



Universidad de Oviedo

Programa de Doctorado  
Biología Funcional y Molecular

Comparativa genómica y expresión  
diferencial de genes en respuesta a  
temperatura y su relación con el proceso  
infeccioso de *Yersinia ruckeri*

**Desirée Cascales Freire**

**Tesis doctoral**

**Oviedo 2017**







Vicerrectorado de Organización  
Académica

Universidad de Oviedo



ASTURIAS  
CAMPUS DE EXCELENCIA  
INTERNACIONAL  
[SU FUTURO]

### Justificación

El presente trabajo reúne todos los requisitos necesarios.

Oviedo, 7 de Abril de 2017

Director del Departamento de Biología funcional



Fdo.: Alvaro Jesús Celaya González

F  
O  
R  
M  
A  
T  
I  
V  
O  
A  
-  
0  
12

Contra la presente resolución podrá interponer recurso de alzada ante el Excmo. Sr. Rector Magfco. de esta Universidad en el plazo de un mes a contar desde el siguiente a la recepción de la presente resolución, de acuerdo con lo previsto en el artículo 114 de la Ley 30/92, de 26 de noviembre, del Régimen Jurídico de las Administraciones Públicas y Procedimiento Administrativo Común (B.O.E. de 27 de noviembre), modificada por la Ley 4/1999, de 13 de enero (B.O.E. de 14 de enero)

SR.

(Doctorando, Director de la Tesis Doctoral y Sra. Directora del Centro Internacional de Postgrado)



## RESUMEN DEL CONTENIDO DE TESIS DOCTORAL

1.- Título de la Tesis	
Español/Otro Idioma: <b>Comparativa genómica y expresión diferencial de genes en respuesta a temperatura y su relación con el proceso infeccioso de <i>Yersinia ruckeri</i>.</b>	Inglés: <b>Comparative genomics and differential gene expression in response to temperature and their relationship with the infectious process of <i>Yersinia ruckeri</i></b>
2.- Autor	
Nombre: <b>DESIRÉE CASCALES FREIRE</b>	DNI/Pasaporte/NIE: _____
Programa de Doctorado: <b>BIOLOGÍA FUNCIONAL Y MOLECULAR</b>	
Órgano responsable: <b>UNIVERSIDAD DE OVIEDO</b>	

### RESUMEN (en español)

*Yersinia ruckeri* es el agente etiológico de la yersiniosis, enfermedad que afecta principalmente a salmónidos. Esta patología causa importantes pérdidas económicas en la acuicultura de muchos países. Por ello, se hace necesario ahondar en el conocimiento de los factores relacionados con la virulencia de esta bacteria y así poder desarrollar nuevas estrategias de prevención y tratamiento.

Con el fin de aportar datos en este campo, en la presente Tesis Doctoral se ha abordado el estudio de este patógeno desde dos puntos de vista. En primer lugar se ha secuenciado, analizado y comparado el genoma de la cepa *Y. ruckeri* 150, con el de otras cuatro cepas de la misma especie. De este modo, se han puesto de manifiesto similitudes y diferencias en cuanto a serotipo y hospedador, así como genes que pueden resultar esenciales en la virulencia de este patógeno. Por otro lado, también se han identificado numerosos genes cuya expresión es mayor a 18 °C, temperatura entorno a la cual tienen lugar los brotes de la infección, que a 28 °C, temperatura óptima de crecimiento de la bacteria, y que codifican potenciales factores implicados en el proceso infeccioso de *Y. ruckeri*. De entre ellos, se han estudiado en mayor profundidad el gen *acrR*, que codifica un represor de la bomba de expulsión de productos tóxicos AcrAB-TolC, y el gen *osmY*, relacionado con la respuesta a cambios en la osmolaridad. Además, el uso de la tecnología IVIS Lumina, permitió, mediante la detección de luminiscencia, determinar el patrón de expresión de ambos genes en los tejidos de trucha arcoíris.

Los resultados obtenidos contribuyen a profundizar en el conocimiento del proceso infeccioso de *Y. ruckeri*, abriendo así, nuevas vías para el estudio no solo de esta bacteria sino también de otros patógenos de animales ectotermos.

### RESUMEN (en Inglés)



***Yersinia ruckeri* is the etiological agent of yersiniosis, a disease affecting mainly salmonids. This pathology causes significant economic losses in aquaculture worldwide. Therefore, it is necessary to delve into the knowledge of the factors related to the virulence of this bacterium and to be able to develop new strategies for prevention and treatment.**

In order to provide data in this field, the present Doctoral Thesis has addressed the study of this pathogen from two points of view. First, the genome of the *Y. ruckeri* 150 strain was sequenced, analyzed and compared with the genomes of other four strains of the same species. Thus, similarities and differences in serotype and host have been shown, as well as the genes that could be essential for the virulence of this pathogen. On the other hand, numerous genes have also been identified whose expression is higher at 18 ° C, temperature at which outbreaks take place, than at 28 ° C, optimum bacterial growth temperature, and which encode potential factors involved in the infectious process of *Y. ruckeri*. Among them, the *acrR* gene, which encodes a repressor of the toxic compounds AcrAB-TolC efflux pump, and the *osmY* gene, related to the response to changes in osmolarity, have been studied in greater depth. In addition, the use of IVIS Lumina technology, allowed, through the detection of luminescence, to determine the expression pattern of both genes in rainbow trout tissues.

The results obtained contribute to a deeper understanding of the infectious process of *Y. ruckeri*, thus opening new ways for the study not only of this bacterium but also of other ectothermic animal pathogens.

# Agradecimientos









# Índice



Índice .....	13
Abreviaturas y siglas .....	21
1. Introducción .....	25
1.1. Situación de la acuicultura y sus principales patologías bacterianas asociadas .....	27
1.2. <i>Yersinia ruckeri</i> .....	27
1.3. La enfermedad entérica de la boca roja (enteric redmouth disease).....	29
1.4. Factores de virulencia de <i>Y. ruckeri</i> .....	33
1.5. Influencia de la temperatura en la expresión de genes de virulencia en bacterias patógenas de animales ectotermos .....	35
1.6. Efecto de la exposición a antibióticos en la virulencia .....	36
1.7. Bombas de expulsión de productos tóxicos .....	37
1.8. Estrés osmótico. Proteína OsmY.....	38
1.9. La luminiscencia como herramienta para el estudio de la regulación génica y el análisis de los procesos infecciosos.....	39
1.10. Secuenciación y análisis de genomas .....	40
2. Objetivos.....	41
3. Material y métodos.....	45
3.1. Cepas, plásmidos y condiciones de cultivo .....	47
3.2. Técnicas generales de manipulación del ADN .....	49
3.3. Secuenciación y caracterización genómica de la cepa <i>Y. ruckeri</i> 150 .....	49
3.3.1. Secuenciación del ADN.....	49
3.3.2. Anotación génica del cromosoma e identificación de secuencias repetidas, profagos y elementos CRISPR.....	50
3.4. Análisis comparativo del genoma de <i>Y. ruckeri</i> 150 con las cepas <i>Y. ruckeri</i> ATCC24973, <i>Y. ruckeri</i> CSF007-82, <i>Y. ruckeri</i> Big Creek 74 y <i>Y. ruckeri</i> SC09. ....	50
3.5. Obtención y análisis de una genoteca de mutantes de <i>Y. ruckeri</i> 150 mediante transposición .....	52
3.5.1. Construcción del transposón mini-Tn5 <i>luxlac</i> Km2.....	52
3.5.2. Transferencia e inserción del transposón Tn5 <i>luxlac</i> en el genoma de <i>Y. ruckeri</i> 150.....	53
3.5.3. Análisis de la inserción del transposón Tn5 <i>luxlac</i> .....	54
3.5.4. Estabilidad del transposón e influencia de éste sobre el crecimiento de los clones seleccionados .....	55
3.6. Selección, identificación y análisis <i>in vivo</i> de mutantes de <i>Y. ruckeri</i> con mayor actividad $\beta$ -galactosidasa a 18 °C que a 28 °C .....	55

3.6.1. Selección de clones con mayor expresión a 18 °C que a 28°C.....	55
3.6.2. Identificación del sitio de inserción del transposón Tn5 <i>luxlac</i> en los clones seleccionados. ....	56
3.6.3. Determinación de la virulencia de los mutantes obtenidos.....	57
3.7. Caracterización <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> de clones de <i>Y. ruckeri</i> 150 obtenidos con cefotaxima como sistema de selección.....	57
3.7.1. Obtención de la cepa <i>Y. ruckeri</i> 150CTX en medio con cefotaxima .....	57
3.7.2. Agregación en medio líquido.....	58
3.7.3. Tinción de las colonias con negro sudán.....	58
3.7.4. Observación de células al microscopio.....	58
3.7.5. Perfil de resistencia a antibióticos.....	58
3.8. Identificación, secuenciación y análisis de genes que codifican distintas porinas de <i>Y. ruckeri</i> .....	59
3.9. Análisis del perfil de proteínas mediante SDS-PAGE.....	59
3.10. Análisis de los mutantes <i>acrR</i> <sup>-</sup> y <i>osmY</i> <sup>-</sup> .....	60
3.10.1. Cuantificación de la actividad β-galactosidasa de los clones <i>acrR</i> <sup>-</sup> y <i>osmY</i> <sup>-</sup> mediante ensayo ONPG .....	60
3.10.2. Análisis <i>in silico</i> de los genes <i>acrR</i> y <i>osmY</i> .....	60
3.10.3. Obtención de las cepas complementadas <i>Y. ruckeri</i> <i>acrR</i> <sup>+</sup> , <i>Y. ruckeri</i> <i>osmY</i> <sup>+</sup> y <i>Y. ruckeri</i> <i>osmY</i> <sup>++</sup> .....	60
3.10.4. Caracterización fenotípica de las cepas <i>Y. ruckeri</i> <i>acrR</i> <sup>-</sup> , <i>Y. ruckeri</i> <i>acrR</i> <sup>+</sup> , <i>Y. ruckeri</i> <i>osmY</i> <sup>-</sup> , <i>Y. ruckeri</i> <i>osmY</i> <sup>+</sup> y <i>Y. ruckeri</i> <i>osmY</i> <sup>++</sup> .....	61
2.10.4.1. Ensayo de susceptibilidad a distintos compuestos.....	61
3.10.4.2. Ensayo de sensibilidad a compuestos orgánicos y sales biliares .....	61
3.10.4.3. Efecto de colorantes y azúcares en la morfología de la colonia.....	62
3.10.5. Determinación de la virulencia .....	63
3.10.6. Análisis de la expresión de los genes <i>acrR</i> y <i>osmY</i> vía detección de la luminiscencia .....	64
3.10.6.1. Influencia de los compuestos acrilflavina y NaCl.....	64
3.10.6.2. Expresión en relación a los distintos órganos de trucha arcoíris .....	65
4. Resultados.....	67
4.1. Secuenciación y caracterización genómica de la cepa <i>Y. ruckeri</i> 150 .....	69
4.2. Análisis comparativo del genoma de <i>Y. ruckeri</i> 150 con los de las cepas <i>Y. ruckeri</i> ATCC24973, <i>Y. ruckeri</i> CSF007-82, <i>Y. ruckeri</i> Big Creek 74 y <i>Y. ruckeri</i> SC09 .....	70
4.2.1. Alineamiento de genomas por pares .....	70

4.2.2. Genes diferenciales en el conjunto de los genomas analizados.....	71
4.2.2.1. Identificación de genes compartidos de forma exclusiva entre las cepas <i>Y. ruckeri</i> 150, <i>Y. ruckeri</i> ATCC 29473 y <i>Y. ruckeri</i> CSF007-82 .....	73
4.2.2.2. Identificación de genes compartidos de forma exclusiva por las cepas <i>Y. ruckeri</i> Big Creek 74 y <i>Y. ruckeri</i> SC09.....	75
4.2.2.3. Identificación de los genes únicos de la cepa <i>Y. ruckeri</i> Big Creek 74.....	77
4.2.2.4. Identificación de genes únicos de la cepa <i>Y. ruckeri</i> SC09 .....	78
4.2.2.5. Identificación de genes ausentes en el genoma de la cepa <i>Y. ruckeri</i> ATCC 29473 y presentes en las otras cuatro cepas estudiadas .....	79
4.3. Generación de una genoteca de mutantes por transposición e identificación de genes que se expresan más a 18 °C que a 28 °C.....	80
4.3.1. Construcción y análisis de una genoteca de mutantes por transposición utilizando cefotaxima como antibiótico de selección .....	80
4.3.1.1. Validación del procedimiento: integración, estabilidad y efecto del transposón en el crecimiento de la bacteria.....	81
4.3.1.2. Selección e identificación de genes que se expresan más a 18 °C que a 28 °C.....	82
4.3.1.3. Virulencia de los clones identificados.....	83
4.3.1.4. Caracterización fenotípica de las cepas cultivadas en presencia de cefotaxima.....	84
4.3.1.5. Efecto del antibiótico cefotaxima en la fisiología y virulencia de <i>Y. ruckeri</i> 150.....	85
4.3.2. Construcción y análisis de una genoteca de mutantes por transposición utilizando eritromicina como antibiótico de selección .....	88
4.3.2.1. Validación del procedimiento: Integración, estabilidad y efecto del transposón en el crecimiento de la bacteria.....	88
4.3.2.2. Selección e identificación de mutantes con mayor actividad $\beta$ -galactosidasa a 18 °C que a 28 °C.....	89
4.3.2.3. Análisis de la virulencia de los clones seleccionados .....	89
4.3.2.4. Cuantificación de la expresión diferencial de los genes <i>acrR</i> y <i>osmY</i> .....	90
4.4. Análisis del represor AcrR de la bomba de expulsión de productos tóxicos AcrAB-TolC.....	91
4.4.1. Análisis <i>in silico</i> del gen <i>acrR</i> y de su contexto genético.....	91
4.4.2. Caracterización del mutante <i>Y. ruckeri</i> <i>acrR</i> <sup>-</sup> y su complementado <i>Y. ruckeri</i> <i>acrR</i> <sup>+</sup> .....	92
4.4.2.1. Determinación del efecto de la mutación sobre el crecimiento de la bacteria.....	92

4.4.2.2. Sensibilidad a compuestos antimicrobianos, detergentes y colorantes .....	93
4.4.2.3. Sensibilidad a compuestos orgánicos .....	93
4.4.2.4. Sensibilidad a sales biliares .....	94
4.4.2.5. Morfología de la colonia en el medio EMB .....	95
4.4.3. Determinación de la virulencia.....	97
4.4.4. Regulación del gen <i>acrR</i> vía detección de la luminiscencia.....	98
4.4.4.1. Influencia de la acrilflavina en la expresión del gen <i>acrR</i> .....	98
4.4.4.2. Análisis de la expresión del gen <i>acrR</i> relación a los órganos de la trucha arcoíris .....	99
4.5. Caracterización del mutante <i>Y. ruckeri osmY</i> <sup>-</sup> .....	102
4.5.1. Análisis <i>in silico</i> del gen <i>osmY</i> .....	102
4.5.2. Caracterización de la cepa mutante <i>Y. ruckeri osmY</i> <sup>-</sup> y complementadas <i>osmY</i> <sup>+</sup> y <i>osmY</i> <sup>++</sup> .....	103
4.5.3. Determinación de la virulencia de las cepas <i>Y. ruckeri osmY</i> <sup>-</sup> y <i>Y. ruckeri osmY</i> <sup>++</sup> .....	105
4.5.4. Estudio de la regulación del gen <i>osmY</i> vía detección de la luminiscencia.....	106
4.5.4.1. Efecto del NaCl en la expresión del gen <i>osmY</i> .....	106
4.5.4.2 Análisis de la expresión del gen <i>osmY</i> en relación a los órganos de trucha arcoíris .....	107
5. Discusión.....	111
5.1. Secuenciación y análisis comparativo del genoma de <i>Y. ruckeri</i> 150.....	113
5.1.1. Genes compartidos de forma exclusiva por las cepas de <i>Y. ruckeri</i> 150, ATCC24973 y SC007-82, de serotipo O1 .....	114
5.1.2. Genes compartidos de forma exclusiva por las cepas <i>Y. ruckeri</i> Big Creek y SC09 .....	115
5.1.3. Genes únicos de la cepa <i>Y. ruckeri</i> Big Creek.....	117
5.1.4. Genes únicos de la cepa <i>Y. ruckeri</i> SC09 .....	118
5.1.5. Identificación de genes ausentes en el genoma de la cepa <i>Y. ruckeri</i> ATCC 29473 y presentes en las otras cuatro cepas estudiadas.....	118
5.2. Expresión diferencial de genes de <i>Y. ruckeri</i> en respuesta a cambios de temperatura.....	119
5.2.1. Validación del método: Integración, estabilidad y efecto del transposón Tn5 <i>luxlac</i> en el crecimiento de la bacteria .....	119
5.2.2. Identificación de genes que se expresan más a 18 °C que a 28 °C .....	120
5.2.3. Caracterización fenotípica de los clones seleccionados en presencia de cefotaxima .....	128



5.2.4. Caracterización fenotípica del mutante <i>Y. ruckeri</i> <i>acrR</i> <sup>-</sup> .....	130
5.2.5 Caracterización fenotípica del mutante <i>Y. ruckeri</i> <i>osmY</i> <sup>-</sup> .....	134
5.2.6. Expresión diferencial de los genes <i>acrR</i> y <i>osmY</i> en relación a los órganos de trucha arcoíris.....	135
5.2.6.1. Expresión diferencial del gen <i>acrR</i> .....	136
5.2.6.2. Expresión diferencial del gen <i>osmY</i> .....	137
6. Conclusiones .....	139
7. Bibliografía .....	143



## Abreviaturas y siglas



<b>ABC:</b> ATP-Binding Cassette superfamily	Naciones Unidas para la agricultura y la alimentación)
<b>AMC:</b> amoxicilina/ clavulánico	
<b>AMP:</b> ampicilina	<b>FEP:</b> cefepima
<b>AMPc:</b> adenosín monofosfato cíclico	<b>FOX:</b> cefoxitina
<b>AN:</b> Agar Nutritivo	<b>GC:</b> guanina más citosina
<b>sARN:</b> small ARN (ARN de pequeño tamaño)	<b>GFP:</b> Green Fluorescet Protein (proteína fluorescente verde)
<b>BCL:</b> Bloque Colinear Local	<b>IVET:</b> <i>In Vivo</i> Expression Technology (Tecnología de Expresión <i>In Vivo</i> )
<b>CAZ:</b> ceftazidima	<b>Kb:</b> kilobases
<b>CDS:</b> Coding Sequence (Secuencia Codificante)	<b>KF:</b> cefalotina
<b>CMI:</b> Concentración Mínima Inhibitoria	<b>LPS:</b> lipopolisacárido
<b>CN:</b> Caldo Nutritivo	<b>MATE:</b> Multidrug And Toxic compound Extrusión family
<b>CN:</b> gentamicina	<b>Mb:</b> megabases
<b>CRISPR:</b> Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeat	<b>MDR:</b> Multi Drug Resistance
<b>CTX:</b> cefotaxima	<b>MEM:</b> meropenem
<b>CXM:</b> cefuroxima	<b>MFS:</b> Major Facilitator Superfamily
<b>dntps:</b> desoxiribonucleótidos trifosfato	<b>NCBI:</b> National Center for Biotechnology Information (Centro Nacional para la Información Biotecnológica)
<b>DL<sub>50</sub>:</b> Dosis Letal 50	<b>ONPG:</b> o-nitrofenil-beta-D-galactopiranosido
<b>DO:</b> Densidad Óptica	<b>ORF:</b> Open Realing Frame (pauta abierta de lectura)
<b>E:</b> eritromicina	<b>pb:</b> pares de bases
<b>ELISA:</b> enzyme-linked inmuno absorbent assay (ensayo inmuno enzimático)	<b>PBS:</b> Phosphate Buffered Saline (solución salina tamponada con fosfato)
<b>EMB:</b> Eosin Methylene Blue (eosina azul de metileno)	<b>PTS:</b> phosphoenolpyruvate-dependent phosphotransferase system (sistema fosfotransferasa dependiente de fosfoenolpiruvato)
<b>ERM:</b> Enteric Red Mouth (enfermedad entérica de la boca roja)	
<b>FAO:</b> Food and Agriculture Organization (Organización de las	

**RAG:** Reductasa de Ácidos Grasos

**RAST:** Rapid Annotation using  
Subsystem Technology

**RLU:** Relative Light Unit (unidad relativa  
de luz)

**RND:** Resistance Nodulation cell  
División family

**rpm:** revoluciones por minuto

**SAM:** S-Adenosil Metionina

**SDS:** Sodium Dodecil Sulfate  
(dodecilsulfato sódico)

**SDS-PAGE:** sodium dodecyl sulfate  
polyacrylamide gel electrophoresis  
(Electroforesis en gel de poliacrilamida  
con dodecil sulfato sódico)

**SMR:** Small Multidrug Resistance family

**TOB:** tobramicina

**TSB:** Tryptic Soy Broth (Caldo se soja y  
triptona)

**TSA:** Tryptic Soy Agar (agar de soja y  
triptona)

**ufc:** unidades formadoras de colonias

# 1. Introducción





## 1.1. Situación de la acuicultura y sus principales patologías bacterianas asociadas

La Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO) define la acuicultura como el cultivo de organismos acuáticos, tanto en zonas costeras como del interior, que implica intervenciones en el proceso de cría para aumentar la productividad. Este sector es el que más ha crecido en las últimas 3 décadas y se prevé que continúe haciéndolo en el futuro. En términos de suministro de alimentos, por primera vez en el año 2014, la acuicultura proporcionó más pescado que la propia pesca de captura (FAO, 2016). En el contexto mundial, España se encuentra entre los 25 países con mayor producción derivada de la acuicultura (FAO, 2016).

La práctica de la acuicultura, al ser una actividad intensiva, lleva asociado un aumento de los procesos patológicos. Entre ellos, destacan especialmente las infecciones de origen bacteriano, causantes de grandes pérdidas económicas debido a la gran mortalidad que generan y al elevado coste de los tratamientos. Es por ello que la investigación en el campo de la patología bacteriana en acuicultura es de gran interés. Las principales bacterias patógenas causantes de problemas en este ámbito se pueden clasificar en los siguientes grupos:

### - Bacilos Gram-negativos

Este grupo representa probablemente el más extenso en cuanto a procesos patológicos en acuicultura y el que más problemas ocasiona. En él se encuentran enterobacterias como *Yersinia ruckeri* y *Edwardsiella tarda*, Vibrionáceas como *Vibrio vulnificus* y *Photobacterium damsela*, Aeromonadáceas como *Aeromonas hydrophyla* o *Aeromonas salmonicida* y Pseudomonadáceas como *Pseudomonas fluorescens* o *Pseudomonas angilliseptica* (para revisión, ver Méndez y col., 2012).

### - Bacilos y cocos Gram-positivos

En este grupo se incluyen las especies *Streptococcus iniae*, *Lactococcus garvieae*, *Carnobacterium piscícola* y *Renibacterium salmoninarum*, entre otros.

### - Micobacterias y Nocardáceas

*Mycobacterium marinum*, *Mycobacterium fortuitum* y *Nocardia salmonicida*.

### - Flavobacteriaceas

*Flavobacterium psychrophilum*, *Flavobacterium columnare* y *Tenacibaculum maritimum*.

## 1.2. *Yersinia ruckeri*

El género *Yersinia* está constituido por 17 especies, de las cuales 3 son importantes patógenos humanos: *Yersinia pestis*, agente etiológico de la peste, *Yersinia enterocolitica* y *Yersinia pseudotuberculosis*, ambas causantes de procesos

gastrointestinales y afecciones de ganglios mesentéricos. Además de las especies anteriormente citadas, este género se encuentra conformado por: *Y. aldovae*, *Y. aleksiciae*, *Y. bercovieri*, *Y. entomophaga*, *Y. frederiksenii*, *Y. intermedia*, *Y. kristensenii*, *Y. malssiliensis*, *Y. moratelli*, *Y. nurmii*, *Y. pekkanenii*, *Y. rodehi*, *Y. ruckeri* y *Y. similis*. Recientemente se ha añadido a la lista a *Y. wautersii* (Savin y col., 2014), aunque hay autores que opinan que no hay evidencias suficientes como para que deba ser considerada una nueva especie (Neubauer y Sprague, 2015).

*Y. ruckeri*, fue aislada por primera vez a partir de trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*), en Idaho (Estados Unidos) en los años 50, siendo descrita inicialmente por Ross y col. (1966) y Rucker (1966). En un primer momento, la bacteria fue adscrita a la familia de las Enterobacterias basándose en su morfología y en sus características bioquímicas, más difícil fue la asignación del género, ya que dependiendo de las pruebas taxonómicas realizadas, la bacteria se podía relacionar con los géneros *Serratia*, *Salmonella* o *Yersinia* (Ross y col, 1966; Ewing y col., 1978; Green y Austin, 1982). En 1978, Ewing y col., basados en pruebas de hibridación y en el análisis de la composición de bases del ADN, incluyeron a la bacteria en el género *Yersinia*. Esta clasificación, que se extiende a la actualidad, ha generado mucha controversia, habiendo sido puesta en entredicho por autores como Kotetishvili y col. (2005), los cuales sugirieron que la posición taxonómica de *Y. ruckeri* debía ser reevaluada, ya que los resultados de tipificación mediante secuencia multilocus (MLST) y análisis de ARNr 16S indicaban que esta especie es la más alejada genéticamente del género *Yersinia*. Por otro lado, dicha clasificación se ha visto apoyada por estudios como el de Brenner y col., (2005) donde se mostró que el contenido en GC de *Y. ruckeri* ( $48 \pm 0,5$  %) era más próximo al de las bacterias de los géneros *Yersinia* (46-50 %) que a las del género *Serratia* (52-60 %) o *Salmonella* (50-53 %). Más recientemente, Chen y col. (2010) han confirmado mediante secuenciación genómica que *Y. ruckeri*, a pesar de ser el miembro más alejado del género, posee un genoma "core" común a las demás especies de *Yersinia*.

*Y. ruckeri* es una bacteria Gram-negativa con forma de bacilo recto o semicurvado de aproximadamente 1  $\mu\text{m}$  de diámetro y 2-3  $\mu\text{m}$  de largo. Gran parte de las cepas son móviles, presentando flagelos en disposición peritrica. Su temperatura óptima de crecimiento se encuentra entre los 28 y 29 °C. Es una bacteria anaerobia facultativa, positiva para la prueba de la catalasa, lisina y ornitina descarboxilasa, es también oxidasa y  $\beta$ -galactosidasa negativa, reduce el nitrato a nitrito, y es capaz de hidrolizar el Tween 20, 40 y 60, además de fermentar la glucosa, manitol, maltosa y trehalosa. La distinta capacidad de las cepas de *Y. ruckeri* para hidrolizar el Tween 80, la gelatina o la caseína, así como para producir acetoína y fermentar el sorbitol, ha resultado de utilidad en la realización de estudios taxonómicos y epidemiológicos (Davies y Frerichs, 1989).

La clasificación intraespecífica de *Y. ruckeri* define 2 biotipos: el biotipo 1 es móvil y positivo para la prueba de hidrólisis del Tween 80, mientras que el biotipo 2 no es móvil e incapaz de hidrolizar el Tween 80 (Davies y Friedrich, 1989).

La clasificación serológica es compleja y a lo largo de los años se han realizado distintas propuestas (Stevenson y Airdrie, 1984; Daly y col., 1986; Davies, 1990; Davies, 1991a; Stevenson y col., 1993; Romalde y col., 1993; Sousa y col., 2001). La más aceptada es la de Romalde y col. (1993) que, basándose en el estudio de los antígenos O-termoestables, lipopolisacáridos (LPS) y proteínas de la membrana externa u OMPs, diferencia cuatro serotipos: serotipo O1, que se subdivide en el grupo a (correspondiente al antiguo serotipo I) y b (correspondiente al antiguo serotipo III), serotipo O2 (antiguo serotipo II) que se subdivide en los grupos a, b y c, serotipo O3 (antiguo serotipo V) y serotipo O4 (antiguo serotipo VI). Dentro de estos serotipos, en el serotipo O1a (equivalente al clásico serotipo I) se encuentran las cepas más virulentas.

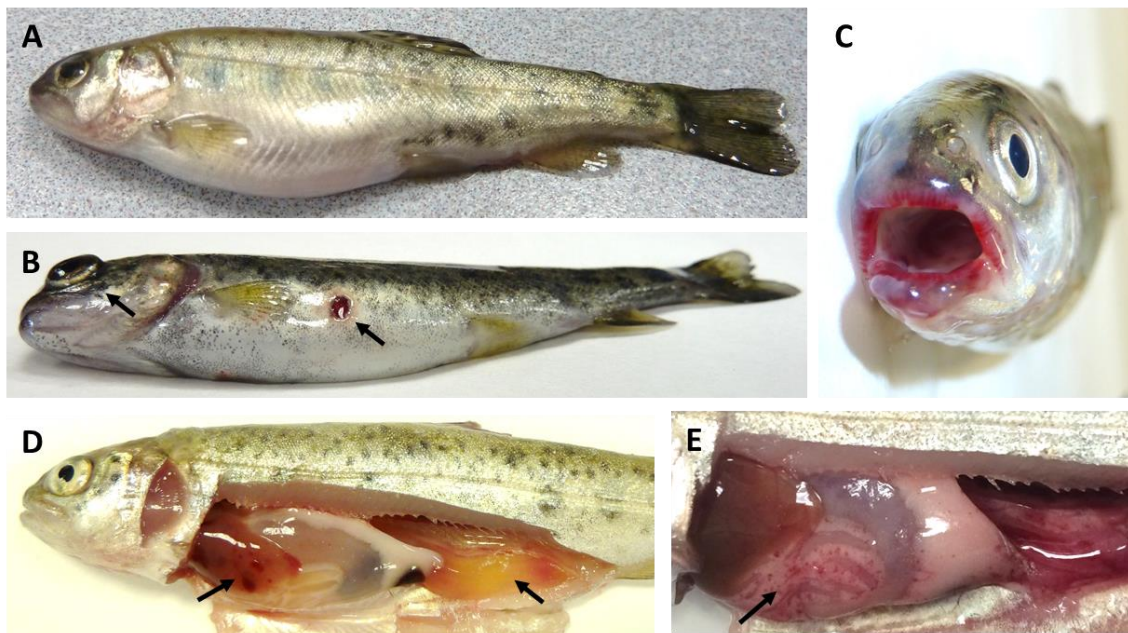
En cuanto a la clasificación genética de *Y. ruckeri*, García y col., 1998, tras analizar 183 cepas de distintos orígenes geográficos, encontraron 8 perfiles plasmídicos diferentes. Además, la mayoría de las cepas del serotipo I (correspondiente al actual serotipo O1a) presentaban un plásmido de gran tamaño (75MDa) cuya implicación en la virulencia aún no ha sido determinada. Lo que sí está claro es que este plásmido no presenta homología con los plásmidos de virulencia de otras especies del género *Yersinia* (Guilvout y col., 1988). En contraposición a estudios anteriores en los que se atribuía a *Y. ruckeri* una gran homogeneidad (García y col., 1998), los estudios realizados por Bastardo y col. (2012a) revelaron una gran variabilidad intraespecífica a nivel bioquímico, serológico y genético.

### 1.3. La enfermedad entérica de la boca roja (enteric redmouth disease)

*Y. ruckeri* es el agente etiológico de la enfermedad entérica de la boca roja (Enteric Redmouth Disease, ERM) también conocida como yersiniosis. Aunque *Y. ruckeri* fue inicialmente aislada en Estados Unidos, con el tiempo se ha detectado su presencia en Canadá, Europa, Sudamérica, Oriente Medio, China, India y Australia (Kumar y col., 2015). La ERM, que afecta principalmente a salmónidos, dentro de los cuales la trucha arcoíris resulta especialmente susceptible, también ha sido detectada en peces pertenecientes a otras familias (McArdle y Dooley-Martyn, 1985; Manna y col., 2003; Shaowu y col., 2013). Además, *Y. ruckeri* también se ha aislado de otros animales como la rata almizclera (*Ondatra zibethicus*), el cernícalo (*Falco spp.*), la gaviota (*Larus spp.*), la tortuga (*Cheloniidae*) e incluso el hombre (Kumar y col., 2015). Se puede decir por tanto, que *Y. ruckeri* tiene un amplio rango tanto de hospedador como de distribución geográfica.

La yersiniosis es una enfermedad sistémica que puede afectar a peces en todos los estadios, cursando de forma aguda en alevines y con tendencia a cronificarse en peces adultos (Tobback y col., 2007). En el transcurso de la infección suelen tener lugar alteraciones en el comportamiento del pez fácilmente identificables, tales como anorexia, letargia o natación errática cercana a la superficie. Además, suelen aparecer

determinados signos externos como oscurecimiento de la piel, distensión abdominal o hemorragias en la superficie del cuerpo, base de las aletas, línea lateral o región craneal, que en ocasiones derivan en úlceras (**figura 1.1.A,B**). Cuando estas hemorragias se producen en los capilares de la cavidad oral, le dan ese aspecto de boca roja tan característico, al que debe su nombre la enfermedad (**figura 1.1.C**). En estados avanzados de la infección, se puede producir exoftalmia (**figura 1.1.B**) con hemorragias en la cavidad ocular y el iris (**Fuhrmann y col., 1983**). Internamente, también pueden tener lugar hemorragias que se detectan como petequias en el hígado, el páncreas, el tejido adiposo asociado a ciegos pilóricos, la vejiga natatoria y los músculos laterales (**figura 1.1.D,E**). El riñón y el bazo pueden inflamarse y en el estómago e intestino puede aparecer un líquido mucoso, opaco y amarillento (**Busch, 1982**) (**figura 1.1.D**).



**Figura 1.1.** Alevines de trucha arcoíris que presentan algunos de los signos característicos de la yersiniosis: **A)** distensión abdominal; **B)** exoftalmia y úlceras; **C)** boca roja; **D)** petequias en el hígado e intestino inflamado con líquido amarillento en su interior; **E)** petequias en la grasa que rodea los ciegos pilóricos.

El examen histológico muestra generalmente una respuesta inflamatoria en prácticamente todos los tejidos como consecuencia de la septicemia. Se ha detectado la presencia de la bacteria especialmente en órganos bien vascularizados como el riñón, el bazo, el corazón, el hígado y las agallas (**Rucker, 1966**). Utilizando la proteína fluorescente verde o GFP, **Welch y Wiens (2005)** localizaron la bacteria en el bazo y en la sangre. Más recientemente, **Méndez y Guijarro (2013)** corroboraron la presencia de la bacteria en el intestino mediante la detección de luminiscencia en experimentos *in vivo*, y han sugerido que este órgano es importante para el establecimiento de la infección y la diseminación del patógeno. Por otra parte, **Ohtani y col. (2014)**, utilizando tomografía de proyección óptica, una novedosa técnica de imagen en 3D

aplicada a muestras biológicas, evidenciaron la presencia de *Y. ruckeri* en agallas y sangre de peces recién sometidos a inmersión, lo que indica que la primera vía de entrada de la bacteria son las agallas. Tras 7 días de infección, la bacteria fue encontrada en todos los órganos analizados, incluyendo el cerebro, sugiriendo que *Y. ruckeri* puede causar encefalitis (Ohtani y col. 2014).

