G P I D R
421  AAGGAGTATCTCTATTTTTCTTTATTTCTTCCCCACCATTTTCGTACAGGGCCAATTGATCGT
161  F R R F Q K E L E A P L T D K Y A E Y L
481  TTCCGACGTTTTCCAAAAAGAGCTTGAAGCGCCACTTACGGATAAGTATGCAGAGTACTTG
181  G K G I F Y I F Q G F L Y N F I I S Y L
541  GGAAAAGGAATTTTCTATATTTTCCAAGTTTCCTGTATAATTTTCATCATTTCTCTATCTG
201  I S H Y F L H G L A I K A T L H P N M W
601  ATCTCACATTTTCTGCATGGTTTAGCAATAAAAGCGACTTTGCATCCCAATATGTGG
221  N M M G S M Y A Y G F Y L F F N F A G Y
661  AATATGATGGGCAGCATGTATGCTTACGGTTTCTATCTCTTTTTCAACTTGCAGGTTAT
241  S L F A M G V S L I M G Y K I P I N F N
721  TCCTTTTTGCGATGGGCGTTTCTTGTATATGGGATATAAAAATTCCTTAAGCTTAAT
261  K P F L A K N I N D F W Q R W H I S L S
781  AAACCCTTCTTTCGAAAAATATTAATGACTTTTGGCAACGTTGGCATATCTCTTTATCG
281  F W F R D F V F M R L V K W I M V K K W
841  TTCTGGTTCAGAGATTTTGTCTTTATGCGCTTAGTAAAGTGGATTATGGTTAAAAAATGG
301  S K N M V T I S N V G Y L V N M F I M G
901  TCCAAAAATATGGTGACCATATCAAACGTGGGTTACTTAGTGAACATGTTTATTATGGGG
321  C W H G L T W Y Y I L Y G V Y H A C L M
961  TGCTGGCACGTTTGCAGTGGTACTATATCTTATATGGTGTATCATGCCTGTCTGATG
341  I I Y D A W K R M K K K H K W N I P D N
1021  ATCATTTATGATGCTTGAAGCGAATGAAGAAGAAGCATAAATGGAATATTCCTGATAAC
361  M W T R G A A I F I T F N A V M V S F L
1081  ATGTGGACAGTGGAGCTGCAATATTTACTTTTTAATGCGGTTATGGTTCAGTTTCCTC
381  I F S G I P N Y A I M H A I N G L G S P
1141  ATCTTTTCAGGAATCCCTAATTATGCCATAATGCACGCAATCAACGGACTTGGTAGTCCA
401  L P N F -
1201  TTACCTAATTTTAA
    
```

Los codones de iniciación y terminación de la traducción aparecen resaltados y subrayados en gris, respectivamente. La superposición del codón de inicio del gen *dltB* con el codón de parada del gen *dltA* en un par de bases se muestra encuadrada en negro.

Secuencia de nucleótidos del gen *dltC* de *L. garvieae* y secuencia de aminoácidos deducida

```

                                     ACAACAAAAGAA (AGAAG) AATAAAT
1   M K N E V L N I I E E V A G T D E F R E
1   ATGAAAAATGAAGTCTTAAATATCATTGAAGAAGTTGCTGGCACAGATGAGTTTCGTGAA
21  D L D M D L F E E G I L D S M R A I M L
61  GATTTAGATATGGATCTTTTTGAAGAAGGCATCCTTGGACTCGATGAGAGCAATTATGCTT
41  I V E L E N A F S L S L P P S E M D R D
121 ATTGTTGAAC TTGAAAATGCCTTTAGTTTGAGTTTACCACCTTCTGAAATGGATCGTGAC
61  D W N T A N K I A D R I K E K M D E E R
181 GACTGGAACACAGCAAATAAGATTGCCGATCGTATCA (AGGAA) AAGATGGATGAAGAAAGA
81  -
241 TAA

```

La secuencia teórica de unión al ribosoma está incluida entre paréntesis. Los codones de iniciación y terminación de la traducción aparecen resaltados y subrayados en gris, respectivamente.

Secuencia de nucleótidos del gen *dltD* de *L. garvieae* y secuencia de aminoácidos deducida

```

1   M K K D K V L Q E L A P L V A A L T L L
1   ATGAAGAAAGATAA SGTACTTCAAGAACTCGCCCTTTAGTTGCGGCCCTCACTTTATTG
21  G I L I F S P L T V F P K F N K H E L D
61  GGAATACTCATCTTTTCTCCTCTCACTGTTTTTCTAAGTTTAAATAAGATGAACTGGAT
41  E F A T D P K N R T G F V S Y A I K S Q
121 GAGTTTGCAGCTGATCCTAAGAAATCGGACAGGCTTTGTAAAGCTATGCGATTAAATCACAA
61  A F S N P H Y L P I L G S S E L E H I D
181 GCTTTCCTAATCCGCATTAATCTGCCTATTTTAGGCTCTTCTGAACTCGAACATATTGAT
81  P F H P S S F F M K N N K G F T P F L A
241 CCTTTTCATCCAAGTAGCTTCTTTATGAAAAATAATAAAGGTTTACGCCATTTCTAGCA
101 G Q P G T Q S L T H F F Y M N S V E K Q
301 GGGCAACCGGGTACCCCAATCCTTAACACACTTTTTCTATATGAATTCTGTGAAAAGCAA
121 L H N R K I V F I I S P Q W F T R K G I
361 TTGCATAACCGTAAGATCGTCTTTATTATCAGTCCACAGTGGTTACACGTAAAAGGGATT
141 G T P E L S Q F V S K G E I Y A W L Q S
241 GGTACCCTGAATTGAGTTAGTCTTGTCTCTAAAGGGGAAATATATGCGTGGTTACAATCT
161 A S P K D V A T Q K L A Q R L L N F K D
481 GCTTACCAAAAAGATGTCGCGACCCAAAACCTGCGCAACGCCCTTGAATTTTAAAGAT
181 F P C E D I V V T Q A L K A L A N G K K I
541 TTTCCGAGGATATTGTCGTTACCCCAAGCACTAAAAGCTCTAGCAAATGGTAAAAGAAAT
201 D S I D Q I S I Q L A N Q F W T K Q D F
601 GACAGCATCGACCAGATTTCCATTCAACTTGCAAATCAGTTCTGGACCAACAAGATTTT
221 L F T T G L S K L G G K Q E N S Y E K L G
661 CTTTTACAGGCTTATCAAAGCTTGGCGGTAAGCAAGAAAATTCATACGAAAAGCTAGGT
241 Q I S K Q L P N T K D F E Q L D Q A A Y
721 CAAATCAGTAAACAATTACCAATACAAAAGATTTGAACTGATCAAGCAGCATAAC
261 E R G A A T S A N N Q F Q I V D H V W S
781 GAACGGGAGCAGCAACTTCAAGCAATAATCAATTTCAAATTTGACCATGTGTGGTCA
281 R N L Q K V F K E R K D V M K E V S Y L
841 AGAAATCTTCAAAAAGCTTTAAAGAACGTAAAGACGTTATGAAAGAAGTGAGCTATCTA
301 R S P E Y L D F Q Q L L N Q F A K N N N
901 AGAAGTCCGGAATATCTTGTATTTTTCAGCAGCTTTTAAATCAATTTGCAAAAAATAACAAT
321 D V Q F V I P P V N G A W Y Q Y T G L S
961 GATGTTGAGTTTCGTCATTCCACCGGTAATGGAGCCTGGTATCAGTATACGGGACTCTCT
341 Y E M L Q E F S A K I K Y Q L N S Q G F
1021 TATGAGATGTTACAGGAGTTAGCGCAAAGATTAATATCAACTGAACAGCCAGGTTTC
361 H H I Y D M T D K F N E K Y Y I G D T I
1081 CATCACATCTATGACATGACCGATAAATCAATGAAAAGTACTATATTGGGGACACCATC
381 H L N N R G W V A L D K K I E E F M S H
1141 CATCTGAATAATCGTGGTTGGGTTGCTTTAGATAAAAAAATCGAGGAATTTATGAGTCAT

```

Anexo I

Continuación secuencia de nucleótidos del gen *dltD* de *L. garvieae* y secuencia de aminoácidos deducida

```
401 P T K T A Y K L D N A Q F L S T E W A N
1201 CCGACTAAAACAGCATATAAGCTCGACAATGCACAATTCCTTAGTACAGAATGGGCTAAT
421 G D K E V S L N S N K -
1261 GGGGACAAAGAAGTCTCTCTTAATAGTAATAAATAAAAAGAATAAAATAAAAACGACAAT
GGCTAATGTCGTTTTTTTTGTCCTT.....
```

Los codones de iniciación y terminación de la traducción aparecen resaltados y subrayados en gris, respectivamente. La superposición del codón de inicio del gen *dltD* con el codón de parada del gen *dltC* en 14 pares de bases se indica encuadrada en negro. Los nucleótidos correspondientes al lazo en horquilla y la cola de timinas del posible terminador de la transcripción identificado se muestran en negrita y color gris.



Contents lists available at ScienceDirect

Veterinary Microbiology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/vetmic



Short communication

dltA gene mutation in the teichoic acids alanylation system of *Lactococcus garvieae* results in diminished proliferation in its natural host

P. Reimundo, A. Menéndez, J. Méndez, D. Pérez-Pascual, R. Navais, E. Gómez, A.F. Braña, J.A. Guijarro*

Area de Microbiología, Departamento de Biología Funcional, Facultad de Medicina, IUBA, Universidad de Oviedo, 33006 Oviedo, Asturias, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 27 May 2009

Received in revised form 27 November 2009

Accepted 2 December 2009

Keywords:

*Lactococcus garvieae**dltA*

Host-limited replication

ABSTRACT

The *dltABCD* cluster is involved in the D-alanylation of teichoic acids in gram positive bacteria. In order to determine the role of this alanylation in the physiology and virulence of *Lactococcus garvieae*, a previously isolated *dltAΔTn917* signature tagged mutagenesis (STM) clone was analyzed. RT-PCR results revealed that *dltABCD* genes form an operon. No major differences could be established between the parental and mutant strains with respect to growth rate, autolytic properties, and susceptibility to acid conditions, lysozyme treatment, anionic detergents, or oxidant agents. However, the *dltA* mutant was more susceptible to nisin than the parental strain, with minimum inhibitory concentration (MIC) values of 8 and 16 μg/ml, respectively. Less proliferation of the mutant was observed in *in vivo* competence index experiments (CI = 0.08). Furthermore, the mutant strain had a 50% lethal dose (LD₅₀) 3-fold that of the parental strain. These results, together with the fact that the *dltAΔTn917* mutant was isolated as a STM clone, reveal that the *dltA* locus of *Lactococcus garvieae* is required for full growth and pathogenesis on rainbow trout.

© 2009 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Lactococcus garvieae is the etiological agent of lactococcosis that causes hyperacute, haemorrhagic septicaemia in many fish species the world over with special incidence in rainbow trout (*Onchorhynchus mykiss*) and yellowtail (*Seriola quinqueradiata*) aquaculture (Vendrell et al., 2006). Moreover, this microorganism is ubiquitous, as it has also been isolated in buffaloes suffering from mastitis (Teixeira et al., 1996) and even in humans, associated with bacterial endocarditis and with different tissue infections (Fihman et al., 2006; Li et al., 2008). This suggests that this bacterium might be considered an emerging pathogen and potential zoonotic agent.

Despite the importance of this pathogen, little is known about the molecular basis of its mechanisms of virulence.

According to several studies, the presence or absence of a capsule is a major determinant of virulence (Barnes et al., 2002) and putative siderophores have been reported in *Lactococcus garvieae* (Schmidtke and Carson, 2003).

dlt operon gene products reportedly participate in D-alanylation of teichoic acids in many gram positive bacteria (Neuhaus and Baddiley, 2003) and disturbances of this activity have been shown to produce a wide variety of phenotypic changes. Additionally, a correlation has been established between D-alanylation of teichoic acids and virulence in *Listeria monocytogenes* (Abachin et al., 2002), *Streptococcus agalactiae* (Poyart et al., 2003), and *Staphylococcus aureus* (Collins et al., 2002).

Here we report the identification and sequence of the *dlt* loci in *Lactococcus garvieae*. RT-PCR analyses have indicated that said genes form a *dltABCD* operon. Characterization of a *dltAΔTn917* mutant showed that the bacterium presents an alteration of the cell surface charge and increased susceptibility to nisin in comparison to the parental strain. Furthermore, the growth capacity of the

* Corresponding author. Tel.: +34 985104218; fax: +34 985103148.
E-mail address: jaga@fq.uniovi.es (J.A. Guijarro).

bacterium was severely impaired in rainbow trout, its natural host.

2. Materials and methods

2.1. Bacterial strains and culture conditions

The strains used in this study were *Lactococcus garvieae* UNIUD074 (obtained from Dr L. Gusmani, University of Udine, Italy) and mutant XVIII (Menéndez et al., 2007). *Lactococcus garvieae* strains were routinely cultured at 20 °C in brain heart infusion (BHI) broth (Difco). Erythromycin, 1 µg/ml, was added to the medium when growing mutant XVIII. BHI plates contained 2% agar.

2.2. DNA manipulation

Chromosomal DNA extraction was conducted using the GenElute Bacterial Genomic DNA kit (Sigma–Aldrich Co.) following the manufacturer's instructions. Routine DNA manipulation was performed as described by Sambrook and Russell (2001). Phage T4 DNA ligase, calf intestinal alkaline phosphatase, and restriction enzymes were purchased from Amersham, and oligonucleotides were from Sigma–Aldrich Co.

2.3. Identification of genomic regions flanking Tn917 insertion in mutant XVIII

Tn917 insertion in mutant XVIII occurred in a gene encoding a protein homologous to DltA (Menéndez et al., 2007). The inverse PCR method (IPCR) was used to amplify Tn917-DNA flanking regions. *Lactococcus garvieae* UNIUD074 genomic DNA was digested with PstI at 37 °C for 5 h. The digested DNA was then circularized at 16 °C overnight and the reaction mix was used as the template for IPCR under the following conditions: 10 min of denaturation at 94 °C, 35 1-min cycles at 94 °C, 1 min at 60 °C, and 10 min at 72 °C, followed by 10 min of final extension at 72 °C. Primers dltA1: 5' GGTTCCACCCGTGTCAAGC 3' and dltA2: 5' GCTATCACAAGTATTCA 3', designed from the known *dltA* sequence of *Lactococcus garvieae* (Menéndez et al., 2007), were used in the amplification process. The PCR product was purified with the GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit (GE Healthcare) and the sequence was obtained in an ABI Prism 310A automated DNA sequencer from Perkin-Elmer, according to the manufacturer's instructions, at the facilities' of the Universidad de Oviedo. Sequence analysis was performed using the BLASTX computer program (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>).

2.4. RNA isolation and RT-PCRs

Total RNA was obtained from 2 ml overnight cultures of parental and mutant strains grown in BHI. RNA was isolated using an RNeasy Mini Kit (QIAGEN, Valencia, CA) and treated with DNase I-RNase-free (Ambion Inc.) to eliminate traces of DNA. Reverse transcriptions (RT-PCRs) were performed using Superscript One-Step with Platinum Taq (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA). Seventy

nanograms of RNA were used in each reaction. Control PCRs using Platinum Taq DNA polymerase (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA) were carried out to determine whether RNA was free of contaminant DNA and negative controls were included in each run by omitting the reverse transcription step. The primers used for RT-PCR reactions are listed in Table 1.

2.5. Alcian blue binding assay

The binding capacity of the cationic colorant Alcian blue to both strains was determined using the method described by Chan et al. (2007) with slight modifications. Briefly put, cells grown in BHI and adjusted to an optical density (OD) at 600 nm of 0.4, were harvested and washed once by centrifugation (10,000 × g for 5 min) with 20 mM morpholinepropanesulfonic acid (MOPS) buffer (pH 7). The cells were resuspended in MOPS buffer to a final OD at 600 nm of 0.4, and the cationic dye Alcian blue 8GX (Sigma Aldrich Co.) was added to a final concentration of 250 µg/ml. Samples were rotated at room temperature. After 10 min, the mixtures were centrifuged to pellet the bacteria and the unbound Alcian blue present in the supernatants was measured at OD₆₁₅ nm. In parallel, tubes containing the same amount of Alcian blue in MOPS buffer but without bacteria were treated in identical manner as controls. The amount of Alcian blue bound to the bacteria was calculated as (OD₆₁₅ of control supernatant – OD₆₁₅ of sample supernatant)/OD₆₁₅ of control supernatant × 100. Each experiment was carried out three times.

2.6. Antimicrobial susceptibility test

Antimicrobial susceptibility tests were performed according to the broth microdilution methods described by the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2006). Three antimicrobial agents were used: nisin (0.0156–16 µg/ml), vancomycin (0.0156–16 µg/ml), and sodium colistimethate (16–4096 µg/ml). Antibacterial agents were serially diluted twice in cation-adjusted Mueller-Hinton broth (CAMHB) in U-bottom 96-well microtiter plates. For inoculation, 0.5 McFarland suspensions of the isolates were diluted 10-fold with CAMHB. Diluted inocula (5 µl) were added to each microtiter well and incubated at 28 °C for 24 h. Each panel contained a negative control well without antibiotics or inoculum. The lowest concentration of antibiotic that visibly inhibited bacterial growth was regarded as the MIC (CLSI, 2006). Currently, no criteria have been established for interpreting

Table 1
Primers used for RT-PCR reactions.

Primer	Sequence	Gene
1F	5' GTAACGGGATTGATAGCGGTC 3'	<i>dltA</i>
1R	5' CGGAAACGATCAATGGCCC 3'	<i>dltB</i>
2F	5' GGTGTTTATCATGCCTGTCTG 3'	<i>dltB</i>
2R	5' TGTTCCGAGTTCAGAAGGCCT 3'	<i>dltD</i>
3F	5' AGCCAAGAGGAGACAACG 3'	<i>dltA</i>
3R	5' CAACTCGATTCTAAAAC 3'	<i>dltA</i>
4F	5' GCTCTACCGCACTATCGAA 3'	<i>dltB</i>
4R	5' CAGACAGGCATGATAAACCC 3'	<i>dltB</i>

MIC test results in aquatic pathogens (resistant, intermediate, or susceptible breakpoints). Each experiment was carried out three times.

2.7. Competition experiments and LD₅₀ determination

For each *in vivo* experiment, rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* weighing between 10 and 15 g) were obtained from a commercial fish farm and the animals were maintained in 60-l plastic tanks supplied with well-aerated dechlorinated water at 18 °C.

For *in vivo* competition assays, parental strain UNIUD074 and mutant XVIII were grown separately in BHI at 20 °C and adjusted to an OD at 600 nm of 0.5 (10⁸ CFU/ml). Bacteria were harvested and washed in phosphate-buffered saline (PBS) and mutant XVIII was mixed with the parental strain. Dilutions of the resultant suspension were plated onto BHI (to measure total CFU) and BHI with erythromycin (to determine mutant CFU). From this, the exact mutant to parental input ratio was calculated. A sample of 10⁴ CFU of the mixed suspension in 0.1 ml was used to infect 10 rainbow trout by intraperitoneal injection. After 72 h, three animals were killed and dissected, and the liver and spleen were homogenized in BHI with a stomacher. Homogenates were plated onto selective media to determine the mutant to parental output ratio. CI is defined as the output ratio (mutant/parental) divided by the input ratio (mutant/parental). Each experiment was carried out twice.

For 50% lethal dose (LD₅₀) determinations, groups of 10 fish were challenged by intraperitoneal injection of 0.1-ml serial 10-fold dilutions of exponential-phase cultures of the strains *Lactococcus garvieae* UNIUD074 and mutant XVIII corresponding to a range of 10²–10⁷ CFU. The microorganisms were previously washed and resuspended in PBS. A group of 10 fish injected with 0.1 ml of PBS was used as controls. Mortality of the fish was recorded over a period of 7 days post-injection and some dead specimens were removed and dissected for routine bacteriological examination. Samples of the spleens and livers were plated onto BHI and BHI with erythromycin; PCR analysis confirmed that *Lactococcus garvieae* colonies were present. Each experiment was carried out twice and LD₅₀ were calculated 3 days post-injection using Reed and Muench's statistical approach (1938). All of the animal experiments were conducted in compliance with European legislation governing animal welfare and were authorized and supervised by the Animal Experimentation Ethics Committee from the Oviedo University.

2.8. Nucleotide sequence accession number

The sequence accession number for the *dlt* genes in the GenBank database is FJ973474.

3. Results and discussion

The application of STM to *Lactococcus garvieae* UNIUD074 led to the identification of 29 mutants that could not be recovered from rainbow trout following infection (Menéndez et al., 2007). Among them, mutant

XVIII, which showed a single Tn917 insertion in a *dltA* gene homologue, underwent further analysis. The IPCR method was used to amplify the Tn917-DNA flanking regions. Sequence analysis of the amplicon obtained led to the identification of a 4700-bp DNA segment containing five open reading frames (ORF), all in the same direction. The deduced amino acid sequence of the first ORF revealed 39% identity to the hypothetical protein L170548 of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* II1403 (accession number NP267886). This protein has an alpha/beta hydrolase domain whose function has yet to be characterized and is encoded by the *yriC* gene. The products of the transduction of the other four ORFs disclosed significant identities to the proteins encoded by the *dlt* region, which has been seen to be involved in the D-alanylation of teichoic acids in many gram positive bacteria. These proteins are: DltA (with 62% identity to the DltA protein of *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* MG1363), DltB, DltC, and DltD (revealing an identity of 69%, 80%, and 49% to the DltB, DltC and DltD proteins of *L. lactis* subsp. *lactis* II1403, respectively). *dltA* gene product is a protein containing 501 amino acids (accession number FJ973474); the Tn917 transposon insertion into the gene occurred in the coding sequence at amino acid position 363. This means that the Tn917 insertion site precedes two of the three regions proposed by Heaton and Neuhaus (1992) as being essential to *dltA* gene function. In order to examine the possibility of there being more than one copy of the *dlt* genes, Southern Blot analysis of BamHI digested genomic DNA from *Lactococcus garvieae* UNIUD074 was conducted using an internal labelled PCR *dltA* generated fragment as a probe. A single hybridization band was observed suggesting the presence of a single locus for the *dlt* operon (data not shown). The *dltABCD* cluster in *Lactococcus garvieae* is flanked by two transcriptional terminators (Fig. 1a). Analysis of *dltABCD* genetic organization showed that *dltB* overlaps the stop codon of *dltA* by 1 bp, whereas *dltB* and *dltC* are separated by 24 bp and *dltD* overlaps the stop codon of *dltC* by 14 bp. Therefore, a translation coupling mechanism previously described in other *dlt* operons may be also present in *Lactococcus garvieae* to provide coordinated synthesis of Dlt proteins. However, it is worth noting that presumed ribosome binding sites (RBS) preceded the *dltA* (GGAG), *dltB* (GGAGG), *dltC* (GAAG), and *dltD* (GGA) start codons (Fig. 1a). Hence, the *dltABCD* gene translation in *Lactococcus garvieae* might also be specific for each gene and independent from the preceding genes. This putative RBS configuration is also present in the *dlt* operon of *L. lactis* (accession number AE008562) and *S. agalactiae* (accession number AJ291784). Further experiments are needed to determine the translational process of the *dlt* operon.

The small size of the intergenic spaces, together with the presence of putative transcriptional terminators flanking the *dltABCD* gene cluster of *Lactococcus garvieae*, suggested that it might be transcribed as a single unit as occurs in other gram positive bacteria. This was confirmed by RT-PCR analyses using the primers listed in Table 1. Fragments corresponding to the overlapping regions of the *dltABCD* genes were amplified when RNA from the parental strain *Lactococcus garvieae* UNIUD074 was used (Fig. 1b),

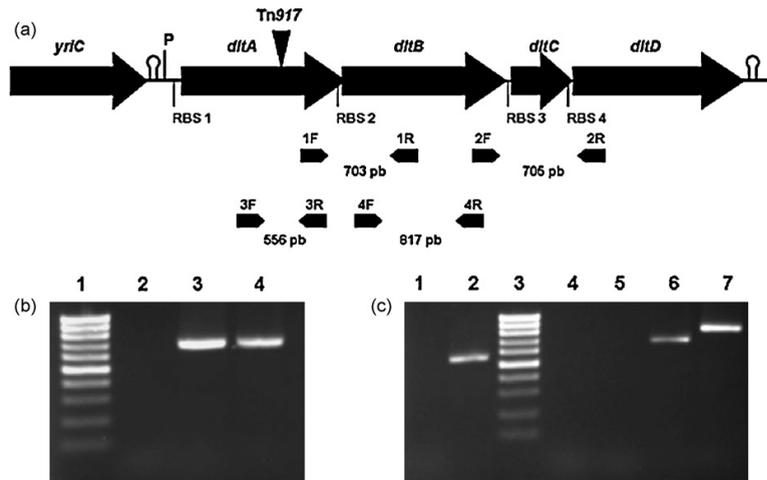


Fig. 1. RT-PCR analysis showing transcriptional organization of the genomic *dltABCD* regions flanking Tn917 insertion. (a) The orientation of the genes and the location of the primers used for RT-PCR amplifications are shown. P, putative promoter region contains a -10 "TTTAAT" and a -35 "AAGACA" sequences; RBS, putative ribosome binding site; stem-loop structure, putative transcriptional terminator. The insertion site of transposon Tn917 in *dltA* locus of mutant XVIII is also indicated. (b) RT-PCR of *Lactococcus garvieae* parental strain using primers 1F and 1R (lane 3), and 2F and 2R (lane 4). (c) RT-PCR of *Lactococcus garvieae* parental (lane 2) and mutant (lane 5) strains using primers 3F and 3R to confirm the Tn917 interruption of *dltA* locus in mutant XVIII. RT-PCR of mutant strain using primers 1F and 1R (lane 6) and 4F and 4R (lane 7) to analyze whether the *dltA* mutation has a polar effect or not. Lanes 1 (b) and 3 (c) correspond to a 100 bp molecular weight marker. Lanes 2 (b), 1 (c), and 4 (c), negative controls included in each run by omitting the reverse transcription step to determine whether RNA was free of contaminant DNA.

revealing that the *dlt* loci form an operon. When RNA from the *dltA*ΔTn917 strain was used in RT-PCR analysis, the *dltA* gene was not amplified (Fig. 1c). Nevertheless, amplifications were obtained corresponding to the overlapping region *dltA*-*dltB* and to an internal region of the *dltB* locus (Fig. 1c). This indicates that the *dltA* mutation resulting from the Tn917 insertion does not have a polar effect. It could be due to the fact that the transposon Tn917 has some kind of promoter activity. Thus, Dobinsky et al. (2002) observed that transposon Tn917 allowed transcriptional read-through into downstream located genes when Tn917 inserted in the same transcriptional direction as those genes, as occurred in the *dltA*ΔTn917 strain. However, the translational coupling may compromise the expression of *dltA* downstream genes.

In several previous studies, defects in the D-alanylation of teichoic acids were hypothesized to result in a more negative cell surface charge, since the positively charged amino groups of D-alanyl esters partially antagonize the negative charges of the backbone phosphate groups (Neuhaus and Baddiley, 2003). To examine this, the binding capacity of cationic dye Alcian blue to both strains was determined following the method previously described by Chan et al. (2007). The results from the Alcian blue binding assay revealed that the mutant has an increased negative surface charge. Therefore, the *dltA*ΔTn917 strain bound $89.9\% \pm 1.15$ of the Alcian blue versus $80.48\% \pm 2.44$ in the case of the parental strain. These values differ statistically ($P < 0.05$) and are similar to the ones found in the Alcian blue binding assay of *Streptococcus gordonii* *dltA* mutants (Chan et al., 2007). These results are also consistent with those obtained in the cytochrome c

binding assay of *Bacillus subtilis* *dlt* mutants (Wecke et al., 1997), which reflected an increase in anionic binding sites on the bacterial surface, indicating that the cell's surface charge had been modified considerably.

Teichoic acids are expected to bear a higher negative charge if defects in D-alanyl substitutions occur; consequently, *dlt* mutants in several gram positive bacterial species exhibit enhanced sensitivity to antimicrobial cationic peptides (Peschel et al., 1999; Kristian et al., 2005; Kovacs et al., 2006; Perea Vélez et al., 2007). Thus, the parental and *dltA* mutant strains were tested for susceptibility to the antibiotics nisin, vancomycin, and sodium colistimethate. Thanks to their increased negative cell surface charge, *dlt* mutants bind positively charged compounds such as the cationic antimicrobial nisin more avidly, resulting in increased sensitivity. Accordingly, the MIC determination of nisin showed that the *dltA* mutant is more sensitive to the antibiotic than the parental strain, with values of 8 and 16 $\mu\text{g/ml}$, respectively. Sensitivity to nisin in gram positive bacteria depends on different mechanisms. Thus, in *S. aureus*, the absence of D-alanylation leads to increased sensitivity to nisin (Peschel et al., 1999), albeit not in *Listeria monocytogenes* (Davies et al., 1996) or in *Streptococcus bovis* (Mantovani and Russell, 2001). On the contrary, no differences were observed in MIC values between parental and mutant strains for vancomycin (MIC 0.5 $\mu\text{g/ml}$) and sodium colistimethate (MIC 4096 $\mu\text{g/ml}$). It should be noted that gram positive bacteria are less susceptible than gram negative bacteria to sodium colistimethate and other polymyxin antibiotics due to the protective effect of their cell wall. On the other hand, other cell surface modifications may also contribute to resistance

to antimicrobial peptides. Similarly, deacetylation of the hexosamine residues of the peptidoglycan by *PgdA* introduces positive charges into murein in *Streptococcus pneumoniae* (Vollmer and Tomasz, 2000) and the modification of anionic membrane lipids with L-lysine by *MprF* decreases the negative charge of the membrane surface in *S. aureus* (Peschel et al., 2001). Thus, a group of several mechanisms may be responsible for conferring overall resistance to antimicrobial peptides and the role D-alanylation of teichoic acids plays in resistance may vary considerably from one bacterial species to another (Peschel et al., 1999; Abachin et al., 2002; Poyart et al., 2003).