Un hecho relevante a tener en cuenta es que algunos peces infectados por *Y. ruckeri* son asintomáticos, de tal manera que el patógeno no es detectado en los controles rutinarios. Por tanto, estos portadores pueden tener un papel muy importante como reservorios en la transmisión de la enfermedad. Además, en condiciones de estrés para el animal, tales como el aumento de la temperatura del agua, el deterioro de la calidad de la misma, la alta densidad de población, etc, puede desencadenarse la enfermedad en estos portadores, dando lugar a la aparición de brotes en las piscifactorías. En ocasiones, la corrección de los factores ambientales alterados basta para restaurar la salud de los animales afectados, pero habitualmente, se hace necesaria la utilización de antibióticos.

La principal fuente de dispersión de la bacteria tiene lugar por vía horizontal a partir de las heces de peces portadores o enfermos (Busch y Lingg, 1975; Méndez y Guijarro, 2013), aunque, en condiciones normales la carga bacteriana no llega a ser suficiente para producir brotes, salvo que se den condiciones de estrés (Hunter y col., 1980). Un estudio reciente de Glenn y col. (2014) sugiere que la transmisión de este patógeno también ocurre por vía vertical de las hembras a los huevos. Además, algunos autores sugieren que tanto peces silvestres como mamíferos y aves pueden actuar como vectores en la transmisión de la yersiniosis entre piscifactorías (Hunter y col., 1980; Willumsen, 1989). Por otra parte, la capacidad de *Y. ruckeri* de formar biopelículas sobre superficies y sedimentos, representa también un potencial foco de infección recurrente en las instalaciones (Coquet y col., 2002, Vendrell y col., 2009).

La prevención de la yersiniosis en los sistemas de producción piscícola, viene dada por la aplicación de **buenas prácticas en acuicultura**. Así, en instalaciones libres de la enfermedad es importante evitar la introducción de huevos o ejemplares infectados, mientras que en aquellas donde la enfermedad es endémica resulta de extrema importancia controlar los factores estresantes que desencadenan la aparición de los brotes. Aun así, es difícil evitar ciertas pérdidas sobre todo en verano cuando la temperatura del agua aumenta y su flujo disminuye. Otra medida de profilaxis es la **vacunación**. La yersiniosis fue la primera enfermedad de peces para la cual se desarrolló una vacuna comercial efectiva (Busch, 1978; Cossarini-Dunier, 1986). Desde entonces y hasta la fecha se han desarrollado diferentes vacunas monovalentes, que en su mayoría utilizan suspensiones celulares de cepas de *Y. ruckeri* serotipo O1, biotipo1, que han sido inactivadas con formalina y que pueden ser administradas por diversas rutas como inmersión, inyección u oral (Kumar y col., 2015). Este tipo de vacuna proporciona un buen grado de protección contra las cepas de *Y. ruckeri* de biotipo 1 (Çagırgan y Tanrikul, 1998; Villumsen y col., 2014). Sin embargo, en los últimos años se han descrito brotes de la enfermedad en peces que habían sido

previamente vacunados contra el biotipo 1 en Inglaterra (Austin y col., 2003), España (Fouz y col., 2006) y Estados Unidos (Arias y col., 2007). En todos los casos, las cepas de *Y. ruckeri* aisladas a partir de los animales enfermos fueron del biotipo 2. Un trabajo de Tinsley y col. (2011), parece indicar que las diferencias existentes en el antígeno O del lipopolisacárido de las cepas de biotipo 1 y 2, podría ser el responsable de la falta de eficacia de las vacunas comerciales (portadoras exclusivamente del biotipo 1), frente al biotipo 2. La presión selectiva ejercida durante años en las piscifactorías por el uso reiterado de las vacunas frente al biotipo 1 ha podido favorecer la aparición de cepas antigénicamente diferentes contra las cuales las vacunas existentes resultan ineficaces. Recientemente, se ha desarrollado una vacuna bivalente inactivando con formalina células de *Y. ruckeri* de ambos biotipos, que confiere una buena protección (Tinsley y col., 2011; Deshmukh y col., 2012). En el contexto anterior, está descrito que la aplicación de **inmunoestimulantes** puede mejorar la efectividad de las vacunas, un ejemplo de ello es el compuesto  $\beta$ -hidroxi- $\beta$ -metilbutirato (HMB), un derivado del aminoácido leucina, que administrado con la dieta tiene un efecto inmunoestimulante tanto a nivel celular como humoral (Siwicki y col., 2001). El uso de **probióticos** es una alternativa en la que se focalizan diversos estudios para prevenir la aparición de la ERM o mitigar su efecto. La administración por vía oral de cepas de *Bacillus subtilis* y *Bacillus licheniformis* (Raida y col., 2003), *Carnobacterium maltaromaticum* o *Carnobacterium divergens* (Kim y Austin, 2006), *Bacillus s.p.* o *Aeromonas sobria* (Brunt y col., 2007), *Enterobacter cloacae* y *Bacillus mojavenis* (Capkin y Altinok, 2009), proporciona a la trucha arcoíris protección frente a *Y. ruckeri*, reduciendo considerablemente su mortalidad. Además, se ha encontrado que determinadas bacterias lácticas presentan un efecto antagonista con *Y. ruckeri* (Balcázar y col., 2008; Sica y col., 2012).

Una vez que la enfermedad se desarrolla, la forma de tratamiento más frecuente consiste en el uso de agentes **antimicrobianos**. Los más usados son amoxicilina, ácido oxolínico, oxitetraciclina, sulfadiazina en combinación con trimetoprim y florfenicol (Alderman y Hastings, 1998). No obstante, la utilización reiterada de estos compuestos durante largos periodos de tiempo favorece la selección de cepas resistentes. En este sentido, Rodgers (2001) observó en experimentos *in vitro*, que tras una exposición continuada de *Y. ruckeri* a ácido oxolínico y oxitetraciclina, tenía lugar un aumento de la resistencia de la bacteria a dichos compuestos.

En cuanto al diagnóstico de la ERM, éste puede llevarse a cabo mediante técnicas de aislamiento y posterior identificación de la bacteria en medios como Agar de triptona y soja, Columbia agar sangre o Agar MacConkey. Algunos métodos de diagnóstico se basan en pruebas bioquímicas como los sistemas API 20E (Romalde y Toranzo, 1991) o API ZYM (Joh y col., 2010), o serológicas como ELISA, aglutinación y utilización de anticuerpos inmunofluorescentes (Smith y col., 1987). Las técnicas de detección molecular incluyen la búsqueda de polimorfismos en tamaños de fragmentos de restricción (García y col., 1998), amplificación isotérmica del ADN (LAMP) (Saleh y col., 2008) y PCR. Este último método tiene la ventaja de ser muy sensible, resultando de gran utilidad en los casos de portadores asintomáticos (Gibello y col., 1999; Altinok y col., 2001., Temprano y col., 2001; Del Cerro y col., 2002; Keeling y col., 2012;

**Bastardo y col., 2012b**). Recientemente, **Saleh y col. (2015)**, han demostrado la efectividad de la novedosa tecnología basada en nanopartículas de oro como herramienta de detección rápida y directa de ácidos nucleicos sin amplificar de *Y. ruckeri* en muestras clínicas.

## 1.4. Factores de virulencia de *Y. ruckeri*

A pesar de que *Y. ruckeri* es un patógeno de gran relevancia en la acuicultura continental, el conocimiento acerca de sus factores de virulencia, así como los mecanismos que los regulan, es escaso, posiblemente como consecuencia de que durante muchos años su estudio fue limitado, debido al desarrollo temprano de una vacuna contra la ERM. No obstante, la aparición de la enfermedad en peces que habían sido vacunados previamente, pone de manifiesto la necesidad de ahondar en los estudios en este ámbito para poder desarrollar nuevas estrategias de prevención y tratamiento. Además, desde un punto de vista biológico, el estudio de este patógeno también resulta de gran interés debido a que, a diferencia de otras especies del género que afectan a animales endotermos, entre los que se encuentra el hombre, *Y. ruckeri* afecta a ectotermos, por lo que los mecanismos de virulencia, así como su regulación, pueden ser muy distintos.

A continuación, se describen brevemente algunos de los factores que han sido relacionados con la virulencia de esta bacteria:

La capacidad de **supervivencia fuera del hospedador** durante largos periodos de tiempo, es una característica muy ventajosa que facilita la dispersión y transmisión de las bacterias patógenas. *Y. ruckeri* es capaz de sobrevivir durante al menos 4 meses en agua con salinidad baja (0 a 2 %), aunque en salinidades mayores (3,5 %) su supervivencia se ve notablemente disminuida (**Thorsen y col., 1992**). **Romalde y col. (1994)**, demostraron que ante situaciones de estrés o escasez de nutrientes *Y. ruckeri* puede entrar en un estado de dormancia en el que la bacteria mantiene la capacidad infectiva.

Los **biofilms** son importantes para la persistencia de las bacterias en el medio ambiente, protegiéndolas de agentes físicos y químicos. En este sentido, **Coquet y col., (2002)**, encontraron que ciertas cepas de *Y. ruckeri* eran capaces de formar biofilms sobre superficies inertes de los tanques de las piscifactorías, favoreciendo así su persistencia durante largos periodos de tiempo en el ambiente acuático.

La capacidad de **evasión del sistema inmunológico** es esencial para la multiplicación del patógeno y posterior colonización del hospedador. **Stave y col. (1987)**, observaron que las cepas de *Y. ruckeri* de serotipo I (O1a) poseedoras de un plásmido de 75 MDa resistían la acción bactericida de los macrófagos de lubina estriada (*Morone saxatilis*). Asimismo, **Davies (1991b)**, indicó que, salvo excepciones, las cepas virulentas del serotipo O1 eran resistentes a la acción bactericida del suero de trucha arcoíris. Un mecanismo que podría facilitar la supervivencia de esta bacteria en el interior de los macrófagos, es el resultante de la expresión del operón *cdsAB* implicado en el

transporte y degradación de cisteína (Méndez, 2012). Este operón, que se expresa fuertemente *in vivo* (Méndez y Guijarro., 2013), está implicado en la virulencia de *Y. ruckeri* (Méndez y col., 2011). Por otro lado, Furones y col. (1990), encontraron una correlación entre la presencia de un factor sensible al calor (HSF) y la virulencia de las cepas de serotipo O1a. Sin embargo, un estudio reciente de Navais y col. (2014) establece que el factor HSF es en realidad la alkilsulfatasa YraS, que es capaz de degradar SDS pero que no está relacionada con la virulencia de *Y. ruckeri*.

La **captación de hierro** es esencial para el crecimiento de los microorganismos en un ambiente con baja disponibilidad de este elemento como es el interior de un hospedador. En peces, el hierro suele encontrarse asociado a proteínas como la hemoglobina o la transferrina, por tanto las bacterias patógenas deben tener sistemas eficaces para adquirir este metal esencial. Entre estos mecanismos se encuentra la captación de hierro mediada por sideróforos, pequeñas moléculas capaces de unirse a este elemento con gran afinidad y especificidad, aun cuando éste se encuentre asociado a complejos insolubles o compuestos del hospedador (Ratledge y Dover, 2000). *Y. ruckeri* posee un sistema de captación de hierro mediado por el sideróforo denominado ruckerbactina, cuya producción se induce durante el proceso infeccioso, y cuya implicación en la virulencia ha sido demostrada por Fernández y col. (2004). Relacionado con la captación de hierro se encuentran las hemolisinas, que degradan proteínas transportadoras de hierro y eritrocitos, aumentando así la disponibilidad de este metal para su aprovechamiento por el patógeno. En el caso de *Y. ruckeri*, Fernández y col. (2007), confirmaron que la producción de la hemolisina YhIA estaba regulada por hierro y que presentaba actividad citolítica y hemolítica frente a la línea fibroblástica BF-2 de pez sol (*Lepomis macrochirus*). Estudios *in vivo* demostraron la implicación de esta proteína en la virulencia de *Y. ruckeri* (Fernández y col., 2007), además de su expresión en los tejidos del pez durante el proceso infeccioso (Méndez y Guijarro., 2013).

Los microorganismos patógenos han desarrollado sistemas eficaces de **captación de zinc**, un micronutriente esencial para ellos y cuya disponibilidad al igual que la del hierro, se encuentra limitada en el interior del hospedador. La implicación en la virulencia de los sistemas de captación de zinc ha sido descrita en microorganismos como *Escherichia coli* o *Salmonella enterica* (Gabbianelli y col., 2011; Sabri y col., 2009; Ammendola y col., 2007; Petrarca y col., 2010). En *Y. ruckeri* el operón *znuABC*, que codifica un sistema de transporte de alta afinidad por el zinc, también está implicado en el establecimiento y mantenimiento del proceso infeccioso en trucha arcoiris (Dahiya y Stevenson, 2010a).

Romalde y Toranzo (1993), demostraron que los **productos extracelulares** de *Y. ruckeri*, entre los que se encuentran lipasas, proteasas y hemolisinas, cuando se inyectaban en peces por vía intraperitoneal mostraban una alta toxicidad y producían las hemorragias y zonas necróticas propias de la enfermedad. Basados en estos estudios, Secades y Guijarro (1999) purificaron y caracterizaron la metaloproteasa Yrp1. Ésta, es capaz de digerir diferentes proteínas tanto de la matriz como del



músculo, destacando especialmente su potencial para digerir la laminina, componente mayoritario de la membrana basal, lo que está relacionado directamente con la invasión de tejidos (Fernández y col., 2003). La proteasa Yrp1 es secretada por un sistema de transporte ABC de tipo I codificado por 3 genes (*yrpD*, *yrpE* e *yrpF*) que se encuentran en operón en cuyo extremo 5' se localiza el gen que codifica la propia proteasa (*yrp1*) y un inhibidor de la misma (*inh*) (Fernández y col., 2002). Estudios *in vivo* demostraron la implicación de esta proteasa en la virulencia de *Y. ruckeri* (Fernández y col., 2002; 2003).

Los **sistemas de secreción de tipo IV** (T4SS) de patógenos intracelulares transfieren moléculas efectoras al interior de las células del hospedador, desarrollando un papel clave en la supervivencia de éstos en el interior de macrófagos o eritrocitos. En *Y. ruckeri* se ha encontrado que el T4SS codificado por el operón *traHIJKCLMN* está implicado en la virulencia y podría ser importante durante la etapa intracelular (Méndez y col., 2009). Este operón se parece, tanto en su secuencia como en su estructura, al operón *tra* del plásmido de virulencia pADAP de *Serratia entomophila* que también está implicado en la virulencia de esta bacteria (Hurst y col., 2003).

Los mecanismos de **regulación de la expresión génica** juegan un papel importante durante el desarrollo del proceso infeccioso ya que permiten la expresión diferencial de genes, gracias a lo cual, la bacteria es capaz de adaptarse a los diferentes ambientes existentes dentro del hospedador. Uno de los mecanismos más utilizados para el control de la expresión génica, son los sistemas de dos componentes. Un ejemplo de ello es el sistema BarA-UvrY que contribuye a la virulencia de *Y. ruckeri* al estar implicado en la resistencia al estrés oxidativo producido por las células del sistema inmune y en la invasión de las células epiteliales del hospedador (Dahiya y Stevenson., 2010b).

### 1.5. Influencia de la temperatura en la expresión de genes de virulencia en bacterias patógenas de animales ectotermos

Los microorganismos están constantemente sujetos a variaciones ambientales, por lo que para sobrevivir deben ser capaces de percibir dichas variaciones y responder a ellas adaptando su fisiología (Abee y Wouters, 1999). Uno de los cambios más importantes frente a los que una bacteria tiene que responder es el nuevo hábitat que encuentra cuando coloniza un hospedador. En este sentido, en el caso de las bacterias patógenas, éstas deben poner en marcha una maquinaria que les permita establecer la infección y colonizar los tejidos.

Uno de los factores más importantes en este proceso infeccioso, es la adaptación a los cambios de temperatura, sobre todo en aquellos patógenos que alternan la vida libre o en el interior de un vector ectotermo, con la colonización de un hospedador endotermo (Konkel y Tilly, 2000; Han y col., 2013; Steinmann y Dersch, 2013). En

este contexto, la entrada en el hospedador implica normalmente un aumento de temperatura, lo que produce en la bacteria una respuesta adaptativa que en muchos casos va acompañada de la inducción de genes de virulencia (Schumann, 2012). La expresión de estos genes de virulencia tiene lugar a temperaturas próximas al óptimo de crecimiento de estas bacterias.

Las bacterias patógenas de plantas también responden a cambios de temperatura, aunque en este caso la inducción de los genes implicados en la patogénesis suele ocurrir a temperaturas por debajo de su óptimo de crecimiento. Ejemplos documentados de este fenómeno se encuentran en *Agrobacterium tumefaciens*, *Pseudomonas syringae* o *Erwinia spp.* (Jin y col., 1993; Smirnova y col., 2001; Arvizu-Gómez y col., 2013). Algo similar ocurre con los patógenos de animales ectotermos, entre los que se incluyen los peces, cuya temperatura corporal no difiere demasiado de la del ambiente exterior y por tanto, la enfermedad ha de desarrollarse a temperaturas inferiores al óptimo de crecimiento de los patógenos (Guijarro y col., 2015). Este fenómeno ha sido estudiado en los patógenos de peces *F. psychrophilum*, *L. garvieae*, *A. hydrophyla*, *E. tarda*, *Y. ruckeri*, *Aliivibrio salmonicida* y *Pseudomonas plecoglossicida*, en los que se describen varios factores de virulencia cuya expresión es mayor a baja temperatura (Guijarro y col., 2015; Tao y col., 2016). En este sentido, la comparación del transcriptoma de *L. garvieae* cuando la bacteria era incubada a 18 °C y 28 °C, reveló la inducción, a la temperatura más baja, de diversos genes que codifican proteínas asociadas con la patogénesis (Aguado-Urda y col., 2013). Del mismo modo, en *F. psychrophilum*, mediante hibridación substractiva (SSH), se identificaron un buen número de factores probablemente relacionados con la virulencia, que se expresaban más a 8 °C que a 20 °C (Hesami y col., 2011). Además, la aplicación de la tecnología IVET (*In Vivo* Expression Technology) en *Y. ruckeri*, permitió seleccionar genes que se inducían específicamente durante el proceso infeccioso y no en los medios de laboratorio convencionales (Fernández y col., 2004), expresándose muchos de ellos más a 18 °C que a 28 °C, temperatura óptima de crecimiento de esta bacteria (Fernández y col., 2004; Fernández y col., 2007; Méndez y col., 2009; Méndez y col., 2011).

## 1.6. Efecto de la exposición a antibióticos en la virulencia

Desde el momento en que se inició el uso de los antimicrobianos, se comenzó también a detectar bacterias resistentes a los mismos. Los principales mecanismos a través de los cuales los patógenos pueden volverse resistentes a los compuestos antimicrobianos se basan en impedir la entrada del compuesto en la célula, expulsarlo activamente al exterior, inactivar el antimicrobiano modificándolo o degradándolo, o alterar su diana en la célula para impedir su acción. Estos mecanismos pueden ser intrínsecos o haber sido adquiridos a partir de otras bacterias mediante conjugación o transformación, así como por transducción mediada por fagos.

El aumento de la resistencia a los antibióticos se ha asociado típicamente a una reducción en la "fitness" y en la virulencia de la bacteria (Andersson y Hughes, 2010). No obstante, durante los últimos años se ha observado en bacterias como en *Salmonella enterica* serotipo Typhimurium (*S. Typhimurium*) y *E. coli* que un aumento en la resistencia no tiene por qué implicar un coste en términos de eficacia biológica (Baker y col., 2013; De Lastours y col., 2014). Es más, en patógenos como *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii* y *V. cholerae*, el aumento en la resistencia a distintos antimicrobianos ha venido acompañada de una mayor "fitness" *in vivo* asociada a una mayor virulencia (Roux y col., 2015).

Entre los mecanismos que confieren resistencia a los antimicrobianos destaca el papel de las porinas, canales situados en la membrana externa de las bacterias Gram-negativas, que median la entrada de distintas moléculas al citoplasma. La disminución de la expresión de algunas porinas o la alteración de su función debido a mutaciones, tiene como consecuencia un aumento en la resistencia al compuesto por parte de las bacterias (Pagés y col., 2008). Por otro lado, se ha demostrado la implicación de las porinas en la virulencia de bacterias como *Shigella flexneri* (Bernardini y col., 1993), *Klebsiella pneumoniae* (Tsai y col., 2011) o *E. coli* (Hejair y col., 2017) en las que la mutación del gen que codifica la porina mayoritaria OmpC (o su homólogo OmpK36 en *K. pneumoniae*), reduce significativamente la capacidad de colonización de tejidos *in vitro* o la mortalidad *in vivo*.

Un hecho realmente interesante es que concentraciones subinhibitorias (Sub-MIC) de compuestos antimicrobianos pueden tener diversos efectos a nivel fenotípico en las bacterias como la inducción de la formación de polisacáridos capsulares (Held y col., 1995) y de biofilms (Kaplan, 2011; Gomes y col., 2013; Bedran y col., 2014; Hathroubi y col., 2015). La morfología de las células bacterianas también puede variar en respuesta a sub-MICs de antibióticos, formando estructuras de aspecto filamentosas, cambio que ha sido asociado con una mayor susceptibilidad a la fagocitosis por macrófagos (Lorian y Atkinson, 1984; Kadurugamuwa y col., 1988; Fonseca, 2004).

Parece claro que la exposición a compuestos antimicrobianos afecta tanto a la fisiología como a la virulencia de las bacterias.

## 1.7. Bombas de expulsión de productos tóxicos

Uno de los mecanismos más importantes que confieren resistencia a las bacterias frente a los antimicrobianos es la exportación activa de los mismos mediante transportadores de membrana llamados bombas de expulsión. Éstas pueden ser específicas para una clase de compuesto, o bien, más genéricas, siendo responsables de multirresistencias, MDR (Multi Drug Resistance). Existen 5 familias de bombas asociadas a MDR, que se clasifican acorde a su estructura y función: ABC (ATP-binding cassette superfamily), MFS (major facilitator superfamily), MATE (multidrug and toxic compound extrusión family), SMR (small multidrug resistance family) y RND (resistance nodulation cell división family) (Putman y col., 2000).

En bacterias Gram-negativas, los sistemas de expulsión más comunes son los pertenecientes a la familia RND. Los miembros de esta familia son antiportadores que utilizan el gradiente electroquímico de protones a través de la membrana para transportar los substratos tóxicos de la célula al exterior (Putman y col., 2000). Uno de los más estudiados es la bomba AcrAB-TolC, la cual exporta un amplio rango de compuestos, entre los que se incluyen colorantes catiónicos como acrilflavina, cristal violeta o rodamina G6; antibióticos estructuralmente bien diferenciados como penicilinas, cefalosporinas, fluoroquinolonas, macrólidos, cloranfenicol o tetraciclinas; detergentes como Triton X-100, SDS o sales biliares; incluso solventes orgánicos (Nikaido, 1996; Tsukagoshi y Aono, 2000). Este sistema de transporte, está formado por 3 componentes, una proteína transportadora situada en la membrana interna (AcrB), una proteína accesoria periplásmica (AcrA) y una proteína en la membrana externa que actúa de canal (TolC).

En *E. coli* la expresión del operón *acrAB* está modulada, además de por condiciones generales de estrés, por los activadores globales MarA, SoxS y Rob, pertenecientes a la familia AraC y por el represor local AcrR, miembro de la familia de reguladores transcripcionales TetR (Ma y col., 1996; Randall y Woodward, 2002; Rosenberg y col., 2003). Este represor, cuya expresión es activada por los mismos factores que inducen la del operón *acrAB*, funciona como un modulador secundario, previniendo la expresión exacerbada de dicho operón, además de autoregular su propia expresión (Ma y col., 1996; Su y col., 2007).

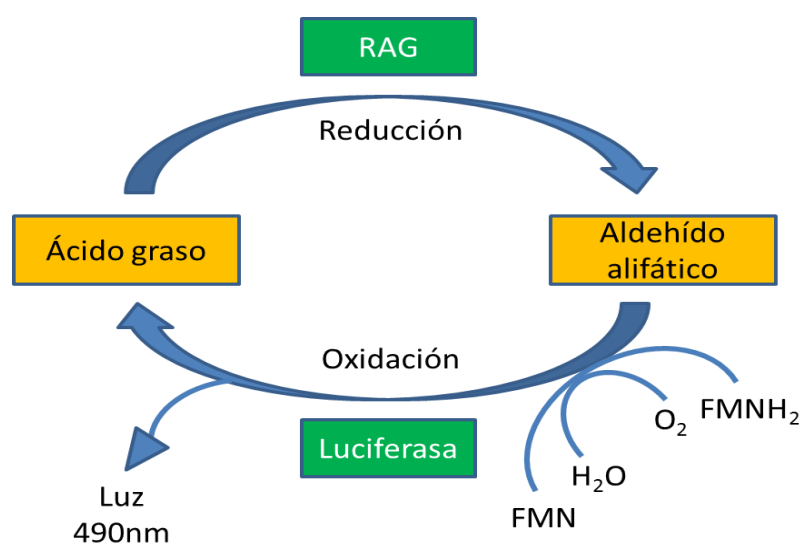
## 1.8. Estrés osmótico. Proteína OsmY.

Las bacterias son capaces de adaptarse a cambios de la presión osmótica externa. Así, condiciones de hiperosmolaridad, como las que se pueden encontrar en aguas saladas o en determinados órganos de un hospedador, desencadenan un cambio en el perfil o modelo de proteínas presentes en la envuelta celular, especialmente aquellas que se encuentran en el periplasma (Barron y col., 1986). Un ejemplo es la proteína OsmY de *E. coli*. Su síntesis es dependiente del factor de transcripción RpoS (Hengge-Aronis y col., 1993; Yim y col., 1994) y es inducida en condiciones de hiperosmolaridad, así como en fase estacionaria de crecimiento (Yim y Villarejo, 1992). También es inducida en respuesta al estrés generado por péptidos antibacterianos de origen catiónico (Oh y col., 2000) y en presencia de sales biliares (Bernstein y col. 1999). No obstante, la regulación de esta proteína parece diferir entre las distintas especies bacterianas puesto que en *S. Typhimurium*, ni la hiperosmolaridad ni los péptidos catiónicos activan la transcripción del gen que la codifica (Zheng y col., 2015).

En *E. coli*, una mutación en el gen *osmY* conduce a un ligero incremento en la sensibilidad de la bacteria al estrés hiperosmótico, por lo que se cree que está implicada en la adaptación a este tipo de estrés (Yim y Villarejo, 1992). Aunque la función concreta de OsmY no ha sido determinada, Yim y Villarejo (1992), especularon que podría ser una proteína de unión implicada en el transporte de un osmolito alternativo a prolina o glicina betaína.

## 1.9. La luminiscencia como herramienta para el estudio de la regulación génica y el análisis de los procesos infecciosos.

Los sistemas bacterianos de luminiscencia han sido utilizados en la construcción de diversas herramientas moleculares con aplicaciones tales como la identificación de promotores, el estudio de la expresión de genes bacterianos, la detección de bacterias en muestras ambientales y alimentos, o la monitorización *in vivo* de la distribución de un patógeno durante un proceso infeccioso, entre otras (para revisión [Waidmann y col., 2011](#)). Estos sistemas basados en la enzima luciferasa, presentan una serie de ventajas respecto a aquellos basados en la GFP: no necesitan excitación previa para la emisión, por lo que no son susceptibles al fotoblanqueo; en estudios *in vivo* se evita el ruido de fondo generado por la autofluorescencia típica tanto de tejidos animales como vegetales; y la vida media de la luciferasa es considerablemente menor a la de la GFP, lo cual la hace muy apta para el seguimiento a tiempo real de la expresión génica ([Waidmann y col., 2011](#)). Entre los sistemas basados en la emisión de luminiscencia disponibles, uno de los más utilizados es el operón *luxCDABE* de la bacteria patógena de insectos *Photobacterium luminescens* ([Meighen y Szittner, 1992](#)). En este operón, los genes *luxAB* codifican las subunidades  $\alpha$  y  $\beta$  de la enzima heterodimérico luciferasa, mientras que los genes *luxCDE* codifican un complejo reductasa de ácidos grasos (RAG) ([Meighen y Szittner, 1992](#)). Como se muestra en la **figura 1.2**, la enzima luciferasa, en presencia de oxígeno molecular, cataliza la oxidación de los sustratos flavina mononucleotido reducida ( $\text{FMNH}_2$ ) y un aldehído alifático de cadena larga, en FMN y un ácido graso, generando luz en el espectro del azul-verde, con un pico a 490nm, mientras que la RAG se encarga de la regeneración del aldehído graso de cadena larga que actúa como luciferina ([Waidmann y col., 2011](#)).



**Figura 1.2.** Mecanismo enzimático de producción de luminiscencia por la luciferasa y de regeneración de la luciferina por el complejo RAG.

La utilización de sistemas basados en la luciferasa, tiene muchas aplicaciones en la microbiología. Entre ellas, el estudio de la expresión génica y el seguimiento *in vivo* de los procesos infecciosos (Waidmann y col., 2011). *S. Typhimurium* es la primera bacteria donde se ha utilizado el operón *luxCDABE* para definir un proceso infeccioso en ratones (Contag y col., 1995). En bacterias Gram-positivas, también se ha utilizado el operón *luxCDABE* para demostrar la eficacia del tratamiento con amoxicilina frente a las infecciones de *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae* y *Pseudomonas aeruginosa* en ratones (Francis y col., 2000; 2001; Kadurugamuwa y col., 2003). Asimismo, la utilización de la luminiscencia resultó útil en el análisis de la interacción entre bacterias como *Enterobacter cloacae* o *Rhizobium leguminosarum* y raíces de plantas (Rattray y col., 1995; Chabot y col., 1996) y para analizar la expresión de promotores durante el proceso infeccioso de *E. coli* o *Y. enterocolitica* (Lane y col., 2007; Trcek y col., 2010).

En peces la utilización de los sistemas luminiscentes ha sido limitada. Tan solo se han registrado 3 trabajos en los que la luminiscencia haya sido empleada para el análisis de los procesos infecciosos, concretamente con novirhabdovirus (Harmache y col., 2006), *Listonella anguillarum* (Weber y col., 2010) y *Y. ruckeri* (Méndez y Guijarro, 2013) en trucha arcoíris. En este último, se definieron 2 modelos de infección dependiendo de la ruta de administración de la bacteria. Así, cuando ésta era inoculada por vía intraperitoneal, el primer órgano en el que se observó luminiscencia fue la vejiga natatoria, extendiéndose posteriormente al resto de tejidos, mientras que cuando fue administrada por inmersión, la luminiscencia fue detectada principalmente en el tracto intestinal (Méndez y Guijarro, 2013).

## 1.10. Secuenciación y análisis de genomas

Con las nuevas técnicas de secuenciación masiva, resulta cada vez más rápido y económico secuenciar ADN. En la actualidad, se encuentran disponibles más de 91.000 genomas de procariotas en la base de datos del NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/browse/>). Para poder analizar tanta cantidad de información, se han desarrollado herramientas bioinformáticas que permiten manejar los datos de una forma cómoda y rápida. En este contexto surgió la genómica comparativa, un nuevo campo de la biología que estudia las semejanzas y diferencias que existen entre los genomas de distintos organismos. Esta metodología resulta muy útil para asignar potenciales funciones a los genes de los nuevos genomas secuenciados, identificar secuencias reguladoras en regiones no codificantes pero conservadas entre los genomas, establecer relaciones evolutivas entre los organismos, etc.

En el momento de la realización de esta tesis, se encontraban 8 genomas de *Y. ruckeri* disponibles en la base de datos NCBI, y a fecha de marzo de 2017 el número asciende a 60. Esta situación refleja la gran velocidad a la que se genera nueva información en este campo, lo cual, resulta sin duda de gran utilidad pero a su vez aumenta la complejidad de los análisis.

## 2. Objetivos





El conocimiento de los factores de virulencia de una bacteria no solamente es importante para definir el proceso infeccioso desde un punto de vista patológico sino que es clave para desarrollar sistemas de tratamiento y prevención de la enfermedad. En este sentido, la utilización de herramientas bioinformáticas que permiten analizar y comparar la gran cantidad de información disponible en las bases de datos resulta de gran utilidad. Además, teniendo en cuenta los antecedentes expuestos en la introducción, una estrategia potencialmente útil para seleccionar genes relacionados con la virulencia en bacterias patógenas de animales ectotermos, como es el caso de *Y. ruckeri*, es identificar aquellos que se expresan más a la temperatura entorno a la cual ocurre el proceso patológico, que a la óptima de crecimiento de la bacteria. Por todo ello, los objetivos planteados en este trabajo son los siguientes:

1. Secuenciación y análisis del genoma de la cepa *Y. ruckeri* 150 y su comparación con el genoma de otras 4 cepas de los serotipos O1 y O2, aisladas de diferentes hospedadores.
2. Identificación y caracterización de genes de *Y. ruckeri* que se expresan más a 18 °C que a 28 °C.
  - 2.1. Determinación del efecto que tiene su inactivación en la fisiología y virulencia de la bacteria.
  - 2.2. Análisis de su regulación *in vitro*, *ex vivo* e *in vivo*.



### 3. Material y métodos



### 3.1. Cepas, plásmidos y condiciones de cultivo

En el presente trabajo se han utilizado las cepas de *Y. ruckeri* y *E. coli* que aparecen recogidas en la **tabla 3.1**. Del mismo modo, los plásmidos usados se encuentran en la **tabla 3.2**.

Para el cultivo rutinario de *E. coli* se utilizó el medio 2xTY, cuya composición es 5 g/l de NaCl (Merck), 10 g/l de extracto de levadura (Laboratorios Conda) y 15 g/l de triptona (Merck), líquido o sólido con agar al 2 % (p/v). *Y. ruckeri* se cultivó en los medios caldo de soja y triptona (TSB, Tryptic Soy Broth) o agar de soja y triptona (TSA, Tryptic Soy Agar) (con agar al 1,5 % p/v) (Merck) y caldo nutritivo (CN) o agar nutritivo (AN) (con agar al 1,5 %) (VWR). Para la selección de clones vía detección de la actividad  $\beta$ -galactosidasa se utilizó el medio agar eosina azul de metileno (EMB, Eosin Methylene Blue) (Merck).

Cuando fue necesario se añadieron a los medios de cultivo los siguientes antibióticos en las concentraciones indicadas: ampicilina 100  $\mu$ g/ml, cefotaxima 0,1  $\mu$ g/ml para los medios sólidos y 0,2  $\mu$ g/ml para los líquidos, eritromicina 10  $\mu$ g/ml, kanamicina 50  $\mu$ g/ml y estreptomina 50  $\mu$ g/ml (Sigma Aldrich Co).