Comparison of the growth curves of the parental and *dltAΔTn917* strains showed no differences (data not shown). No differences were detected in their autolytic properties either as per the induced autolysis assay described by Perea Vélez et al. (2007) (data not shown). Likewise, both strains behaved identically when grown on BHI media under acid conditions and presented equal MIC values to lysozyme, SDS, and H₂O₂ (data not shown). These results contrast those of previous reports that reported differences in growth rates (Clemans et al., 1999), induced autolysis (Walter et al., 2007), and sensitivity to acid conditions (Walter et al., 2007), lysozyme (Giaouris et al., 2008), anionic detergents (Perea Vélez et al., 2007), or oxidant agents between parental strains and *dlt* mutants of gram positive bacteria.

Transmission electron microscopy was performed with cells collected in exponential growth and late stationary phases. No dramatic changes in cell morphology were seen in the *dltAΔTn917* mutant strain populations, as occurs in *Lactobacillus plantarum* (Palumbo et al., 2006), although some cells presented irregular shapes which were not observed in the parental strain populations (Fig. 2). This variety of physiological differences between *dlt* mutants and parental strains is observed in other gram positive bacteria (Kovacs et al., 2006; Fittipaldi et al., 2008), given that, while it is apparent that the D-alanyl esters of teichoic acids play an important role in the physiology of the individual species, there is no single phenotype common to all the species examined (Neuhaus and Baddiley, 2003).

Despite the absence of any salient physiological changes related to the inactivation of the *dltA* gene, experiments using rainbow trout made it possible to evaluate the specific

contribution of D-alanylation of teichoic acids to *Lactococcus garvieae* pathogenesis. CI constitutes an alternative measuring tool to evaluate the degree of growth due to a given mutation in mutant and parental strain coinfections. A value of 0.082 ± 0.1 was obtained in the *in vivo* competition experiments. This result clearly establishes that the mutant strain has significantly greater difficulty growing inside the host than the parental strain.

The mean LD₅₀ values obtained for the parental and mutant strains were 5.2×10^3 and 4.2×10^6 CFU per fish, respectively. Furthermore, following a 7-day post-injection period, mean survival rates indicated that fish infected with the mutant strain survived longer than those infected with the parental strain (data not shown). This demonstrates that the 3-fold LD₅₀ value of the *dltAΔTn917* mutant strain versus the parental strain, is not a consequence of attenuated virulence, but rather is due to the bacterium's limited capacity for replication within the host. It is tempting to speculate that this might be a consequence of greater sensitivity of the mutant strain to the peptide antibiotics called cathelicidins, which are produced by rainbow trout and are involved in the innate immune response of the fish (Chang et al., 2006). Because they are not commercially available as yet, they could not be assayed in MIC experiments.

Dlt mutants of different gram positive pathogens have been described as highly susceptible to death by neutrophils and/or by macrophages (Abachin et al., 2002; Poyart et al., 2003; Kristian et al., 2005; Weidenmaier et al., 2005; Chan et al., 2007) and present reduced biofilm formation (Gross et al., 2001) or adherence (Abachin et al., 2002; Kristian et al., 2005). Furthermore, D-alanylation of teichoic acids has been seen to contribute to virulence in several gram positive bacteria in surrogate models of infection (Abachin et al., 2002; Collins et al., 2002; Poyart et al., 2003; Weidenmaier et al., 2005), but only one *dltA* mutant of *Streptococcus suis* was tested in its natural host (Fittipaldi et al., 2008). Therefore, D-alanylation of teichoic acids may be involved in virulence in bacteria by means of a combined action, interfering with the host's innate immune clearance mechanisms and facilitating bacterial penetration through the natural host's barriers. In this study we report what is, to our knowledge, the first

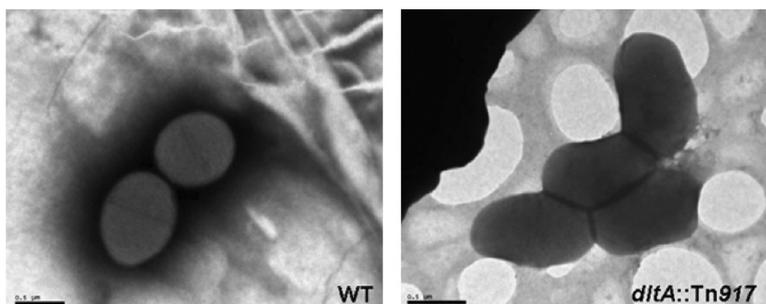


Fig. 2. Cell morphology of the parental (WT) and *dltAΔTn917* strains. Transmission electron microscopy was performed with cells collected in exponential growth and late stationary phases. Cell samples were washed once with Tris–HCl buffer 0.1 M, pH 7.5 and resuspended in the same buffer. The samples were observed on a MET JEOL-2000 EX-II transmission electron microscope after 4% uranyl acetate staining. Some cells in the mutant populations presented slightly irregular shapes. Bars: 0.5 μm WT and *dltAΔTn917*.

evidence of the importance of D-alanylation of teichoic acids in the pathogenesis of *Lactococcus garvieae*.

Acknowledgements

This work was supported by a grant from the Ministry of Science and Innovation (MICINN) of Spain (AGL2006-07562). J. Méndez was the recipient of a grant from the University of Oviedo. P. Reimundo, D. Pérez-Pascual, R. Navais and E. Gómez were recipients of predoctoral fellowships from the MICINN. We thank Dr. L. Gusmani from the University of Udine, Italy, for donating the *Lactococcus garvieae* UNIUD074 strain, C. Álvarez for his help in performing the transmission electron microscopy work and L. Erice for correcting the manuscript.

References

- Abachin, E., Poyart, C., Pellegrini, E., Milohanic, E., Fiedler, F., Berche, P., Trieu-Cuot, P., 2002. Formation of D-alanyl-lipoteichoic acid is required for adhesion and virulence of *Listeria monocytogenes*. *Mol. Microbiol.* 43, 1–14.
- Barnes, A.C., Guyot, C., Hanse, B.G., Mackenzie, K., Horn, M.T., Ellis, A.E., 2002. Resistance to serum killing may contribute to differences in the abilities of capsulate and non-capsulate isolates of *Lactococcus garvieae* to cause disease in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* L.). *Fish Shellfish Immunol.* 12, 155–168.
- Chan, K.G., Mayer, M., Davis, E.M., Halperin, S.A., Lin, T.J., Lee, S.F., 2007. Role of D-alanylation of *Streptococcus gordonii* lipoteichoic acid in innate and adaptive immunity. *Infect. Immun.* 75, 3033–3042.
- Chang, C.I., Zhang, Y.A., Zou, J., Nie, P., Secombes, C.J., 2006. Two cathelicidin genes are present in both rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and atlantic salmon (*Salmo salar*). *Antimicrob. Agents Chemother.* 50, 185–195.
- Clemans, D.L., Kolenbrander, P.E., Debabov, D.V., Zhang, Q., Lunsford, R.D., Sakone, H., Whittaker, C.J., Heaton, M.P., Neuhaus, F.C., 1999. Insertional inactivation of genes responsible for the D-alanylation of lipoteichoic acid in *Streptococcus gordonii* DL1 (Challis) affects intragenetic coaggregations. *Infect. Immun.* 67, 2464–2474.
- Clinical and Laboratory Standards Institute, 2006. *Methods for Broth Dilution Susceptibility Testing of Bacteria Isolated from Aquatic Animals*: Approved Guideline M49-A. CLSI, Waune, PA, USA.
- Collins, L.V., Kristian, S.A., Weidenmaier, C., Faigle, M., Van Kessel, K.P., Van Strijp, J.A., Gotz, F., Neumeister, B., Peschel, A., 2002. *Staphylococcus aureus* strains lacking D-alanine modifications of teichoic acids are highly susceptible to human neutrophil killing and are virulence attenuated in mice. *J. Infect. Dis.* 186, 214–219.
- Davies, E.A., Falahee, M.B., Adams, M.R., 1996. Involvement of the cell envelope of *Listeria monocytogenes* in the acquisition of nisin resistance. *J. Appl. Bacteriol.* 81, 139–146.
- Dobinsky, S., Bartscht, K., Mack, D., 2002. Influence of Tn917 insertion on transcription of the *icaADBC* operon in six biofilm-negative transposon mutants of *Staphylococcus epidermidis*. *Plasmid* 47, 10–17.
- Fihman, V., Raskine, L., Barrou, Z., Kiffel, C., Riabi, J., Bercot, B., Sanson-Le Pors, M.J., 2006. *Lactococcus garvieae* endocarditis: identification by 16S rRNA and *sodA* sequence analysis. *J. Infect.* 52, 3–6.
- Fittipaldi, N., Sekizaki, T., Takamatsu, D., Harel, J., Dominguez-Punaro Mde, L., Von Aulock, S., Draing, C., Marois, C., Kobisch, M., Gottschalk, M., 2008. D-Alanylation of lipoteichoic acid contributes to the virulence of *Streptococcus suis*. *Infect. Immun.* 76, 3587–3594.
- Giaouris, E., Briandet, R., Meyrand, M., Courtin, P., Chapot-Chartier, M.P., 2008. Variations in the degree of D-alanylation of teichoic acids in *Lactococcus lactis* alter resistance to cationic antimicrobials but have no effect on bacterial surface hydrophobicity and charge. *Appl. Environ. Microbiol.* 74, 4764–4767.
- Gross, M., Cramton, S.E., Gotz, F., Peschel, A., 2001. Key role of teichoic acid net charge in *Staphylococcus aureus* colonization of artificial surfaces. *Infect. Immun.* 69, 3423–3426.
- Heaton, M.P., Neuhaus, F.C., 1992. Biosynthesis of D-alanyl-lipoteichoic acid: cloning, nucleotide sequence, and expression of the *Lactobacillus casei* gene for the D-alanine-activating enzyme. *J. Bacteriol.* 174, 4707–4717.
- Kovacs, M., Halfmann, A., Fedtke, I., Heintz, M., Peschel, A., Vollmer, W., Hakenbeck, R., Bruckner, R., 2006. A functional *dlt* operon, encoding proteins required for incorporation of D-alanine in teichoic acids in gram-positive bacteria, confers resistance to cationic antimicrobial peptides in *Streptococcus pneumoniae*. *J. Bacteriol.* 188, 5797–5805.
- Kristian, S.A., Datta, V., Weidenmaier, C., Kansal, R., Fedtke, I., Peschel, A., Gallo, R.L., Nizet, V., 2005. D-Alanylation of teichoic acids promotes group A streptococcus antimicrobial peptide resistance, neutrophil survival, and epithelial cell invasion. *J. Bacteriol.* 187, 6719–6725.
- Li, W.K., Chen, Y.S., Wann, S.R., Liu, Y.C., Tsai, H.C., 2008. *Lactococcus garvieae* endocarditis with initial presentation of acute cerebral infarction in a healthy immunocompetent man. *Intern. Med.* 47, 1143–1146.
- Mantovani, H.C., Russell, J.B., 2001. Nisin resistance of *Streptococcus bovis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 67, 808–813.
- Menéndez, A., Fernández, L., Reimundo, P., Guijarro, J.A., 2007. Genes required for *Lactococcus garvieae* survival in a fish host. *Microbiology* 153, 3286–3294.
- Neuhaus, F.C., Baddiley, J., 2003. A continuum of anionic charge: structures and functions of D-alanyl-teichoic acids in gram-positive bacteria. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 67, 686–723.
- Palumbo, E., Deghorain, M., Cocconcelli, P.S., Kleerebezem, M., Geyer, A., Hartung, T., Morath, S., Hols, P., 2006. D-alanyl ester depletion of teichoic acids in *Lactobacillus plantarum* results in a major modification of lipoteichoic acid composition and cell wall perforations at the septum mediated by the *Acm2* autolysin. *J. Bacteriol.* 188, 3709–3715.
- Perea Vélez, M., Verhoeven, T., Draing, C., Von Aulock, S., Pfitzenmaier, M., Geyer, A., Lambrechts, I., Grangette, C., Pot, B., Vanderleyden, J., De Keersmaecker, S., 2007. Functional analysis of D-alanylation of lipoteichoic acid in the probiotic strain *Lactobacillus rhamnosus* GG. *Appl. Environ. Microbiol.* 73, 3595–3604.
- Peschel, A., Jack, R.W., Otto, M., Collins, L.V., Staubitz, P., Nicholson, G., Kalbacher, H., Nieuwenhuizen, W.F., Jung, G., Tarkowski, A., van Kessel, K.P., van Strijp, J.A., 2001. *Staphylococcus aureus* resistance to human defensins and evasion of neutrophil killing via the novel virulence factor MprF is based on modification of membrane lipids with L-lysine. *J. Exp. Med.* 193, 1067–1076.
- Peschel, A., Otto, M., Jack, R.W., Kalbacher, H., Jung, G., Gotz, F., 1999. Inactivation of the *dlt* operon in *Staphylococcus aureus* confers sensitivity to defensins, protergins, and other antimicrobial peptides. *J. Biol. Chem.* 274, 8405–8410.
- Poyart, C., Pellegrini, E., Marceau, M., Baptista, M., Jaubert, F., Lamy, M., Trieu-Cuot, P., 2003. Attenuated virulence of *Streptococcus agalactiae* deficient in D-alanyl-lipoteichoic acid is due to an increased susceptibility to defensins and phagocytic cells. *Mol. Microbiol.* 49, 1615–1625.
- Reed, L.J., Muench, H., 1938. A simple method of estimating fifty percent endpoints. *Am. J. Hyg.* 27, 493–497.
- Sambrook, J., Russell, D., 2001. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY.
- Schmidtke, L., Carson, J., 2003. Antigen recognition by rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) of whole cell proteins expressed by *Lactococcus garvieae* when obtained directly from fish and under iron limited culture conditions. *Vet. Microbiol.* 93, 63–71.
- Teixeira, L., Merquior, V., Vianni, M., Carvalho, M., Fracalanza, S., Steigerwalt, A., Brenner, D., Facklam, R., 1996. Phenotypic and genotypic characterization of atypical *Lactococcus garvieae* strains isolated from water buffalos with subclinical mastitis and confirmation of *L. garvieae* as a senior subjective synonym of *Enterococcus seriolicida*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 46, 664–668.
- Vendrell, D., Balcázar, J., Ruiz-Zarzueta, I., de Blas, I., Gironés, O., Múzquiz, J., 2006. *Lactococcus garvieae* in fish: a review. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* 29, 177–198.
- Vollmer, W., Tomasz, A., 2000. The *pgdA* gene encodes for a peptidoglycan N-acetylglucosamine deacetylase in *Streptococcus pneumoniae*. *J. Biol. Chem.* 275, 20496–20501.
- Walter, J., Loach, D., Alqumber, M., Rockel, C., Hermann, C., Pfitzenmaier, M., Tannock, G., 2007. D-alanyl ester depletion of teichoic acids in *Lactobacillus reuteri* 100-23 results in impaired colonization of the mouse gastrointestinal tract. *Environ. Microbiol.* 9, 1750–1760.
- Wecke, J., Madela, K., Fischer, W., 1997. The absence of D-alanine from lipoteichoic acid and wall teichoic acid alters surface charge, enhances autolysis and increases susceptibility to methicillin in *Bacillus subtilis*. *Microbiology* 140, 2953–2960.
- Weidenmaier, C., Peschel, A., Xiong, Y., Kristian, S., Dietz, K., Yeaman, M., Bayer, A., 2005. Lack of wall teichoic acids in *Staphylococcus aureus* leads to reduced interactions with endothelial cells and to attenuated virulence in a rabbit model of endocarditis. *J. Infect. Dis.* 191, 1771–1777.

Application of suppressive subtractive hybridization to the identification of genetic differences between two *Lactococcus garvieae* strains showing distinct differences in virulence for rainbow trout and mouse

Pilar Reimundo,¹ Amable J. Rivas,² Carlos R. Osorio,² Jéssica Méndez,¹ David Pérez-Pascual,¹ Roberto Navais,¹ Esther Gómez,¹ Miguel Sotelo,³ Manuel L. Lemos² and José A. Gujjarro¹

Correspondence
José A. Gujjarro
jaga@fq.uniovi.es

¹Área de Microbiología, Departamento de Biología Funcional, Facultad de Medicina, IUBA, Universidad de Oviedo, 33006 Oviedo, Spain

²Departamento de Microbiología y Parasitología, Instituto de Acuicultura, Universidad de Santiago de Compostela, 15782 Santiago de Compostela, Spain

³Biomar Iberia, Apdo 16, 34210 Dueñas, Palencia, Spain

Lactococcus garvieae is the causative microbial agent of lactococcosis, an important and damaging fish disease in aquaculture. This bacterium has also been isolated from vegetables, milk, cheese, meat and sausages, from cow and buffalo as a mastitis agent, and even from humans, as an opportunistic infectious agent. In this work pathogenicity experiments were performed in rainbow trout and mouse models with strains isolated from human (*L. garvieae* HF) and rainbow trout (*L. garvieae* UNIUDO74; henceforth referred to as 074). The mean LD₅₀ value in rainbow trout obtained for strain 074 was $2.1 \times 10^2 \pm 84$ per fish. High doses of the bacteria caused specific signs of disease as well as histological alterations in mice. In contrast, strain HF did not prove to be pathogenic either for rainbow trout or for mice. Based on these virulence differences, two suppressive subtractive hybridizations were carried out to identify unique genetic sequences present in *L. garvieae* HF (SSH1) and *L. garvieae* 074 (SSHII). Differential dot-blot screening of the subtracted libraries allowed the identification of 26 and 13 putative ORFs specific for *L. garvieae* HF and *L. garvieae* 074, respectively. Additionally, a PCR-based screening of 12 of the 26 HF-specific putative ORFs and the 13 074-specific ones was conducted to identify their presence/absence in 25 *L. garvieae* strains isolated from different origins and geographical areas. This study demonstrates the existence of genetic heterogeneity within *L. garvieae* isolates and provides a more complete picture of the genetic background of this bacterium.

Received 28 December 2010
Revised 31 March 2011
Accepted 1 May 2011

INTRODUCTION

Lactococcus garvieae is a ubiquitous and widely distributed bacterium. It is known mainly for being the aetiological agent of lactococcosis, an important fish infection which causes great economic losses in the aquaculture industry worldwide. Many cultured fish species including rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*), olive flounder (*Paralichthys olivaceus*), Japanese amberjack (*Seriola quinqueradiata*) and black rockfish (*Sebastes* sp.) are affected by this Gram-positive bacterium. Besides cultured fish, the bacterium has

been isolated from fermented fish products (Kopermsub & Yunchalard, 2010; Paludan-Müller *et al.*, 2002), dairy products from raw milk of different ruminants (Villani *et al.*, 2001), vegetables (Kawanishi *et al.*, 2007), cheeses (Alegria *et al.*, 2009; El-Baradei *et al.*, 2007; Flórez & Mayo, 2006; Fortina *et al.*, 2007), meat and sausages (Ammor *et al.*, 2004; Barakat *et al.*, 2000; Dávila *et al.*, 2006; Rantsiou *et al.*, 2005), cows and buffaloes with mastitis (Carvalho *et al.*, 1997; Devriese *et al.*, 1999; Teixeira *et al.*, 1996), cat and dog tonsils (Pot *et al.*, 1996), and even humans, as a component of the intestinal biota (Kubota *et al.*, 2010), and as an opportunistic pathogen (Aubin *et al.*, 2011; Chan *et al.*, 2011; Elliott *et al.*, 1991; Fefer *et al.*, 1998; Fihman *et al.*, 2006; Furutan *et al.*, 1991; James *et al.*, 2000; Mofredj *et al.*, 2000; Vinh *et al.*, 2006; Wang

Abbreviation: SSH, suppressive subtractive hybridization.

The GenBank/EMBL/DDBJ accession numbers for the sequences reported in this paper are given in Tables 3 and 4.

et al., 2007; Wilbring *et al.*, 2011; Zuily *et al.*, 2011). According to this, *L. garvieae* is considered as a potential zoonotic micro-organism, although its incidence in this sense has still not been demonstrated (Vendrell *et al.*, 2006).

During recent years, various typing methods have been applied to the study of genetic variation among *L. garvieae* populations, including biotyping (Eldar *et al.*, 1999; Vela *et al.*, 2000), random amplified polymorphic DNA (RAPD)-PCR (Foschino *et al.*, 2008; Ravelo *et al.*, 2003), *Sau*-PCR and amplified fragment length polymorphism (AFLP) (Foschino *et al.*, 2008), restriction fragment length polymorphism (RFLP) ribotyping and serotyping (Eldar *et al.*, 1999; Eyngor *et al.*, 2004), pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) typing (Kawanishi *et al.*, 2005; Vela *et al.*, 2000) and amplified rRNA gene restriction analysis (ARDRA) (Michel *et al.*, 2007). These molecular typing approaches, although providing valuable information, have some disadvantages such as the necessity for specific equipment (PFGE) and the lack of reproducibility (PFGE) and portability (RAPD).

The identification of genetic variation amongst pathogenic bacterial strains is a good strategy for the discovery of strain-specific virulence-associated factors. Suppressive subtractive hybridization (SSH) is an easy and powerful tool for the identification of DNA fragments that are present in one strain (the tester) but absent from another (the driver). This technique is especially useful for the identification of genetic differences between two closely related bacteria whose genomes have not been sequenced (Winstanley, 2002). It has been applied successfully on several occasions to the identification of virulence-related factors, host-specific determinants and epidemiological markers (Bohnsack *et al.*, 2001; el-Adhami *et al.*, 1997; Juárez-Río *et al.*, 2005; Lai *et al.*, 2000; Olivares-Fuster & Arias, 2008; Reckseidler *et al.*, 2001; Soule *et al.*, 2005; Wang *et al.*, 2009; Zhang *et al.*, 2000).

The objective of this work was to study the virulence of two *L. garvieae* strains, one isolated from an outbreak in rainbow trout (*L. garvieae* 074) and the other from a human patient affected by endocarditis provoked by the bacterium (*L. garvieae* HF), in rainbow trout and mouse models. Based on their different virulence, the SSH approach was applied to the identification of genetic variation between the two strains. The results gave insights into the intra-specific genetic variation of this ubiquitous bacterium.

METHODS

Bacterial strains and culture conditions. The bacterial strains used in this study are listed in Table 1. *L. garvieae* were routinely cultured in brain–heart infusion (BHI) medium (Difco) at 28 °C in static cultures and *Escherichia coli* in Luria–Bertani (LB) medium (Pronadisa) at 37 °C with agitation. For solid media 2% (w/v) agar was added to broth. When required, media were supplemented with 100 µg ampicillin ml⁻¹ (Sigma) and 20 µg tetracycline ml⁻¹ (Sigma). All strains were stored frozen at –80 °C in BHI or LB broth with 20% (v/v) glycerol.

DNA manipulation. Routine DNA manipulation was performed as described by Sambrook & Russell (2001). Total genomic DNA from *L. garvieae* strains was extracted according to the manual of the Easy-DNA kit from Invitrogen. Plasmid DNA was isolated using the QIAprep Spin Miniprep kit and DNA was purified from PCRs using the QIAquick Gel Extraction kit, both from Qiagen. Restriction endonucleases were purchased from New England Biolabs.

Virulence assays and histopathological analysis of mouse tissues. *In vivo* assays were conducted to study the virulence of *L. garvieae* strains HF and 074 in rainbow trout and mouse.

For LD₅₀ determinations, rainbow trout (weighing approximately 15 g each) were maintained in 60 l plastic tanks supplied with well-aerated dechlorinated water at 18 °C. Groups of 10 fish were challenged by intraperitoneal injection of 0.1 ml serial 10-fold dilutions of PBS-washed exponential-phase cultures corresponding to a range of 10²–10⁹ c.f.u. of *L. garvieae* strains HF and 074. A group of 10 fish injected with 0.1 ml PBS was used as a control. Mortality of the fish was recorded for 12 days post-injection and some dead specimens were dissected for routine bacteriological examination. Samples of the spleens and livers were plated onto BHI and BHI with tetracycline, and further PCR analysis (Zlotkin *et al.*, 1998) confirmed that *L. garvieae* colonies were present. All dead fish displayed external and internal signs of disease associated with lactococcosis (Austin & Austin, 2007). Each experiment was carried out twice and LD₅₀ values were calculated at the end of the assay by the statistical approach of Reed & Muench (1938).

For mouse virulence assays, 6-week-old male Swiss mice were used as the test animals. Animals were kept under standard conditions of temperature (23 ± 3 °C) and humidity (65 ± 1%) and a regular 12 h light, 12 h dark cycle. The animals were fed a standard diet, and all of them had free access to water. Groups of four mice were injected intraperitoneally with 0.3 ml serial 10-fold dilutions of PBS-washed exponential-phase cultures corresponding to a range of 10³–10⁹ c.f.u. of *L. garvieae* strains HF and 074. A group of four mice injected with 0.3 ml of PBS was used as a control. Additionally, two groups of four mice were intraperitoneally injected with formalin-inactivated *L. garvieae* strains HF and 074. For this, exponential-phase cultures corresponding to 10⁹ c.f.u. of both strains were centrifuged and resuspended in 10% (v/v) formalin. After incubation at room temperature for 24 h and two washes with PBS, the bacteria were suspended in a final volume of 0.3 ml PBS. Aliquots of the inactivated bacterial cultures were plated on BHI and no colonies were detected, indicating that there was complete inactivation. Clinical signs and mortality of mice were recorded for 14 days post-injection. Dead specimens were dissected and samples of the liver, kidneys and intestine were cultured to determine the presence of *L. garvieae* colonies as previously indicated. At 14 days post-injection, surviving mice were sacrificed and some of them were dissected to determine the presence of *L. garvieae*. Tissue samples of spleen, liver and kidney from mice infected with 10⁹ c.f.u. of *L. garvieae* strains HF and 074 were collected and stained with haematoxylin and eosin for histopathological analysis by light microscopy. Each experiment was carried out twice.

All of the animal experiments were conducted in compliance with European legislation governing animal welfare and were authorized and supervised by the Animal Experimentation Ethics Committee of Oviedo University.

Suppressive subtractive hybridizations. Bacterial genome subtractions were performed following the user manuals of the PCR-Select Bacterial Genome Subtraction kit (Clontech) and Advantage cDNA polymerase kit (Clontech). *L. garvieae* HF was used as the tester strain and *L. garvieae* 074 as the driver in the suppressive subtractive hybridization I (SSH I) experiment, whereas in the suppressive subtractive hybridization II (SSH II) experiment tester

P. Reimundo and others

Table 1. *L. garvieae* strains used in this study

CECT, Spanish Type Culture Collection; LILA, Dairy Interprofessional Laboratory of Asturias; IPLA, Dairy Products Institute of Asturias; SERIDA, Regional Institute for Research and Agro-Food Development.

Strain	Host	Geographical origin/year	Donor
UNIUD020	Rainbow trout (<i>Oncorhynchus mykiss</i>)	Italy/1999	University of Udine
UNIUD101	Rainbow trout	Italy/2004	University of Udine
UNIUD028	Brook trout (<i>Salvelinus fontinalis</i>)	Italy/2000	University of Udine
UNIUD074	Rainbow trout	Italy/Aug. 2001	University of Udine
UNIUD041	Rainbow trout	Italy/Feb. 2001	University of Udine
LIZ-4	Rainbow trout	Zaragoza (Spain)/2004	University of Zaragoza
A3	Rainbow trout	Zaragoza (Spain)/2002	SERIDA
A1201	Rainbow trout	Zaragoza (Spain)/2001	SERIDA
A103	Rainbow trout	Zaragoza (Spain)/2002	SERIDA
BO287	Rainbow trout	Galicia (Spain)/2007	BioMar Iberia
BO123	Rainbow trout	Galicia (Spain)/2003	Biomar Iberia
BO340	Rainbow trout	Asturias (Spain)/2000	BioMar Iberia
BO165	Rainbow trout	Castilla y León (Spain)/2005	BioMar Iberia
BO242	Rainbow trout	Castilla la Mancha (Spain)/2002	BioMar Iberia
BO207	Rainbow trout	Castilla la Mancha (Spain)/2007	BioMar Iberia
BO223	Rainbow trout	Navarra (Spain)/2003	BioMar Iberia
BO222	Rainbow trout	Cataluña (Spain)/2002	BioMar Iberia
CECT 4828	Japanese amberjack (<i>Seriola quinqueradiata</i>)	Kochi, (Japan)/1974	CECT
CECT 5274	Japanese amberjack	Kochi, (Japan)/1974	CECT
HF	Human	Paris (France)/2004	Hôpital Lariboisière of Paris
CECT 5073	Raw milk	UK/1949	CECT
4AB5	Cheese	Asturias (Spain)/2009	IPLA
T11	Cheese	Asturias (Spain)/2009	IPLA
Q121	Cheese	Asturias (Spain)/2009	IPLA
CECT 5074	Bovine mastitis	UK/1979	CECT
CECT 4531	Bovine mastitis	UK/1973	CECT
LILA.1	Bovine mastitis	Asturias (Spain)/2009	LILA

and driver strains were exchanged. In each SSH, total tester and driver genomic DNAs were extracted and 2 µg was used for each isolate. Controls recommended by the manufacturer were conducted and they were all positive.