Las temperaturas de incubación fueron 37 °C para *E. coli* y 28 °C o 18 °C para *Y. ruckeri*. La velocidad de agitación de los cultivos en medio líquido fue de 250 rpm. El control de crecimiento bacteriano se llevó a cabo midiendo, a diferentes tiempos de incubación, la densidad óptica de los cultivos a 600 nm ( $DO_{600}$ ), en un espectrofotómetro Hitachi U-2900.

**Tabla 3.1.** Cepas empleadas en este estudio.

Cepa	Características	Fuente o referencia
<i>E. coli</i>		
S17-1 $\lambda$ pir	$\lambda$ (pir) hsdR pro thi RP4-2 Tc::mu Km::Tn7	Simon y col., 1983
DH5 $\alpha$ pir	F <sup>'</sup> /endA1 hsdR17 (rk-mk+) supE44 thi-1 recA1 gyrA (Nal <sup>R</sup> ) $\lambda$ (pir)	Woodcock y col., 1989
<i>Y. ruckeri</i>		
150	Cepa virulenta aislada de brote	J. L. Larsen, (Dinamarca)
150CTX	Subcultivada en presencia de cefotaxima	Este estudio
150 acrR <sup>-</sup>	acrR::mini-Tn5 luxlac Km2, Km <sup>r</sup>	Este estudio
150 acrR <sup>+</sup>	acrR <sup>-</sup> con pGBM5::acrR	Este estudio
150 osmY <sup>-</sup>	osmY::mini-Tn5 luxlac Km2, Km <sup>r</sup>	Este estudio
150 osmY <sup>+</sup>	osmY <sup>-</sup> con pGBM5::osmY	Este estudio
150 osmY <sup>++</sup>	osmY <sup>-</sup> con pGBM5::osmY-ytjA	Este estudio
150 $\beta$ 1T.B2	Clon genoteca incubado con cefotaxima	Este estudio

**Tabla 3.2.** Plásmidos utilizados en este estudio.

Plásmido	Características	Fuente o referencia
pCS26Pac	Km <sup>r</sup> , luxCDABE	Bjarnason y col., 2003
pGBM5	Spc <sup>r</sup> /Sm <sup>r</sup> , promotor lac	Manen y col., 1997
pIVET8	Ap <sup>r</sup> , oriR6K, mob+, cat-lacZY sin promotor	Mahan y col., 1995
pUC19	Ap <sup>r</sup> , vector de clonación	Pharmacia
pUT mini-Tn5 Km2	Ap <sup>r</sup> , oriR6K, mobRP4, tnp, mini-Tn5 Km2 (Km <sup>r</sup> )	De Lorenzo y col., 1990
pUT mini-Tn5 lac Km2	pUT mini-Tn5 Km2 que contiene en el transposón los genes <i>trpAlacZY</i> sin promotor ni terminador	Este estudio
pUT mini-Tn5 luxlac Km2	pUT mini-Tn5 Km2, que contiene en el transposón los genes <i>luxABCDE</i> y <i>trpAlacZY</i> en tándem y sin promotor	Este estudio

## 3.2. Técnicas generales de manipulación del ADN

La manipulación del ADN se realizó de acuerdo a los protocolos establecidos por **Sambrook y col., (2001)**. La extracción del ADN cromosómico de *Y. ruckeri* se realizó utilizando el sistema "GenElute Bacterial Genomic DNA Kit" (Sigma Aldrich Co.) siguiendo las instrucciones del fabricante. La extracción del ADN plasmídico se llevó a cabo según el método de lisis alcalina (**Birnboim y Doly, 1979**) o utilizando el sistema "Plasmid DNA Mini Kit I" (Omega Bio-tek).

Las enzimas ADN ligasa del fago T4 y fosfatasa alcalina empleados para la ligación del ADN, fueron adquiridos en Roche Diagnostics S.L. Las enzimas de restricción utilizadas procedían de la casa comercial Takara Bio Inc.

Las reacciones de PCR se realizaron en un termociclador Perkin-Elmer 9700 GenAmp, siendo los oligonucleótidos empleados de Sigma Aldrich Co. y los reactivos de Biotools B & M Labs. S.A. y New England Biolabs Inc.

Para el análisis de hibridación tipo Southern Blot (**Sambrook y col., 2001**), el ADN que había sido previamente digerido con las enzimas de restricción correspondientes, se separó mediante electroforesis en gel de agarosa al 0,75 % (p/v). Tras este proceso, dicho ADN se transfirió a una membrana de nylon "Amersham Hybond-N" (GE Healthcare Limited) en la que fue fijado tras 3 minutos de exposición a luz UV en un transiluminador Gel Doc XR System (Bio Rad Laboratories). A continuación, la membrana fue hibridada con la sonda obtenida mediante reacción de PCR en la que se utilizaron desoxinucleótidos trifosfato marcados con digoxigenina "PCR DIG labeling mix" (Roche Diagnostics S.L.). Para la detección de la sonda se empleó el anticuerpo antidigoxigenina conjugado con la enzima fosfatasa alcalina "Anti-Digoxigenin-AP Fab fragments" (Roche Diagnostics S.L.). El revelado se llevó a cabo añadiendo el sustrato luminiscente de la fosfatasa alcalina "CDP-Star" (Roche Diagnostics S.L.) y captando la señal emitida en películas para radiografía "Hyperfilm MP" (GE Healthcare Limited).

La transferencia del ADN a células electrocompetentes de las cepas *E. coli* DH5 o S17-*λpir* y también para el caso de *Y. ruckeri* 150 tuvo lugar mediante electroporación, utilizando cubetas de 0,2 cm de ancho (VWR) a las que se aplicó un pulso de 2,5 Kv, utilizando un electroporador modelo MicroPulser™ (BioRad).

## 3.3. Secuenciación y caracterización genómica de la cepa *Y. ruckeri* 150

### 3.3.1. Secuenciación del ADN

A partir de un cultivo de *Y. ruckeri* 150 en fase estacionaria de crecimiento ( $DO_{600}$ : 1,5), se extrajo el ADN genómico tal y como se explica en el **apartado 2.2**. La pureza y concentración del ADN fue determinada en un espectrofotómetro Nanodrop ND-1000 (Nanodrop Technologies, EEUU). Diez microgramos de ADN de alta pureza (relación  $DO_{260}/DO_{280} = 1,89$ ) fueron enviados a la empresa BGI Tech, Pekin. Dicha empresa

utilizó la tecnología Illumina de alto rendimiento para llevar a cabo la secuenciación genómica por "paired ends" o extremos pareados y construir una genoteca con fragmentos de ADN de en torno a 700 pb. Las lecturas se ensamblaron con el programa informático SOAPdenovo (version 1.05) (Luo y col., 2012) en "contigs", y estos a su vez en fragmentos mayores denominados "scaffolds".

#### 3.3.2. Anotación génica del cromosoma e identificación de secuencias repetidas, profagos y elementos CRISPR

La predicción de las posibles pautas abiertas de lectura (ORFs, Open Reading Frames) en cada "contig", así como la asignación de la función más probable de los productos deducidos de la traducción de cada ORF, se llevó a cabo mediante el programa informático RAST (Rapid Annotation using Subsystem Technology) (Aziz y col., 2008). Este paquete informático realiza anotaciones automáticas de genomas de bacterias, arqueas y fagos, mediante comparación con la colección de proteínas de familias FIG (Fellowship for Interpretation of Genomes). Las proteínas que pertenecen a una familia FIG concreta son presumiblemente homólogas y tienen una función común. La existencia de secuencias repetidas en tándem en los "contigs" se determinó mediante la aplicación software Tandem repeats finder (Benson, 1999). Para la identificación de regiones fágicas probables se utilizó el servidor web PHAST, que proporciona tablas con genes anotados como fágicos en los que indica la el mayor o menor grado de precisión en la definición de los profagos, distinguiendo entre completos, incompletos y cuestionables. Esta clasificación, se realiza a partir de una puntuación que se calcula considerando el tamaño de la región, el tanto por ciento de genes de esa región que están relacionados con fagos y la función de los mismos (Zhou y col., 2011). Por último, la predicción de la existencia de posibles elementos CRISPR, secuencias palindrómicas cortas separadas entre sí por secuencias espaciadoras no repetidas, se realizó a través de la aplicación CRISPRFinder (Grissa y col., 2007).

El genoma anotado de *Y. ruckeri* 150 fue depositado en la base de datos GenBank del NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank>) con el número de acceso MKFJ00000000.

#### 3.4. Análisis comparativo del genoma de *Y. ruckeri* 150 con las cepas *Y. ruckeri* ATCC24973, *Y. ruckeri* CSF007-82, *Y. ruckeri* Big Creek 74 y *Y. ruckeri* SC09.

La secuencia del genoma de la cepa *Y. ruckeri* 150 se comparó con 4 de los 9 genomas de *Y. ruckeri* disponibles hasta ese momento en la base de datos del NCBI. Con el objetivo de abarcar cierta diversidad dentro de la especie en cuanto a serotipo y hospedador, los genomas seleccionados para el análisis fueron los de las cepas ATCC24973 y CSF007-82 pertenecientes al serotipo O1 y aisladas de trucha arcoíris, Big Creek de serotipo O2 y aislada de salmón Chinook (*Oncorhynchus tshawytscha*), y SC09 de serotipo desconocido y aislada de pez gato (*Ictalurus punctatus*) (tabla 3.3).



**Tabla 3.3.** Características generales de las cepas de *Y. ruckeri* empleadas en el análisis genómico comparativo con la cepa *Y. ruckeri* 150.

Característica	ATCC29473	CSF007-82	Big Creek 74	SC09
Hospedador	Trucha arcoíris	Trucha arcoíris	Salmon chinook	Pez gato
Virulencia	Avirulenta	Virulenta	Virulenta	Virulenta
Tamaño genoma (Mb)	3,77	3,83	3,69	3,92
Scaffolds	2	1	1	32
Contigs	15	1	1	32
Contenido GC (%)	47,4	47,5	47,6	47,5
CDS	3.377	3.530	3.136	3.651
ARNs	80	102	103	127
Serotipo	O1	O1	O2	¿?*
Nº de acceso	JPPT00000000	CCYO00000000	CP011078	JRWX00000000
Referencia	Daligault y col., 2014	Nelson y col., 2015	-	Liu y col., 2016

\*El serotipo de la cepa SC09 no está descrito.

En primer lugar, se realizaron alineamientos por pares entre el genoma de la cepa *Y. ruckeri* 150 y los de las otras cepas incluidas en el estudio mediante el software MAUVE aligner (Darling y col., 2004). Este programa identifica las regiones genómicas conservadas en los genomas comparados, llamadas bloques colineales locales, (BCL), que están libres de reordenamientos internos. A partir de los BCLs, se conforma un mosaico que contiene regiones sinténicas, zonas que han sufrido reordenamientos y segmentos únicos de cada genoma.

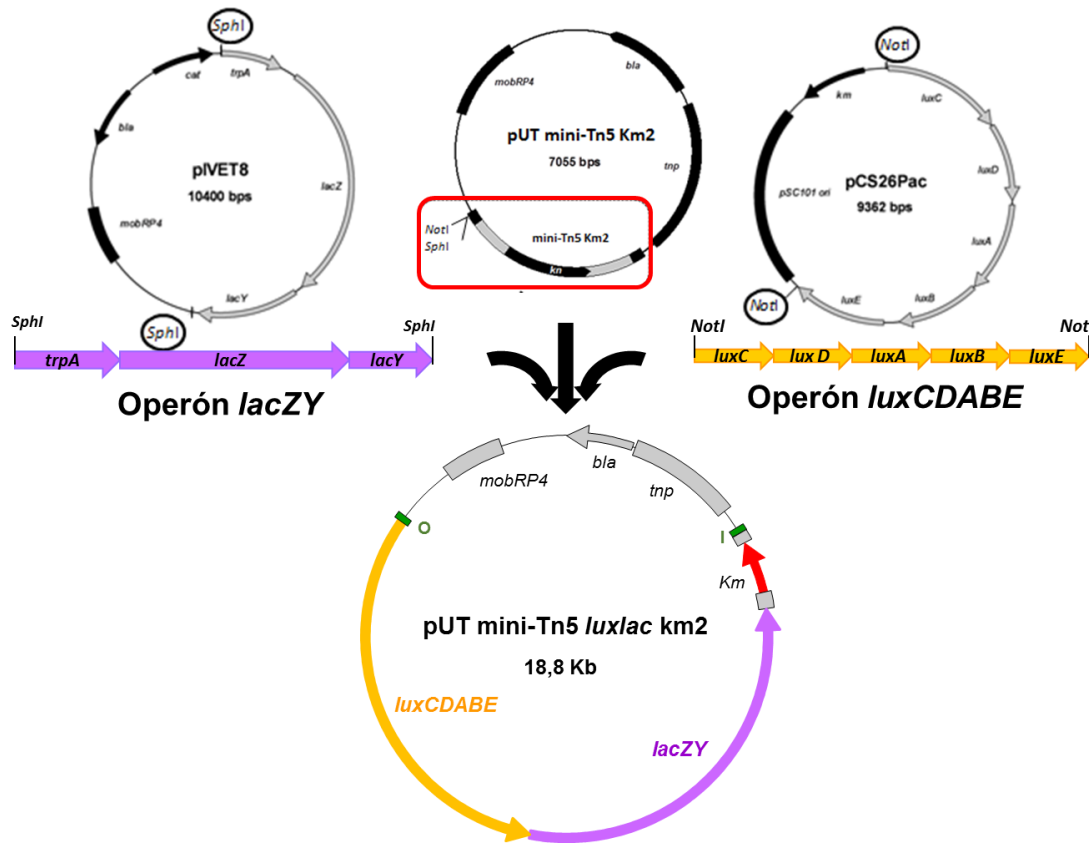
Los productos proteicos deducidos de los 5 genomas se compararon mediante BLASTp con los conjuntos de proteínas de la base de datos UniRef90, para asociar cada proteína a una proteína concreta de esta base de datos. De este modo resultó posible la comparación de los genomas, de tal forma que dos proteínas se consideraron ortólogas cuando han sido asociadas al mismo grupo. Tras una revisión manual del proceso anterior, se construyó un Diagrama de Venn mediante el paquete informático Venn Diagram en R (Chen y Boutros, 2011). Dicho diagrama muestra los conjuntos de proteínas compartidas (ortólogas) entre las distintas cepas.

### 3.5. Obtención y análisis de una genoteca de mutantes de *Y. ruckeri* 150 mediante transposición

#### 3.5.1. Construcción del transposón mini-Tn5 *luxlac* Km2

La construcción del transposón mini-Tn5 *luxlac* Km2 (Tn5*luxlac*) se realizó a partir del plásmido pUTmini-Tn5-Km2 (pUT), portador del transposón mini-Tn5 Km2 (De Lorenzo y col., 1990). En primer lugar, el fragmento *Sph*I de 6 Kb correspondiente al operón *trpAlacZY* (*lac*) sin promotor ni terminador, procedente del plásmido pIVET8 (Mahan y col., 1995), fue ligado con el vector pUT previamente digerido con la misma enzima y defosforilado (figura 3.1). La mezcla de ligación se introdujo en *E. coli* S17  $\lambda$ pir por electroporación, tal y como se explica en el apartado 3.1. Tras el pulso eléctrico, las células fueron resuspendidas en 1ml de medio 2xTY e incubadas durante 1 h a 37 °C. Los clones de interés fueron seleccionados en el medio 2xTY sólido con ampicilina (marcador de resistencia de pUT). Dado que la ligación fue no dirigida, se identificó mediante secuenciación con el oligonucleótido lacsec (5' AAACGCGTATTCAGGCT 3') un clon portador del operón *lac* en la orientación adecuada, coincidiendo ésta con la dirección 5'-3' del gen de resistencia a kanamicina (figura 3.1.)

Una vez obtenido el plásmido intermediario pUT mini-Tn5 *lac* Km2, se procedió a la introducción del operón *luxCDABE* (*lux*), en la diana *Not*I del transposón, situada en el extremo 5' del operón *lac*. Para ello, se digirió el vector pCS26PAC (Bjarnason y col., 2003) con la enzima de restricción *Not*I, liberándose así un fragmento de 5,8 Kb correspondiente al operón *lux* sin promotor ni terminador (figura 3.1), el cual se ligó con el plásmido intermediario pUT mini-Tn5 *lac* Km2, que previamente había sido digerido con el mismo enzima y defosforilado. Al igual que en el proceso anterior, la mezcla de ligación se introdujo en *E. coli* S17- $\lambda$ pir por electroporación y los clones de interés fueron seleccionados en medio 2xTY con ampicilina. Mediante digestión con las enzimas *Sph*I y *Not*I, además de secuenciación con el oligonucleótido luxsec (5' CTTTTAAGGTTTAACGGTTG 3'), se comprobó que el operón *lux* se encontraba en orientación 5'-3' en el transposón Tn5*luxlac*. Así, finalmente se obtuvo el vector de interés que denominamos pUT mini-Tn5 *luxlac* Km2 (pUT*luxlac*).

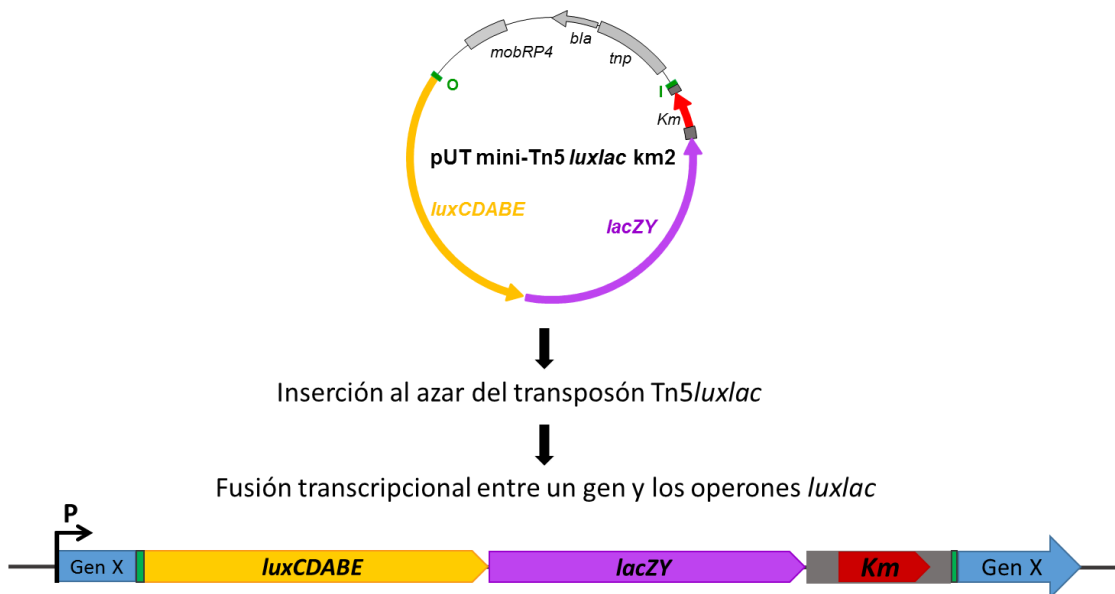


**Figura 3.1.** Construcción del vector pUT mini-Tn5 *luxlac* Km2. En la diana *SphI* del plásmido pUT mini-Tn5 Km2 se introdujo el operón *trpAlacZY* del plásmido pIVET8 y en la diana *NotI* el operón *luxCDABE* del vector pCS26PAC. Ambos operones carecen de promotor y terminador propios. *mobRP4*: origen de replicación; *bla*: gen que confiere resistencia a ampicilina; *trp*: transposasa Tn5; O e I: secuencias de inserción. La representación no está hecha a escala.

### 3.5.2. Transferencia e inserción del transposón Tn5*luxlac* en el genoma de *Y. ruckeri* 150

Una vez obtenido el plásmido pUT*luxlac*, que contiene el transposón Tn5*luxlac*, éste fue transferido de la cepa donadora *E. coli* S17-1*λpir* a la receptora *Y. ruckeri* 150, mediante conjugación. Para ello, células procedentes de 500 µl de cultivo de la cepa donadora y de 4 ml de la cepa receptora, en fase exponencial de crecimiento ( $DO_{600} = 0,5$ ), se lavaron por centrifugación con agua MiliQ estéril. A continuación, se resuspendieron las células de ambas cepas en 10 ml de agua MiliQ estéril. Dicha suspensión se filtró a través de una membrana con un tamaño de poro de 0,45 µm (Pall Life Sciences). Seguidamente, el filtro se colocó sobre una placa con el medio 2xTY y esta se incubó a 28 °C durante 4 h con el objetivo de que tuvieran lugar eventos de conjugación entre ambas cepas. Transcurrido este tiempo, las bacterias presentes en el filtro fueron resuspendidas en 2 ml del medio CN. Posteriormente, se sembraron alícuotas de 50 µl de la suspensión bacteriana, en placas con AN y kanamicina (marcador de resistencia del transposón) y cefotaxima o eritromicina (resistencias intrínsecas de *Y. ruckeri* 150). Dichas placas fueron incubadas durante 48 h a 28 °C para la selección de los

transconjugantes. A modo de ejemplo, en la **figura 3.2** se esquematiza el resultado de la inserción del transposón Tn5*luxlac* en un gen cualquiera del genoma de *Y. ruckeri*.



**Figura 3.2.** Esquema de la fusión transcripcional de los operones *luxlac* con el promotor del gen X interrumpido por el transposón Tn5*luxlac* una vez se ha insertado en el cromosoma de *Y. ruckeri*.

El almacenamiento y conservación de la genoteca se realizó de la siguiente manera: cada uno de los transconjugantes de *Y. ruckeri* se transfirió a un pocillo de una placa microtíter de 96 pocillos que contenía 100  $\mu$ l del medio CN con kanamicina y, cefotaxima en un caso o eritromicina en el otro, con el fin de eliminar las posibles células de *E. coli* que pudieran haber sobrevivido al proceso de la selección inicial, y seguidamente, las placas se incubaron durante 48 h a 28  $^{\circ}$ C. Con ayuda de un replicador de Steers, se realizaron triplicados de las placas incubadas, pero en esta ocasión en el medio de cultivo solo se incluyó el antibiótico kanamicina. Tras incubar las nuevas placas en las condiciones anteriormente citadas, a cada pocillo se le añadió glicerol a una concentración final del 30 % y a continuación, se almacenaron a -80  $^{\circ}$ C hasta su uso posterior.

### 3.5.3. Análisis de la inserción del transposón Tn5*luxlac*

Para analizar el patrón de inserción del transposón en el genoma de *Y. ruckeri* 150, se tomaron, de forma arbitraria, 14 transconjugantes, de los cuales se aisló su ADN. Éste se digirió con la enzima de restricción *Sph*I, y se sometió a electroforesis en geles de agarosa al 0,75 %, para finalmente realizar un Southern blot tal y como se describe en el **apartado 3.2**. En la hibridación se utilizó como sonda marcada con digoxigenina el gen *km*, de resistencia a kanamicina, que había sido amplificado previamente a partir del transposón por PCR utilizando los oligonucleótidos Km-1 (5' CATATTCAACGGGAAAC 3') y Km-2 (5' ATCAGGATTATCAATACCA 3'). Para determinar la existencia o no de integración del plásmido pUT*luxlac* en el genoma bacteriano, se

eliminó la sonda de la membrana utilizada en la primera hibridación mediante la aplicación de 2 lavados durante 20 min a 37 °C con una solución 0,2 M de NaOH y 1 % de SDS, seguidos de otros 2 lavados pero en esta ocasión durante 5 minutos con una solución de NaCl 3 M y citrato sódico 0,3 M. Finalizado el tratamiento, la membrana se hibridó nuevamente pero en esta ocasión con la sonda correspondiente al gen *bla*, presente en el plásmido, el cual había sido previamente amplificado por PCR utilizando *dntps* marcados con digoxigenina y los oligonucleótidos *bla*-1 (5' GTGTCGCCCTTATCCCTTT 3') y *bla*-2 (5' GGCACCTATCTCAGCGATCT 3').

#### 3.5.4. Estabilidad del transposón e influencia de éste sobre el crecimiento de los clones seleccionados

La estabilidad del transposón *Tn5luxlac* se valoró de la siguiente manera: a partir de un cultivo de un mutante seleccionado al azar de entre los obtenidos en la genoteca en fase estacionaria de crecimiento en medio TSB con kanamicina, se realizaron subcultivos en el mismo medio inoculando de forma sucesiva la bacteria de un cultivo, en proporción 1:100, en otro sin antibiótico cada 24 h, durante 3 días consecutivos. Tras ese tiempo, necesario para que se alcancen al menos 100 generaciones, se ajustó la  $DO_{600}$  del cultivo al valor 0,5 (equivalente a  $10^8$  ufc/ml) y se realizaron diluciones seriadas del mismo. A partir de la dilución  $10^{-5}$ , correspondiente a  $10^3$  ufc/ml, se sembraron 100  $\mu$ l en de cada una en placas de medio TSA con y sin kanamicina. Tras ser incubadas a 28 °C durante 24 h, se contabilizaron las ufc en ambas condiciones, calculándose después el porcentaje de resistentes a kanamicina en relación a las no resistentes tras el proceso.

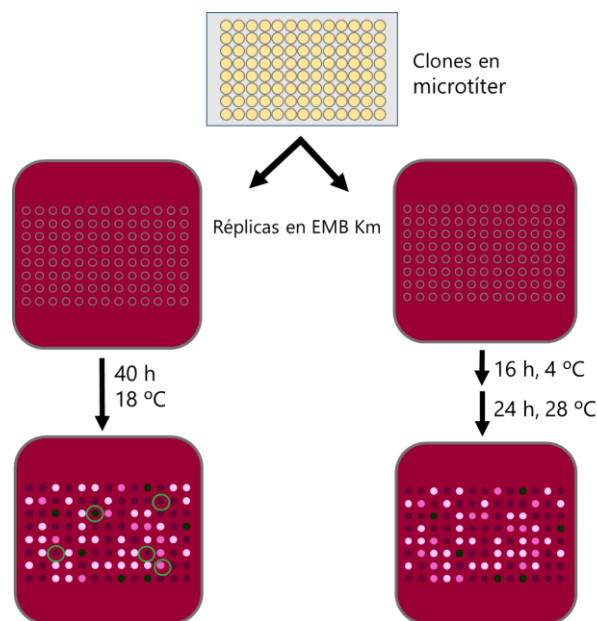
Para determinar si la expresión de los operones *lux* y *lac* del transposón, a partir de los promotores de los genes interrumpidos, podría afectar al crecimiento de las respectivas cepas, se llevaron a cabo curvas de crecimiento de la cepa parental y 3 mutantes de la genoteca elegidos al azar. Con este fin, se inocularon con 200  $\mu$ l de cultivo en fase estacionaria de crecimiento de cada una de las cepas, matraces que contenían 20 ml de medio TSB y se incubaron a 18 °C y 250 rpm. El crecimiento bacteriano se determinó midiendo la  $DO_{600}$  del cultivo del mismo modo que se explica en el **apartado 3.1**. Las curvas de crecimiento se realizaron por triplicado.

### 3.6. Selección, identificación y análisis *in vivo* de mutantes de *Y. ruckeri* con mayor actividad $\beta$ -galactosidasa a 18 °C que a 28 °C

#### 3.6.1. Selección de clones con mayor expresión a 18 °C que a 28 °C

Con el fin de identificar aquellos clones, en el conjunto de la genoteca construida en *Y. ruckeri*, que posean una fusión transcripcional entre el operón *lac* y un promotor regulado por temperatura con mayor actividad a 18 °C que a 28 °C, se descongeló la genoteca, contenida en las placas microtiter, y con ayuda de un replicador de Steers se

hicieron 2 réplicas de cada una en placas de 150 X 150 mm, que contenían medio EMB con kanamicina. Estas réplicas fueron incubadas a 18 °C y 28 °C durante 40 y 24 h, respectivamente. Para poder compararlas simultáneamente en el tiempo, las placas que iban a ser incubadas a 28 °C se mantuvieron primero a 4°C durante 16 h. Una vez transcurrido el periodo de incubación, ambas réplicas fueron comparadas. Los clones de interés fueron aquellos que presentaron una coloración más intensa y por ello una mayor actividad  $\beta$ -galactosidasa en medio EMB a 18 °C que a 28 °C (**figura 2.3**). Estos clones fueron transferidos nuevamente a placas microtíter para su conservación del mismo modo que se describió en el **apartado 2.5.3**.

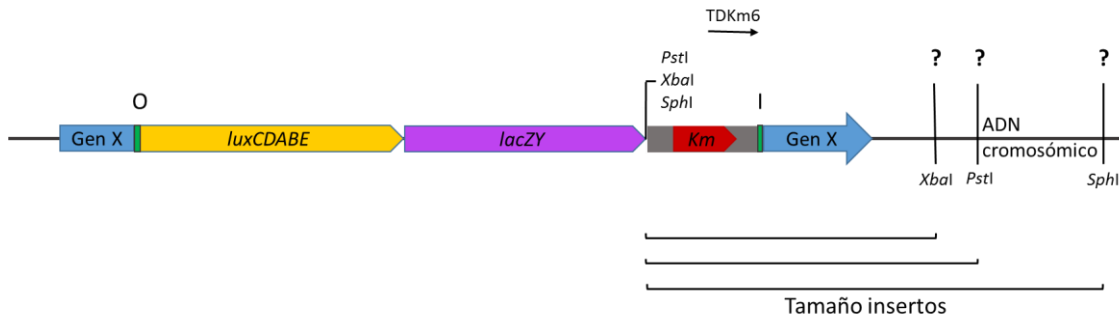


**Figura 3.3.** Proceso de selección de clones con mayor actividad  $\beta$ -galactosidasa a 18 °C que a 28 °C.

### 3.6.2. Identificación del sitio de inserción del transposón Tn5 *luxlac* en los clones seleccionados.

Para la identificación del gen interrumpido en los clones identificados, el ADN genómico de cada uno fue digerido con las enzimas de restricción *Pst*I, *Xba*I o *Sph*I cuyas dianas están presentes en el transposón (**figura 3.4**) y las mezclas de digestión se sometieron a una reacción de ligación con el vector pUC19, que previamente había sido digerido con la enzima correspondiente en cada caso y defosforilado. El ADN de la ligación se introdujo por electroporación en células competentes de *E. coli* S17  $\lambda$ pir y los clones de interés fueron posteriormente seleccionados en el medio 2xTY con ampicilina (marcador de resistencia del plásmido) y kanamicina (marcador de resistencia del transposón). Estos clones son portadores de un fragmento de ADN que contiene el gen de resistencia a kanamicina presente en el transposón, seguido de un fragmento de longitud indeterminada correspondiente al ADN situado en sentido 3' del lugar de inserción del mismo (**figura 3.4**). Los fragmentos de interés fueron secuenciados por el método Sanger (StabVida) con el oligonucleótido TDKm6 (5' AGTTTCATTTGATGCTCGATG 3'), cuya secuencia se encuentra dentro del gen de

resistencia a kanamicina, situado a 8 pb de distancia de su codón de stop. Las secuencias obtenidas fueron analizadas mediante el programa RAST (Aziz y col., 2008) y BlastX (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) para la identificación del gen interrumpido.



**Figura 3.4.** Esquema general de la inserción del transposón Tn5luxlac en el genoma de *Y. ruckeri*. Se representan las dianas *PstI*, *XbaI* y *SphI* en el transposón y en tres sitios hipotéticos del genoma, que darían lugar a fragmentos de distinto tamaño tras ser digeridos con las enzimas indicadas en las dianas correspondientes. Gen X; gen interrumpido por el transposón; O e I: extremos del transposón.

### 3.6.3. Determinación de la virulencia de los mutantes obtenidos

Con el fin de determinar la virulencia, los clones de interés fueron cultivados en medio TSB a 18 °C y 250 rpm hasta alcanzar una DO<sub>600</sub> de 0,5 (correspondiente a 10<sup>8</sup> ufc/ml), a continuación, se lavaron las células con tampón PBS mediante centrifugación y se hicieron diluciones seriadas en el mismo tampón. Seguidamente, se inocularon por vía intraperitoneal 0,1 ml conteniendo 10<sup>3</sup> ufc/ml o del cultivo sin diluir (10<sup>8</sup> ufc/ml) a grupos de 10 alevines de trucha arcoíris con un peso de entre 6-8 g. Los peces fueron mantenidos durante una semana en acuarios con 70 l de agua de clorada a 18 °C ± 1, siendo retirados y registrados los individuos muertos cada 24 h. Los ensayos fueron realizados por duplicado de forma independiente.

## 3.7. Caracterización *in vitro* e *in vivo* de clones de *Y. ruckeri* 150 obtenidos con cefotaxima como sistema de selección.

### 3.7.1. Obtención de la cepa *Y. ruckeri* 150CTX en medio con cefotaxima

Con el fin de estudiar el efecto de la cefotaxima sobre las células de *Y. ruckeri* 150, se trató de emular las condiciones en las que los mutantes de la genoteca fueron expuestos a este antibiótico. Para ello, se realizó un subcultivo de la cepa parental en medio sólido AN con cefotaxima 0,1 µg/ml a partir del cual se tomó una colonia para

realizar nuevamente un subcultivo, esta vez en medio líquido CN, también en presencia del antimicrobiano, pero en esta ocasión a 0,2 µg/ml. La cepa resultante de ese proceso, se denominó como *Y. ruckeri* 150CTX.

#### 3.7.2. Agregación en medio líquido

Para valorar la capacidad de agregación, en relación a la cepa parental, de la cepa *Y. ruckeri* 150CTX, que había sido obtenida por cultivo en presencia de cefotaxima, así como de un mutante de la genoteca elegido al azar (*Y. ruckeri* β1T.B2), que había sido seleccionado también con el mismo antibiótico, se inocularon tubos de poliestireno que contenían 2,5 ml de medio TSB con 25 µl de un cultivo en fase estacionaria de las distintas cepas, y se incubaron a 18 °C y 250 rpm hasta alcanzar nuevamente la fase estacionaria de crecimiento. A continuación, los cultivos se mantuvieron en estático a temperatura ambiente durante 4 h. La cepa parental fue utilizada como referencia de ausencia de agregación.

#### 3.7.3. Tinción de las colonias con negro sudán

Con el fin de determinar la capacidad de unión del colorante negro sudán a la superficie celular, se depositaron 2 µl de cultivo en fase estacionaria de crecimiento de las cepas parental, 150CTX y del mutante β1T.B2, en la superficie de placas con medio TSA. Tras 2 días de incubación a 18 °C, las colonias se cubrieron con una solución del colorante negro sudán B (AMRESCO LLC) al 0,02 % (p/v) disuelto en etanol absoluto. Transcurridos 5 minutos, esta solución fue retirada para observar el aspecto de las colonias.