Dot-blot hybridization screening of the subtracted library. Dot-blot hybridization was performed to identify the subtracted clones that contained tester-unique fragments in SSHI and SSHII. Positive clones were screened on LB plates supplemented with 100 µg ampicillin ml⁻¹, 20 mg X-Gal ml⁻¹ and 200 mg IPTG ml⁻¹ (all from Sigma). Plasmid DNA from individual clones was extracted as previously described. For each clone, 200 ng plasmid DNA was denatured and immediately spotted in duplicate onto two nylon membranes (Boehringer Mannheim) previously activated with 2 × SSC, using a Minifold II apparatus (Schleicher & Schuell). The transferred DNA was fixed to the membranes by exposure to UV light for 2 min in an UV cross-linker (GE Healthcare). Spotted DNA was then hybridized with 2 µg *Rsa*I-digested genomic DNA from: tester and driver separately, using the ECL DNA labelling and detection system (GE Healthcare) and following the manufacturer's instructions.

Sequencing analysis. DNA sequences were determined by the dideoxy chain-termination method on plasmid products, using the GenomeLab DTCS Quick Start kit with a CEQ 8000 DNA Sequencer (Beckman Coulter). The sequences were edited and examined using BioEdit, version 7.0.5 (Hall, 1999). The deduced products from putative ORFs were analysed for protein identities using the National Centre for Biotechnology Information (NCBI) BLASTX program

(<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>) and for protein domain family identities using the Sanger Institute Pfam (<http://pfam.sanger.ac.uk>) application.

PCR-based screening of SSHI- and SSHII-specific clones. All PCR components (DNA polymerase, reaction buffer, and deoxynucleoside triphosphates) were provided by KAPA Biosystems. Suitable oligonucleotides were designed using Primer 3, version 0.4.0 (Rozen & Skaletsky, 2000) to amplify DNA inserts of clones SSHI.2, SSHI.5, SSHI.9, SSHI.12, SSHI.14, SSHI.21, SSHI.23(a), SSHI.44, SSHI.49, SSHI.55, SSHI.58, SSHI.59, SSHII.1, SSHII.7(a, b), SSHII.15, SSHII.21, SSHII.26, SSHII.36, SSHII.43(a, b), SSHII.44, SSHII.48, SSHII.56 and SSHII.61 (Table 2). Oligonucleotides, synthesized by Sigma, were used in a PCR-based screening of 25 *L. garvieae* isolates recovered from different hosts and environments. Conventional PCRs were carried out in a Perkin-Elmer 9700 GeneAmp thermocycler with an initial denaturation cycle at 94 °C for 5 min, followed by 25 cycles of amplification (denaturation at 94 °C for 30 s, annealing at 50 °C for 60 s and extension at 72 °C for 1 min), and a final 7 min elongation step at 72 °C. The PCR products were analysed by 1.5% agarose gel electrophoresis, and the presence of the expected amplification product of each insert was scored as positive. Three independent experiments, including the appropriate positive and negative controls, were conducted to ensure reproducibility.

Nucleotide sequence accession numbers. The DNA sequences described in this article have been assigned the EMBL accession numbers listed in Tables 3 and 4.

Table 2. Primers used for the PCR-based screenings of HF-specific and 074-specific ORFs in 25 *L. garvieae* isolates recovered from different hosts and environments

Subtracted clone	Sequence (5'–3')
SSHL2	2A.F.ATCGGCATTACAGGTCACT 2A.R.TTGAAGCATCGGTTGACG
SSHL5	5A.F.ACATGAAGAATTTTGGAGAAGC 5A.R.GGGAATCCCACATAATAC
SSHL9	9A.F.TGTTATCCTAATACGTTGCCATA 9A.R.CATTGTCTAAAAACGCTTAATGT
SSHL12	12A.F.ATCTGGTGCTTGCCTTTC 12A.R.TGAACACAGGACGCTATCG
SSHL14	14A.F.TGCCAGTCAGCTTAAAGTA 14A.R.TTGGGGTGATAAGAGTCA
SSHL21	21A.F.TTCGTCCAATCACTCAAG 21A.R.TCTTGCCGGAAGTATTGTC
SSHL23(a)	23A.F.AGCATTACTGATAAACCGC 23A.R.GGAATACATCTTTGACCA
SSHL44	44A.F.CTTATCTATCTGGCGTAA 44A.R.CATTGAATATTGCAAGAAC
SSHL49	49A.F.TTCGCTCCGCATCAACTT 49A.R.TCGTAATGATGAGAACAC
SSHL55	55A.F.ACAAGTGAACCAAGTCC 55A.R.TCTAAAGGTCGTTGCTGG
SSHL58	58A.F.TTATGGCCGCTATTGAAG 58A.R.ATCGCCAGTTAGCATGAC
SSHL59	59A.F.TAGTTCCTTGAGCTGTTC 59A.R.ATTCATGGTCAAGTTGCT
SSHII.1	1B.F.AATCCAGCAGTAGCAGC 1B.R.ACGTTAGATTTTACCCC
SSHII.7(a, b)	7B.F.TAGCGAATACATCTCTT 7B.R.AAGGTTCCAGAGAGTTTG
SSHII.15	15B.F.TTCGCAGAGTTCAATAC 15B.R.TGAGGACTTATCTGAGG
SSHII.21	21B.F.GAGACATGGTGATAGCC 21B.R.ATGAGTAGCACAAGGCA
SSHII.26	26B.F.AACCATTTCATTACAAA 26B.R.AATGTGGACGACTGGCT
SSHII.36	36B.F.AACCGTACCAGTCATCA 36B.R.CAATTGTTCCCTATGCC
SSHII.43(a, b)	43B.F.AGTTCAGTATATTCGTCT 43B.R.TGTTCCCACTCAATATG
SSHII.44	44B.F.TAGTGGCATTGTGTGTC 44B.R.AAGCCATCAATATAGTC
SSHII.48	48B.F.ACGACTCCAAAGGCTGT 48B.R.AAGTATCTCTGGTTGTG
SSHII.56	56B.F.TAAGGGGAAGGGCAAT 56B.R.TTCAATCCATGGCTGTG
SSHII.61	61B.F.ATCTGACGTGGTGTAAAT 61B.R.TGAATTTAACTGGTACG

RESULTS AND DISCUSSION

Virulence assays in rainbow trout and mouse

Since *L. garvieae* has been isolated from a wide range of different hosts and environments, several studies have focused on the host specificity of the bacterium through

infectivity trials with different animal models. In the rainbow trout challenges carried out in this study, the mean LD₅₀ value obtained for strain 074 was $2.1 \times 10^2 \pm 84$ c.f.u. per fish. However, no LD₅₀ value could be calculated for strain HF since no relevant mortality was recorded during the whole challenge time period. All dead fish showed external and internal clinical signs of *L. garvieae* infection and strain 074 was successfully recovered from the internal organs. Previous studies showed the avirulence for fish of *L. garvieae* strains isolated from mammals and from terrestrial environments, which led the authors to propose that the virulence mechanisms of the bacterium may differ between strains isolated from fish and those isolated from other environments (Kawanishi *et al.*, 2006, 2007). Since strain HF did not prove to be pathogenic for rainbow trout, our results agree with this earlier suggestion that the virulence mechanisms of the bacterium may differ between strains isolated from fish and those isolated from other environments.

Virulence experiments were also performed in a mouse model. Mice injected with a dose range of 10^3 – 10^9 c.f.u. of strain HF survived and did not show any clinical symptoms during the whole challenge period. No *L. garvieae* cells were recovered from the organs of these animals. Dissection of mice injected with 10^9 c.f.u. of *L. garvieae* HF strain showed intact internal organs. Neither histological alterations nor evidence of infection were observed in the spleen, liver and kidney tissues from these animals. In contrast, those injected with the same dose range of strain 074 showed, at 10^9 c.f.u., external and internal clinical signs during the 24–48 h post-injection. Mice displayed fatigue and asthenia, and half-closed and suppurating eyes. These mice died at 48–72 h post-injection. Macroscopic signs of inflammation were observed in the internal organs of these animals. Histological analysis of the spleen revealed hyperplasia of white pulp (Fig. 1b). Additionally, presence of bacteria was observed surrounding the white pulp area, and apoptotic bodies were detected (Fig. 1b). Accumulation of bacteria was present within hepatic sinusoidal spaces (Fig. 1d), although no damage was observed either in hepatocytes (Fig. 1d) or in kidney tissue (data not shown). *L. garvieae* cells were recovered from the suppuration of the eyes, liver, spleen and intestine. The presence of clinical signs of infection in mice after the injection of 10^9 c.f.u. of strain 074 and their absence in the assay conducted with the same cell number of strain HF seems to indicate that *L. garvieae* 074, apart from being highly virulent for rainbow trout, is also virulent for mice; whilst *L. garvieae* HF is not virulent either for rainbow trout or for mice. Formalin-inactivated bacteria of either strain HF or strain 074 did not produce any visible clinical sign in mice, confirming that the death of mice provoked by *L. garvieae* 074 is an infectious process. To our knowledge, no mortality in mice due to *L. garvieae* has previously been reported (Kawanishi *et al.*, 2006, 2007). Our data put into question the host specificity of *L. garvieae* and are consistent with the increasing importance of this bacterium in recent years as an emerging zoonotic pathogen.

Table 3. Summary of the sequence analysis of clone inserts specific for *L. garvieae* strain HF, isolated from a human, and absent from strain 074, isolated from rainbow trout

Fragment no.	Insert size (bp)	Predicted protein (aa)	Accession no.	Homology	Amino acid identity (%)	<i>e</i> value	Homologue accession no.
SSHI.2	537	1977	HM852546	<i>Leuconostoc citreum</i> mucus-binding protein	91	3e-88	YP_001727229.1
SSHI.3	479	--	HM852547	No significant database matches	--	--	--
SSHI.4	462	--	HM852548	No significant database matches	--	--	--
SSHI.5	389	396	HM852549	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> putative glycosyl/glycerophosphate transferase EpsI	34	2e-08	NP_053024.1
SSHI.9	374	--	HM852550	No database matches	--	--	--
SSHI.12	373	793	HM852551	<i>Listeria monocytogenes</i> peptidoglycan-binding protein	42	5e-10	NP_463692.1
SSHI.14	418	358	HM852552	<i>L. lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> DNA segregation ATPase FtsK/SpoIIIE related protein	71	3e-49	YP_796565.1
SSHI.15	439	199	HM852553	<i>Lactococcus</i> phage gp053a endolysin	37	3e-09	YP_001469051.1
SSHI.17	514	--	HM852554	No significant database matches	--	--	--
SSHI.20	515	a: 620 b: --	HM852555	<i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> cation transport ATPase	96	3e-09	YP_003354951.1
SSHI.21	468	1584	HM852556	<i>L. lactis</i> restriction-modification system LiaBIII	67	1e-52	AAM02924.1
SSHI.23	743	a: 599 b: 124	HM852557	<i>L. lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> surface protein	29	1e-12	YP_001031586.1
SSHI.25	288	264	HM852558	<i>Streptococcus mutans</i> putative transcriptional regulator	46	0.085	YP_001031588.1
SSHI.27	121	--	HM852559	No database matches	--	--	--
SSHI.33	349	--	HM852560	No significant database matches	--	--	--
SSHI.34	268	a: 302 b: 86	HM852561	<i>Lactobacillus rhamnosus</i> MIT family metal ion transporter CorA	100	2e-14	ZP_04442597.1
SSHI.44	414	223	HM852562	<i>L. lactis</i> hypothetical protein	100	0.12	NP_053443.1
SSHI.45	935	353	HM852563	<i>L. garvieae</i> tetracycline-resistance protein	100	2e-71	ABF72533.1
SSHI.46	280	--	HM852564	<i>Streptococcus oralis</i> conserved hypothetical protein	36	3e-26	EFE56793.1
SSHI.49	711	349	HM852565	No significant database matches	--	--	--
SSHI.52	357	--	HM852566	<i>Lactobacillus fermentum</i> predicted protein	42	7e-45	ZP_05864696.1
SSHI.55	435	390	HM852567	No significant database matches	--	--	--
SSHI.59	549	157	HM852568	<i>L. lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> DNA repair exonuclease	63	2e-43	YP_809376.1
				<i>Enterococcus faecium</i> PTS system protein	55	3e-36	ZP_05668408.1

Genomic subtractions between *L. garvieae* strains HF and 074 using HF as a tester (SSHI) and as a driver (SSHII)

Two individual SSH experiments were performed, using *L. garvieae* HF strain as a tester in one case (SSHI) and *L. garvieae* 074 in the other (SSHII), with the aim of detecting the differences between their genetic content. SSHI library generation was carried out successfully and selection rendered a total of 58 clones harbouring DNA insert fragments of less than 1 kb. Dot-blot hybridization analysis was conducted to determine how many of those selected clones carried HF-specific fragments. Thirty clones hybridized to the horseradish-peroxidase-labelled genomic DNA of the tester strain but not to that of the driver (data not shown). Therefore, 28 out of 58 clones were found to be false positives since they hybridized to both tester and driver horseradish-peroxidase-labelled DNAs. The 30 true positive clones were sequenced, the putative ORFs were defined and their most probable hit was determined by BLASTX and Pfam analysis. In this way, 34 putative ORFs were inferred, among

which 26 were found to be different ORFs since four selected fragments were present in two or more clones (Table 3). The frequency of 51% of true positives fits exactly to the 50% estimated by the kit manufacturers.

The SSHII experiment allowed the selection of a total of 45 clones harbouring DNA insert fragments of less than 1 kb. From these, a total of 15 074-specific clones and 30 false positive clones were determined by dot-blot analysis. Nineteen putative ORFs were inferred from the sequences of the real positives and analysed by searching for similarities with the BLASTX and Pfam applications. Thirteen different putative ORFs were identified since three fragments were present in two or more clones (Table 4). The frequency of real positives was 33%, which was slightly lower than expected.

Analysis of the HF- and 074-specific DNA sequences identified by SSHI and SSHII

According to the results obtained after the BLASTX and Pfam search analysis, the translation products derived from the

Table 4. Summary of the sequence analysis of clone inserts specific for *L. garvieae* strain 074, isolated from rainbow trout, and absent from strain HF, isolated from a human

Fragment no.	Insert size (bp)	Predicted protein (aa)	Accession no.	Homology	Amino acid identity (%)	e value	Homologue accession no.
SSHII.1	830	1566	HM989024	<i>L. lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> SLT-domain-containing protein	72	5e 76	YP_811682.1
SSHII.7	794	a: 66 b: 211	HM989025	<i>Lactococcus</i> phage TP901-1 Orf20 <i>Lactococcus</i> phage bIL286 Orf27	69 35	2e 17 5e 10	NP_112683.1 NP_076661.1
SSHII.15	768	855	HM989026	<i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> conjugal transfer protein	44	2e 56	YP_003354632.1
SSHII.21	340		HM989027	No database matches			
SSHII.26	959	492	HM989028	<i>Lactococcus</i> bacteriophage phi31 putative primase	97	6e 157	CAC04163.1
SSHII.36	376	334	HM989029	<i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> hypothetical protein	30	0.36	NP_267513.1
SSHII.43	738	a: 88 b: 269	HM989030	<i>Mollicutes</i> bacterium conserved hypothetical protein <i>Acholeplasma laidlawii</i> integral membrane protein	66 71	4e 23 7e 21	ZP_04563139.1 YP_001621364.1
SSHII.44	575		HM989031	No significant database matches			
SSHII.48	851	940	HM989032	<i>Trichomonas vaginalis</i> viral A-type inclusion protein	20	9e 07	XP_001579765.1
SSHII.56	666	285	HM989033	<i>Lactococcus</i> phage bIL285 Orf45	72	2e 91	NP_076617.1
SSHII.61	609		HM989034	No significant database matches			

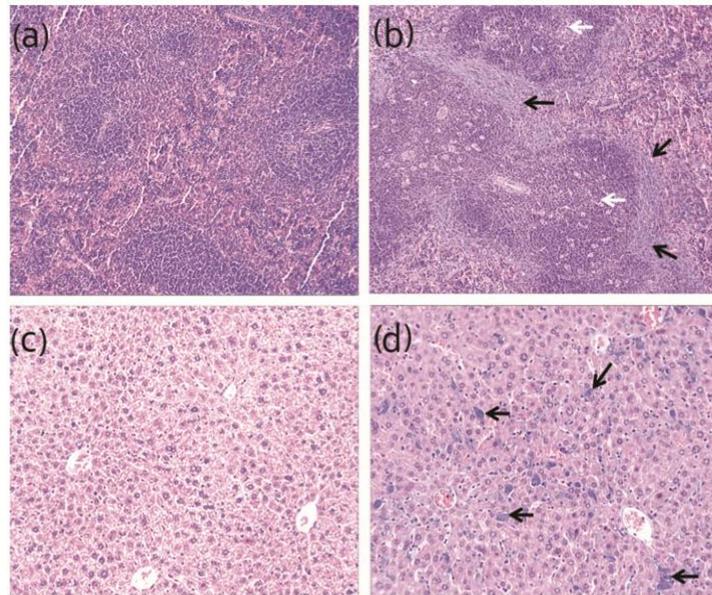


Fig. 1. Micrographs of spleen and liver tissues from mice following infection with *L. garvieae*. Images were taken at magnifications of $\times 10$ (a, b) and $\times 20$ (c, d). Mice were infected with 10^9 c.f.u. of *L. garvieae* strains HF and 074, and after 2 days samples of internal organs were collected to be analysed for histological alterations. (a, b) Spleen and (c, d) liver tissues from mice infected with (a, c) *L. garvieae* HF and (b, d) *L. garvieae* 074. The spleen of mice infected with *L. garvieae* 074 developed white pulp hyperplasia (b, white arrows). Accumulation of bacterial cells surrounding splenic white pulp was also observed (b, black arrows). Bacteria were detected within hepatic sinusoidal spaces of mice injected with *L. garvieae* 074 (d, black arrows). Neither histological alterations nor presence of bacteria was observed in either spleen or liver tissues from mice infected with *L. garvieae* strain HF (a, c).

HF-specific and the 074-specific selected DNA fragments can be distributed into three groups. Group 1 corresponds to sequences that showed homology to genes encoding known proteins. Thirteen and eight putative ORFs for SSHI and SSHII respectively showed homology to genes encoding proteins described in other bacterial species. Group 2 consists of sequences whose translation products showed homology to hypothetical proteins. Four putative ORFs for SSHI and two for SSHII showed homology to genes encoding predicted proteins without a described function. Finally, group 3 is formed by nine putative ORFs for SSHI and three for SSHII whose translation products showed low-significance matches or no matches with entries in the public protein database.

Group 1 of translation products derived from subtracted sequences can be classified into the following categories (Tables 3 and 4).

Binding proteins. The predicted protein encoded by sequence SSHI.2 shows high identity (91%) at the amino acid level to the *Leuconostoc citreum* KM20 mucus-binding protein YP_001727229.1, as well as to other mucus-adhesion-related proteins. One mucin-binding protein (MucBP) domain is identified within the predicted protein encoded by sequence SSHI.2. MucBP domains are widely distributed among lactic acid bacteria and are thought to play an important role in bacterial adherence to intestinal mucus as well as in host-microbe interactions (Boekhorst *et al.*, 2006). Since adhesion is one of the first steps in most infections caused by pathogenic bacteria, the presence of this protein may provide *L. garvieae* with an effective mechanism for colonizing the host. The fact that this protein is present in strain HF, isolated from a human, but absent in all the strains isolated from fish (Table 5), may be due to a different composition of the mucosal surfaces of the gastrointestinal tracts of these hosts, and consequently to the requirement for specific host adhesion proteins.

The translated product of the SSHI.12 sequence shows homology to a *Listeria monocytogenes* peptidoglycan-binding protein (NP_463692.1). This protein has one conserved domain belonging to the collagen-binding superfamily and four repetitive conserved domains which have been proposed to present the former domain away from the bacterial cell surface and hence to facilitate its binding to the ligand (Deivanayagam *et al.*, 2000). The predicted translated product of sequence SSHI.12 has a domain with these characteristics. Microbial surface components recognizing adhesive matrix molecules, such as collagen, constitute an important mechanism of host-tissue adherence and an advantageous colonization factor for bacteria at the initial stages of a pathogenic process (Foster & Höök, 1998; Speziale *et al.*, 1986). Therefore, this protein could be considered as one of the putative virulence factors which may have facilitated the progress of the infection in the human host. However, the wide distribution of the corresponding encoding gene amongst the *L. garvieae*

strains analysed does not seem to support this suggestion (Table 5).

DNA segregation/modification proteins. The subtracted sequence SSHI.14 exhibits homology to a chromosomally encoded DNA segregation ATPase FtsK/SpoIIIE-related protein of *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* SK11. FtsK/SpoIIIE orthologous genes have been proved to be involved in bacterial conjugation (Lloa *et al.*, 2002; Parsons *et al.*, 2007) and even related to a potential Gram-positive secretion system related to the ESAT-6-like and YukuA-like proteins and which is important in bacterial virulence and protective immunity (Pallen, 2002). This DNA transporter family could be involved in horizontal gene transfer, one of the major systems related to antibiotic resistance and virulence acquisition in bacteria, so it should be carefully studied, especially in bacterial pathogens. The predicted ORF SSHI.14 was found to be present exclusively in strain HF (Table 5).

The translated product of sequence SSHI.55 shows homology to a *L. lactis* subsp. *cremoris* SK11 exonuclease. This protein has a conserved domain (SbcD) classified as a DNA repair exonuclease and which is involved in DNA replication, recombination and repair. It is also related to repression of type 5 capsule production as part of the SOS response in *Staphylococcus aureus* (Chen *et al.*, 2007). This domain is found in the predicted translation product of sequence SSHI.55. It is one of the subtracted genes which we have found to be widespread in *L. garvieae* strains isolated from raw milk, cheese and bovine mastitis as well as in all the rainbow trout strains with the exception of the Italian ones (Table 5).

Restriction-modification. The putative protein encoded by the selected clone SSHI.21 shows homology to the *L. lactis* restriction-modification system LlaBIII identified in a naturally occurring plasmid, isolated from *L. lactis* W56 (Kong *et al.*, 2001) and involved in the resistance to various phage infections (Kong & Josephsen, 2002). This find is not surprising given the fact that many lactococcal genomes have genomic regions encoding different phage-resistance systems. Interestingly, this putative ORF was found to be present only in strain HF and could be chromosomally encoded, although the possibility that it is located on a mobile genetic element still not detected in this strain cannot be excluded. The presence of this bacteriophage-resistance system in *L. garvieae* strain HF may explain why the number of subtracted phage sequences in SSHI was lower than in SSHII.

Resistance-related proteins. The predicted protein encoded by the subtracted sequence SSHI.44 shows high identity (94%) at the amino acid level with the *L. garvieae* tetracycline-resistance protein CAJ09686.1. *L. garvieae* strain HF was not known to be tetracycline resistant before this study. Antimicrobial susceptibility tests performed according to the broth microdilution methods

Table 5. PCR-based determination of the distribution of 12 HF-specific ORFs in 25 *L. garvieae* isolates recovered from different hosts and environments

The row for *L. garvieae* HF, used as tester strain, is highlighted in bold.

Isolate origin	Strain	SSHII clone no.											
		2	5	9	12	14	21	23a	44	49	55	58	59
Rainbow trout, Italy	UNIUD020	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	UNIUD101	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	UNIUD041	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	UNIUD074	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Brook trout, Italy	UNIUD028	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Rainbow trout, Spain	LIZ-4	-	-	+	+	-	-	-	-	-	+	-	+
	A3	-	-	+	+	-	-	-	-	-	+	-	+
	A1201	-	-	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-
	A103	-	-	+	+	-	-	-	-	-	+	-	+
	BO287	-	-	+	+	-	-	-	-	-	+	-	+
	BO123	-	-	+	+	-	-	-	-	-	+	-	+
	BO340	-	-	+	+	-	-	-	-	-	+	-	+
	BO165	-	-	+	+	-	-	-	-	-	+	-	+
	BO242	-	-	+	+	-	-	-	-	-	+	-	+
	BO207	-	-	+	+	-	-	-	-	-	+	-	+
	BO223	-	-	+	+	-	-	-	-	-	+	-	+
	BO222	-	-	+	+	-	-	-	-	-	+	-	+
	Japanese amberjack, Japan	CECT 4828	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
		CECT 5274	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Human, France	HF	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
Raw milk, UK	CECT 5073	-	+	+	+	-	-	-	-	-	+	-	+
Cheese, Spain	4AB5	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	-	+
	T11	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
	Q121	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Bovine mastitis, UK and Spain	CECT 5074	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	+
	CECT 4531	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	LILA.1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-

described by the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2006) revealed a minimum inhibitory concentration value of the *L. garvieae* HF strain for tetracycline of 128 µg ml⁻¹. The fact that this putative ORF is absent from all the screened *L. garvieae* strains isolated from rainbow trout calls into question the suggestion that the wide use of oxytetracycline for the treatment of some bacterial infection outbreaks in aquaculture has increased the occurrence of fish pathogens harbouring tetracycline resistance genes (Kim *et al.*, 2004; Nonaka *et al.*, 2007). Nevertheless, 41 different tetracycline-resistance genes have been described to date (Thaker *et al.*, 2010) so a further study would be needed to determine properly the occurrence of these genes among the 25 *L. garvieae* isolates.

Membrane/surface proteins. The subtracted ORF SSHI.23.a encodes a predicted protein, only present in strain HF, which shows homology to the *L. lactis* subsp. *cremoris* surface protein YP_001031586.1. It is a predicted outer-membrane protein with no identified conserved domains or identities to other lactococcal and streptococcal

proteins. In contrast, the ORF SSHI.43.b, which was found to be present exclusively in the Italian rainbow trout strains, encodes a predicted protein which shows homology to the *Acholeplasma laidlawii* integral membrane protein YP_001621364.1, which is a predicted transmembrane protein conserved in diverse cellular organisms. It shows seven predicted transmembrane helices and its role is unknown.

Transport. The translated product of sequence SSHI.20.a shows high amino acid identity (96%) to the *L. lactis* subsp. *lactis* cation transport ATPase YP_003354951.1. This protein has a conserved domain characteristic of copper- and cadmium-type heavy-metal-transporting P-type ATPases. The identity at the amino acid level between the predicted protein encoded by the putative ORF SSHI.34.a and the *Lactobacillus rhamnosus* MIT family metal-ion transporter CorA is as high as 100%. This transporter has been suggested as being responsible for the major Mg²⁺ uptake system in the Bacteria and Archaea. However, it is also believed that, in some family members, it may have a different activity than Mg²⁺ transport

(Niegowski & Eshaghi, 2007). The predicted protein encoded by the sequence SSHI.59 shows homology to the product of the ZP_05668408.1 gene from *Enterococcus faecium*, a protein from the phosphotransferase system. This system has been demonstrated to control not only sugar phosphorylation but also a wide variety of metabolic processes and the expression of several genes (Saier & Reizer, 1994). In fact, it has surprisingly been related to the expression of the cold-shock response in *Lactobacillus casei* (Monedero *et al.*, 2007) and also of some virulence-related proteins in different species of bacteria (Poncet *et al.*, 2009). This putative ORF is one of the subtracted fragments most widely distributed amongst the different studied strains.

Biosynthesis. The product of sequence SSHI.5 exhibits homology to the putative glycosylglycerophosphate transferase EpsJ of *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*, which is involved in teichoic acid biosynthesis. Wall-associated teichoic acids are covalently linked to the cell wall peptidoglycan of Gram-positive bacteria and have been demonstrated to play an important role in bacterial physiology and virulence (Neuhaus & Baddiley, 2003; Swoboda *et al.*, 2010). Since the PCR screening analysis showed that this putative ORF is only present in the HF, raw milk and cheese strains, it is possible that the mechanism of teichoic acid biosynthesis differs slightly amongst the different *L. garvieae* strains studied in this work.

Transcriptional regulator. The selected sequence SSHI.25 encodes a predicted protein which shows homology to the *Streptococcus mutans* NN2025 putative transcriptional regulator YP_003485719.1. This protein has a conserved N-terminal domain characteristic of the BmrR multidrug-efflux transporter transcription regulators included in the MerR superfamily. These regulators are involved in the transcription of certain membrane proteins which cause the efflux of a variety of toxic substances and antibiotics (Grkovic *et al.*, 2002); this is a widely distributed strategy among pathogenic bacteria to survive under stress conditions (Martínez & Baquero, 2002).

Conjugal proteins. The predicted protein encoded by the selected fragment SSHI.15 shows homology to the *L. lactis* subsp. *lactis* conjugal transfer protein YP_003354632.1. Bacterial conjugation is considered an important mechanism of horizontal gene transfer (Zechner *et al.*, 2000) and the SSH-mediated identification of mobile genetic elements has been shown to be an important starting point in the identification of genomic islands implicated in virulence in several species (Winstanley, 2002). The possible influence of these mobile genetic elements on the virulence of *L. garvieae* should be considered.