#### 3.7.4. Observación de células al microscopio

A partir de cultivos en fase exponencial de crecimiento de la cepa *Y. ruckeri* 150CTX en medio TSB con el antibiótico cefotaxima y sin él, se tomaron y depositaron 20 µl en porta objetos de vidrio. A continuación, en un caso, las muestras se fijaron con calor y se tiñeron con el colorante safranina, para, posteriormente, ser observadas en un microscopio óptico VisiScope® (VWR). Mientras que, de forma paralela, otras muestras fueron deshidratadas a temperatura ambiente y posteriormente recubiertas con oro en un metalizador Balzers SCD-004 (Balzers), para ser observadas en un microscopio electrónico de barrido Jeol JSM-6610LV (JEOL Ltd.).

#### 3.7.5. Perfil de resistencia a antibióticos

A partir de cultivos de las cepas parental, 150CTX y β1T.B2 en fase estacionaria de crecimiento, se realizaron diluciones 1:100 en medio TSB, de las cuales se sembraron 200 µl en placas cuadradas de 150 x 150 mm con medio Mueller Hinton, extendiéndose uniformemente por la superficie con ayuda de un hisopo estéril. A continuación, se colocaron de forma equidistante discos conteniendo los siguientes antibióticos y cantidades: ampicilina y gentamicina, 10 µg; eritromicina, 15 µg; y tobramicina, meropenem, cefepima, amoxicilina/clavulánico, cefalotina, cefotaxima, ceftazidema, cefuroxima y ceftazidema, 30 µg. Finalmente, las placas fueron incubadas durante 24 h a 18 °C.



### 3.8. Identificación, secuenciación y análisis de genes que codifican distintas porinas de *Y. ruckeri*

Mediante el programa RAST (Aziz y col., 2008), se identificó la secuencia de 4 genes que codifican las porinas tipo OmpC (OEU24200.1 y OEU26731.1), OmpF (OEU26867.1) y PhoE (OEU26976.1), en el genoma de la cepa *Y. ruckeri* 150. Posteriormente, a partir del ADN genómico extraído de las cepas *Y. ruckeri* 150 y 150CTX, se amplificó mediante reacciones de PCR las secuencias correspondientes a esos cuatro genes. Las condiciones de PCR así como los oligonucleótidos empleados en las reacciones, se encuentran recogidos en la **tabla 3.4**. Los fragmentos resultantes fueron secuenciados por el método Sanger (Stabvida) con los mismos oligonucleótidos empleados en su amplificación. Las secuencias obtenidas, fueron alineadas con el programa Clustal W2 (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>) para su comparación.

**Tabla 3.4.** Oligonucleótidos empleados en la secuenciación de los genes que codifican porinas tipo OmpC de *Y. ruckeri*.

Porina	Oligonucleótidos	T <sup>a</sup> (°C)	Fragmento PCR (pb)
OmpC	OmpC-F (5' ATATAGGATCCGTGTGTTTTGGTTAATTGTTG 3') OmpC-R (5' ATATACTGCAGTCGGAAATTAATTCGTTTG 3')	52	1131
OmpC.2	OmpC.2-F (5' GTCTGGATCCTAACGCCATGCATATCTT 3') OmpC.2-R (5' TATACTGCAGCTTACACTTGATCGCCGACG 3')		1098
OmpF	OmpF-F (5' AATTGGATCCCTATGTAAGTGGCGTACAAA 3') OmpF-R (5' TGATCTGCAGTTCACGCTGGTCAGTAC 3')		1101
PhoE	PhoE-F (5' TGATGGATCCTCGCTTAATGCTAATGTC 3') PhoE-R (5' TATACTGCAGTTATTCCACGGCTGT 3')		1095

### 3.9. Análisis del perfil de proteínas mediante SDS-PAGE

Para la preparación de las muestras de proteínas, se tomaron 2 ml de los cultivos crecidos a 18 °C, de las cepas *Y. ruckeri* 150 y *Y. ruckeri* 150CTX, en fase exponencial tardía de crecimiento (DO<sub>600</sub> =1). Después de ser lavados mediante centrifugación con H<sub>2</sub>O destilada, los sedimentos así obtenidos, fueron resuspendidos en 100 µl del tampón de carga Laemli, que consiste en una mezcla de Tris-HCl 62 mM, pH 6,8, SDS 2 %, glicerol 10 % (v/v); azul de bromofenol 0,01 % (p/v) y 2-mercaptoetanol 5 % (v/v), y posteriormente hervidos durante 5 min. Finalmente, y tras una centrifugación durante 1 min a 4 °C, se tomaron 10 µl de los sobrenadantes que fueron depositados en los pocillos correspondientes de un gel SDS-PAGE (12, 5 %) del sistema de minigeles Miniprotean II (Bio-Rad, España), y las proteínas separadas acorde con el método Laemli (1970). La concentración de acrilamida (44:0,8) del gel de separación fue del 12,5 %. Finalizada la electroforesis el gel fue teñido con una solución del colorante azul Coomassie (Sigma Aldrich Co.) al 0,25 %.

### 3.10. Análisis de los mutantes *acrR*<sup>-</sup> y *osmY*<sup>-</sup>

#### 3.10.1. Cuantificación de la actividad $\beta$ -galactosidasa de los clones *acrR*<sup>-</sup> y *osmY*<sup>-</sup> mediante ensayo ONPG

Los clones *acrR*<sup>-</sup> y *osmY*<sup>-</sup>, seleccionados durante la construcción de la genoteca con eritromicina y kanamicina, presentaron una mayor actividad  $\beta$ -galactosidasa a 18 °C que a 28 °C en medio EMB. Con el fin de cuantificar esta diferencia de expresión dependiente de temperatura se realizaron ensayos colorimétricos utilizando ONPG como sustrato de la enzima  $\beta$ -galactosidasa. Para la realización de estos, se inocularon matraces de 250 ml que contenían 20 ml de medio TSB con 0,2 ml de cultivo en fase estacionaria de crecimiento. Dichos matraces fueron incubados en condiciones de 18 °C y 28 °C y 250 rpm, hasta que los cultivos alcanzaron una DO<sub>600</sub> de en torno a 1. En ese momento, se tomaron muestras de 1 ml por triplicado que se centrifugaron a 12.000 rpm durante 10 minutos. Una vez eliminado el sobrenadante, el sedimento obtenido se mantuvo a -20 °C hasta el momento de proceder a la cuantificación de la actividad  $\beta$ -galactosidasa. Para ello, se utilizó el método de Miller (Miller, 1972), en el que se cuantifica a través de la medición de la DO<sub>420</sub>, la presencia del compuesto coloreado o-nitro-fenol, producto de la transformación del sustrato ONPG por parte de la enzima  $\beta$ -galactosidasa.

#### 3.10.2. Análisis *in silico* de los genes *acrR* y *osmY*

El análisis bioinformático de los genes *acrR* y *osmY*, así como el de su contexto genético se llevó a cabo con los programas RAST (Aziz y col., 2008) y Blast (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

#### 3.10.3. Obtención de las cepas complementadas *Y. ruckeri* *acrR*<sup>+</sup>, *Y. ruckeri* *osmY*<sup>+</sup> y *Y. ruckeri* *osmY*<sup>++</sup>

La complementación de los mutantes *Y. ruckeri* *acrR*<sup>-</sup> y *osmY*<sup>-</sup> se llevó a cabo utilizando el plásmido pGBM5 (tabla 3.2). En él, se clonó una copia del gen interrumpido en cada caso, junto con su propio promotor. De igual modo, para el caso del mutante *osmY*<sup>-</sup> se realizó otra construcción en la que se incluyó además del gen *osmY*, el gen adyacente (perteneciente a la familia YtjA), situado en su extremo 3'. Para ello, se amplificaron los genes *acrR* y *osmY* mediante PCR con la polimerasa Phusion® High-Fidelity (NewEngland Biolabs Inc.) utilizando los pares de oligonucleótidos *acrR*-F/*acrR*-R y *osmY*-F/*osmY*-R (tabla 3.5). Igualmente, el fragmento de ADN correspondiente al gen *osmY* y su adyacente fue amplificado con los oligonucleótidos *osmY*-F/*osmY*-R2 (tabla 3.5). Los oligonucleótidos denominados "F" se diseñaron con una diana *Bam*HI y los "R" con una *Pst*I, además de con cuatro bases adicionales en su extremo 5'. Una vez obtenidos los productos de PCR, estos fueron digeridos con las enzimas *Pst*I y *Bam*HI y ligados con el vector pGBM5 que previamente había sido digerido con las mismas enzimas. Cada mezcla de ligación fue introducida por electroporación en células competentes de *E. coli* DH5 $\alpha$  *λpir* y los transformantes fueron seleccionados en placas con el medio 2xTY y estreptomina. Tras constatar mediante digestión con las mismas enzimas utilizados para la clonación y PCR, que las construcciones eran correctas, éstas

fueron transferidas a células competentes de los respectivos mutantes mediante electroporación. En este caso, los transformantes fueron seleccionados en el medio TSB con kanamicina y estreptomycinina.

**Tabla 3.5.** Oligonucleótidos empleados para la síntesis mediante PCR de los genes utilizados en la complementación de los mutantes.

Gen	Secuencia	T <sup>a</sup> (°C)	Tamaño fragmento (pb)
<i>acrR</i>	acrR-F (5' TTTATCTGCAGTCCTATAAGTACCAAGCTG 3') acrR-R (5' TTTAAGGATCCAATGCGTTAAATAATGACT 3')	50	947
<i>osmY</i>	osmY-F (5' ATGCCTGCAGTCATCGGGGTATTTTCATT 3') osmY-R (5' ATGCGGATCCCCAACGGCCAGAAGCAG 3')	48	1016
<i>osmY-ytjA</i>	osmY-F (5' ATGCCTGCAGTCATCGGGGTATTTTCATT 3') osmY-R2 (5' ATGCGGATCCCATAGTGATGCACCCT 3')	48	1382

En las secuencias de los oligonucleótidos aparecen subrayadas las dianas de restricción.

### 3.10.4. Caracterización fenotípica de las cepas *Y. ruckeri* *acrR*<sup>-</sup>, *Y. ruckeri* *acrR*<sup>+</sup>, *Y. ruckeri* *osmY*<sup>-</sup>, *Y. ruckeri* *osmY*<sup>+</sup> y *Y. ruckeri* *osmY*<sup>++</sup>

#### 2.10.4.1. Ensayo de susceptibilidad a distintos compuestos

Los compuestos a ensayar se diluyeron de forma seriada con base 2 en el medio TSB, dispensándose a continuación 95 µl de cada dilución por triplicado en pocillos de placas microtíter con fondo en U. El inóculo bacteriano de las cepas *Y. ruckeri* 150, *Y. ruckeri* *acrR*<sup>-</sup> y *Y. ruckeri* *acrR*<sup>+</sup> se preparó diluyendo 1:10 cultivos en fase exponencial (DO<sub>600</sub> de 0,5) correspondientes a una suspensión 0,5 Mc Farland (10<sup>8</sup> ufc/ml). Se añadieron 5 µl de la suspensión a cada pocillo, obteniéndose así 5 x 10<sup>4</sup> ufc por pocillo. Las placas fueron incubadas 24 h a 18 °C en estático. Tras este tiempo se determinó la concentración mínima inhibitoria (CMI) de cada uno de los compuestos. Los ensayos fueron realizados tres veces de forma independiente. Los compuestos ensayados y sus rangos de concentración fueron los siguientes: acrilflavina y cloranfenicol, 0,02-40,96 µg/ml; ciprofloxacina, 0,02-1,28 µg/ml; tetraciclina 0,02-10,24 µg/ml; SDS y tritón X-100, 0,0015625-25,6 % (p/v).

#### 3.10.4.2. Ensayo de sensibilidad a compuestos orgánicos y sales biliares

•**Compuestos orgánicos:** Se cultivaron las cepas *Y. ruckeri* 150, *Y. ruckeri* *acrR*<sup>-</sup> y *Y. ruckeri* *acrR*<sup>+</sup> en el medio TSB a 18 °C hasta alcanzar una DO<sub>600</sub> de 0,5 (10<sup>8</sup> ufc/ml). A continuación, los cultivos se lavaron con tampón PBS mediante centrifugación, y se hicieron diluciones con base 10 en el mismo tampón. Seguidamente, se depositaron 10 µl de cada suspensión en la superficie del medio TSA en placas Petri de vidrio. Tras dejar durante 10 min que se absorbiese el líquido depositado la superficie, el medio se

inundó con una fina capa de aproximadamente 3 mm de espesor de los solventes orgánicos n-hexano, ciclohexano y xileno. Finalmente, las placas se incubaron a 18 °C durante un periodo de 3 días.

•**Sales biliares:** A partir de cultivos de las cepas *Y. ruckeri* 150, *Y. ruckeri*  $\text{acrR}^-$  y *Y. ruckeri*  $\text{acrR}^+$  en fase exponencial de crecimiento que fueron previamente lavados mediante centrifugación con tampón PBS, se realizaron diluciones con base 10 en el mismo tampón y se depositaron 10  $\mu\text{l}$  de las diferentes concentraciones sobre placas con el medio TSA al que se le había añadido sales biliares en una proporción del 4 % (p/v). Las sales empleadas fueron colato sódico y deoxicolato sódico (Sigma Aldrich Co.), en una proporción de 85:15, que según el trabajo de **Denton y col., 1974**, se corresponde con la existente en el intestino de trucha arcoíris. Las placas se incubaron a 18 °C durante 3 días.

#### 3.10.4.3. Efecto de colorantes y azúcares en la morfología de la colonia

Para determinar el efecto de distintos compuestos en la morfología de la colonia de las cepas *Y. ruckeri* 150, *Y. ruckeri*  $\text{acrR}^-$  y *Y. ruckeri*  $\text{acrR}^+$ , se depositaron 2  $\mu\text{l}$  del cultivo en fase estacionaria de crecimiento de cada cepa, en la superficie diferentes medios de cultivo sólidos con los distintos compuestos, que luego fueron incubados a 18 °C y 28 °C durante 3 días.

•**Efecto de colorantes:** Al medio TSA se le añadió los siguientes compuestos y concentraciones: azul de metileno 0,035, 0,07 y 0,14  $\mu\text{g/ml}$ ; eosina A (amarillenta) 0,2, 0,4 y 0,8  $\mu\text{g/ml}$ ; la combinación azul de metileno + eosina A 0,07 y 0,4  $\mu\text{g/ml}$ , respectivamente (concentración a la que se encuentran en el medio EMB); cristal violeta 0,07  $\mu\text{g/ml}$ ; y acrilflavina 0,035  $\mu\text{g/ml}$ .

•**Efecto de azúcares:** En primer lugar se analizó el efecto de la lactosa (0,5 %) utilizando el medio TSA con diferentes proporciones de agar (0,3; 0,6; 1,3 y 2 %, p/v). También, se valoró el efecto de la glucosa (0,5 %) y galactosa (0,5 %) en TSA con agar al 0,6% (p/v). Finalmente, se analizó el efecto de estos tres azúcares (glucosa 0,25 % y 0,5%; galactosa 0,75 %; galactosa 0,5 + glucosa 0,25 %; lactosa 0,75 %; lactosa 0,5 % + glucosa 0,25 %; arabinosa 0,75 %; arabinosa 0,5 % + glucosa 0,25 %) en AN con 0,6 % de agar (p/v).

#### 3.10.4.4. Efecto del NaCl sobre el crecimiento

El análisis del efecto del NaCl sobre el crecimiento de las cepas *Y. ruckeri* 150, *Y. ruckeri*  $\text{osmY}^-$ , *Y. ruckeri*  $\text{osmY}^+$  y *Y. ruckeri*  $\text{osmY}^{++}$ , se llevó a cabo por 2 métodos.

• **En medio líquido:** Cultivos en fase estacionaria de crecimiento de las 4 cepas fueron diluidos 1:100 para inocular matraces que contenían 20 ml de medio TSB al que se le había añadido 3 % de NaCl. Los cultivos se incubaron a 18 °C y 250 rpm y el crecimiento fue seguido durante un periodo de 60 h mediante la determinación de la densidad óptica, como viene indicado en el **apartado 3.1**. Las curvas de crecimiento fueron realizadas 3 veces de forma independiente.

- **En medio sólido:** La obtención del inóculo y preparación del ensayo se realizó de la misma manera que se describe en el **apartado 3.10.4.2.**, con la diferencia de que en esta ocasión al medio TSA se le añadió NaCl en proporciones de 2, 4 y 8 % (p/v). Las placas fueron incubadas a 18 °C durante 3 días.

#### 3.10.5. Determinación de la virulencia

La determinación de la virulencia se llevó a cabo por distintas aproximaciones según el caso.

##### • Inyección

A partir de cultivos a una  $DO_{600}$  de 0,5 (correspondiente a  $10^8$  ufc/ml) que habían sido crecidos en medio TSB a 18 °C y 250 rpm, las células se lavaron con el tampón PBS mediante centrifugación y se hicieron diluciones seriadas con base 10 en el mismo tampón.

—Para las cepas *Y. ruckeri* 150, *Y. ruckeri*  $acrR^-$  y  $acrR^+$ , se determinó la  $DL_{50}$  con el siguiente procedimiento: se inyectaron grupos de 10 alevines de trucha arcoíris (con un peso de entre 6-8 g) por vía intraperitoneal con 0,1 ml de las distintas diluciones que abarcaron el rango de concentraciones entre  $10^2$  y  $10^8$  ufc/ml. Los peces fueron mantenidos durante una semana en acuarios con 70 l de agua de clorada a  $18\text{ °C} \pm 1$ , y cada 24 h se retiraron y registraron los individuos muertos. Todos los ensayos fueron realizados por duplicado de forma independiente. Los valores de  $DL_{50}$  fueron calculados de acuerdo con el método **Reed y Muench (1938)**.

—En el caso de las cepas *Y. ruckeri*  $osmY^-$  y  $osmY^{++}$ , y utilizando la cepa parental como control, la determinación de la virulencia se realizó como sigue: a partir de la dilución  $10^{-1}$  ( $10^7$  ufc/ml) de un cultivo con una  $DO_{600}$  de 0,5, se inocularon por vía intraperitoneal 0,1 ml de la suspensión a alevines de trucha arcoíris (con un peso de entre 6-8 g) distribuidos en 3 grupos de 5 individuos por cada cepa a ensayar. Los peces fueron mantenidos durante una semana en acuarios con 70 l de agua de clorada a  $18\text{ °C} \pm 1$ , y cada día se retiraron y registraron los individuos muertos. Los ensayos fueron realizados por duplicado y de forma independiente. En el caso de la cepa *Y. ruckeri*  $osmY^{++}$ , los peces fueron inoculados además con 0,5  $\mu$ l de una solución de kanamicina a 6 mg/ml por vía intramuscular, en el momento inicial y 48 h postinfección.

A lo largo de los experimentos, se analizaron al azar algunos peces muertos de los que se sembraron muestras de su cavidad abdominal en placas con medio TSA (añadiendo kanamicina en el caso de haber inoculado mutantes) que se incubaron a 28 °C durante 48 h. El tipo de colonia mayoritaria resultante, fue analizada por PCR para confirmar que correspondía a la cepa de *Y. ruckeri* inoculada en cada caso.

##### • Inmersión

Las condiciones de cultivo de las cepas, así como las características de los peces utilizados, fueron las mismas que las descritas para la determinación de la virulencia por inyección. No obstante, en este caso se utilizó 1 l de cultivo, en fase exponencial de

crecimiento y a una  $DO_{600}$  de 0,5, el cual se lavó por centrifugación y resuspendió en 250 ml de agua destilada para, a continuación, realizar una dilución 1:10 en un volumen final de 10 l de agua de clorada, obteniéndose una suspensión bacteriana de  $10^7$  ufc/ml. Finalmente, grupos de 10 peces fueron sumergidos durante 1 h en dicha suspensión y posteriormente trasladados a tanques con 70 l de agua de clorada donde fueron mantenidos un periodo de 7 días durante los cuales se fueron registrando y retirando de los acuarios diariamente los individuos muertos.

De igual modo, a lo largo de los experimentos se fueron recogiendo muestras del intestino de peces muertos que fueron sembradas en el medio TSB con el antibiótico para confirmar la presencia mayoritaria de la cepa correspondiente de *Y. ruckeri* en el interior del pez.

#### 3.10.6. Análisis de la expresión de los genes *acrR* y *osmY* vía detección de la luminiscencia

##### 3.10.6.1. Influencia de los compuestos acrilflavina y NaCl

La cuantificación de la actividad promotora de los genes *acrR* y *osmY*, en medio líquido en presencia de acrilflavina y NaCl, respectivamente, se realizó mediante la detección de la luminiscencia emitida por las cepas mutantes en los respectivos genes, con el luminómetro Sirius L Tube Luminometer (Titertek-Berthold).

Previamente se estableció la correlación entre la luminiscencia emitida y el número de células. Para ello, a partir de cultivos en el medio TSB en fase exponencial de crecimiento ( $DO_{600}$  0,5), se realizaron diluciones seriadas con base 10 en el rango de  $10^2$  a  $10^8$  ufc/ml y se transfirieron 0,1 ml de cada dilución a tubos de poliestireno de 12 mm de diámetro (Deltalab S.L.). Seguidamente se midió la luminiscencia de cada uno de los tubos con un tiempo de exposición de 1 segundo. Las muestras se tomaron por triplicado y el experimento se realizó 2 veces de forma independiente.

Los ensayos con cada cepa se llevaron a cabo a partir de cultivos en fase estacionaria de crecimiento, que fueron utilizados para inocular matraces de 250 ml que contenían 30 ml del medio TSB, de forma que la  $DO_{600}$  tras el inóculo fuera de aproximadamente 0,15. Estos matraces se incubaron a 18 °C y 250 rpm hasta alcanzar una  $DO_{600}$  en torno a 0,3. En ese momento, volúmenes de 6 ml del cultivo se distribuyeron en matraces de 100 ml a los cuales se adicionaron, según el caso, los compuestos acrilflavina a 2,5; 5 y 10 µg/ml o NaCl en una proporción de 1,5 %, dejando en ámbos casos un matraz control, en el que no fue añadido ningún compuesto. Estos matraces se incubaron de nuevo en las condiciones anteriores, y a los tiempos 0, 10, 20 y 30 min se cuantificó la luminiscencia en muestras de 0,1 ml de cada uno de los matraces. En cada ensayo se tomaron muestras por triplicado y cada experimento fue llevado cabo 2 veces de forma independiente. Se empleó un test de Análisis de la Varianza (ANOVA) para determinar el nivel de significación estadística de los resultados.

#### 3.10.6.2. Expresión en relación a los distintos órganos de trucha arcoíris

●**In vivo:** para la visualización de la actividad promotora, a tiempo real, durante el proceso infeccioso, se utilizaron 3 grupos de 35 peces cada uno de entre 8 y 10 g que fueron infectados con las cepas de *Y. ruckeri*  $acrR^-$  y *Y. ruckeri*  $osmY^{++}$ . La infección con la cepa *Y. ruckeri*  $acrR^-$  se realizó por 2 sistemas diferentes: en un grupo se inyectó por vía intraperitoneal  $10^6$  ufc por individuo, mientras que en el otro, los peces fueron inmersos en una suspensión bacteriana ( $10^7$  ufc/ml), durante una hora en 10 l de agua de clorada. La infección con la cepa *Y. ruckeri*  $osmY^{++}$  solo se realizó mediante inyección intraperitoneal, inoculando  $10^6$  ufc por individuo. En todos los casos, los peces fueron mantenidos en tanques de 70 l de agua de clorada a  $18\text{ °C} \pm 1$ . Cada 24 h y durante un periodo de 4 días en el caso de la infección intraperitoneal, y 7 para la infección por inmersión, se analizaron entre 5 y 10 individuos cada día. Para ello, los peces fueron sacrificados por sobredosis de anestesia con éter monofenílico de etilenglicol (Merck Schuchardt OHG). Seguidamente, fueron diseccionados y analizados con el sistema IVIS® Imaging System (Xenogen) para mediante la detección de la luminiscencia emitida por la bacteria, determinar su presencia en los tejidos y definir su progresión a lo largo del tiempo. Las condiciones de toma de imágenes fueron: exposición de 2 min y un "binning" de 2. Los análisis se realizaron por duplicado y de forma independiente.

●**Ex vivo:** en este contexto, consideraremos ensayos *ex vivo*, aquellos realizados con órganos procedentes de trucha arcoíris, previamente extraídos del animal. Estos ensayos fueron abordados de 2 maneras:

—En medio sólido

A partir de cultivos en la fase exponencial de crecimiento ( $OD_{600} = 0,5$ ) de cada una de las cepas de interés, se realizó una dilución 1:10 de la que se sembró 100  $\mu$ l en medio TSA para conseguir su crecimiento confluyente. Inmediatamente se depositaron en la superficie del medio, órganos o porciones de tejidos extirpados de alevines de trucha arcoíris: encéfalo, corazón, hígado, bazo, intestino, agallas y, en el caso de *OsmY* también músculo. Las placas fueron incubadas a  $18\text{ °C}$  durante una noche, transcurrida la cual, se procedió a visualizar la luminiscencia emitida por los mutantes, mediante el sistema IVIS® Imaging System (Xenogen), con los parámetros: 1 min de exposición y un "binning" de 2.

—En medio líquido

Los ensayos se llevaron a cabo de un modo similar al que se detalla en el **apartado 3.10.6.1**, utilizando un luminómetro. En este caso, lo que se adicionó al medio de cultivo para el estudio de su influencia en la expresión génica, fueron porciones de hígado, tejido adiposo o músculo, extirpados de trucha arcoíris.





## 4. Resultados

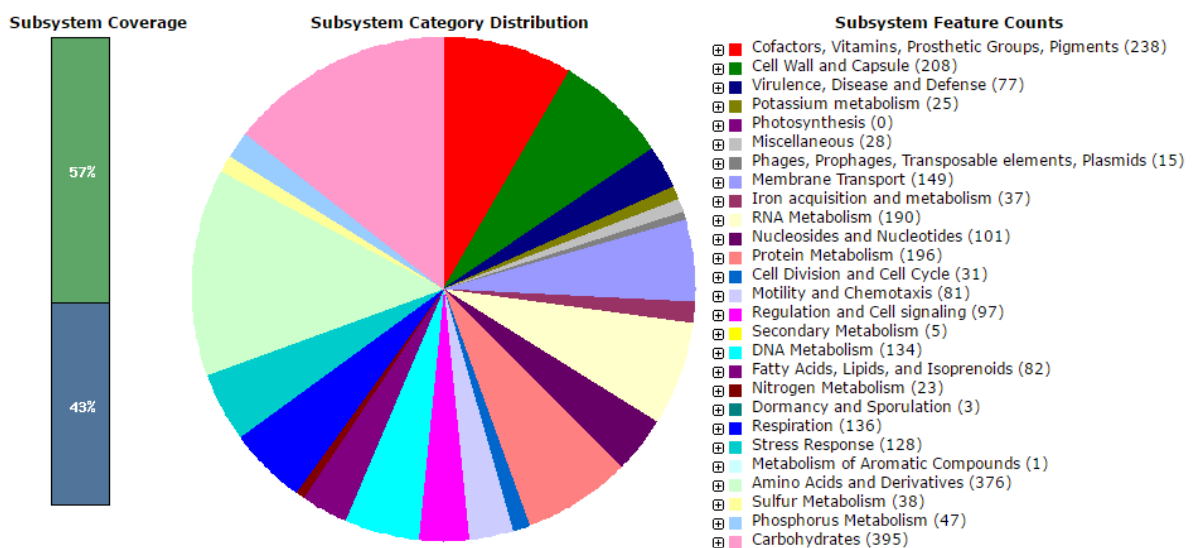


## 4.1. Secuenciación y caracterización genómica de la cepa *Y. ruckeri* 150

Las lecturas del genoma de *Y. ruckeri* 150 generadas mediante secuenciación Illumina de alto rendimiento se ensamblaron en un total de 49 "scaffolds" con un rango de tamaño de 502 a 572.189 pb.

El ADN genómico de *Y. ruckeri* 150 consta de 3.826.775 pb con un contenido en GC del 46,88 %. Según la anotación funcional, el genoma contiene 4 ARNr, concretamente un ARNr 5S y 3 ARNr 23S, además de 21 ARNt (Cascales y col., 2016).

En el genoma de *Y. ruckeri* 150 existen al menos 3.538 pautas abiertas de lectura u ORFs (Open Reading Frames), de las cuales un 81,17 % codifica proteínas con función conocida en otras bacterias, mientras que un 18,83 % codifica proteínas hipotéticas. Del total de ORFs identificados, el 56,85 % fue incluido en subsistemas RAST (figura 4.1), los cuales están formados por productos proteicos funcionalmente relacionados.



**Figura 4.1.** Distribución de los ORFs del genoma de *Y. ruckeri* 150 en distintos subsistemas según el programa RAST.

A lo largo del genoma de la bacteria se determinó la presencia de un total de 87 secuencias repetidas en tándem entre 2 y 8,5 veces cada una. Además, se identificaron 4 posibles regiones con secuencias relativas a fagos, una de ellas representa un genoma fágico completo, 2 incompletos y otra no bien definida, constituidas por 53, 17, 16 y 10 ORFs, respectivamente. El análisis de estas secuencias permitió adscribirlas con mayor probabilidad a los fagos que se encuentran recogidos en la **tabla 4.1**. Por otro lado no se encontró en el genoma ningún elemento CRISPR.

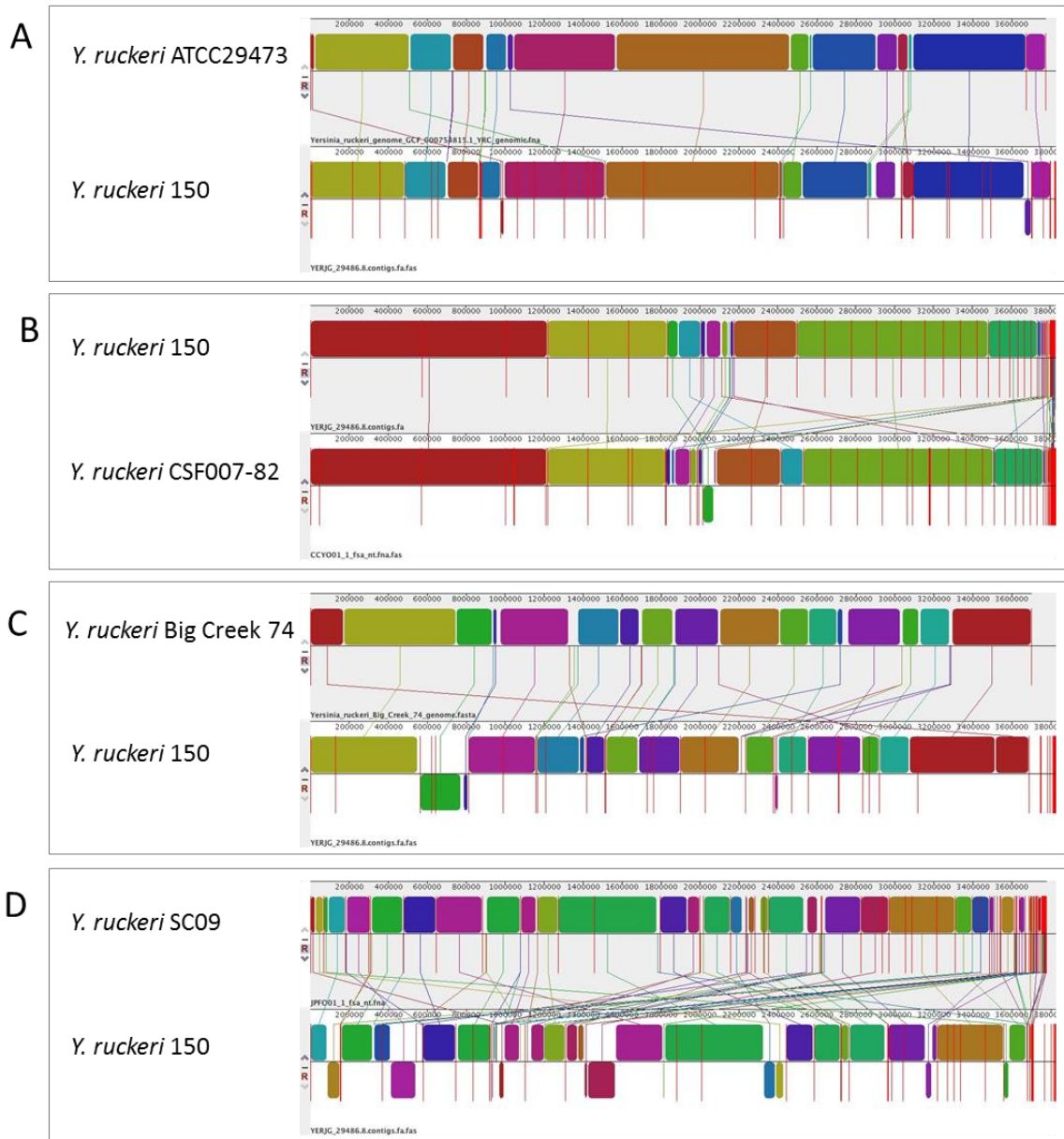
**Tabla 4.1.** Características generales de las regiones fágicas identificadas en *Y. ruckeri* 150.

Región	Tamaño (Kb)	Integridad	ORFs	Posible fago	GC (%)
1	24,6	Incompleto	17	<i>Yersinia</i> L-413C (NC_005069)	45,95
2	31,5	Incompleto	16	<i>Salmonella</i> Fels2 (NC_010463)	49,57
3	56	Completo	53	<i>Shigella</i> Sfil (NC_021857)	46,96
4	6,3	No definido	10	<i>Erwinia</i> ENT90 (NC_019932)	49,90

## 4.2. Análisis comparativo del genoma de *Y. ruckeri* 150 con los de las cepas *Y. ruckeri* ATCC24973, *Y. ruckeri* CSF007-82, *Y. ruckeri* Big Creek 74 y *Y. ruckeri* SC09

### 4.2.1. Alineamiento de genomas por pares

Mediante la utilización del programa MAUVE se ha podido alinear y comparar la secuencia del genoma de la cepa *Y. ruckeri* 150 con cada uno de los genomas de las cuatro cepas estudiadas, determinando así las regiones que son ortólogas y xenólogas, entre ellos. De este modo, se generaron patrones de las homologías que se representaron en mosaicos organizados en BCLs que se muestran en la **figura 4.2**. El resultado indica que la cepa *Y. ruckeri* 150 comparte un mayor número de regiones homólogas con las cepas *Y. ruckeri* ATCC 29473 y CSF007-82, que también son de serotipo O1 y fueron aisladas de trucha arcoíris, (**figuras 4.2.A y 4.2.B**) que con *Y. ruckeri* Big Creek 74 de serotipo O2 y SC09 de serotipo desconocido, ambas aisladas de otros hospedadores (**figuras 4.2C y 4D**). Por otro lado, el mayor número de reordenamientos génicos se detectaron en el alineamiento y comparación de los genomas de las cepas *Y. ruckeri* 150 y SC09 (**figura 4.2.D**).