Phage sequences. As with the conjugal proteins, the existence of many phage-encoded virulence factors as well as their decisive role at different stages of bacterial infection has been demonstrated in several studies (Boyd & Brüssow, 2002). Furthermore, the presence of phage sequences in

bacterial genomes is often associated with strain variability through lateral gene transfer and genomic islands as well as with the trespass of virulence-related genes among different bacterial strains (Hueck, 1998). The subtraction of a high percentage of specific phage sequences is a common event when conducting SSH experiments. Seven phage-related sequences have been identified, all except one in the SSHII, suggesting that these sequences may play an important role in the intraspecific variability of *L. garvieae*. The translated product of the selected sequence SSHI.15 encodes a predicted protein which exhibits homology to *Lactococcus* phage gp053a endolysin. The predicted protein encoded by sequence SSHI.1 shows homology to the *L. lactis* subsp. *cremoris* SLT-domain-containing protein YP_811682.1. This protein exhibits three phage-related domains, including a lysozyme-like domain which is commonly present in β -1,4-linked-polysaccharide hydrolytic enzymes, such as soluble lytic transglycosylases (SLT). Members of this lysozyme-like protein domain family have been proposed as virulence-related factors in bacterial pathogens of plants and animals (Mushegian *et al.*, 1996). The ORF SSHII.7.a and its neighbouring downstream putative ORF SSHII.7.b encode two predicted proteins which show homology to *Lactococcus* phage TP901-1 Orf20 and *Lactococcus* phage bIL286 Orf27, respectively. Neither of these two proteins contain any conserved domains with a known function described in the literature. The translated product of the sequence SSHII.26 shows high identity (96%) at the amino acid level to the *Lactococcus* bacteriophage phi31 putative primase, which is an ssDNA-dependent RNA polymerase responsible for synthesizing RNA primers during DNA replication. The sequence SSHII.56 encodes a predicted protein which exhibits homology to the *Lactococcus* phage bIL285 Orf45. This ORF codes for a hypothetical protein with no conserved domain detected. And finally, the subtracted sequence SSHII.48 codes for a predicted protein which shows homology to the *Trichomonas vaginalis* G3 viral A-type inclusion protein XP_001579765.1. This protein contains two domains named SMC_prok_A and SMC_prok_B, conserved in the chromosome segregation protein SMC family of Bacteria, Archaea and eukaryotes. The high number of putative phage sequences subtracted in the SSHII approach suggested the presence of a prophage in *L. garvieae* strain 074. These phage sequences are present almost exclusively in the Italian rainbow trout strains, and in the Spanish rainbow trout A1201 strain. Thus, mitomycin C-stimulated prophage induction was conducted to test for the presence of a lysogenic phage in these strains. All Spanish rainbow trout isolated strains, except for strain A1201, were used as hosts. No inhibition haloes or plaques of lysis were observed on the lawns of any of the host strains tested. This might indicate that the SSHII putative phage subtracted sequences belong to a prophage which has lost genes essential for the development of a lytic cycle.

Group 2 of translation products derived from the subtracted sequences SSHI.23.b, SSHI.49, SSHII.36 and

Table 6. PCR-based determination of the distribution of 13 074-specific ORFs in 25 *L. garvieae* isolates recovered from different hosts and environments

The row for *L. garvieae* UNIUD074, used as tester strain, is highlighted in bold.

Isolate origin	Strain	SSHII clone no.											
		1	7a,b	15	21	26	36	43a,b	44	48	56	61	
Rainbow trout, Italy	UNIUD020	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	UNIUD191	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	UNIUD041	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	UNIUD074	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Brook trout, Italy	UNIUD028	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
Rainbow trout, Spain	LIZ-4	-	-	+	+	-	-	-	-	-	+	-	
	A3	-	-	+	+	-	-	-	-	-	+	-	
	A1201	-	-	+	+	-	-	-	-	-	+	-	
	A103	-	-	+	+	-	-	-	-	-	+	-	
	218/07	-	-	+	+	-	-	-	-	-	+	-	
	BO287	-	-	+	+	-	-	-	-	-	+	-	
	BO123	-	-	+	+	-	-	-	-	-	+	-	
	BO340	-	-	+	+	-	-	-	-	-	+	-	
	BO165	-	-	+	+	-	-	-	-	-	+	-	
	BO242	-	-	+	+	-	-	-	-	-	+	-	
	BO207	-	-	+	+	-	-	-	-	-	+	-	
	BO223	-	-	+	+	-	-	-	-	-	+	-	
	Japanese amberjack, Japan	CECT 4828	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
		CECT 5274	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Human, France	HF	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
Raw milk, UK	CECT 5073	-	+	+	+	-	-	-	-	-	+	-	
Cheese, Spain	4AB5	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	-	
	T11	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	Q121	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Bovine mastitis, UK and Spain	CECT 5074	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	
	CECT 4531	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	LILA.1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	

SSHII.43.a (Tables 3 and 4) showed identities to hypothetical proteins in several bacteria. No conserved domain with a defined function could be identified for any of these proteins.

Group 3 of translation products derived from the subtracted sequences SSHI.3, SSHI.4, SSHI.9, SSHI.17, SSHI.20.b, SSHI.27, SSHI.33, SSHI.34.b, SSHI.45, SSHI.46, SSHI.52, SSHII.21, SSHII.44 and SSHII.61 exhibited no significant matches or no matches with any protein from the databases (Tables 3 and 4).

Presence of SSHI and SSHII subtracted sequences in 25 *L. garvieae* strains isolated from different hosts and environments

A PCR-based screening of some representative SSHI and SSHII subtracted sequences was carried out with the DNA of 25 *L. garvieae* strains isolated from rainbow trout, yellowtail, human, raw milk, cheese and bovine mastitis in different countries. None of the 12 HF-specific ORFs chosen for the screening could be amplified from any of the *L. garvieae* strains isolated from rainbow trout in Italy. The

screening among these strains revealed a unique profile, and therefore a high homogeneity between the gene content of these strains (Table 5). On the other hand, some fragments (SSHI.9, SSHI.12, SSHI.55 and SSHI.59) were shown to be present in all the strains isolated from Spanish rainbow trout, with the exception of SSHI.59, which is absent from the A1201 strain. Thus, the Spanish rainbow trout strains exhibit, as do the Italian ones, a single genetic profile related to the HF-specific ORFs chosen for the screening, which indicates a great similarity in their gene content. The presence of one of these four fragments seems to determine the presence of the remaining three, which led us to hypothesize that these putative ORFs may be located on a plasmid. To test this, a plasmid DNA extraction from strain HF was carried out based on the method of O’Sullivan & Klaenhammer (1993). As a result, a plasmid of approximately 30 kb, as deduced by a restriction pattern analysis, was successfully isolated. Southern blot analysis of chromosomal and plasmid DNA from strain HF was conducted using digoxigenin-labelled SSHI.9, SSHI.12, SSHI.55 and SSHI.59 PCR-generated fragments as probes. In all cases, hybridization bands were observed only within the genomic DNA lane,

indicating that the four gene fragments are chromosomally located (data not shown). The rest of the *L. garvieae* strains showed a quite heterogeneous PCR-product pattern, since the amplicons corresponding to fragments SSHI.2, SSHI.5, SSHI.9, SSHI.12, SSHI.55, SSHI.58 and SSHI.59 were amplified in several strains but without exhibiting a defined profile (Table 5).

With respect to the 13 074-specific ORFs, all of them were found to be present in the genome of the *L. garvieae* strains recovered from rainbow trout in Italy, with the exception of the SSHI.56 clone, which is absent from the UNIUD020 and UNIUD028 strains (Table 6). The 13 specific fragments are also present in the genome of strain A1201 isolated from rainbow trout in Spain, which shares many similarities with the strains isolated from rainbow trout in Italy (Table 6). Nevertheless, the majority of the 074-specific fragments are absent from the genomes of the rest of the bacterial strains involved in the screening. Thus, only the PCR amplification of clones SSHI.7, SSHI.36, SSHI.44 and SSHI.61 produced the corresponding amplicons from some of the bacterial DNAs involved in the screening (Table 6).

As a whole, the distribution of the genes within the genome of *L. garvieae* strains isolated from different hosts seems to be quite heterogeneous. For example, none of the strains other than HF harboured all the HF-specific sequences tested, and none of the HF-specific or 074-specific ORFs were present in all the isolates tested (Tables 5 and 6). Four out of the 12 HF-specific ORFs tested were present exclusively in the HF genome (Table 5). However, extensive research involving human-isolated *L. garvieae* strains should be carried out to determine if some of those ORFs can be used as specific gene markers.

Conclusions

In this study a *L. garvieae* strain isolated from rainbow trout has been proved, to our knowledge for the first time, to be virulent for mice. Histological analysis of spleen and liver tissues from infected mice revealed histopathological alterations and evidence of bacterial infection. During recent years, several cases of opportunistic human infections caused by *L. garvieae* have been reported in the literature. Our results agree with the zoonotic potential attributed to *L. garvieae*, although its incidence in this sense is still unknown. No virulence of strain HF could be proved either for rainbow trout or for mice despite this strain having been isolated as the causative agent of a case of human endocarditis. Therefore, studies involving experimental infections with *L. garvieae* strains from different hosts and environments in aquatic and terrestrial animals are needed on a larger scale to determine the existence or not of a host-specificity relation as well as the epidemiological characteristics of the disease produced by this bacterium. The SSHI and SSHII putative ORFs identified in this study could be a good approach for this analysis.

The screening of the selected SSHI and SSHII subtracted sequences carried out in this study indicates that the bacterial strains isolated from the same fish host and from the same geographical origin exhibit a high genetic homogeneity, whilst genetic heterogeneity is detected in the strains isolated from different hosts and geographical origins. These results agree with those obtained in previous research focused on the molecular epidemiology of the bacterium (Kawanishi *et al.*, 2006; Michel *et al.*, 2007). Furthermore, based on the results obtained in our study, the *L. garvieae* strains isolated from rainbow trout in Italy and in Spain can be classified into two distinct gene profiles. This observation has been made before by other authors (Eldar *et al.*, 1999; Eyngor *et al.*, 2004; Ravelo *et al.*, 2003; Vela *et al.*, 2000). In contrast, the bacterial strains isolated from raw milk, cheese and bovine mastitis show a quite heterogeneous distribution of the subtracted sequences which makes them difficult to classify in a clearly defined gene profile. The fact that genetic homogeneity of this pathogen exists in certain geographical areas or hosts where the disease is endemic has been proposed to be due to a clonal evolution of the bacterial population in such circumstances (Eyngor *et al.*, 2004). In contrast, no evolutionary process would have taken place in hosts or geographical areas where the presence of *L. garvieae* is sporadic, leading to the maintenance of a genetic diversity of the pathogen (Eyngor *et al.*, 2004). The selective pressure of different vaccine strategies in countries with a long history of lactococcosis has been also hypothesized to have caused the evolution of an ancestral common lineage into two different ones (Ravelo *et al.*, 2003). Both theories are consistent with our results, since epidemic outbreaks of lactococcosis have been reported from Italy and Spain over the last 15 years (Eldar *et al.*, 1996; Nieto *et al.*, 1995) and since vaccines have been classically employed in both countries to fight against the disease.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by the Ministry of Science and Innovation of Spain (MICINN), projects AGL2009-07003 and CSD2007-00002 (Consolider Aquagenomics). P.R., D.P.-P., R.N., and E.G. were recipients of predoctoral fellowships from the MICINN. J.M. was recipient of a predoctoral fellowship from the University of Oviedo. Our warmest thanks to Dr Alvaro Obaya for his continued support, help and advice throughout this work and previous projects. Our gratitude to Dr L. Gusmani from the University of Udine, Italy, and Dr V. Fihman from Hôpital Lariboisière of Paris, France, for donating the *Lactococcus garvieae* UNIUD074 and HF strains, respectively.

REFERENCES

- Alegria, A., Alvarez-Martín, P., Sacristán, N., Fernández, E., Delgado, S. & Mayo, B. (2009). Diversity and evolution of the microbial populations during manufacture and ripening of casin, a traditional Spanish, starter-free cheese made from cow's milk. *Int J Food Microbiol* **136**, 44–51.
- Ammor, S., Yaakoubi, K., Chevallier, I. & Dufour, E. (2004). Identification by fluorescence spectroscopy of lactic acid bacteria

- isolated from a small-scale facility producing traditional dry sausages. *J Microbiol Methods* 59, 271–281.
- Aubin, G. G., Bémer, P., Guillouzoic, A., Crémet, L., Touchais, S., Fraquet, N., Boutolle, D., Reynaud, A., Lepelletier, D. & Corvec, S. (2011). First report of a hip prosthetic and joint infection caused by *Lactococcus garvieae* in a woman fishmonger. *J Clin Microbiol* 49, 2074–2076.
- Austin, B. & Austin, D. A. (2007). *Bacterial Fish Pathogens, Disease of Farmed and Wild Fish*, 4th edn. Godalming: Springer Praxis.
- Barakat, R. K., Griffiths, M. W. & Harris, L. J. (2000). Isolation and characterization of Carnobacterium, *Lactococcus*, and *Enterococcus* spp. from cooked, modified atmosphere packaged, refrigerated, poultry meat. *Int J Food Microbiol* 62, 83–94.
- Boekhorst, J., Helmer, Q., Kleerebezem, M. & Siezen, R. J. (2006). Comparative analysis of proteins with a mucus-binding domain found exclusively in lactic acid bacteria. *Microbiology* 152, 273–280.
- Bohnsack, J. F., Takahashi, S., Detrick, S. R., Pelinka, L. R., Hammitt, L. L., Aly, A. A., Whiting, A. A. & Adderson, E. E. (2001). Phylogenetic classification of serotype III group B streptococci on the basis of *hylB* gene analysis and DNA sequences specific to restriction digest pattern type III-3. *J Infect Dis* 183, 1694–1697.
- Boyd, E. F. & Brüssow, H. (2002). Common themes among bacteriophage-encoded virulence factors and diversity among the bacteriophages involved. *Trends Microbiol* 10, 521–529.
- Carvalho, M. G., Vianni, M. C., Elliott, J. A., Reeves, M., Facklam, R. R. & Teixeira, L. M. (1997). Molecular analysis of *Lactococcus garvieae* and *Enterococcus gallinarum* isolated from water buffalos with subclinical mastitis. *Adv Exp Med Biol* 418, 401–404.
- Chan, J. F., Woo, P. C., Teng, J. L., Lau, S. K., Leung, S. S., Tam, F. C. & Yuen, K. Y. (2011). Primary infective spondylodiscitis caused by *Lactococcus garvieae* and a review of human *L. garvieae* infections. *Infection*. (Epub ahead of print). doi:10.1007/s15010-011-0094-8.
- Chen, Z., Luong, T. T. & Lee, C. Y. (2007). The *sbpDC* locus mediates repression of type 5 capsule production as part of the SOS response in *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol* 189, 7343–7350.