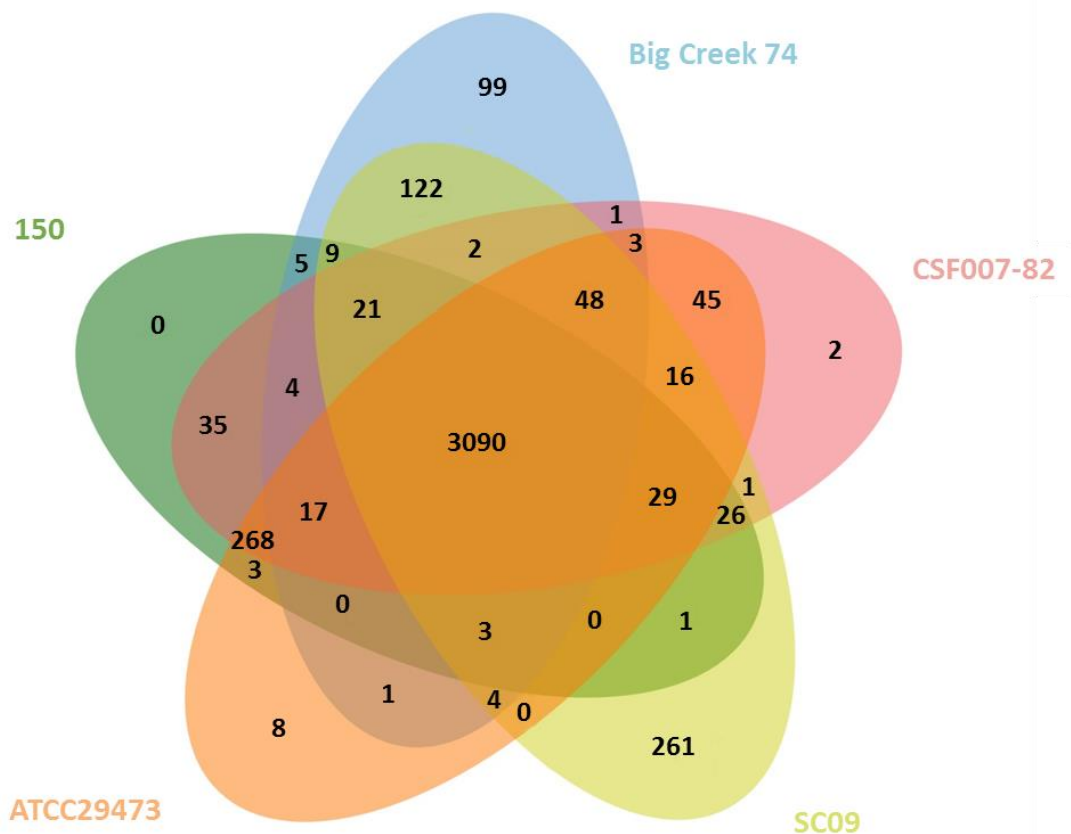


**Figura 4.2.** Alineamientos por pares, resultado de la aplicación del programa MAUVE entre los genomas de *Y. ruckeri* 150 y **A)** *Y. ruckeri* ATCC 29473; **B)** *Y. ruckeri* CSF007-82; **C)** *Y. ruckeri* Big Creek 74; y **D)** *Y. ruckeri* SC09. Los bloques de colores representan los BCLs, regiones sin reordenamientos internos entre los genomas. Los BCLs homólogos están representados por el mismo color y unidos por líneas también del mismo color. Las líneas rojas verticales indican los límites de los "contigs". Las regiones representadas debajo de la línea central de un genoma indican que estas se encuentran en sentido inverso respecto al genoma de referencia.

#### 4.2.2. Genes diferenciales en el conjunto de los genomas analizados

Para la identificación de aquellos genes compartidos entre las distintas cepas analizadas de *Y. ruckeri*, así como los que son únicos para cada una de ellas, se construyó un diagrama de Venn de cinco conjuntos, correspondientes a los 5 genomas (**figura 4.3.**). En éste se puede observar que el pangenoma de *Y. ruckeri* consiste en

4.117 genes que codifican proteínas, de los cuales, 3.090 son comunes a todas las cepas comparadas, conformando el genoma "core" o núcleo, el cual representa el 75,05 % del conjunto. Las cepas *Y. ruckeri* 150, ATCC 29473 y CSF007-82, que pertenecen al serotipo O1 y han sido aisladas de trucha arcoíris, comparten 268 genes (6,5 %) que no aparecen en las otras 2 cepas incluidas en el estudio. Del mismo modo, los genomas de las cepas *Y. ruckeri* Big Creek 74, de serotipo O2 y aislada de salmón Chinook, junto con SC09, de serotipo desconocido y aislada de pez gato, poseen 122 genes en común (2,96 %), ausentes en el genoma de las tres cepas de serotipo O1. Por otro lado, hay que destacar también que el número de genes únicos, es decir, que aparecen en un genoma pero no en los demás, fue muy superior en las cepas *Y. ruckeri* Big Creek 74 y SC09, con 99 y 261 genes respectivamente, comparado con las cepas de serotipo O1, en las que tan solo se localizaron 2 en *Y. ruckeri* ATCC 29473, 8 en CSF007-82 y ninguno en 150.



**Figura 4.3.** Diagrama de Venn en el que se comparan los genes de 5 cepas de *Y. ruckeri*. Cada una de las cepas viene representada por un color diferente. Se indica el número de genes (3.090) que conforman el genoma "core", común a todas las cepas, así como los genes compartidos y únicos de cada cepa incluida en el análisis.

#### 4.2.2.1. Identificación de genes compartidos de forma exclusiva entre las cepas *Y. ruckeri* 150, *Y. ruckeri* ATCC 29473 y *Y. ruckeri* CSF007-82

Entre los 268 genes que comparten las cepas de serotipo O1 y que no están presentes en las otras cepas estudiadas (**figura 4.3**), 112 codifican proteínas hipotéticas, 33 se corresponden con elementos genéticos móviles, 24 codifican proteínas relacionadas con actividad fágica y 99 codifican proteínas con función conocida (**tabla 4.2**).

**Tabla 4.2.** Productos proteicos deducidos de los genes compartidos de forma exclusiva por las cepas *Y. ruckeri* 150, *Y. ruckeri* ATCC 29473 y *Y. ruckeri* CSF007-82, agrupados según su función.

Proteína	150	ATCC 29473	CSF007-82
<b>Restriction-modification systems</b>			
Type I restriction-modification system, specificity subunit S	BI323_00005	DJ39_RS07815	CSF007_RS15880
Eco57I restriction-modification methylase family protein	BI323_06175	DJ39_RS04570	CSF007_RS05790
Type I restriction-modification system, restriction subunit R	BI323_00080	DJ39_RS07890	CSF007_RS15805
Type I restriction-modification system, DNA-methyltransferase subunit M	BI323_00010	DJ39_RS07820	CSF007_RS15875
Restriction methylase	BI323_06275	DJ39_RS04465	CSF007_RS05895
Restriction methylase	BI323_07120	DJ39_RS07795	CSF007_RS06135
Antirestriction family protein	BI323_06250	DJ39_RS04490	CSF007_RS05870
Antirestriction family protein	BI323_000601	DJ39_RS07870	CSF007_RS15825
<b>Toxin-antitoxin systems</b>			
YfjZ protein (Antitoxin to YpjF)	BI323_00070	DJ39_RS07880	CSF007_RS15815
Toxin Ykfl	BI323_00075	DJ39_RS07885	CSF007_RS15810
toxin_HigB-2_	BI323_15350	DJ39_RS16625	CSF007_RS00015
Antitoxin ParD	BI323_16600	DJ39_RS11355	CSF007_RS09305
Toxin Ykfl	BI323_06265	DJ39_RS04475	CSF007_RS05885
<b>Legionaminic acid biosynthesis</b>			
Dehydratase/C-5-epimerase	BI323_14300	DJ39_RS00115	CSF007_RS08290
Aminotransferase	BI323_14305	DJ39_RS00110	CSF007_RS08285
UDP-N-acetylglucosamine 2-epimerase	BI323_14310	DJ39_RS00105	CSF007_RS08280
N-acetylneuraminate synthase	BI323_14315	DJ39_RS00100	CSF007_RS08275
4-amino-6-deoxy-N-Acetyl-D-hexosaminyll- (Lipid carrier) acetyltrasferase	BI323_14320	DJ39_RS00095	CSF007_RS08270
Mannose-1-phosphate guanyltransferase	BI323_14325	DJ39_RS00090	CSF007_RS08265
Oxidoreductase , NAD-binding Rossmann fold family protein	BI323_14330	DJ39_RS00085	CSF007_RS08260
Acylneuraminate cytidyltransferase	BI323_14335	DJ39_RS00080	CSF007_RS08255
Dehydrogenase	BI323_14340	DJ39_RS00075	CSF007_RS08250
Polysaccharide biosynthesis family protein	BI323_14345	DJ39_RS00070	CSF007_RS08245
Aminotransferase	BI323_14360	DJ39_RS00055	CSF007_RS08230
Imidazole glycerol phosphate synthase subunit HisH	BI323_14365	DJ39_RS00050	CSF007_RS08225
Imidazole glycerol phosphate synthase	BI323_14370	DJ39_RS00045	CSF007_RS08220
Epimerase/dehydratase	BI323_14375	DJ39_RS00040	CSF007_RS08215
UDP-2-acetamido-2,6-dideoxy-beta-L-talose-4-dehy drogenase	BI323_14380	DJ39_RS00035	CSF007_RS08210
UDP-N-acetylglucosamine 2-epimerase	BI323_14385	DJ39_RS00030	CSF007_RS08205
Glycosyl transferases group 1 family protein	BI323_14390	DJ39_RS00025	CSF007_RS08200
Tryptophan synthase beta chain like	BI323_14395	DJ39_RS00020	CSF007_RS08195
<b>Dna repair</b>			
DNA repair RadC family protein	BI323_00065	DJ39_RS07875	CSF007_RS15820

ATPase involved in DNA repair	BI323_15390	DJ39_RS16660	CSF007_RS00050
DNA_repair_ATPase_	BI323_06180	DJ39_RS04565	CSF007_RS05795
ATPase involved in DNA repair	BI323_06215	DJ39_RS04530	CSF007_RS05830
RadC family DNA repair protein	BI323_06255	DJ39_RS04485	CSF007_RS05875
<b>Transcriptional regulators</b>			
Regulator	BI323_01350	DJ39_RS09205	CSF007_RS01385
XRE_family_transcriptional_regulator	BI323_15355	DJ39_RS16630	CSF007_RS00020
transcription_factor_	BI323_16050	DJ39_RS16900	CSF007_RS16935
XRE_family_transcriptional_regulator	BI323_05810	DJ39_RS16260	CSF007_RS05430
<b>Type IV secretion system</b>			
Type IV secretion-system coupling DNA-binding domain protein	BI323_15400	DJ39_RS16670	CSF007_RS00060
TrbA	BI323_15410	DJ39_RS16680	CSF007_RS00070
RelB/StbD replicon stabilization protein (Antitoxin to RelE/StbE)	BI323_15420	DJ39_RS16690	CSF007_RS00080
Conjugal transfer/type IV secretion DotA/TraY family protein	BI323_15425	DJ39_RS16680	CSF007_RS00085
Incl1 plasmid conjugative transfer protein TraW	BI323_15435	DJ39_RS16705	CSF007_RS00095
Incl1 plasmid conjugative transfer protein TraU	BI323_15440	DJ39_RS16710	CSF007_RS00100
Incl1 plasmid conjugative transfer protein	BI323_15455	DJ39_RS16725	CSF007_RS00115
Incl1 plasmid conjugative transfer protein TraO	BI323_15465	DJ39_RS16735	CSF007_RS00125
TraN	BI323_15470	DJ39_RS16740	CSF007_RS00130
TraM	BI323_15475	DJ39_RS16745	CSF007_RS00135
TraC	BI323_15485	DJ39_RS16755	CSF007_RS00145
TraK	BI323_15490	DJ39_RS16760	CSF007_RS00150
Plasmid transfer ATPase TraJ	BI323_15495	DJ39_RS16765	CSF007_RS00155
TraI	BI323_15500	DJ39_RS16770	CSF007_RS00160
Incl1 plasmid conjugative transfer protein TraH	BI323_15505	DJ39_RS16775	CSF007_RS00165
Prepilin	BI323_15525	DJ39_RS16795	CSF007_RS00185
General_secretion_pathway_protein_GspF	BI323_15530	DJ39_RS16800	CSF007_RS00190
PilO	BI323_15545	DJ39_RS16815	CSF007_RS00205
Incl1 plasmid conjugative transfer lipoprotein PilN	BI323_15550	DJ39_RS16820	CSF007_RS00210
Type IVB pilus formation outer membrane protein, R64 PilN family	BI323_15555	DJ39_RS16825	CSF007_RS00215
<b>Transferases</b>			
Methyltransferase domain protein	BI323_16780	DJ39_RS04020	CSF007_RS16255
Glycosyl transferase, family 2	BI323_06290	DJ39_RS04450	CSF007_RS05910
<b>Other proteins</b>			
ATP/GTP-binding_protein	BI323_00035	DJ39_RS07845	CSF007_RS15850
Bipolar DNA helicase HerA	BI323_10945	DJ39_RS01005	CSF007_RS11255
Phosphopantetheine attachment site family protein	BI323_13885	DJ39_RS06465	CSF007_RS15645
AMP-dependent synthetase	BI323_13890	DJ39_RS06470	CSF007_RS15640
3-oxoacyl-[acyl-carrier protein] reductase	BI323_13895	DJ39_RS06475	CSF007_RS15635
Polysaccharide deacetylase	BI323_13905	DJ39_RS06485	CSF007_RS15625
Endonuclease	BI323_15395	DJ39_RS16665	CSF007_RS00055
Putative ATP-binding protein involved in virulence	BI323_16055	DJ39_RS16905	CSF007_RS16930
ATP-dependent DNA helicase RecG	BI323_16060	DJ39_RS16910	CSF007_RS16925
Chromosome segregation ATPase	BI323_16110	DJ39_RS16960	CSF007_RS16875
Initiator Replication family protein	BI323_16595	DJ39_RS11350	CSF007_RS09310
plasmid_stabilization_protein_	BI323_16605	DJ39_RS11360	CSF007_RS09300
Cobyrinic acid a,c-diamide synthase	BI323_16640	DJ39_RS11395	CSF007_RS09265
Glycosaminoglycan attachment site	BI323_16685	DJ39_RS14755	CSF007_RS03940
Retron-type RNA-directed DNA polymerase	BI323_16690	DJ39_RS14760	CSF007_RS03935
Sulfur transport family protein	BI323_16730	DJ39_RS00135	CSF007_RS17245
Cytotoxic family protein	BI323_16760	DJ39_RS17105	CSF007_RS17365



Low calcium response locus protein T	BI323_16800	DJ39_RS04040	CSF007_RS16275
ParB/RepB/Spo0J family partition domain protein	BI323_16820	DJ39_RS16600	CSF007_RS16685
Plasmid partition protein A	BI323_16825	DJ39_RS16605	CSF007_RS16690
ATP-dependent Lon protease	BI323_06155	DJ39_RS04590	CSF007_RS05770
alkaline_phosphatase	BI323_06160	DJ39_RS04585	CSF007_RS05775
ABC_transporter_ATP-binding_protein_	BI323_06170	DJ39_RS04575	CSF007_RS05785
DNA-binding_protein_	BI323_06200	DJ39_RS04545	CSF007_RS05815
AlpA family protein	BI323_06210	DJ39_RS04535	CSF007_RS05825
GTPase	BI323_06225	DJ39_RS04520	CSF007_RS05840
YagBYeeUYfjZ family protein	BI323_06270	DJ39_RS04470	CSF007_RS05890
DNA-binding protein	BI323_06285	DJ39_RS04455	CSF007_RS05905
37-kD nucleoid-associated bacterial protein	BI323_06340	DJ39_RS00940	CSF007_RS06920
(p)ppGpp_synthetase_	BI323_06345	DJ39_RS00935	CSF007_RS06915
Colicin-Ib	BI323_06365	DJ39_RS17065	CSF007_RS17470
AAA ATPase	BI323_06375	DJ39_RS00905	CSF007_RS06885
AAA ATPase	BI323_06400	DJ39_RS00875	CSF007_RS06855
Invasin	BI323_06460	DJ39_RS17045	CSF007_RS17450
DNA-directed RNA polymerase subunit sigma70	BI323_09490	DJ39_RS13885	CSF007_RS05930
ATP-binding_protein_	BI323_09540	DJ39_RS13835	CSF007_RS05980

#### 4.2.2.2. Identificación de genes compartidos de forma exclusiva por las cepas *Y. ruckeri* Big Creek 74 y *Y. ruckeri* SC09

Como se puede observar en el diagrama de Venn (**figura 4.3**), las cepas *Y. ruckeri* Big Creek 74 y SC09 poseen 122 genes en común que no se localizaron en las otras cepas estudiadas, entre ellos, 37 codifican proteínas de función desconocida, 50 son genes relativos a funciones relacionadas con fagos y 30 codifican proteínas relacionadas con funciones ya establecidas (**tabla 4.3**). Entre estas últimas, es necesario destacar la presencia de los genes que están relacionados con el metabolismo del sorbitol, característico de las cepas de *Y. ruckeri* de serotipo O2 (**Davies y Frerich, 1989**).

**Tabla 4.3.** Productos deducidos de los genes compartidos de forma exclusiva por las cepas *Y. ruckeri* Big Creek 74 y *Y. ruckeri* SC09, agrupados en relación a su función.

<b>Protein</b>	<b>SC09</b>	<b>Big Creek 74</b>
<b>Restriction modification system</b>		
Typel R-M System, specificity subunitS	NJ56_RS02590	UGYR_RS06280
Toxin-antitoxin system		
Antitoxin to RelE/StbE	NJ56_RS02580	UGYR_RS12460
Replicon stabilization toxin RelE	NJ56_RS02585	UGYR_RS12465
<b>Fimbria</b>		
Fimbrial protein StfD	NJ56_RS14520	UGYR_RS0378
Exotoxin/MrfF	NJ56_RS14525	UGYR_RS03790
Putative fimbrial membrane protein	NJ56_RS14530	UGYR_RS03795
Exotoxin	NJ56_RS14540	UGYR_RS03805
Fimbrial anchoring protein FimD	NJ56_RS10070	UGYR_RS06285
Fimbrial subunit	NJ56_RS17965	UGYR_RS16650
Exotoxin/minnor fimbrial subunit	NJ56_RS14535	UGYR_RS03800
Fimbria-like adhesine SfmA	NJ56_RS16255	UGYR_RS05635
Fimbrial periplasmic chaperone SfmC	NJ56_RS10065	UGYR_RS06280
Fimbrial like adhesine prot	NJ56_RS17890	UGYR_RS16665
PilN family type IV pilus biogenesis protein	NJ56_RS10080	UGYR_RS06295
GCN5-related N-acetyltransferase	NJ56_RS10095	UGYR_RS06310
<b>Insecticidal virulence protein</b>		
Probable insecticidal protein	NJ56_RS10100	UGYR_RS06315
Putative toxin subunit	NJ56_RS10110	UGYR_RS06325
Putative insecticidal toxin complex	NJ56_RS10115	UGYR_RS06330
<b>Sorbitol sorbose utilization</b>		
arabinose 5-phosphate isomerase	NJ56_RS11170	UGYR_RS07380
transcriptional regulator/glucitol operon activator prot	NJ56_RS11160	UGYR_RS07370
Transcriptional repressor of fructose operon DeoR family	NJ56_RS11165	UGYR_RS07375
sorbitol-6-phosphate 2-dehydrogenase	NJ56_RS11155	UGYR_RS07365
PTS glucitol/sorbitol transporter subunit IIB	NJ56_RS11145	UGYR_RS07355
PTS glucitol/sorbitol transporter subunit IIA	NJ56_RS11150	UGYR_RS07360
PTS glucitol/sorbitol transporter subunit IIC	NJ56_RS11140	UGYR_RS07350
<b>Other proteins</b>		
Transcriptional regulator LysR family	NJ56_RS10085	UGYR_RS06300
S-adenosylhomocysteine hydrolase	NJ56_RS02625	UGYR_RS12500
primosomal protein	NJ56_RS14055	UGYR_RS02835
Outer memb component of tripartite multidrug resistance system	NJ56_RS10260	UGYR_RS06475
chromosome partitioning protein ParA	NJ56_RS11555	UGYR_RS07765
Tfp pilus assembly protein%2C major pilin PilA	NJ56_RS09235	UGYR_RS02515
cyclopropane-fatty-acyl-phospholipid synthase	NJ56_RS11560	UGYR_RS07770
FAD-dependent oxidoreductase	NJ56_RS11550	UGYR_RS07760
Inorganic pyrophosphatase/exopoliphosphatase	NJ56_RS02630	UGYR_RS12505
Spermidine/putrescine ABC trasportor permease	NJ56_RS06425	UGYR_RS16290

#### 4.2.2.3. Identificación de los genes únicos de la cepa *Y. ruckeri* Big Creek 74

La cepa *Y. ruckeri* Big Creek 74, de serotipo O2 y aislada de salmón, presentó 99 genes únicos que no poseían las otras 4 cepas analizadas. Entre ellos se encuentran 53 genes que codifican proteínas hipotéticas, 8 con una función relacionada con actividad de fagos, 4 que son elementos genéticos móviles y 33 genes que codifican proteínas con funciones ya descritas (**Tabla 4.4**).

**Tabla 4.4.** Productos proteicos deducidos de los genes únicos de la cepa *Y. ruckeri* Big Creek 74, agrupados en relación a su función.

Protein	Big Creek 74
<b>Restriction -Modification systems</b>	
Restriction endonuclease	UGYR_RS12300
Type I restriction enzyme EcoKI M protein	UGYR_RS12280
Restriction endonuclease	UGYR_RS12305
Specificity determinant for hsdM and hsdR	UGYR_RS12285
<b>Transcriptional regulators</b>	
Repressor	UGYR_RS02755
Rha family transcriptional regulator	UGYR_RS04430
Regulatory protein	UGYR_RS04515
Repressor	UGYR_RS04520
<b>Polysaccharide biosynthesis</b>	
dTDP-4-dehydrorhamnose reductase	UGYR_RS14790
Polysaccharide biosynthesis family protein	UGYR_RS13615
UDP-N-acetylglucosamine 2-epimerase	UGYR_RS14785
Polysaccharide pyruvyl transferase family protein	UGYR_RS13605
<b>Transferases</b>	
Glycosyl transferase	UGYR_RS14780
Glycosyl transferases group 1 family protein	UGYR_RS13600
Glycosyl transferases group 1 family protein	UGYR_RS14800
Methyltransferase small domain protein	UGYR_RS14770
Acyltransferase family protein n=	UGYR_RS13625
Cytosine-specific methyltransferase	UGYR_RS12420
<b>Other proteins</b>	
Replication protein B	UGYR_RS02770
Helicase UvrD	UGYR_RS06215
Helicase	UGYR_RS06255
DEAD/DEAH box helicase	UGYR_RS12290
DEAD/DEAH box helicase	UGYR_RS12275
Chromosome segregation protein SMC	UGYR_RS06220
Peptidase M15	UGYR_RS04440
Endopeptidase	UGYR_RS04435
ATP-dependent Clp protease proteolytic subunit	UGYR_RS04405
Dipicolinate synthase	UGYR_RS12380
Cupin fold metallo, WbuC family protein	UGYR_RS14775
Ornithine decarboxylase (Fragment)	UGYR_RS12310
Nitroreductase family protein	UGYR_RS13610
Toxin	UGYR_RS06225
Histidine kinase	UGYR_RS12425
DNA-binding protein	UGYR_RS04510

#### 4.2.2.4. Identificación de genes únicos de la cepa *Y. ruckeri* SC09

La cepa *Y. ruckeri* SC09 de serotipo no descrito, y aislada de pez gato, posee 261 genes únicos, de los cuales, 148 codifican proteínas hipotéticas, 17 tienen origen fágico, 9 se corresponden con elementos móviles y 87 codifican proteínas con diversas funciones ya conocidas (**tabla 4.5**).

**Tabla 4.5.** Productos deducidos de los genes únicos de la cepa *Y. ruckeri* SC09, agrupados según su función.

Proteins	SC09
<b>Conjugual transfer proteins</b>	
Conjugative coupling factor TraD	NJ56_RS01525
Conjugal transfer protein TraD	NJ56_RS17275
Conjugal transfer protein TraN	NJ56_RS17305
Conjugal transfer protein TraB	NJ56_RS17340
Conjugal transfer protein TraB	NJ56_RS17100
Conjugal transfer protein TraH	NJ56_RS17290
Conjugal transfer protein TraW	NJ56_RS17320
Conjugal transfer protein TraL	NJ56_RS17355
Conjugal transfer protein TraU	NJ56_RS17315
Protein TraE	NJ56_RS17350
Conjugal transfer protein TraI	NJ56_RS17270
Conjugal transfer protein TrbB	NJ56_RS17295
Conjugal transfer protein TraC	NJ56_RS17330
Conjugal transfer protein TraF	NJ56_RS17300
Conjugal transfer protein	NJ56_RS01515
Conjugal transfer protein	NJ56_RS01570
Conjugal transfer protein Trbl	NJ56_RS01575
Conjugal transfer protein	NJ56_RS01615
Conjugal transfer protein	NJ56_RS01550
Conjugal transfer protein	NJ56_RS01610
Conjugal transfer protein	NJ56_RS01475
Conjugal transfer protein	NJ56_RS01605
IncF plasmid conjugative transfer protein TraN	NJ56_RS17990
Conjugal pilus assembly protein TraF	NJ56_RS16815
Sex pilus assembly and mating pair formation protein TrbC	NJ56_RS17065
Conjugal transfer pilus assembly protein TraU	NJ56_RS17070
Conjugal transfer pilus assembly protein TraH	NJ56_RS17045
Conjugal transfer ATP-binding protein TraC	NJ56_RS17090
TraK protein	NJ56_RS17105
Conjugal transfer protein	NJ56_RS01580
IncF plasmid conjugative transfer protein TraN	NJ56_RS17085
Type IV conjugative transfer system protein TraV	NJ56_RS17095
<b>Restriction-modification</b>	
Restriction methylase	NJ56_RS17400
Methyltransferase	NJ56_RS17575
Cytosine-specific methyltransferase	NJ56_RS02490
Antirestriction ArdB family protein	NJ56_RS01655
Antirestriction protein	NJ56_RS01675
Restriction endonuclease	NJ56_RS02485

Type II restriction endonuclease	NJ56_RS02500
<b>Toxin-antitoxin systems</b>	
Addiction module antitoxin	NJ56_RS16010
RelE toxin protein	NJ56_RS17395
<b>DNA interaction</b>	
DNA-binding protein	NJ56_RS17390
NAD-dependent DNA ligase	NJ56_RS13970
DNA mismatch repair protein Vsr	NJ56_RS02495
DNA primase	NJ56_RS11625
DNA-binding protein	NJ56_RS01540
DNA-binding protein	NJ56_RS13980
Replicative DNA helicase	NJ56_RS01450
Mutagenesis and repair protein MucA	NJ56_RS17435
HNH endonuclease	NJ56_RS17615
DNA topoisomerase III	NJ56_RS01485
DNA polymerase V subunit UmuD	NJ56_RS01710
DNA polymerase V subunit UmuC	NJ56_RS17440
Chromosome (Plasmid) partitioning protein ParA	NJ56_RS17460
Methylase	NJ56_RS17225
Replication protein	NJ56_RS17150
DNA-binding protein	NJ56_RS01640
<b>Transcriptional regulators</b>	
Repressor protein C2	NJ56_RS17790
CI repressor	NJ56_RS16805
Putative transcriptional regulator	NJ56_RS17165
Transcriptional regulator	NJ56_RS14800
<b>Cellular energy homeostasis</b>	
ATPase AAA	NJ56_RS16020

#### 4.2.2.5. Identificación de genes ausentes en el genoma de la cepa *Y. ruckeri* ATCC 29473 y presentes en las otras cuatro cepas estudiadas

La cepa tipo *Y. ruckeri* ATCC 29473 ha sido definida como no virulenta (Furones y col., 1990). Por esta característica se trató de identificar aquellos genes ausentes en esta cepa, pero presentes en los genomas de las otras cuatro analizadas y de este modo intentar establecer o relacionar la atenuación en la virulencia con una base genética. En la comparativa, se encontraron 21 genes presentes en todas las cepas a excepción de en la cepa *Y. ruckeri* ATCC 29473, todos ellos codificaban proteínas con función ya conocida (tabla 4.6).

**Tabla 4.6.** Productos proteicos deducidos de los genes que solo están ausentes en la cepa *Y. ruckeri* ATCC 29473.

Protein	150	Big Creek 74	CSF007-82	SC09
Aromatic amino acid decarboxylase	BI323_03940	UGYR_RS01810	CSF007_RS12055	NJ56_RS08540
Serine hydrolase family protein	BI323_03955	UGYR_RS01805	CSF007_RS12040	NJ56_RS08535
Virulence factor	BI323_039601	UGYR_RS01800	CSF007_RS12035	NJ56_RS08530
Crp-like helix-turn-helix domain protein	BI323_16505	UGYR_RS04050	CSF007_RS14555	NJ56_RS14785
Fe(3+) ions import ATP-binding protein FbpC	BI323_16510	UGYR_RS04045	CSF007_RS14560	NJ56_RS14780
Putative binding protein-dependent transport system%2C inner-membrane component	BI323_16515	UGYR_RS04040	CSF007_RS14565	NJ56_RS14775
Bacterial extracellular solute-binding family protein	BI323_16520	UGYR_RS040351	CSF007_RS14570	NJ56_RS14770
Major Facilitator Superfamily protein	BI323_16525	UGYR_RS04030	CSF007_RS14575	NJ56_RS14765
Sensor histidine protein kinase UhpB, glucose-6-phosphate specific	BI323_16530	UGYR_RS04025	CSF007_RS14580	NJ56_RS14760
Bacterial regulatory s, luxR family protein	BI323_16535	UGYR_RS04020	CSF007_RS14585	NJ56_RS14755
Transcriptional regulatory protein	BI323_16540	UGYR_RS04015	CSF007_RS14590	NJ56_RS14750
Sensor histidine kinase DpiB	BI323_16545	UGYR_RS04010	CSF007_RS14595	NJ56_RS14745
[citrate (Pro-3S)-lyase] ligase	BI323_16550	UGYR_RS04005	CSF007_RS14600	NJ56_RS14740
Citrate lyase acyl carrier protein	BI323_16555	UGYR_RS04000	CSF007_RS14605	NJ56_RS14735
Citrate lyase subunit beta	BI323_16560	UGYR_RS03995	CSF007_RS14610	NJ56_RS14730
Citrate lyase alpha chain	BI323_16565	UGYR_RS03990	CSF007_RS14615	NJ56_RS14725
Holo-ACP synthase CitX	BI323_16570	UGYR_RS03985	CSF007_RS14620	NJ56_RS14720
Probable 2-(5'-triphosphoribosyl)-3'-dephosphocoenzyme-A synthase	BI323_16575	UGYR_RS03980	CSF007_RS14625	NJ56_RS14715
Citrate carrier	BI323_16580	UGYR_RS03975	CSF007_RS14630	NJ56_RS14710
4'-phosphopantetheinyl transferase siderophore	BI323_16585	UGYR_RS03970	CSF007_RS14635	NJ56_RS14705
Holin	BI323_09445	UGYR_RS04445	CSF007_RS17025	NJ56_RS17590

### 4.3. Generación de una genoteca de mutantes por transposición e identificación de genes que se expresan más a 18 °C que a 28 °C

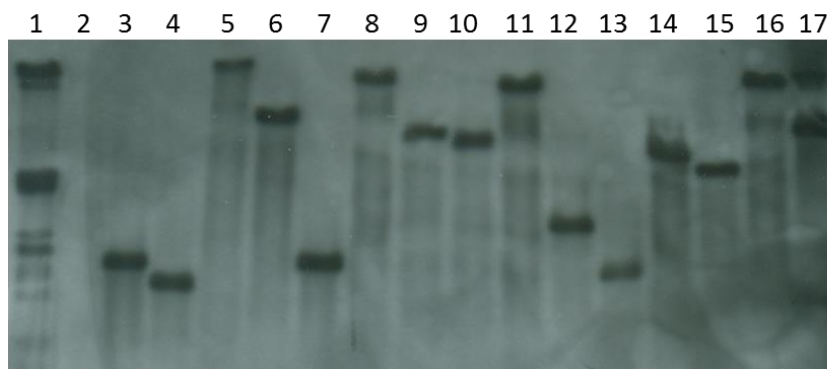
#### 4.3.1. Construcción y análisis de una genoteca de mutantes por transposición utilizando cefotaxima como antibiótico de selección

Para la selección de genes de *Y. ruckeri* con mayor expresión a 18 °C que a 28 °C, el primer paso fue el diseño y construcción del vector pUT*luxlax*, portador del transposón Tn5*luxlac* en el que se incluyeron los operones *luxABCDE* y *lacZY* en tándem, sin

promotor ni terminador. Dicho vector, se utilizó para generar una genoteca de mutantes por transposición en *Y. ruckeri* 150. La selección de los transconjugantes se llevó a cabo utilizando el medio EMB con kanamicina (marcador de resistencia portado por el transposón) y cefotaxima (marcador de resistencia intrínseca de *Y. ruckeri* 150). De esta manera, se obtuvieron un total de 4.982 transconjugantes.

#### 4.3.1.1. Validación del procedimiento: integración, estabilidad y efecto del transposón en el crecimiento de la bacteria

La integración del transposón Tn5*luxlac* en el genoma de *Y. ruckeri* se confirmó mediante análisis Southern blot. El patrón de hibridación que se obtuvo utilizando como sonda el gen de la kanamicina evidenció que el transposón se había integrado solo una vez y en una zona diferente del genoma en cada uno de los 14 transconjugantes analizados elegidos al azar (**figura 4.10**). Cuando la misma membrana fue incubada con una sonda sintetizada a partir del gen *bla* del plásmido pUT*luxlac*, no se observaron bandas de hibridación en ninguna calle, a excepción de la correspondiente al control representado por el plásmido pUT*luxlac* (**figura 4.10**).

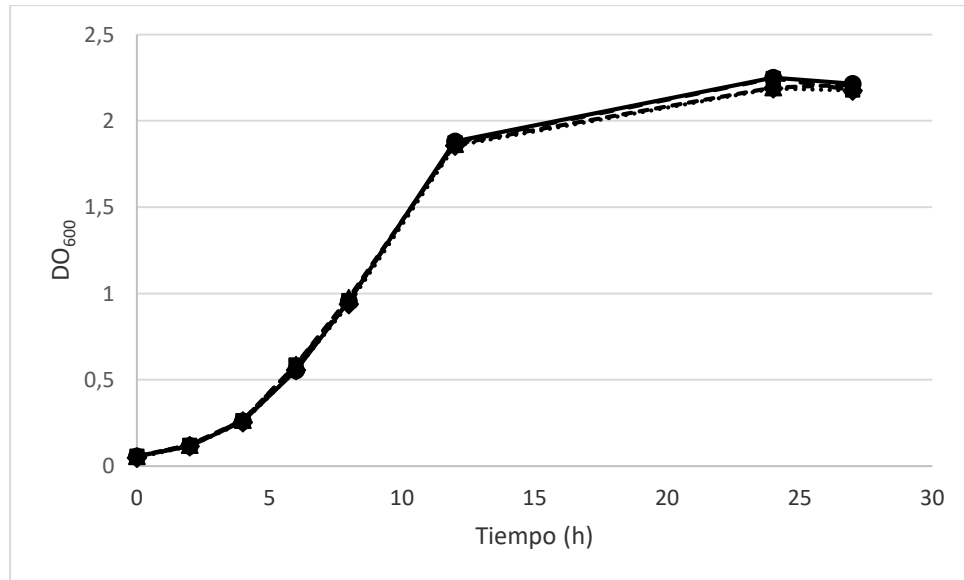


**Figura 4.10.** Perfil de hibridación de ADN genómico de transconjugantes de *Y. ruckeri*. El genoma de los diferentes clones tomados al azar, fue digerido con la enzima de restricción *SphI*, y tras su separación y transferencia a membrana, hibridado con la sonda "Km" correspondiente al gen de la kanamicina. Calle 1: marcador de peso molecular, ADN del fago  $\lambda$  digerido con la enzima *PstI*; calle 2: ADN de la cepa parental *Y. ruckeri* 150; calles 3-16: ADN genómico de los transconjugantes; calle 17: plásmido pUT*luxlac*.

Para valorar la estabilidad del transposón una vez insertado en el genoma, se tomó un transconjugante al azar, el cual se subcultivó en medio sin agentes selectivos durante aproximadamente 100 generaciones y posteriormente, se sembraron 100  $\mu$ l una dilución correspondiente con  $10^3$  ufc/ml en el medio con y sin kanamicina. Tras la incubación, el recuento de colonias fue de  $217 \pm 11$  ufc y  $243 \pm 12$  ufc en medio con y sin el antibiótico, respectivamente, lo que indica que aproximadamente, un 90 % de las colonias conservaban el transposón.

Para determinar si la presencia del transposón en el genoma de los transconjugantes, y en particular la expresión del operón *lux* demandante de energía, ejercía algún tipo de influencia en el crecimiento de la bacteria, se comparó el crecimiento de 3

transconjugantes elegidos al azar en relación al de la cepa parental, en medio TSB a 18 °C. Tal y como se observa en la **figura 3.11** no se detectaron cambios significativos en las curvas de crecimiento de los mutantes ensayados respecto a la de la cepa parental.



**Figura 4.11.** Curvas de crecimiento de las cepas *Y. ruckeri* 150 (●) y los transconjugantes 2γ2T.A2 (■); 2α2T.C10 (▲) y 2α2T.E7 (◆), en el medio TSB. La incubación se realizó a 18 °C. La desviación estándar fue inferior a 0,1 en cada punto de la curva.

#### 4.3.1.2. Selección e identificación de genes que se expresan más a 18 °C que a 28 °C

Se analizaron 3.552 de los transconjugantes obtenidos en el medio EMB, de los cuales 70 (1,9 %) mostraron mayor actividad β-galactosidasa a 18 °C que a 28 °C. De estos 70 clones seleccionados, se logró identificar el lugar de inserción del transposón en 41. Así se pudo determinar que 23 eran genes diferentes entre sí, 3 resultaron ser secuencias intergénicas y en una ocasión fue identificado el gen de la transposasa de *Tn5* presente en el plásmido pUTluxlac (**tabla 4.7**).



**Tabla 4.7:** Productos proteicos deducidos de los genes interrumpidos por el transposón Tn5luxlac en los clones seleccionados con cefotaxima.

Clones	Homología con bases de datos	Nº acceso
$\alpha$ D7, $\beta$ 4T.D7	Glicosiltransferasa	OEU24749.1
$\beta$ 1T.G7, $\beta$ 2T.A4	Proteína de membrana/ Polimerasa del antígeno O	ABY48117.1
$\beta$ 2T.A4, $\beta$ 3T.D7, $\beta$ 1T.B2	Proteína Dam X, implicada en la división celular	EEP98349.1
$\beta$ 3T.H3, $\beta$ 1T.D2, $\beta$ 3T.B5, $\beta$ 3T.E2, $\beta$ 3T.E4, $\beta$ 3T.G6, $\beta$ 5T.G6	Glucógeno fosforilasa	OEU26568.1
$\beta$ 3T.C9	Proteína hipotética BI323_06340	OEU24382.1
$\beta$ 7T.A1	Proteína de transposición C de Tn7	OEU24391.1
$\alpha$ G3	Toxina StbD, sistema de estabilidad toxina/antitoxina	OEU25145.1
$\beta$ 4T.A5	Regulador de respuesta YsrS	OEU25024.1
$\alpha$ D4, $\beta$ 5T.H1	Proteína hipotética BI323_06370	OEU24387.1
$\alpha$ D11	Proteína MglA , importa Galactosa/metilgalactosido mediante unión a ATP	OEU26755.1
$\beta$ 7T.C10	Posible peptidoglicano deacetilasa	KFE37461.1
$\beta$ 7T.A4	Diguanilato ciclasa YfiN	OEU26487.1
$\beta$ 7T.A2, $\beta$ 4T.G11, $\beta$ 4T.E11, $\beta$ 4T.G7	Metiltransferasa dependiente de SAM	OEU24750.1
$\alpha$ A8, $\beta$ 3T.B3, $\beta$ 3T.B6, $\beta$ 5T.E9	D-glicerol-D-mano-heptosa-1-fosfato guanosiltransferasa	OEU25698.1
$\beta$ 4T.A3	Serina /treonina quinasa	OEU26573.1
$\beta$ 4T.A1	Fosfoporina PhoE	OEU26976.1
$\beta$ 2T.A1	O-acyltransferasa	OEU26581.1
$\beta$ 6T.B9	Glicosiltransferasa	
$\beta$ 5T.H5	4-Alfa-gluconotransferasa	OEU26314.1
$\beta$ 5T.H3	Fosfatasa inducible en escasez de nutrientes	EEQ00620.1
$\beta$ 4T.G6, $\beta$ 4T.E4	Transposasa Tn5	-
$\beta$ 4T.F8	Secuencia intergénica	-
$\alpha$ G6	Secuencia intergénica	-
$\beta$ 4T.B5	Secuencia intergénica	-

#### 4.3.1.3. Virulencia de los clones identificados

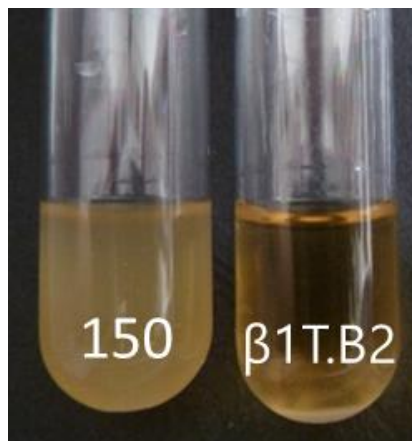
Para valorar la virulencia, se tomaron los diez primeros clones que aparecen identificados en la **tabla 4.7**. Tras inocular  $10^2$  ufc por individuo a grupos de 10 alevines de trucha arcoíris y después de 7 días de ensayo, no se registró ninguna muerte, a diferencia de lo que ocurrió con la cepa parental que mató al 50 % de los individuos. Este resultado tan llamativo por su uniformidad en cuanto a la atenuación total en todos los mutantes, indujo a llevar a cabo un segundo experimento, pero esta vez inoculando  $10^7$  ufc por individuo. En este caso, tampoco se registró ninguna muerte de animales con ninguno de los mutantes, mientras que la cepa parental provocó el 100 % de mortalidad. Con este resultado, parecía poco probable que en todos los mutantes el transposón hubiera interrumpido un gen esencial para el desarrollo del proceso infeccioso. En este sentido, una posible explicación a este hecho podría ser que la atenuación de los clones se debiera a su exposición al antibiótico cefotaxima,

utilizado durante el proceso de selección de la genoteca, nexos comunes a todos ellos. Es por ello que se caracterizaron estos clones para determinar el origen de tal comportamiento en relación a la virulencia.

#### 4.3.1.4 Caracterización fenotípica de las cepas cultivadas en presencia de cefotaxima

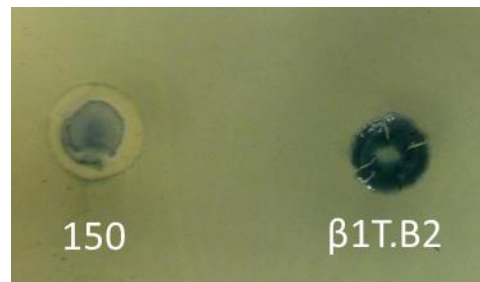
El análisis de los clones que habían sido seleccionados con cefotaxima indicó que presentaban una serie de fenotipos comunes a todos ellos, independientemente del gen que tuvieran mutado. Como ejemplo representativo se muestran los resultados del análisis fenotípico del mutante  $\beta$ 1T.B2.

•**Agregación celular en medio líquido:** cuando los cultivos de la cepa mutante  $\beta$ 1T.B2 en fase estacionaria de crecimiento, incubados a 18 °C y agitación, eran mantenidos durante 4 h en estático, mostraban la formación de un agregado de células que precipitaba, a diferencia de lo que ocurría con la cepa parental en la que el medio continuaba turbio, sin acúmulos celulares (**figura 3.7**).



**Figura 4.7.** Cultivos de *Y. ruckeri* (cepa parental 150 y mutante  $\beta$ 1T.B2) procedentes de una fase estacionaria de crecimiento y mantenidos en estático durante 4 h.

•**Tinción de colonias con negro sudán:** los resultados de agregación celular descritos, sugerían que este fenotipo podría ser consecuencia de algún tipo de alteración, en los mutantes analizados, de su superficie celular. Una forma de contrastar esta modificación fue mediante la tinción de las bacterias con el colorante negro sudán, que presenta afinidad por las moléculas de naturaleza lipídica, por lo que es capaz de teñir componentes de la membrana externa como lipopolisacáridos o lipoproteínas. Tras la aplicación del colorante sobre las colonias, el mutante *Y. ruckeri*  $\beta$ 1T.B2 mostró una mayor capacidad de tinción que la cepa parental (**Figura 4.8**).

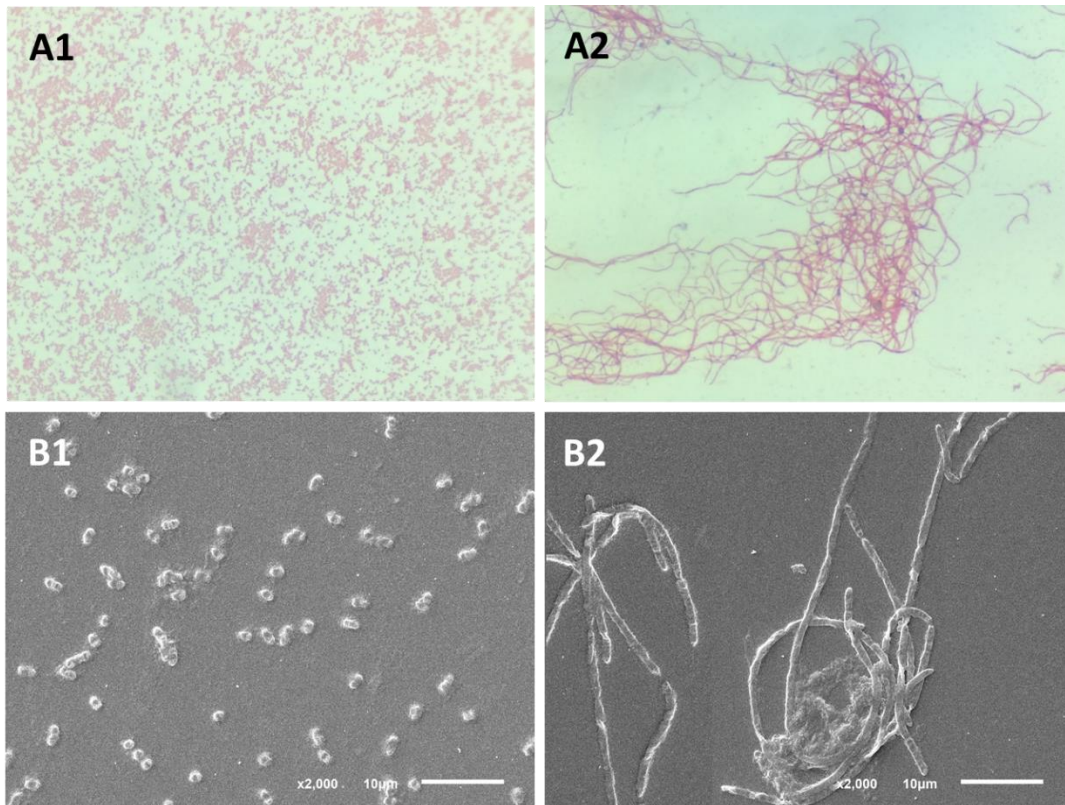


**Figura 4.8.** Colonias de *Y. ruckeri* (cepa parental 150 y mutante B1T.B2) teñidas con el colorante negro sudán.

#### 4.3.1.5. Efecto del antibiótico cefotaxima en la fisiología y virulencia de *Y. ruckeri* 150

Con el fin de comprobar si los fenotipos encontrados en los mutantes seleccionados en la genoteca mediante cefotaxima, se realizó un experimento en el que se cultivó la cepa parental con el antibiótico, reproduciendo el proceso realizado durante la construcción de la genoteca, es decir, se llevó a cabo una incubación en medio sólido seguida de otra en medio líquido, ambas en presencia de cefotaxima. Posteriormente, se tomó una de las colonias obtenidas tras el proceso (*Y. ruckeri* 150CTX), a partir de la cual se repitieron los ensayos de agregación celular y tinción de colonia con negro sudán, obteniéndose unos fenotipos semejantes a los ya observados en los clones de la genoteca (resultados no presentados). Del mismo modo, cuando se realizaron ensayos de virulencia, los peces que habían sido inoculados con la cepa *Y. ruckeri* 150CTX, no presentaron signos de enfermedad en el transcurso de siete días, incluso cuando se les inyectaron  $10^7$  ufc por individuo, a diferencia de lo ocurrido en el caso de la cepa parental que con una cantidad igual de bacterias, causó la muerte de todos los animales. Acorde con este resultado, no fue posible la recuperación de la cepa *Y. ruckeri* 150CTX a partir de órganos de los peces a las 48-72 h postinfección. Por tanto, las colonias resistentes a cefotaxima resultantes del tratamiento de la cepa parental, *Y. ruckeri* 150, con este antibiótico presentaron una atenuación completa de la virulencia.

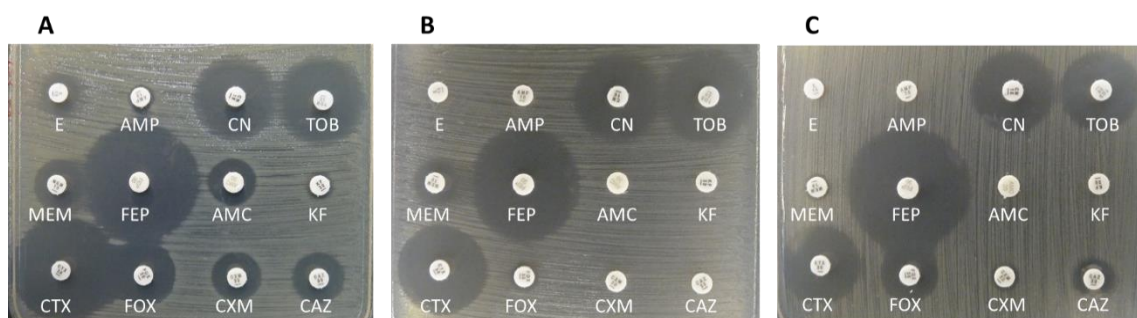
A diferencia de los fenotipos mencionados anteriormente que eran estables en ausencia de cefotaxima, sí se observó durante el proceso de obtención de la cepa *Y. ruckeri* 150CTX, que en presencia de este antibiótico, la cepa parental presentaba un aspecto filamentososo en el que no se apreciaban con claridad los límites entre células individuales, fenotipo que desaparecía cuando el antibiótico era eliminado del medio de cultivo (**figura 4.9**).



**Figura 4.9.** Fotografías de *Y. ruckeri* 150CTX. **A)** microscopio óptico; y **B)** microscopio electrónico de transmisión. A1 y B1 cepa crecida en ausencia de antibiótico. A2 y B2 cepa crecida en presencia de 0.2 µg/ml de cefotaxima.

### 3.3.1.5.1. Perfil de resistencia a antibióticos

Con el fin de determinar si el tratamiento con cefotaxima generaba una modificación de la sensibilidad de la bacteria a otros antimicrobianos se realizó un ensayo de sensibilidad a antimicrobianos. Así, se pudo observar que *Y. ruckeri* 150 mostró halos de inhibición del crecimiento de distinto tamaño para cada uno de los antibióticos ensayados, mientras que en la cepa 150CTX, no se observaron halos alrededor de los discos con: eritromicina, ampicilina, amoxicilina/clavulánico, cefalotina, cefuroxima y ceftazidima (**figura 4.9**) Este perfil de resistencia difirió un poco en el mutante  $\beta$ 1T.B2, que a diferencia de la cepa 150CTX, mostró un halo de inhibición muy disminuido con meropenem y de mayor tamaño con cefoxitina, además, también se observó la aparición de un pequeño halo alrededor de los discos con cefuroxima y ceftazidima.



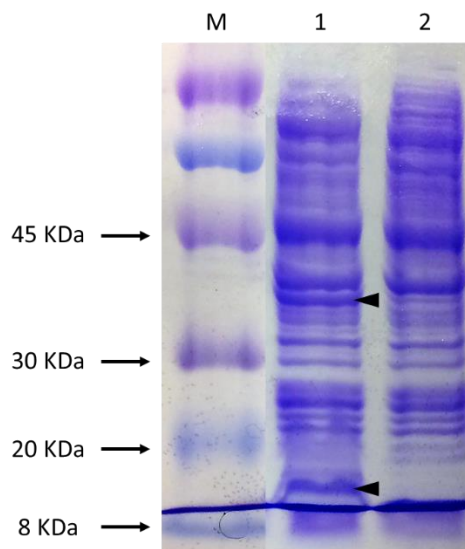
**Figura 4.10.** Perfil de resistencia a antibióticos de **A)** *Y. ruckeri* 150; **B)** *Y. ruckeri* 150CTX; **C)** *Y. ruckeri*  $\beta$ 1T.B2. E: eritromicina (15  $\mu$ g); AMP: ampicilina (10  $\mu$ g); CN: gentamicina (10  $\mu$ g); TOB: tobramicina (30  $\mu$ g); MEM: meropenem (30  $\mu$ g); FEP: cefepima (30  $\mu$ g); AMC: amoxicilina/clavulámico (30  $\mu$ g); KF: cefalotina (30  $\mu$ g); CTX: cefotaxima (30  $\mu$ g); FOX: cefoxitina (30  $\mu$ g); CXM: cefuroxima (30  $\mu$ g); CAZ: ceftazidima (30  $\mu$ g).

#### 4.3.1.5.2. Secuenciación y análisis de los 4 genes que codifican las principales porinas de *Y. ruckeri*

Los fenotipos mostrados por los clones que habían sido incubados en presencia de cefotaxima, sugerían que estas cepas de *Y. ruckeri* podrían haber sufrido la alteración de alguna proteína de la envuelta celular en este proceso. Las porinas, suponen la vía de penetración de numerosos antibióticos al interior celular, y la alteración de las mismas puede resultar en modificaciones de la sensibilidad de la bacteria a distintos antibióticos simultáneamente (Nikaido, 1994; Lou y col., 2011). En *Y. ruckeri*, se identificaron los genes que codifican 2 variantes de la porina OmpC, además de las porinas OmpF y PhoE. Con el fin de tratar de esclarecer si había una base genética relacionada con la alteración de alguno de estos genes que explicase los fenotipos de resistencia a antibióticos observados en las bacterias que fueron cultivadas previamente en presencia de cefotaxima, se procedió a la comparación de las secuencias de cada uno de los 4 genes de la cepa parental con su respectivo en la cepa 150CTX. El resultado del alineamiento indicó que estos 4 genes que codifican porinas triméricas de *Y. ruckeri* 150 y 150CTX comparten el 100 % de la secuencia (datos no presentados), lo que indica que los fenotipos observados en los clones incubados en presencia de cefotaxima, no son debidos a mutaciones en la secuencia de los genes que codifican las principales porinas en *Y. ruckeri*.

#### 4.3.1.5.3. Análisis del perfil proteico de *Y. ruckeri*

Para comprobar si las diferencias observadas en los fenotipos de las cepas que habían sido incubadas en medio con cefotaxima, se veían reflejadas en diferencias a nivel proteico, se procedió a la separación, mediante electroforesis en SDS-PAGE, de las proteínas totales de las cepas *Y. ruckeri* 150 y 150CTX. Una vez teñidas las proteínas con el colorante azul Coomassie se apreció que, al menos había 2 bandas claramente presentes en la cepa parental desaparecían o disminuían considerablemente su intensidad en el perfil proteico correspondiente a la cepa *Y. ruckeri* 150CTX (figura 4.11.). Las masas moleculares de estas proteínas diferenciales entre ambas cepas se calcularon 12 kDa y 38 kDa, aproximadamente.



**Figura 4.11.** SDS-PAGE de las proteínas de *Y. ruckeri* 150 (calle1) y 150CTX (calle 2). La calle M corresponde con las proteínas de masa molecular conocida utilizadas como marcador. Las bandas diferenciales entre el perfil proteico de la calle 1 y 2 se indican con una punta de flecha.

### 4.3.2. Construcción y análisis de una genoteca de mutantes por transposición utilizando eritromicina como antibiótico de selección

Los mutantes obtenidos a partir de la genoteca construida con el plásmido pUT*luxlac* que habían sido seleccionados con el antibiótico cefotaxima, no eran útiles para valorar la implicación de cada uno de los genes interrumpidos en la virulencia de la bacteria, puesto que el antibiótico seleccionó aquellos que presentaban además de alteraciones fenotípicas diversas, una total atenuación en la virulencia. Por ello, fue necesario reconducir el trabajo mediante la construcción de una nueva genoteca de mutantes por transposición utilizando el transposón Tn5*luxlac*, pero en esta ocasión se empleó el antibiótico eritromicina como agente de selección de *Y. ruckeri* frente a *E. coli*. El número de clones resultante en esta genoteca fue de 9.742.

#### 4.3.2.1. Validación del procedimiento: Integración, estabilidad y efecto del transposón en el crecimiento de la bacteria

Al igual que en el análisis de la genoteca anterior en la que se utilizó cefotaxima, en esta, se comprobó en un grupo de diez clones que el transposón se integraba al azar en el cromosoma bacteriano y que era estable durante al menos 100 generaciones (datos no presentados). Además, ninguno de ellos tenía un fenotipo característico de agregación, lo que indicaba que la utilización de la eritromicina no seleccionaba al menos de manera masiva, un fenotipo sin relación con la inserción del transposón en el genoma de la bacteria.



#### 4.3.2.2. Selección e identificación de mutantes con mayor actividad $\beta$ -galactosidasa a 18 °C que a 28 °C

De un total de 9.742 clones obtenidos con eritromicina, se analizaron 6.882, de los cuales 98 presentaron mayor actividad  $\beta$ -galactosidasa en el medio EMB a 18 °C que a 28 °C, lo que equivale a un 1,4 %.

En 25 de los 98 clones seleccionados, se identificó el gen que había sido interrumpido por el transposón, de los cuales, en 17 se pudo determinar que se correspondían con genes distintos, y uno presentó la inserción en una secuencia intergénica (**tabla 4.8**).

**Tabla 4.8.** Identificación de los productos de los genes mutados en clones seleccionados de la genoteca construida en *Y. ruckeri* 150 con eritromicina.

Clones	Homología con bases de datos	Nº acceso
Clon7	Regulador transcripcional AcrR	OEU24368.1
2 $\alpha$ 1T.F5	Transportador de magnesio	OEU26742.1
2 $\alpha$ 1T.G1	Proteína hipotética BI323_16715	OEU24935.1
2 $\alpha$ 1T.H7	Proteína OsmY, inducible osmóticamente	OEU26500.1
2 $\alpha$ 1T.C8	Transportador MSF	OEU26751.1
2 $\alpha$ 1T.H6	Proteína hipotética DJ39_821	KGA49879.1
2 $\alpha$ 1T.A2	Proteína ArnC, resistencia a polimixina	OEU24187.1
2A1.2F3	Proteína hipotética BI323_02470/Proteína C implicada en la síntesis de glucano	OEU25186.1
2 $\beta$ 1T.B11, 2 $\alpha$ 2T.D5	Proteína hipotética BI323_02470	OEU25186.1
2 $\beta$ 1T.D9	Metaloproteasa Yrp1	CAC39217.1
2 $\alpha$ 2T.E7	Exoenzima de la familia ADP ribosiltransferasa	KGA50131.1
2 $\beta$ 2T.B3	Esterasa YqiA	AJI94468.1
2 $\beta$ 1T.D11	UDP-N-acetylglucosamine 4,6-dehidratase	OEU25693.1
2 $\beta$ 1T.D3	Secuencia intergénica	-
2 $\beta$ 2T.C4, 2 $\beta$ 2T.E1, 2 $\beta$ 2T.F2, 2 $\beta$ 1T.F3	Proteína hipotética DJ39_821	KGA49879.1
2 $\alpha$ 2T.A2, 2 $\alpha$ 2T.A8, 2 $\alpha$ 2T.C10, 2 $\alpha$ 2T.G10, 2 $\beta$ 2T.E12	Proteína hipotética BI323_06300	OEU24718.1
2 $\alpha$ 1T.D4	Proteína hipotética BI323_15445	OEU25150.1

#### 4.3.2.3. Análisis de la virulencia de los clones seleccionados

Se realizó una valoración de la virulencia de los 14 primeros clones diferentes identificados (**tabla 4.8.**), y para ello, se inyectaron  $10^2$  ufc a cada uno de los peces en grupos de 10 alevines de trucha arcoíris, con la excepción del mutante en la metaloproteasa Yrp1 que ya había sido descrito previamente por este grupo como atenuado (**Fernández y col., 2003**). Los mutantes en los genes *acrR*, *arnC* e *yqiA*, así como 2 mutantes en genes que codifican proteínas hipotéticas, se mostraron virulentos en las condiciones ensayadas causando la muerte de un porcentaje variable de los individuos inoculados, mientras que el resto de clones no ocasionaron mortalidad alguna, considerándolos por tanto atenuados (**tabla 4.9**).

**Tabla 4.9.** Análisis de la virulencia de cepas mutantes en genes con mayor expresión a 18 °C que a 28 °C. La mortalidad se expresa como porcentaje sobre el total de peces en cada caso, la ausencia de la misma viene indicada por una línea. ND: No determinado. La dosis ensayada equivale a la DL<sub>50</sub> para la cepa parental.

Clon	Mortalidad
Regulador transcripcional AcrR	80 %
Transportador de magnesio	-
Proteína hipotética BI323_16715	30 %
Proteína OsmY, inducible osmóticamente	-
Transportador MSF	-
Proteína hipotética DJ39_821	-
Proteína ArnC, de resistencia a polimixina	50 %
Proteína hipotética BI323_02470	-
Proteína hipotética BI323_02470	60 %
Metaloproteasa YRP1	_*
UDP-N-acetylglucosamine 4,6-dehidratase	-
Exoenzima de la familia ADP ribosiltransferasa	-
Esterasa YqiA	50 %
Secuencia intergénica	-
Proteína hipotética DJ39_821	ND
Proteína hipotética BI323_06300	ND
Proteína hipotética BI323_15445	ND

\*Atenuación de la virulencia en *Y. ruckeri* constatada en un estudio previo de Fernández y col., 2003

#### 4.3.2.4. Cuantificación de la expresión diferencial de los genes *acrR* y *osmY*

Con el objetivo de comprobar si el sistema de selección de clones basado en la detección de una mayor o menor actividad  $\beta$ -galactosidasa en el medio EMB era válido, se realizó un ensayo cuantitativo utilizando el sustrato ONPG. Para ello, dos de los mutantes identificados, uno en el gen *acrR* y el otro en el *osmY*, se crecieron en el medio TSB. La determinación de la actividad  $\beta$ -galactosidasa durante la fase exponencial de crecimiento, indicó que el nivel de expresión a 18 °C del gen *acrR* resultó ser prácticamente el doble que a 28 °C, mientras que el del gen *osmY*, fue aproximadamente un 30 % más a 18 °C que a 28 °C (**tabla 4.10**).

**Tabla 4.10.** Cuantificación de la actividad  $\beta$ -galactosidasa en las cepas *Y. ruckeri* *acrR*<sup>-</sup> y *Y. ruckeri* *osmY*<sup>-</sup> cultivadas en el medio TSB a 18 °C y 28 °C.

Clon	T <sup>a</sup> (°C)	U. Miller
<i>acrR</i> <sup>-</sup>	28	1439,8 ± 11,9
	18	2860,6 ± 158,3
<i>osmY</i> <sup>-</sup>	28	583,4 ± 15,4
	18	786,6 ± 42,1

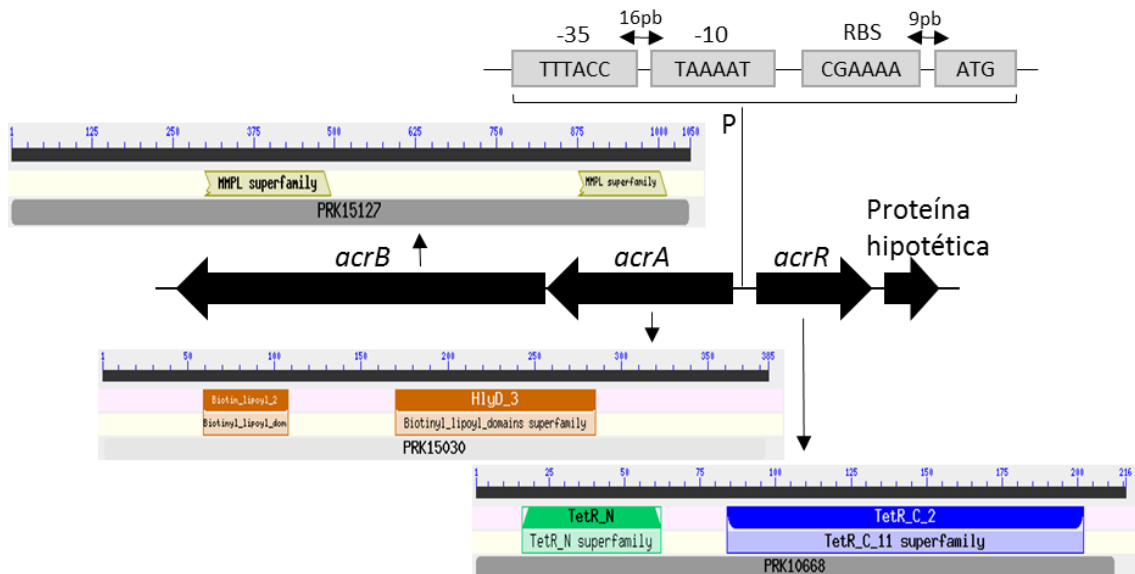


## 4.4. Análisis del represor AcrR de la bomba de expulsión de productos tóxicos AcrAB-TolC

### 4.4.1. Análisis *in silico* del gen *acrR* y de su contexto genético

La secuenciación de la región adyacente al lugar de inserción del transposón Tn5*luxlac* en el ADN del mutante *Y. ruckeri* 150 *acrR*<sup>-</sup>, reveló la presencia de un marco abierto de lectura de 651 pb que codifica una proteína de 216 aminoácidos que el RAST define como represor de la transcripción del operón *acrAB*, el cual codifica una bomba de expulsión de productos tóxicos. AcrR de *Y. ruckeri* 150 presenta un 100 % de identidad con proteínas homólogas de otras cepas de *Y. ruckeri* como CSF007-82 (CEK26733.1) o 37751 (KFE38393.1), así como identidades muy elevadas con la misma proteína de otras especies de *Yersinia* como *Y. nurmii* (CNE66444.1/85 %) o *Y. pestis* (EFA48822.1/80 %). La proteína AcrR posee 3 dominios conservados: el dominio TetR\_C\_2 (pfam08361), perteneciente a la familia TetR de represores de la transcripción implicados en el control de la expresión de proteínas de resistencia a múltiples drogas, TetR\_N (pfam00440), típico de proteínas reguladoras de la familia TetR y por último, el dominio PRK10668, correspondiente al represor de la transcripción AcrR de unión al ADN (**figura 4.12**).

El gen *acrR* en *Y. ruckeri*, se encuentra flanqueado en su extremo 3' y a 18 pb de distancia, por un gen de 354 pb que codifica una proteína hipotética de 117 aminoácidos. Esta proteína contiene un dominio DsrE (COG1553), implicado en la reducción intracelular del sulfuro. Por otro lado, adyacente a su extremo 5' y en sentido opuesto, se encuentran 2 genes de 1.179 y 3.153 pb, separados entre sí por 17 pb. Dichos genes codifican los componentes AcrA y AcrB, respectivamente, de la bomba de expulsión de productos tóxicos AcrAB-TolC. El análisis *in silico* de la secuencia proteica de AcrA predice la existencia de un péptido señal de 24 aminoácidos y una localización de ésta proteína en la membrana interna. AcrA contiene el dominio conservado HlyD\_3 (pfam13437), típico de la familia de proteínas de secreción HlyD, constituida en gran parte por translocadores de hemolisinas y el dominio PRK15030, definido como transportador AcrA del sistema de expulsión de múltiples drogas (**figura 4.12**). Por otro lado, AcrB posee el dominio conservado PRK15127, que la identifica como proteína AcrB del sistema de expulsión de múltiples drogas (**figura 4.12**). En su conjunto, la región *acrAB* está flanqueada en su extremo 5' por una posible secuencia promotora y en el 3' por un terminador de la transcripción independiente de rho (**figura 4.12**). Los resultados de identidad obtenidos y el pequeño espacio intergénico (17pb) existente entre estos dos genes sugiere que estarían formando un operón en *Y. ruckeri*.