- CLSI (2006). *Methods for Broth Dilution Susceptibility Testing of Bacteria Isolated from Aquatic Animals*. Wauna, PA, USA: Clinical and Laboratory Standards Institute.
- Dávila, E., Zamora, L. M., Pla, M., Carretero, C. & Parés, D. (2006). Identification and antagonistic activity of lactic acid bacteria occurring in porcine blood from industrial slaughterhouses – a preliminary study. *Int J Food Microbiol* 107, 207–211.
- Deivanayagam, C. C., Rich, R. L., Carson, M., Owens, R. T., Danthuluri, S., Bice, T., Höök, M. & Narayana, S. V. (2000). Novel fold and assembly of the repetitive B region of the *Staphylococcus aureus* collagen-binding surface protein. *Structure* 8, 67–78.
- Devriese, L. A., Hommez, J., Laevens, H., Pot, B., Vandamme, P. & Haesebrouck, F. (1999). Identification of aesculin-hydrolyzing streptococci, lactococci, aerococci and enterococci from subclinical intramammary infections in dairy cows. *Vet Microbiol* 70, 87–94.
- el-Adhami, W. A., Stewart, P. R. & Matthaesi, K. I. (1997). The isolation and cloning of chromosomal DNA specific for a clonal population of *Staphylococcus aureus* by subtractive hybridisation. *J Med Microbiol* 46, 987–997.
- El-Baradei, G., Delacroix-Buchet, A. & Ogier, J. C. (2007). Biodiversity of bacterial ecosystems in traditional Egyptian Domiat cheese. *Appl Environ Microbiol* 73, 1248–1255.
- Eldar, A., Ghittino, C., Asanta, L., Bozzetta, E., Gorla, M., Prearo, M. & Bercovier, H. (1996). *Enterococcus seriolicida* is a junior synonym of *Lactococcus garvieae*, a causative agent of septicemia and meningoencephalitis in fish. *Curr Microbiol* 32, 85–88.
- Eldar, A., Gorla, M., Ghittino, C., Zlotkin, A. & Bercovier, H. (1999). Biodiversity of *Lactococcus garvieae* strains isolated from fish in Europe, Asia, and Australia. *Appl Environ Microbiol* 65, 1005–1008.
- Elliott, J. A., Collins, M. D., Pigott, N. E. & Facklam, R. R. (1991). Differentiation of *Lactococcus lactis* and *Lactococcus garvieae* from humans by comparison of whole-cell protein patterns. *J Clin Microbiol* 29, 2731–2734.
- Eyngor, M., Zlotkin, A., Ghittino, C., Prearo, M., Douet, D. G., Chilmonec, S. & Eldar, A. (2004). Clonality and diversity of the fish pathogen *Lactococcus garvieae* in Mediterranean countries. *Appl Environ Microbiol* 70, 5132–5137.
- Fefer, J. J., Ratzan, K. R., Sharp, S. E. & Saiz, E. (1998). *Lactococcus garvieae* endocarditis: report of a case and review of the literature. *Diagn Microbiol Infect Dis* 32, 127–130.
- Fihman, V., Raskine, L., Barrou, Z., Kiffel, C., Riahi, J., Berçot, B. & Sanson-Le Pors, M. J. (2006). *Lactococcus garvieae* endocarditis: identification by 16S rRNA and *sodA* sequence analysis. *J Infect* 52, e3–e6.
- Flórez, A. B. & Mayo, B. (2006). Microbial diversity and succession during the manufacture and ripening of traditional, Spanish, blue-veined Cabrales cheese, as determined by PCR-DGGE. *Int J Food Microbiol* 110, 165–171.
- Fortina, M. G., Ricci, G., Foschino, R., Picozzi, C., Dolci, P., Zeppa, G., Cocolin, L. & Manachini, P. L. (2007). Phenotypic typing, technological properties and safety aspects of *Lactococcus garvieae* strains from dairy environments. *J Appl Microbiol* 103, 445–453.
- Foschino, R., Nucera, D., Volponi, G., Picozzi, C., Ortoffi, M. & Bottero, M. T. (2008). Comparison of *Lactococcus garvieae* strains isolated in northern Italy from dairy products and fishes through molecular typing. *J Appl Microbiol* 105, 652–662.
- Foster, T. J. & Höök, M. (1998). Surface protein adhesins of *Staphylococcus aureus*. *Trends Microbiol* 6, 484–488.
- Furutan, N. P., Breiman, M. A., Fischer, M. A. & Facklam, R. R. (1991). *Lactococcus garvieae* infection in humans: a cause of prosthetic valve endocarditis [C297]. In *Proceedings of the 91st American Society for Microbiology Conference*, p. 109. Dallas: American Society for Microbiology.
- Grkovic, S., Brown, M. H. & Skurray, R. A. (2002). Regulation of bacterial drug export systems. *Microbiol Mol Biol Rev* 66, 671–701.
- Hall, T. A. (1999). BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symp Ser* 41, 95–98.
- Hueck, C. J. (1998). Type III protein secretion systems in bacterial pathogens of animals and plants. *Microbiol Mol Biol Rev* 62, 379–433.
- James, P. R., Hardman, S. M. & Patterson, D. L. (2000). Osteomyelitis and possible endocarditis secondary to *Lactococcus garvieae*: a first case report. *Postgrad Med J* 76, 301–303.
- Juiz-Río, S., Osorio, C. R., de Lorenzo, V. & Lemos, M. L. (2005). Subtractive hybridization reveals a high genetic diversity in the fish pathogen *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*: evidence of a SXT-like element. *Microbiology* 151, 2659–2669.
- Kawanishi, M., Kojima, A., Ishihara, K., Esaki, H., Kijima, M., Takahashi, T., Suzuki, S. & Tamura, Y. (2005). Drug resistance and pulsed-field gel electrophoresis patterns of *Lactococcus garvieae* isolates from cultured *Seriola* (yellowtail, amberjack and kingfish) in Japan. *Lett Appl Microbiol* 40, 322–328.
- Kawanishi, M., Yoshida, T., Yagashiro, S., Kijima, M., Yagyu, K., Nakai, T., Murakami, M., Morita, H. & Suzuki, S. (2006). Differences between *Lactococcus garvieae* isolated from the genus *Seriola* in Japan and those isolated from other animals (trout, terrestrial animals from Europe) with regard to pathogenicity, phage susceptibility and genetic characterization. *J Appl Microbiol* 101, 496–504.

- Vela, A. I., Vázquez, J., Gibello, A., Blanco, M. M., Moreno, M. A., Liébana, P., Albendea, C., Alcalá, B., Mendez, A. & other authors (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.
- Vendrell, D., Balcázar, J. L., Ruiz-Zarzuela, I., de Blas, I., Gironés, O. & Múzquiz, J. L. (2006). *Lactococcus garvieae* in fish: a review. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* 29, 177–198.
- Villani, F., Aponte, M., Blaiotta, G., Mauriello, G., Pepe, O. & Moschetti, G. (2001). Detection and characterization of a bacteriocin, garvicin L1-5, produced by *Lactococcus garvieae* isolated from raw cow's milk. *J Appl Microbiol* 90, 430–439.
- Vinh, D. C., Nichol, K. A., Rand, F. & Embil, J. M. (2006). Native-valve bacterial endocarditis caused by *Lactococcus garvieae*. *Diagn Microbiol Infect Dis* 56, 91–94.
- Wang, C. Y., Shie, H. S., Chen, S. C., Huang, J. P., Hsieh, I. C., Wen, M. S., Lin, F. C. & Wu, D. (2007). *Lactococcus garvieae* infections in humans: possible association with aquaculture outbreaks. *Int J Clin Pract* 61, 68–73.
- Wang, Y., Xu, Z., Jia, A., Chen, J., Mo, Z. & Zhang, X. (2009). Genetic diversity between two *Vibrio anguillarum* strains exhibiting different virulence by suppression subtractive hybridization. *Wei Sheng Wu Xue Bao* 49, 363–371.
- Wilbring, M., Alexiou, K., Reichenspurner, H., Matschke, K. & Tugtekin, S. M. (2011). *Lactococcus garvieae* causing zoonotic prosthetic valve endocarditis. *Clin Res Cardiol*. (Epub ahead of print).
- Winstanley, C. (2002). Spot the difference: applications of subtractive hybridisation to the study of bacterial pathogens. *J Med Microbiol* 51, 459–467.
- Zechner, E. L., de la Cruz, F., Eisenbrandt, R., Grahn, A. M., Koraimann, G. & Lanka, E. & al., e. (2000). Conjugative DNA transfer processes. In *The Horizontal Gene Pool: Bacterial Plasmids and Gene Spread*, pp. 87–174. Edited by C. M. Thomas. Amsterdam: H. A. Publishers.
- Zhang, Y. L., Ong, C. T. & Leung, K. Y. (2000). Molecular analysis of genetic differences between virulent and avirulent strains of *Aeromonas hydrophila* isolated from diseased fish. *Microbiology* 146, 999–1009.
- Zlotkin, A., Eldar, A., Ghittino, C. & Bercovier, H. (1998). Identification of *Lactococcus garvieae* by PCR. *J Clin Microbiol* 36, 983–985.
- Zuily, S., Mami, Z. & Meune, C. (2011). *Lactococcus garvieae* endocarditis. *Arch Cardiovasc Dis* 104, 138–139.

Edited by: D. A. Mills

Genome Sequence of *Lactococcus garvieae* UNIUD074, Isolated in Italy from a Lactococcosis Outbreak[∇]

Pilar Reimundo,^{1*} Miguel Pignatelli,² Luis David Alcaraz,³ Giuseppe D'Auria,^{3,4}
 Andrés Moya,^{3,4} and José A. Guijarro¹

Área de Microbiología, Departamento de Biología Funcional, Facultad de Medicina, IUBA, Universidad de Oviedo, 33006 Oviedo, Spain¹; EMBL-European Bioinformatics Institute, Wellcome Trust Genome Campus, Hinxton, Cambridge CB10 1SD, United Kingdom²; Unidad Mixta de Investigación en Genómica y Salud—Centro Superior de Investigación en Salud Pública (Generalitat Valenciana)/Instituto Cavanilles de Biodiversidad y Biología Evolutiva (Universitat de Valencia), Valencia, Spain³; and CIBER en Epidemiología y Salud Pública, Valencia, Spain⁴

Received 2 May 2011/Accepted 10 May 2011

***Lactococcus garvieae* is the etiological agent of lactococcosis disease, affecting many cultured fish species worldwide. In addition, this bacterium is currently considered a potential zoonotic microorganism since it is known to cause several opportunistic human infections. Here we present the draft genome sequence of the *L. garvieae* strain UNIUD074.**

Lactococcus garvieae is a serious fish pathogen responsible for lactococcosis, a bacterial disease that produces hyperacute and hemorrhagic septicemia in various cultured fish species the world over (17). First isolated in 1983 as a mastitis agent in bovines (5), this bacterium has also been isolated from a wide variety of dairy environmental and animal samples (1, 6, 11, 12, 15, 18). Additionally, *L. garvieae* has recently been associated with an increasing number of human infections, such as endocarditis (7–9, 13, 19–23), septicemia (20), liver abscess (14), secondary peritonitis (20), spondylodiscitis (4, 10), and diverticulitis (20). Thus, this ubiquitous bacterium is considered at present as a potential zoonotic agent with an increasing relevance in both veterinary and human medicine. Despite the importance of *L. garvieae* as a bacterial pathogen, little is known about its precise virulence mechanisms.

In the present study, we report the genome sequence of *L. garvieae* strain UNIUD074, isolated in Italy from a lactococcosis outbreak in rainbow trout. Total genomic DNA was extracted from a cultured bacterial strain (brain heart infusion broth at 28°C; Difco) according to the user manual of the UltraClean Mega soil DNA kit (MO-BIO Laboratories, Inc.). Genomic DNA was subsequently sequenced through a whole-genome shotgun strategy using Roche 454 GS-FLX Titanium pyrosequencing. As a result, 395,244 single-end reads and 79,811 paired-end reads (3-kb fragments) were obtained (totaling ~160 Mb; ~70-fold coverage of the genome). Quality-filtered reads were assembled using the 454 Newbler v2.3 (454 Life Sciences) and the Celera v6.1 (SourceForge) software assemblers into 25 large contigs (>1,000 bp). Screening for rRNAs and tRNAs, as well as prediction and annotation of protein-coding sequences (CDSs), were carried out through the RAST (rapid annotation using subsystem technology)

server (2). Identification of insertion sequences (IS) and tandem repeat regions was carried out using IS finder (<http://www-is.biotoul.fr>) (16) and IR finder (3), respectively. The draft genome of *L. garvieae* UNIUD074 includes 2,171,966 bp and contains 2,101 CDSs, with a G+C content of 38.7%. There are at least nine rRNA operons constituted by single-copy genes predicted for 5S, 16S, and 23S rRNAs, at least six pseudotRNAs, and at least 60 tRNAs covering all amino acids except for serine. In addition, nine IS and 215 tandem repeat regions were identified. An estimated 78.15% of the CDSs were predicted to encode proteins with a known function in other bacterial species. A comparison was made between both *Lactococcus lactis* IL1403 and *L. garvieae* UNIUD074 genome sequences, concluding that 18.6% of all the protein-coding genes are specific to the *L. garvieae* genome. The majority (61.8%) of these specific CDSs were annotated as hypothetical proteins. We hope that the whole-genome sequencing of *L. garvieae* strain UNIUD074 will allow scientists to gain insights into the molecular basis of the virulence mechanisms of this important bacterial pathogen.

Nucleotide sequence accession numbers. This whole-genome shotgun project has been deposited at DDBJ/EMBL/GenBank under the accession number AFHF00000000. The version described in this paper is the first version, AFHF01000000.

This work was supported by the project AGL2009-07003 from the Ministry of Science and Innovation of Spain (MICINN). P.R. was the recipient of a predoctoral fellowship from the MICINN. We thank L. Gusmani from the University of Udine for donating the *L. garvieae* UNIUD074 strain and X. S. Puente for his research advice.

P.R. expresses her heartfelt gratitude to all the people at the Department of Health and Genomics, Center for Advanced Research in Public Health, Valencia, Spain, for sharing their knowledge and experience and for making her stay in the city so pleasurable. Additionally, she is heartily grateful to the people at the Microbiology Area, Department of Functional Biology, Faculty of Medicine, University of Oviedo, Oviedo, Spain, where she has the pleasure to work with Jessica Méndez, David Pérez-Pascual, Roberto Navais, Esther Gómez, and Desirée Cascales.

* Corresponding author. Mailing address: Área de Microbiología, Departamento de Biología Funcional, Facultad de Medicina, IUBA, Universidad de Oviedo, 33006 Oviedo, Spain. Phone: 34985104218. Fax: 34985103148. E-mail: reimundomaria@uniovi.es.

[∇] Published ahead of print on 20 May 2011.