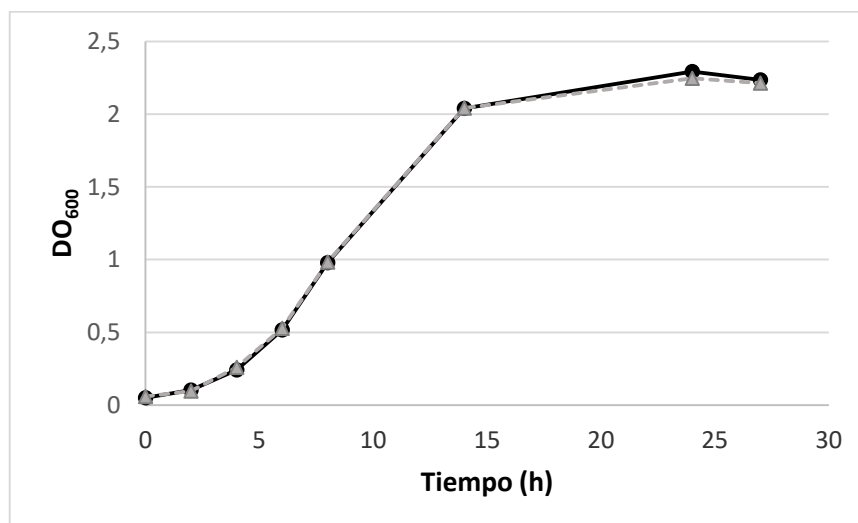


**Figura 4.12:** Contexto genético del gen *acrR*. En su extremo 5' se muestra la secuencia de un posible promotor (P), con las secuencias correspondientes a las regiones -10 y -35, así como el potencial RBS y el codón de inicio (ATG). En la parte inferior se presentan los dominios proteicos conservados que poseen las proteínas AcrR, AcrA y AcrB.

#### 4.4.2. Caracterización del mutante *Y. ruckeri* *acrR*<sup>-</sup> y su complementado *Y. ruckeri* *acrR*<sup>+</sup>

##### 4.4.2.1. Determinación del efecto de la mutación sobre el crecimiento de la bacteria.

En primer lugar, se valoró el efecto de la mutación del gen *acrR* sobre el crecimiento de la bacteria. Como se puede observar en la **figura 4.13**, no hubo diferencias entre la cepa parental y la mutante cuando fueron crecidas en el medio TSB a 18 °C.



**Figura 4.13:** Curvas de crecimiento de *Y. ruckeri* 150 (●) y *Y. ruckeri* 150 *acrR*<sup>-</sup> (Δ) en el medio TSB a 18 °C. Las desviaciones estándar fueron inferiores a 0,1 en todos los casos.

#### 4.4.2.2. Sensibilidad a compuestos antimicrobianos, detergentes y colorantes

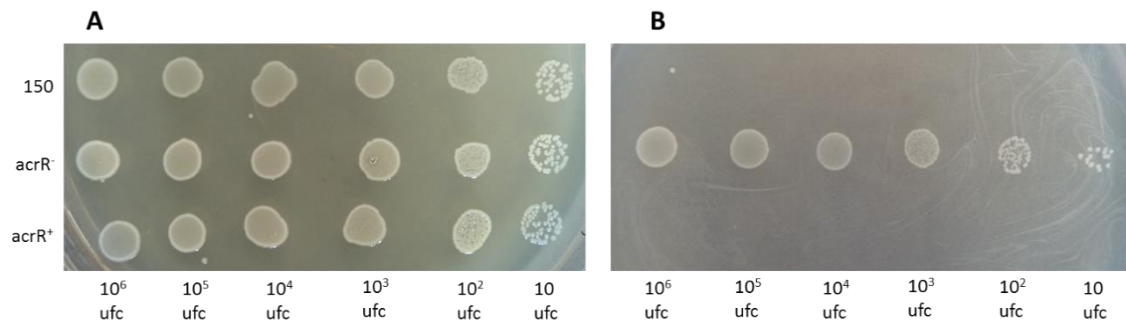
Para estudiar el efecto de la mutación del gen *acrR* se determinó la resistencia de las cepas *Y. ruckeri* 150, *acrR*<sup>-</sup> y *acrR*<sup>+</sup> a distintos antimicrobianos, detergentes y colorantes (**tabla 4.11**). Los resultados obtenidos indicaron que la CMI de los antibióticos ciprofloxacinaa, cloranfenicol y tetraciclina, así como del colorante acrilflavina, fue mayor para la cepa mutante que para la parental, revirtiendo este fenotipo de mayor resistencia en el caso de la cepa complementada. Por otro lado, no se observaron diferencias entre la cepas parental y mutante en cuanto a la resistencia a los detergentes triton X-100 y SDS.

**Tabla 4.11:** Concentración mínima inhibitoria de diferentes compuestos para las cepas *Y. ruckeri* 150, *Y. ruckeri* *acrR*<sup>-</sup> y *Y. ruckeri* *acrR*<sup>+</sup>. Los valores de los compuestos acrilflavina, ciprofloxacinaa, cloranfenicol y tetraciclina se presentan en µg/ml y los correspondientes a los detergentes tritón X-100 y SDS en porcentaje. En aquellos casos en los que no hubo diferencias en la CMI entre la cepa parental y la mutante, no se realizó el ensayo con la cepa complementada.

Compuesto	150	<i>acrR</i> <sup>-</sup>	<i>acrR</i> <sup>+</sup>
Acrilflavina	10,24	20,48	10,24
Ciprofloxacinaa	0,08	0,32	0,04
Cloranfenicol	5,12	10,24	2,56
Tetraciclina	0,32	0,64	0,16
Tritón X-100	12,8	12,8	-
SDS	12,8	12,8	-

#### 4.4.2.3. Sensibilidad a compuestos orgánicos

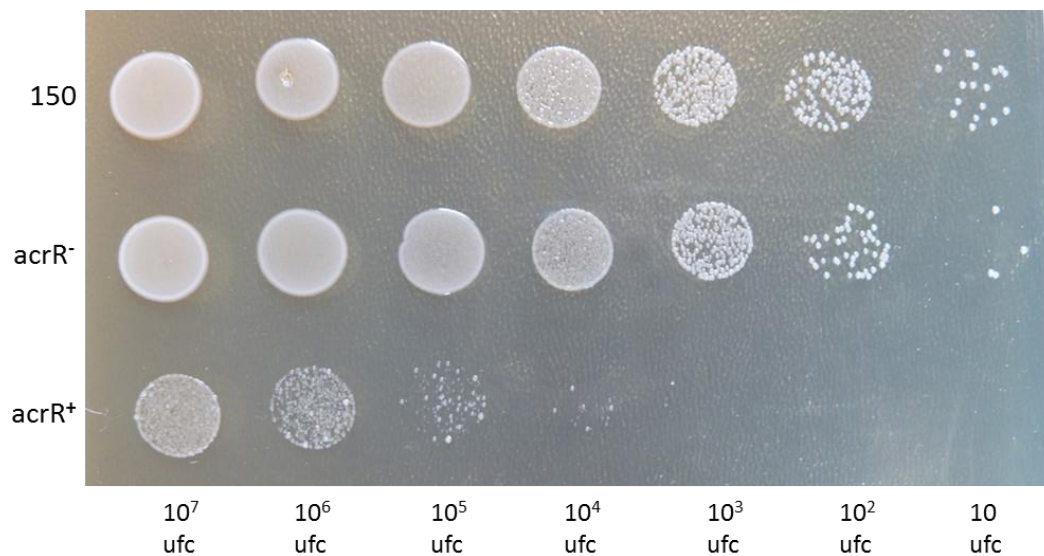
La consecuencia que pudiese tener la ausencia de *AcrR* en *Y. ruckeri* sobre el efecto tóxico de determinados compuestos de carácter orgánico, se determinó analizando el crecimiento de las diferentes cepas de *Y. ruckeri* en presencia de hexano, ciclohexano o xileno. Todas las cepas ensayadas resultaron sensibles tanto al ciclohexano como al xileno, no habiendo crecimiento alguno en presencia de estos compuestos. Sin embargo, la cepa mutante *Y. ruckeri* *acrR*<sup>-</sup> resultó ser altamente resistente al hexano, a diferencia de la cepa parental que fue sensible (**figura 4.14**). Este fenotipo diferencial de la cepa *Y. ruckeri* *acrR*<sup>-</sup> en relación al hexano, revirtió por completo en la cepa complementada, que mostró un comportamiento idéntico al de la cepa la parental (**figura 4.14**).



**Figura 4.14:** Crecimiento de *Y. ruckeri* 150, *Y. ruckeri* *acrR*<sup>-</sup> y *Y. ruckeri* *acrR*<sup>+</sup> en el medio AN. **A)** ausencia; **B)** presencia de n-hexano. Diez  $\mu$ l procedentes de diluciones seriadas con base 10 de un cultivo en fase exponencial de crecimiento fueron depositados sobre el medio de cultivo. A continuación, la superficie del medio en una de las placas, se cubrió con hexano y las placas se incubaron a 18 °C durante 72 h.

#### 4.4.2.4. Sensibilidad a sales biliares

La resistencia a sales biliares puede jugar un papel fundamental para la supervivencia de las bacterias en el intestino del pez. Por este motivo, pareció interesante determinar el efecto que estas podrían tener sobre el crecimiento de las cepas parental, mutante *acrR*<sup>-</sup> y complementada *acrR*<sup>+</sup>. Los resultados mostraron que no existían diferencias en cuanto a su efecto entre la cepa parental y la mutante *acrR*<sup>-</sup>. Sin embargo, la cepa complementada *acrR*<sup>+</sup>, resultó ser mucho más sensible a las sales biliares (**figura 4.15**).



**Figura 4.15.** Crecimiento de *Y. ruckeri* 150, *Y. ruckeri* *acrR*<sup>-</sup> y *Y. ruckeri* *acrR*<sup>+</sup> en el medio AN con sales biliares al 5 %. Diez  $\mu$ l procedentes de diluciones seriadas con base 10 de un cultivo en fase exponencial de crecimiento fueron depositados sobre el medio de cultivo. A continuación, las placas se incubaron a 18 °C durante 72 h.

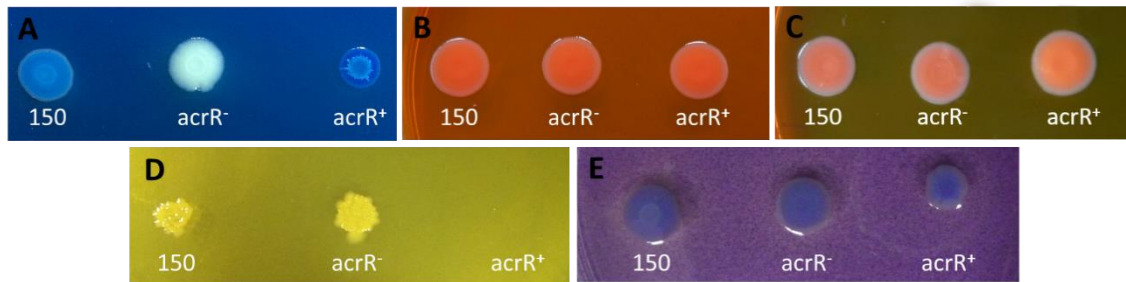
#### 4.4.2.5. Morfología de la colonia en el medio EMB

Durante el proceso de selección de clones de la genoteca en el medio EMB, se observó que algunas de las colonias presentaban un tamaño mayor y un borde más irregular que las demás, fenotipo que se hacía mucho más evidente cuando estos clones eran incubados a 28 °C en lugar de a 18 °C. Entre ellos está el mutante *acrR*<sup>-</sup>, el cual presentó un tamaño de colonia mayor que el de la cepa parental, característica que revirtió al complementar la mutación (**figura 4.16**).



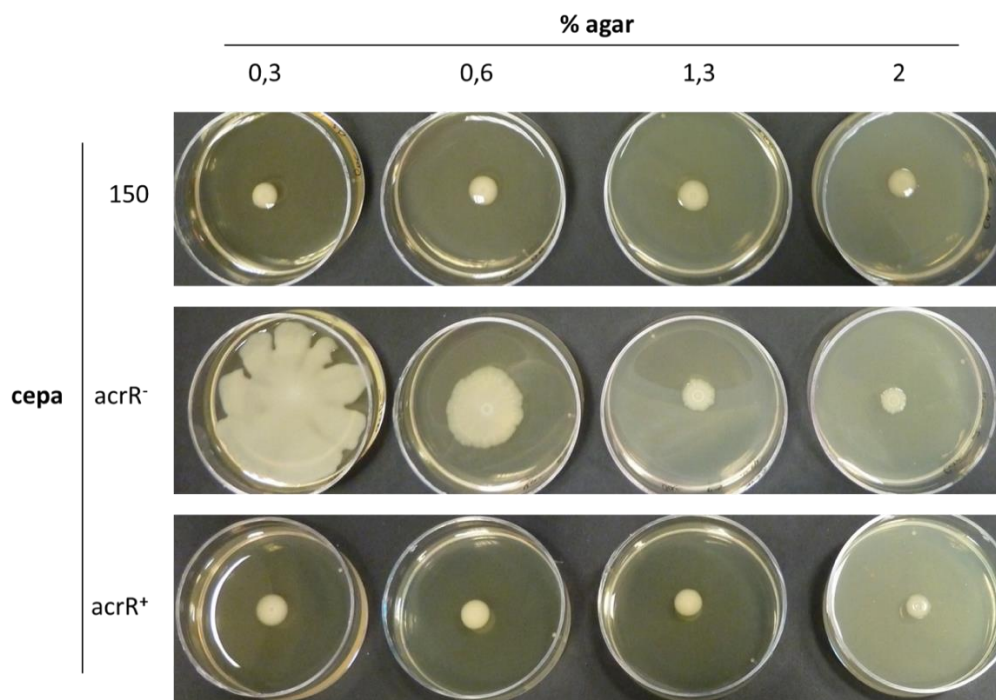
**Figura 4.16.** Colonias de *Y. ruckeri* 150, *Y. ruckeri* *acrR*<sup>-</sup> y *Y. ruckeri* *acrR*<sup>+</sup> crecidas en el medio EMB durante 3 días a 28 °C.

Este fenotipo de “mayor tamaño de la colonia”, resultó ser dependiente del tipo de medio de cultivo utilizado, ya que tenía lugar en EMB pero no en otros medios de cultivo como AN o TSA, donde el tamaño de las colonias de la cepa *acrR*<sup>-</sup> era similar al del resto (resultados no presentados). Ello sugería que esta diferencia de tamaño se debía al efecto específico de algún componente particular del medio EMB. Por ello, y en primer lugar, se analizó si los colorantes azul de metileno y/o eosina A, por separado o de forma conjunta, podrían ser los responsables de este fenotipo diferencial. En ningún caso el tamaño de la colonia se vio alterado (**figura 4.17 A-C**). No obstante, cuando las bacterias fueron incubadas en presencia de azul de metileno, se observó, que la cepa mutante presentaba una coloración blanquecina, diferente a la de la cepa parental y complementada, que adquirieron una coloración azul intenso, la cual fue más acusada a la temperatura de incubación de 28 °C (**figura 4.17 A**). La utilización de otros colorantes básicos como la acrilflavina y el cristal violeta, resultó en colonias con una coloración semejante en todos los casos (**figura 4.17 D-E**). También se pudo observar que la concentración de acrilflavina empleada en el ensayo (0,0035 µg/ml) inhibió parcialmente el crecimiento de las cepas *Y. ruckeri* 150 y *acrR*<sup>-</sup>, y totalmente el de la cepa *acrR*<sup>+</sup> (**figura 4.17 D**).



**Figura 4.17.** Colonias de las diferentes cepas de *Y. ruckeri* crecidas en el medio TSA. La incubación se realizó durante 72 h a 28 °C en presencia de: **A**) azul de metileno (0,07 µg/ml); **B**) eosina A (0,4 µg/ml); **C**) azul de metileno + eosina A (0,07+0,4 µg/ml, respectivamente); **D**) acriflavina (0,035 µg/ml) y **E**) cristal violeta (0,07 µg/ml).

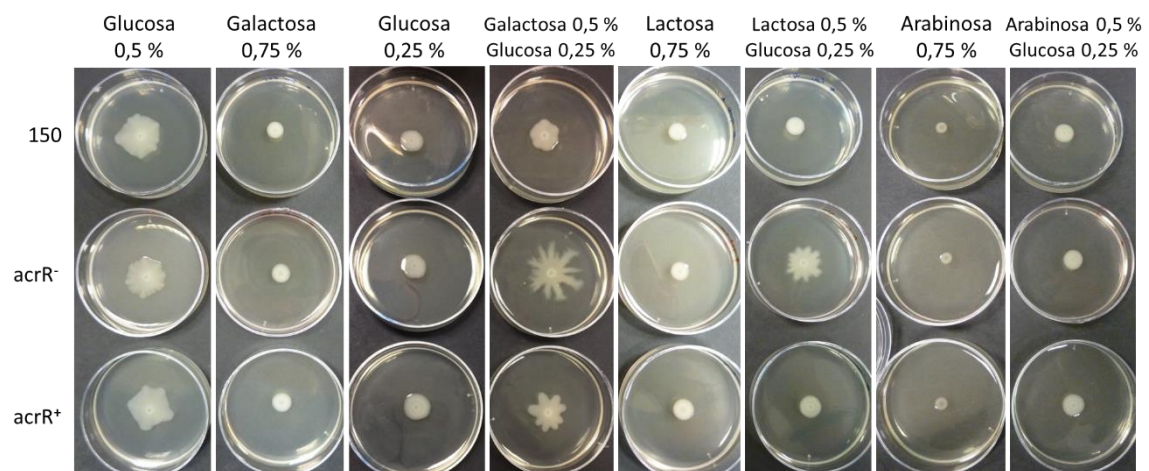
Además de los colorantes indicados otro de los componentes diferenciales que tiene el medio EMB respecto a los medios TSA y AN es la presencia de lactosa. Para determinar si este azúcar tenía alguna influencia tanto en la morfología como en el tamaño de la colonia, se analizó el crecimiento en el medio TSA con distintos porcentajes de agar y lactosa al 0,5 % (proporción a la que se encuentra en el medio EMB). Los resultados mostraron que mientras que las colonias de la cepa parental y complementada no presentaron modificación alguna en ninguna condición, el mutante *acrR*<sup>-</sup> formó colonias de gran tamaño en el medio con 0,3 % y 0,6 % de agar (**figura 4.18**). Estos fenotipos se corresponden con los tipos de movilidad definidos como “swimming” y “swarming”, respectivamente.



**Figura 4.18.** Morfología y tamaño de las colonias de las cepas *Y. ruckeri* 150, *Y. ruckeri* *acrR*<sup>-</sup> y *Y. ruckeri* *acrR*<sup>+</sup>, crecidas en el medio TSA con distintos porcentajes de agar y 0,5 % de lactosa.



Con el fin de determinar si el movimiento definido en la cepa mutante era debido a la utilización los monosacáridos glucosa y/o galactosa, productos de la lactosa hidrolizada por la enzima  $\beta$ -galactosidasa, codificada por el operón *lac* presente en el transposón Tn5*luxlac*, se repitieron los ensayos de movilidad en un medio de cultivo libre de azúcares como es el medio AN. Como puede observarse en la **figura 4.19**, en presencia de glucosa al 0,25 %, no hubo movimiento alguno para ninguna de las cepas ensayadas, con un resultado similar al obtenido en el medio TSA. Sin embargo, cuando el porcentaje de glucosa se incrementó hasta 0,5 %, todas las cepas presentaron una clara movilidad. Cuando la galactosa y la lactosa fueron añadidas al medio de forma independiente en una proporción del 0,75 %, no se indujo la movilidad en ninguna de las cepas (**figura 4.19**). Sin embargo, a una misma proporción final del azúcar, es decir 0,75 %, cuando ésta se correspondía con 0,25 % de glucosa + 0,5 % de galactosa, si se pudo observar la movilidad tanto en la cepa parental como en el mutante  $acrR^-$  y su complementada, aunque la mayor movilidad se correspondió con el mutante  $acrR^-$  (**figura 4.19**). Por otro lado, en la combinación de glucosa (0,25 %) con lactosa (0,5 %), solo hubo una movilidad aparente en la cepa  $acrR^-$ , resultado equivalente a lo observado en el medio TSA con lactosa 0,5 %. Finalmente, no se produjo movilidad alguna en presencia de arabinosa 0,75 %, ni en la combinación de arabinosa 0,5 % + glucosa 0,25 % (**figura 4.19**).



**Figura 4.19.** Morfología de las colonias de las cepas *Y. ruckeri* 150, *Y. ruckeri*  $acrR^-$  y *Y. ruckeri*  $acrR^+$ , crecidas en el medio AN con diferentes proporciones de glucosa, galactosa, lactosa y arabinosa, así como la combinación de cada uno de ellos con glucosa.

#### 4.4.3. Determinación de la virulencia

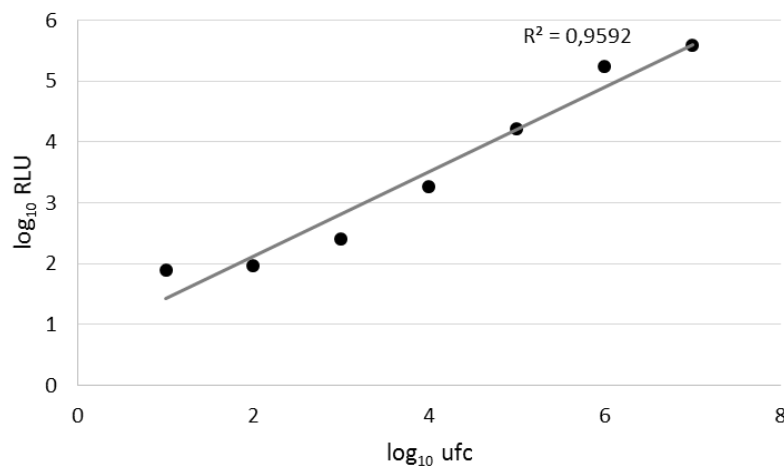
Mediante inyección intraperitoneal se determinó la  $DL_{50}$  para las cepas parental y mutante. Los valores obtenidos fueron  $6,3 \times 10^2$  ufc para la cepa parental y  $3,8 \times 10^2$  ufc para  $acrR^-$ . Cuando la determinación de la virulencia se realizó por inmersión, a los ocho días postinfección se habían registrado al menos un 90 % de muertes en ambos casos. Por lo tanto, puede concluirse que no existen diferencias significativas en cuanto

a la virulencia entre el mutante *acrR*<sup>-</sup> y la cepa parental, y ello, independientemente de la vía de infección utilizada.

#### 4.4.4. Regulación del gen *acrR* vía detección de la luminiscencia

##### 4.4.4.1. Influencia de la acrilflavina en la expresión del gen *acrR*

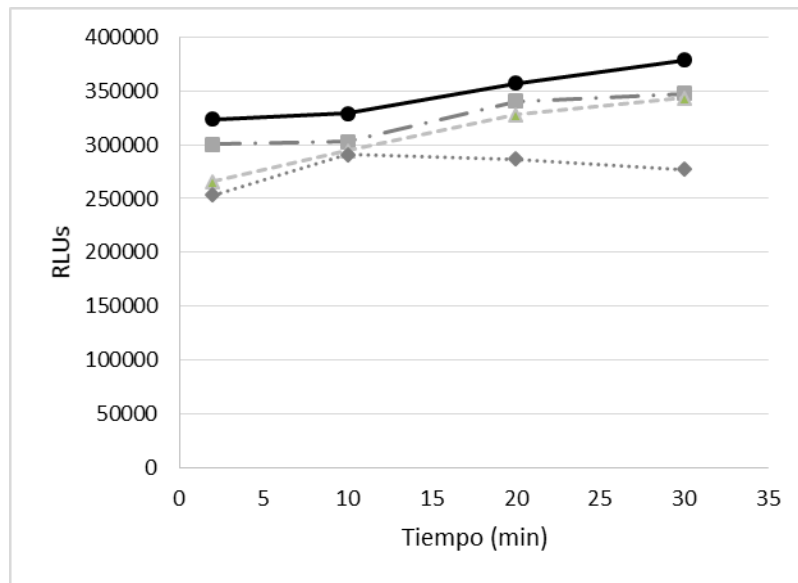
Con el fin de establecer el rango de la relación lineal entre el número de células y la luminiscencia emitida por estas, se realizaron diluciones con base 10 de un cultivo de la cepa mutante *Y. ruckeri* *acrR* y se determinó la luminiscencia emitida por cada una de estas diluciones. Como puede observarse en la figura **figura 4.20**, en las condiciones ensayadas se dio una buena correlación ( $R^2 = 0,9592$ ), especialmente en el rango entre  $10^3$  a  $10^6$  ufc.



**Figura 4.20.** Correlación entre la luminiscencia emitida y el número de bacterias en diluciones seriadas de un cultivo de la cepa *Y. ruckeri* *acrR*<sup>-</sup>.

Una vez establecido el rango de linealidad, se estudió el efecto de la acrilflavina sobre la expresión del gen *acrR*. Para ello, se añadió el compuesto a cultivos del mutante *Y. ruckeri* *acrR*<sup>-</sup> en fase exponencial de crecimiento y a continuación se cuantificó la luminiscencia emitida, a intervalos de tiempo, durante un periodo de 30 minutos. Como puede observarse en la **figura 4.21**, transcurridos 2 minutos desde la adición del compuesto, se detectó ya una disminución de la luminiscencia, siendo esta más acusada cuanto mayor era la concentración del compuesto. Tales diferencias se mantuvieron, al menos, a lo largo de 30 minutos.



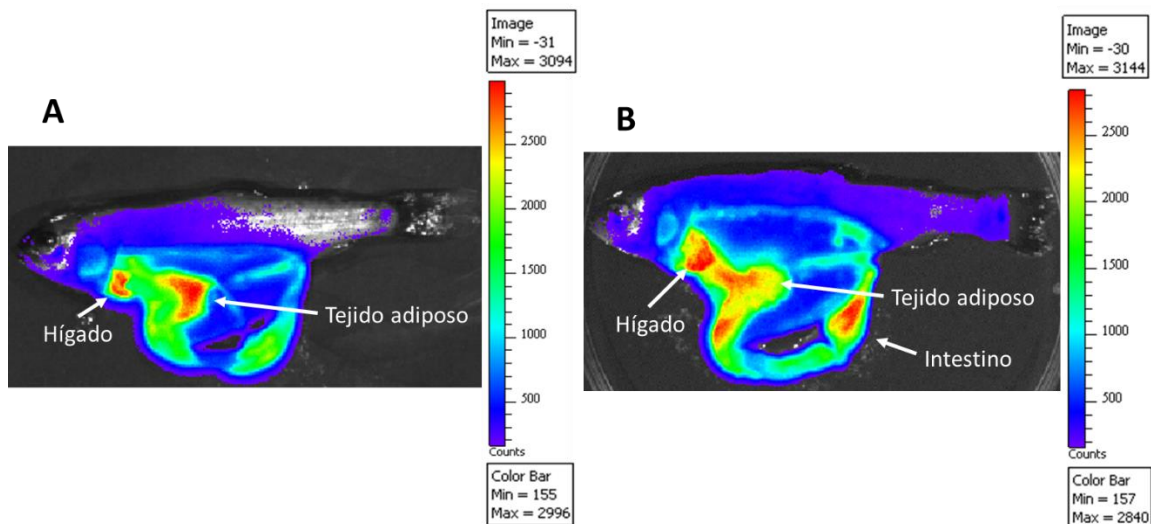


**Figura 4.21.** Unidades relativas de luminiscencia (RLU) emitidas a los 2, 10, 20 y 30 min, por el mutante *Y. ruckeri acrR<sup>-</sup>* en el medio TSB a 18 °C (●); o con acriflavina a las concentraciones 2,5 µg/ml (■); 5 µg/ml (▲) y 10 µg/ml (◆).

#### 4.4.4.2. Análisis de la expresión del gen *acrR* relación a los órganos de la trucha arcoíris

##### 4.4.4.2.1. Expresión del gen *acrR* *in vivo*

El estudio de la expresión del gen *acrR* *in vivo* se llevó a cabo mediante la realización de infecciones, tanto por inyección como por inmersión, de alevines de trucha arcoíris con la cepa *Y. ruckeri acrR<sup>-</sup>*. Cada día, un grupo de peces muertos bien por la infección o por sobredosis de anestesia, fueron diseccionados y analizados con el equipo Ivis Lumina. Para ambos modelos de infección, no se detectó luminiscencia alguna hasta las 48h postinfección. A partir de ese tiempo, de forma general, y en ambos modelos de infección, en los peces sometidos a eutanasia, se observó luminiscencia en la cavidad abdominal, siendo la zona de mayor intensidad de luz la correspondiente al hígado y el acúmulo de tejido adiposo que rodea al bazo (**figura 4.22 A**). En ocasiones, también fue detectada una intensidad de luminiscencia equiparable a la anterior en el tubo digestivo de los peces (**figura 4.22 B**).



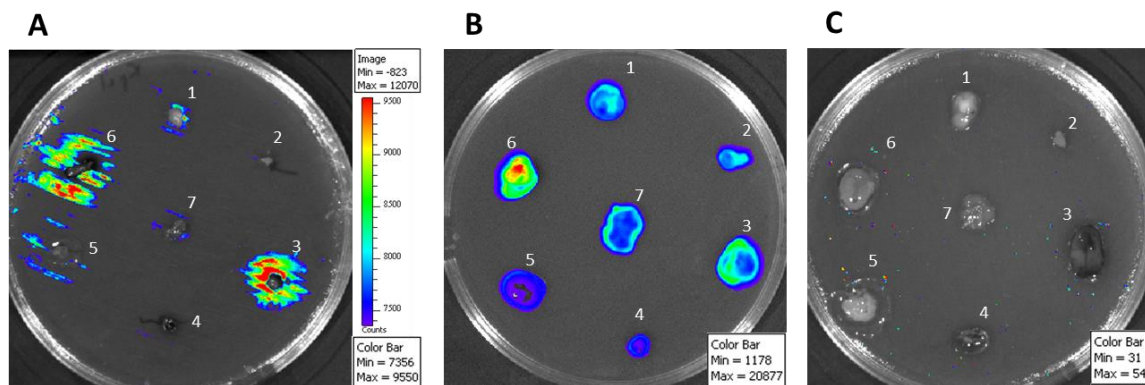
**Figura 4.22.** Luminiscencia emitida por el mutante *Y. ruckeri*  $acrR^-$  en alevines de trucha arcoíris que han sido infectados por inmersión. **A)** Ejemplar sacrificado a las 48 h postinfección. **B)** Ejemplar muerto 72 h postinfección. La luminiscencia fue captada a través del sistema IVIS Lumina en animales con la cavidad abdominal abierta.

#### 4.4.4.2.2. Expresión del gen *acrR* *ex vivo*

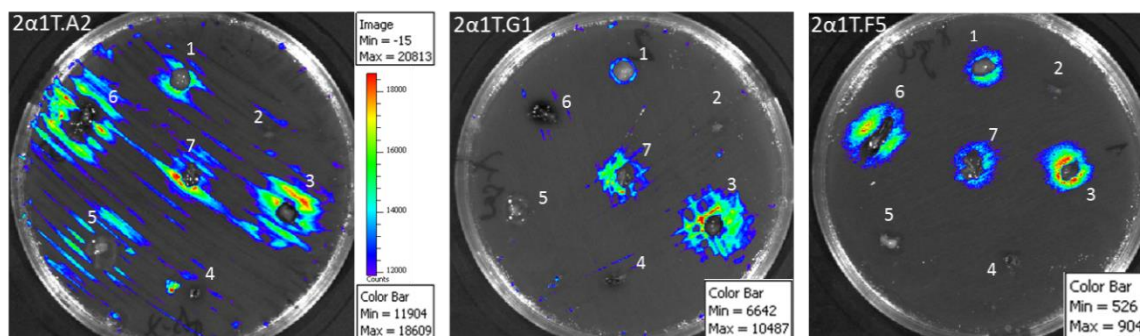
Para comprobar si los patrones de luminiscencia, correspondientes a la expresión del gen *acrR*, observados *in vivo*, se correspondían con un patrón similar *ex vivo*, se realizaron ensayos para cuantificar la luminiscencia emitida por la bacteria en presencia de distintos tejidos de trucha arcoíris. Para ello, se sembró la cepa *Y. ruckeri*  $acrR^-$  para tener un crecimiento confluyente en una placa con el medio TSA. A continuación, se depositaron sobre el medio, tejidos o porciones de órganos procedentes de: cerebro, corazón, hígado, bazo, tejido adiposo, intestino y agallas. Después de 24 h de incubación, las placas fueron analizadas mediante en el sistema IVIS Lumina. Las imágenes captadas mostraron una luminiscencia basal en toda la placa debido al crecimiento confluyente de la bacteria. Esta luminiscencia aumentó hasta en un 50 % alrededor de las diferentes porciones de órganos, llegando a niveles del 100 % en el caso del intestino e hígado (**figura 4.23, A**). Cuando el mismo experimento se realizó con la cepa complementada *Y. ruckeri*  $acrR^+$ , no se observó luminiscencia en ninguna zona de la placa (**figura 4.23, C**).

Con el fin de contrastar el resultado, se analizó la expresión del gen *acrR* en presencia de los distintos órganos del pez, pero variando el protocolo que se había utilizado inicialmente. Así, en vez de sembrar la bacteria en la superficie de la placa, los diferentes tejidos fueron sumergidos en diluciones 1:100 de un cultivo en fase estacionaria de crecimiento de la cepa mutante para, posteriormente, ser depositados sobre la superficie del medio de cultivo. Al igual que en el caso anterior, la mayor intensidad de la luminiscencia fue localizada alrededor de intestino e hígado (**figura 4.23, B**).

Para averiguar si el patrón de expresión observado con el mutante *Y. ruckeri* *acrR*<sup>-</sup> en relación a los tejidos era específico o por el contrario era general de *Y. ruckeri* 150, se repitió el ensayo con varios mutantes elegidos al azar de los seleccionados en la genoteca. El resultado obtenido puede observarse en la **figura 4.24**, donde aparece un modelo de expresión diferencial de cada uno de los mutantes en relación a los diferentes órganos.



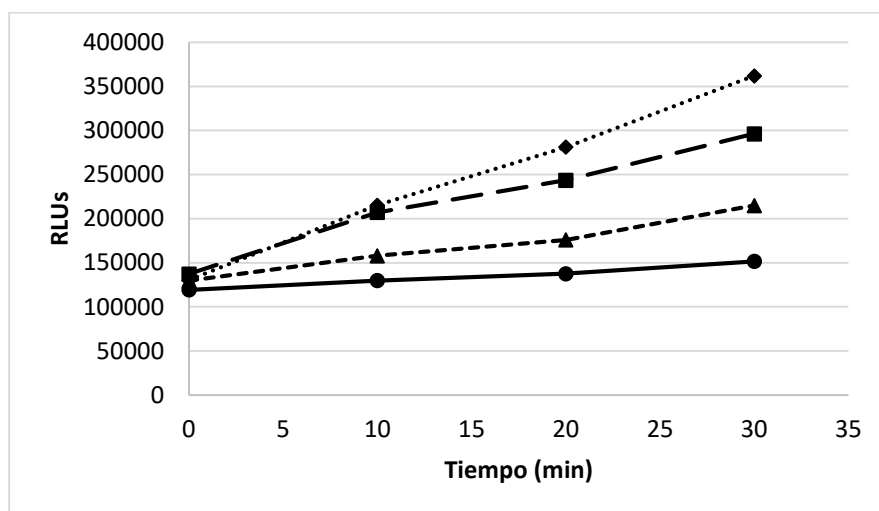
**Figura 4.23.** Luminiscencia emitida por diferentes cepas de *Y. ruckeri* tras 24 h de incubación a 18 °C en contacto con las siguientes porciones de órganos de trucha arcoiris: encéfalo (1); corazón (2); hígado (3); bazo (4); tejido adiposo (5); intestino (6); y agallas (7). **A)** Cepa *Y. ruckeri* *acrR*<sup>-</sup> sembrada para un crecimiento confluyente y porciones de órganos depositados en la superficie del medio TSA. **B)** Porciones de los órganos sumergidas en un cultivo en fase estacionaria de *Y. ruckeri* *acrR*<sup>-</sup> y depositados, posteriormente, en la superficie del medio TSA. **C)** Cepa *Y. ruckeri* *acrR*<sup>+</sup> sembrada para un crecimiento confluyente y porciones de órganos depositados en la superficie del medio TSA. Las imágenes fueron tomadas mediante el sistema IVIS Lumina.



**Figura 4.24.** Luminiscencia emitida por distintos mutantes de *Y. ruckeri* (2α1T.A2; 2α1T.G1; 2α1T.F5) procedentes de la genoteca, tras 24 h de incubación a 18 °C en contacto con las siguientes porciones de órganos de trucha arcoiris: encéfalo (1); corazón (2); hígado (3); bazo (4); tejido adiposo (5); intestino (6) y agallas (7). La cepa *Y. ruckeri* *acrR*<sup>-</sup> fue sembrada para un crecimiento confluyente y los tejidos depositados en la superficie del medio TSA previo a la incubación. Las imágenes fueron tomadas por el sistema IVIS Lumina.

Con el fin de cuantificar la expresión diferencial del gen *acrR* en relación con los distintos órganos del animal y para establecer un modelo que pudiera ser utilizado en

el futuro para la cuantificación de la expresión de otros genes, se estudió la regulación *ex vivo* del gen *acrR* en medio líquido utilizando un luminómetro. El resultado obtenido se muestra en la **figura 4.25** en la que puede verse la luminiscencia emitida por el mutante incubado en el medio TSB con porciones de órganos procedentes del hígado, grasa o músculo de alevín de trucha arcoíris. En todos los casos hubo una mayor luminiscencia cuando estaban presentes los órganos del pez, si bien, los niveles más altos se correspondieron con el tejido adiposo e hígado (**figura 4.25**).



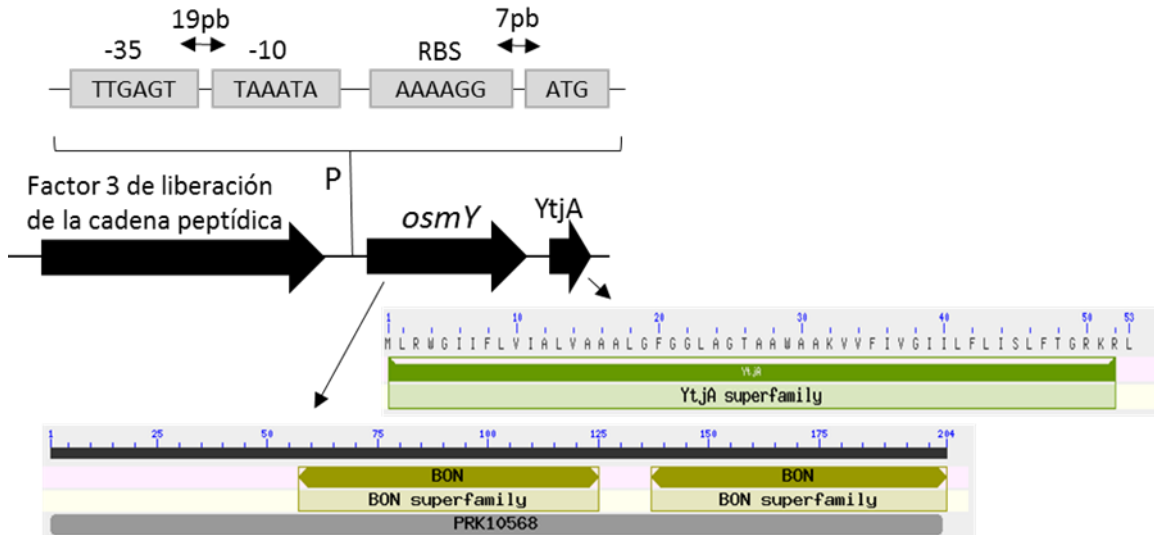
**Figura 4.25.** Unidades relativas de luminiscencia (RLU) emitidas por el mutante *Y. ruckeri* *acrR*<sup>-</sup> en el medio TSB a 18 °C (●); o en presencia de porciones de los siguientes órganos o tejidos: hepático (■); adiposo (◆); y músculo (▲). En ningún caso la desviación estándar fue superior al 5 % de la media.

## 4.5. Caracterización del mutante *Y. ruckeri* *osmY*<sup>-</sup>

### 4.5.1. Análisis *in silico* del gen *osmY*

La secuenciación de la región adyacente al lugar de inserción del transposón *Tn5luxlac* en el ADN del mutante seleccionado, reveló la presencia de un gen de 615 pb que codifica una proteína de 204 aminoácidos que el programa RAST identificó como la proteína *OsmY* inducible osmóticamente. Esta proteína presenta un 100 % de identidad con proteínas homólogas en otras cepas de la misma especie como *Y. ruckeri* ATCC2495 (OEU26500.1) o SC09 (KGX82597.1), así como identidades elevadas con proteínas de otras especies del género como *Y. pestis* (WP\_011906422.1/81 %) y otras enterobacterias como *Serratia fonticola* (WP\_021808016.1/74 %). El análisis de la secuencia aminoacídica identificó 2 dominios conservados BON (pfam04972), dominios encontrados en familias de proteínas relacionadas con la protección frente al shock osmótico (**figura 4.26**). Adyacente al extremo 5' del gen *osmY*, en su mismo sentido de transcripción y a 382 pb de distancia del codón de inicio, se encuentra un gen que codifica una proteína denominada "factor 3 de liberación de la cadena peptídica". En el lado opuesto, y a 169 pb de su extremo 3', se localiza un gen de 162 pb que codifica una proteína hipotética de 53 aminoácidos, con un dominio *YtjA*, de función

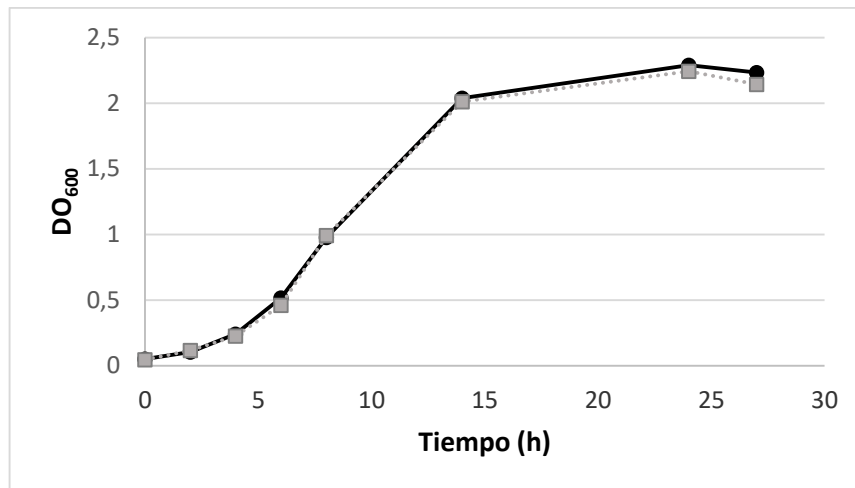
desconocida, común a múltiples proteínas bacterianas de membrana de en torno a 50 residuos aminoacídicos. Este contexto génico es igual en otras especies del género *Yersinia*, además de en *E. coli* K12, *S. Typhimurium* y *Shigella flexneri*.



**Figura 4.26:** Contexto genético del gen *osmY*. Se indica una posible secuencia promotora (P) con las secuencias correspondientes a las regiones -10 y -35, así como el RBS y el codón de inicio (ATG). En la parte inferior, se muestran los dominios proteicos conservados que poseen las proteínas OsmY e YtjA.

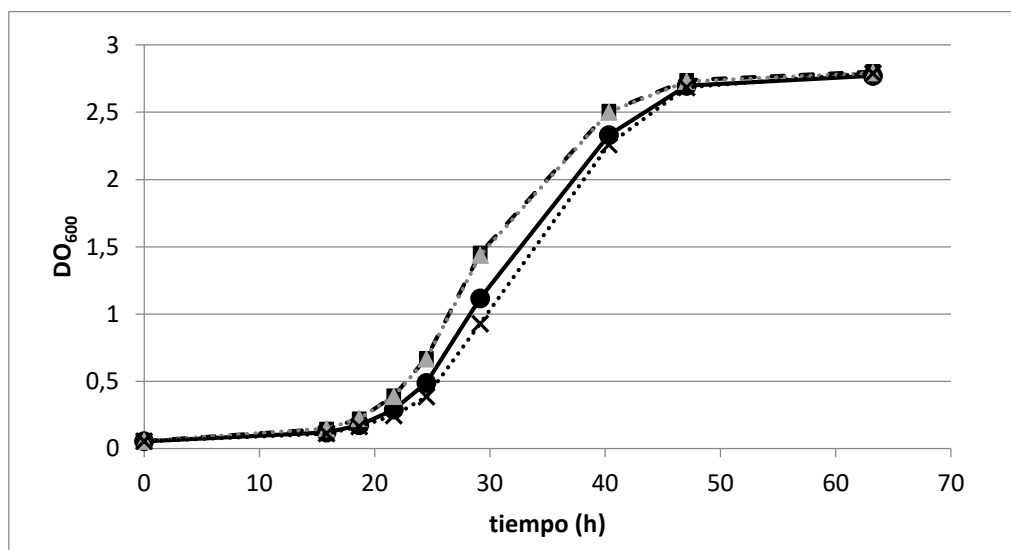
#### 4.5.2. Caracterización de la cepa mutante *Y. ruckeri* *osmY*<sup>-</sup> y complementadas *osmY*<sup>+</sup> y *osmY*<sup>++</sup>

Para determinar si la interrupción del gen *osmY* afectaba la viabilidad de la bacteria, se siguió el crecimiento de la cepa parental y mutante en el medio TSB a 18 °C, observándose que, en estas condiciones, no había diferencias de crecimiento entre ellas (**figura 4.27**).



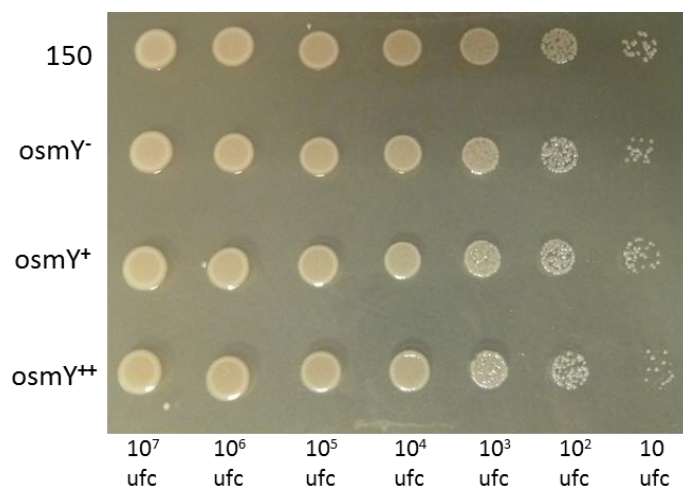
**Figura 4.27** Curvas de crecimiento de las cepas *Y. ruckeri* 150 (●) y *Y. ruckeri* osmY<sup>-</sup> (■) en medio TSB a 18 °C. La desviación estándar en cada punto no fue mayor de 0,1.

Con el objeto de definir si en el caso de *Y. ruckeri* el gen *osmY* estaba relacionado con el choque osmótico, se analizó el crecimiento de las cepas *Y. ruckeri* 150, osmY<sup>-</sup>, osmY<sup>+</sup> (complementada con el gen *osmY*) y osmY<sup>++</sup> (complementada con una copia del gen *osmY* y su adyacente en el extremo 5', *yjA*,) en el medio TSB al que se añadió un 3 % de NaCl. Tras 48 h de incubación a 18 °C, la cepa parental, el mutante osmY<sup>-</sup> y sus complementados, alcanzaron la fase estacionaria de crecimiento a la misma DO<sub>600</sub> (**figura 4.28**). Si bien las curvas de crecimiento fueron similares en todos los clones, se apreció una diferencia en la pendiente de la misma durante la fase exponencial de crecimiento. Así, la pendiente fue menor en la cepa parental y en *Y. ruckeri* osmY<sup>++</sup> que en osmY<sup>-</sup> y osmY<sup>+</sup>, que tuvieron un comportamiento semejante (**figura 4.28**).



**Figura 4.28:** Curvas de crecimiento de las cepas *Y. ruckeri* 150 (●), *Y. ruckeri* osmY<sup>-</sup> (■), *Y. ruckeri* osmY<sup>+</sup> (▲) y *Y. ruckeri* osmY<sup>++</sup> (X) en el medio TSB a 18 °C. La desviación estándar de cada punto de la curva fue inferior a 0,1.

A la vista de los resultados obtenidos, se analizó el crecimiento de las cepas en el medio sólido TSA al que se añadió NaCl en un rango de entre el 2 y el 8 %. En esta ocasión, no se detectaron diferencias entre las cepas parental, mutante y complementadas, creciendo todos por igual en el medio al que se añadió un 2 % de NaCl y no creciendo ninguna de ellas en porcentajes de la sal superiores (**figura 4.29**).



**Figura 4.29.** Efecto del NaCl sobre el crecimiento de diferentes cepas de *Y. ruckeri*. Diez  $\mu$ l procedentes de diluciones seriadas con base 10 de cultivos de cada una de las cepas *Y. ruckeri* 150, osmY<sup>-</sup>, osmY<sup>+</sup> y osmY<sup>++</sup> en fase estacionaria de crecimiento fueron depositados sobre el medio de cultivo TSA suplementado con un 2 % de NaCl. Las placas se incubaron a 18 °C durante 72 h.

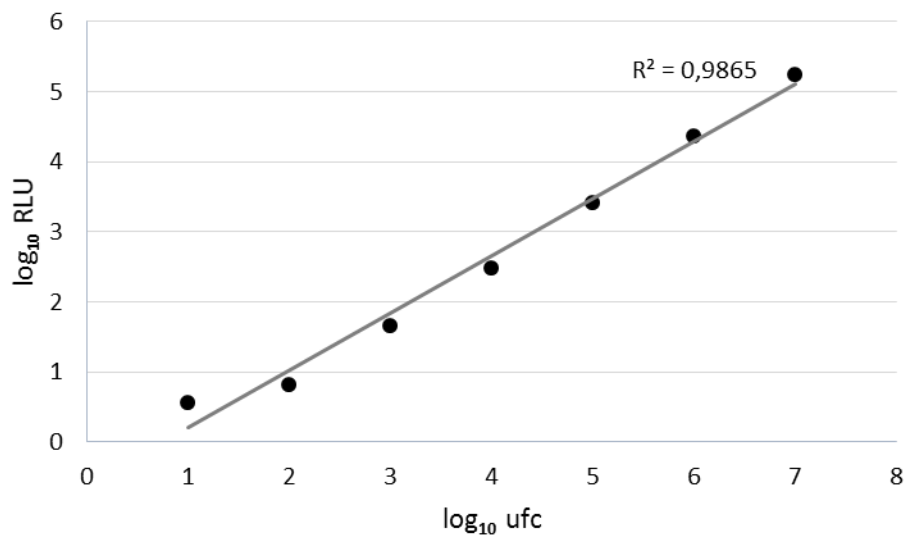
#### 4.5.3. Determinación de la virulencia de las cepas *Y. ruckeri* osmY<sup>-</sup> y *Y. ruckeri* osmY<sup>++</sup>

En estudios previos (**apartado 4.3.2.3.**) se determinó que el mutante *Y. ruckeri* osmY<sup>-</sup>, infectado por vía intraperitoneal, a una dosis de 10<sup>2</sup> ufc (correspondiente a la DL<sub>50</sub> para *Y. ruckeri*), era incapaz de generar un proceso patológico en alevines de trucha arcoíris (**tabla 4.9**). Con el fin de evaluar si la cepa complementada *Y. ruckeri* osmY<sup>++</sup> había recuperado su potencial virulento, se llevaron a cabo experimentos de infección inyectando por vía intraperitoneal 10<sup>6</sup> ufc de cada una de las cepas *Y. ruckeri* 150, osmY<sup>-</sup> y osmY<sup>++</sup>, a grupos de 15 alevines de trucha arcoíris. No se consideró necesario incluir la cepa *Y. ruckeri* osmY<sup>+</sup> al no observarse en ella complementación de la mutación *in vitro*. Siete días después de la infección con la cepa parental el 93,3 % de los animales habían muerto, mientras que tan solo lo hicieron el 16,6 % en los grupos de peces inyectados con el mutante *Y. ruckeri* osmY<sup>-</sup>. Por otro lado, en el caso de la cepa *Y. ruckeri* osmY<sup>++</sup> se produjo un 40 % de bajas. Estas diferencias resultaron estadísticamente significativas aplicando un test Chi cuadrado (P valor = 19,62).

#### 4.5.4. Estudio de la regulación del gen *osmY* vía detección de la luminiscencia

##### 4.5.4.1. Efecto del NaCl en la expresión del gen *osmY*

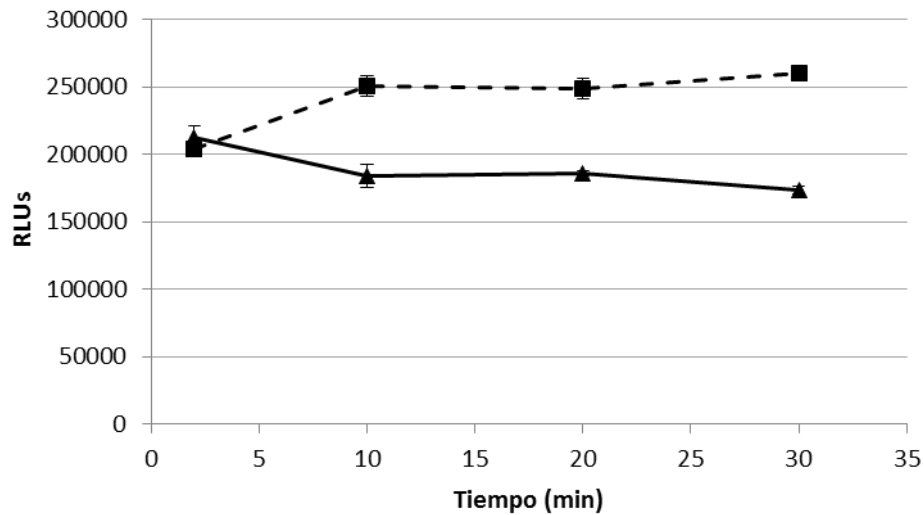
Al igual que se hizo con el mutante *Y. ruckeri* *acrR*<sup>-</sup>, se realizó también un estudio previo con el mutante *Y. ruckeri* *osmY*<sup>-</sup>, para establecer la correlación entre la densidad celular y la luminiscencia. Esta relación resultó también lineal en el rango de 10<sup>2</sup> a 10<sup>7</sup> ufc en las condiciones ensayadas ( $R^2 = 0,9865$ ) (**figura 4.30**).



**Figura 4.30.** Correlación entre la luminiscencia emitida y el número de bacterias de un cultivo de la cepa *Y. ruckeri* *osmY*<sup>-</sup>.

Considerando que el gen *osmY* ha sido definido en *E. coli* como inducible en condiciones de hiperosmolaridad (Yim y Villarejo, 1992), se valoró la luminiscencia emitida por el mutante *Y. ruckeri* *osmY*<sup>-</sup> en presencia de NaCl al 1,5 % a diferentes tiempos, durante 30 minutos. Como se puede observar en la **figura 4.31**, se produjo un incremento de la luminiscencia respecto a la situación control durante los primeros 10 min, que se mantuvo al menos, hasta los 30 min.



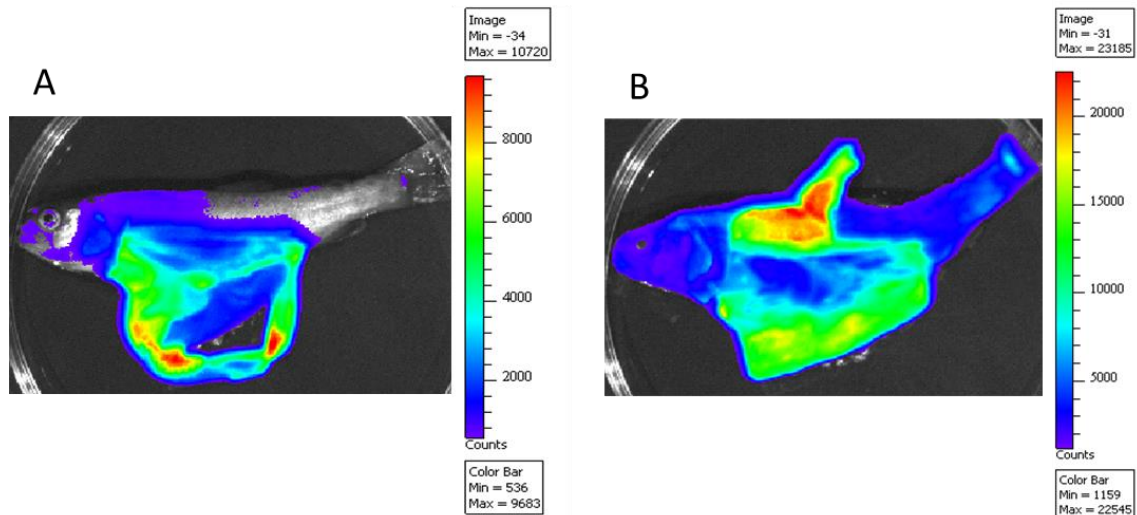


**Figura 4.31.** Luminiscencia emitida (RLU) por el mutante *Y. ruckeri osmY<sup>-</sup>* a 18 °C en el medio TSB (▲); y TSB con 1,5 % de NaCl (■).

#### 4.5.4.2 Análisis de la expresión del gen *osmY* en relación a los órganos de trucha arcoíris

##### 4.5.4.2.1. Expresión del gen *osmY* *in vivo*

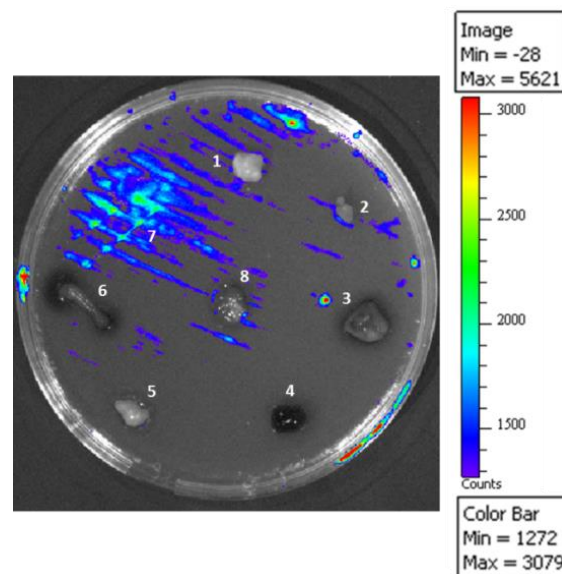
La atenuación de la virulencia que presentaba el mutante *Y. ruckeri osmY<sup>-</sup>*, imposibilitaba su utilización para el seguimiento *in vivo* de la expresión del gen durante proceso infeccioso. Sin embargo, al haberse restaurado, al menos, parcialmente la virulencia en la cepa complementada *Y. ruckeri osmY<sup>++</sup>*, ésta se pudo utilizar para visualizar la expresión del gen *osmY* durante la infección (**figura 4.32**). De forma general, la mayor intensidad de luz fue detectada en el sistema digestivo, concretamente ciegos pilóricos e intestino (**figura 4.32 A**), aunque, algunos individuos que habían muerto de la infección, presentaron niveles muy altos en el tejido muscular (**figura 4.32 B**).



**Figura 4.32.** Luminiscencia emitida por el clon *Y. ruckeri osmY<sup>++</sup>* en alevines de trucha arcoíris inyectados por vía intraperitoneal y muertos por la infección. Ejemplar analizado **A)** 3 días y **B)** 4 días postinfección.

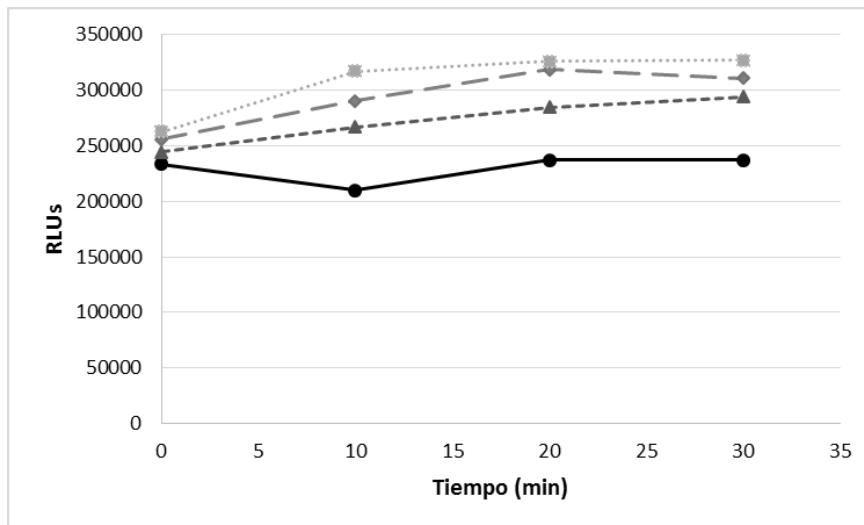
#### 4.5.4.2.2. Expresión del gen *osmY* *ex vivo*

Para confirmar si la expresión del gen *osmY* *in vivo* tenía un perfil semejante *ex vivo* que permitiese directamente y con el uso de menos animales definir los tejidos preferenciales de expresión del gen, se realizaron, al igual que con el mutante *Y. ruckeri* *acrR<sup>-</sup>*, 2 aproximaciones distintas *ex vivo*, por un lado en medio sólido con los órganos depositados en superficie, y por el otro, con los órganos embebidos en medio líquido. Las imágenes de luminiscencia obtenidas revelaron, una gran intensidad de luminiscencia alrededor del tejido muscular en comparación con los otros órganos ensayados (encéfalo, corazón, hígado, bazo, tejido adiposo y agallas) (**figura 4.33**).



**Figura 4.33.** Luminiscencia emitida por la cepa *Y. ruckeri osmY<sup>-</sup>* sembrada para un crecimiento confluyente, tras 24 h de incubación a 18 °C en contacto con las siguientes porciones de órganos o tejidos de trucha arcoíris: encéfalo (1); corazón (2); hígado (3); bazo (4); grasa (5); intestino (6); músculo (7); y agallas (8).

Para la cuantificación de la expresión del gen *osmY*, se registró durante 30 minutos la luminiscencia emitida por el clon *Y. ruckeri osmY*<sup>-</sup> en medio líquido, al que se le añadió independientemente, porciones de hígado, músculo o tejido adiposo de alevines de trucha arcoíris. Como se puede observar en la **figura 4.34**, la luminiscencia emitida fue mayor cuando la bacteria fue incubada en presencia de cualquiera de los tejidos ensayados que en su ausencia. Dicho incremento de la luminiscencia, resultó estadísticamente significativo entre los valores obtenidos para los tres tejidos en relación al control.



**Figura 4.34.** Unidades relativas de luminiscencia (RLU) emitidas a lo largo de 30 min por el mutante *Y. ruckeri osmY*<sup>-</sup> en el medio TSB a 18 °C (●); en presencia de hígado (◆); músculo (▲); y tejido adiposo (■). En ningún caso la desviación estándar fue superior al 5 % de la media.



## 5. Discusión



## 5.1. Secuenciación y análisis comparativo del genoma de *Y. ruckeri* 150

El genoma de *Y. ruckeri* 150 tiene un tamaño de 3,8 Mpb, similar al de otras cepas, pero más pequeño que el del resto de las especies que componen el género *Yersinia* con tamaños que oscilan entre 4,3 y 4,8 Mpb (Tan y col., 2015; Jhonson y col., 2015). Además, presenta un porcentaje GC del 47,4 % y, al menos, 3.538 ORFs, parámetros que se encuentran dentro de los definidos para otros genomas de la especie según la información disponible en la base de datos NCBI (Benson y col., 2015).

La utilización del programa CRISPRFinder no permitió definir ningún elemento CRISPR en el genoma de *Y. ruckeri* 150. El sistema CRISPR/Cas es considerado el "sistema inmune adquirido" en procariontes, siendo clave en la defensa frente a ácidos nucleicos exógenos (Garneau y col., 2010). Es posible que la ausencia de estos elementos esté relacionada con una mayor susceptibilidad a las infecciones por fagos y por tanto a la adquisición de nuevo material genético. De hecho, en el genoma de *Y. ruckeri* 150 se han identificado cuatro regiones que contienen genes relativos a fagos, los cuales han podido jugar un papel importante en la evolución de esta bacteria y su adaptación a nuevos ambientes ya que la transferencia horizontal de material genético es un evento determinante que contribuye a la diversidad de una especie (Brüssow y col., 2004).

El alineamiento de genomas por pares, mostró que la cepa *Y. ruckeri* 150 comparte mayor cantidad de información genética con las cepas ATCC2973 y CSF007-82, que con Big Creek y SC09, lo que indica que las cepas de serotipo O1 que han sido aisladas de trucha arcoíris son entre sí más próximas genéticamente que con aquellas cepas aisladas de distinto serotipo y hospedador. Estos resultados, se ven apoyados por los obtenidos en el Diagrama de Venn, en el que se muestra que las cepas *Y. ruckeri* 150, ATCC29473 y CSF007-82 comparten de forma exclusiva 268 genes, y a su vez, las cepas Big Creek y SC09 comparten 118 genes que no están presentes en las demás. Estos datos indican una clara separación a nivel genético entre las cepas de serotipo O1 cuyo hospedador es trucha arcoíris, respecto a las cepas Big Creek y SC09 que fueron aisladas de un hospedador distinto del anterior y que, al menos en el caso de Big Creek pertenecen al serotipo O2. Aunque el serotipo de la cepa SC09 no ha sido descrito, el gran número de genes compartidos de forma exclusiva con la cepa Big Creek, junto con el hecho de que entre ellos se encuentran varios implicados en la fermentación del sorbitol, característicos de las cepas del serotipo O2 (Davies y Frerichs, 1989), parece indicar que esta cepa, al igual que Big Creek, pertenece a este último serotipo. El número de genes único para cada cepa, 99 para Big Creek y 112 para SC09, apunta a que en ambos conjuntos se puedan encontrar los genes responsables de la especificidad de hospedador, salmón Chinook en un caso y pez gato en el otro. Por el contrario, las cepas de serotipo O1 apenas poseen genes específicos de cada una, lo cual, acorde con el planteamiento anterior, parece tener sentido teniendo en cuenta que fueron aisladas de la misma especie de pez, trucha arcoíris, con lo que sería de

esperar que la especificidad de hospedador viniera definida por genes comunes presentes en las tres cepas.

En conjunto, la información obtenida a partir de los alineamientos y el Diagrama de Ven, indica que la variación de los antígenos presentes en la superficie celular, responsables de la asignación a un serotipo u otro, así como la especificidad de hospedador, se reflejan también en una marcada diferencia genética.

### 5.1.1. Genes compartidos de forma exclusiva por las cepas de *Y. ruckeri* 150, ATCC24973 y SC007-82, de serotipo O1

Entre los genes compartidos solamente por las cepas de serotipo O1 (**tabla 3.2.**), se encuentran varios relacionados con sistemas de restricción-modificación (RM) y sistemas toxina-antitoxina (TA). Ambos sistemas implican la muerte de las células que han perdido uno de sus componentes (la antitoxina o la enzima de modificación) y tienen en común el efecto que causan en la regulación global produciendo alteraciones en fenotipos adaptativos. Un ejemplo de ello es la antitoxina del sistema TA MqsR-MqsA de *E. coli*, que reprime específicamente la transcripción del gen que codifica la proteína RpoS, implicada en la regulación de múltiples genes ante una situación de estrés. La degradación de la antitoxina cuando la célula está sometida a estrés oxidativo, genera modificaciones en la regulación que tienen como consecuencia el paso de un fenotipo de alta motilidad a la formación de biofilm (**Wang y col., 2011**). Del mismo modo, eventos de metilación producidos por sistemas de restricción-modificación pueden afectar a la expresión genética. Así, en patógenos como *Haemophilus influenzae* o *Neisseria sp.* la metilación por sistemas RM Tipo III controla la expresión de ciertos genes produciéndose el fenómeno conocido como "variación de fase", en el que en una misma población se encuentran dos tipos celulares distintos con fenotipos diferentes (**Srikhanta y col., 2010**). Esta estrategia puede resultar útil en la adaptación de las bacterias patógenas al ambiente del hospedador.

Curiosamente, todas las cepas de serotipo O1 comparten un cluster de genes implicado en la biosíntesis de ácido legionamínico. Este diaminomonosacárido de 9 carbonos, que se encuentra recubriendo la superficie de varias bacterias patógenas humanas como componente mayoritario del lipopolisacárido (LPS), es un análogo del ácido siálico. Estos genes que están agrupados en un cluster de, al menos, 18 genes, se encuentran ausentes en otras especies de *Yersinia* pero están presentes en bacterias de hábitat acuático, algunas de ellas patógenas como *V. vulnificus*, *Vibrio parahaemolyticus*, *A. salmonicida* o *Flavobacterium sp.* y otras no patógenas, como *Vibrio fischeri*, *Photobacterium profundum* o *Sewanella sediminis* (información obtenida a través del programa RAST). Atendiendo a estos datos, pudiera ser que este cluster concediera a las bacterias una ventaja adaptativa en el medio acuático, o también, como ocurre en algunos organismos como *Campylobacter jejuni* (**Zebian y col., 2016**), que esté relacionado con la virulencia. Todo ello puede ser debido a que el ácido legionamínico es esencial para el ensamblaje de los flagelos y para la motilidad en múltiples especies de bacterias (**Morrison e Imperiali, 2014**). Por esta razón, los genes implicados en su biosíntesis pueden constituir nuevas dianas para el desarrollo de



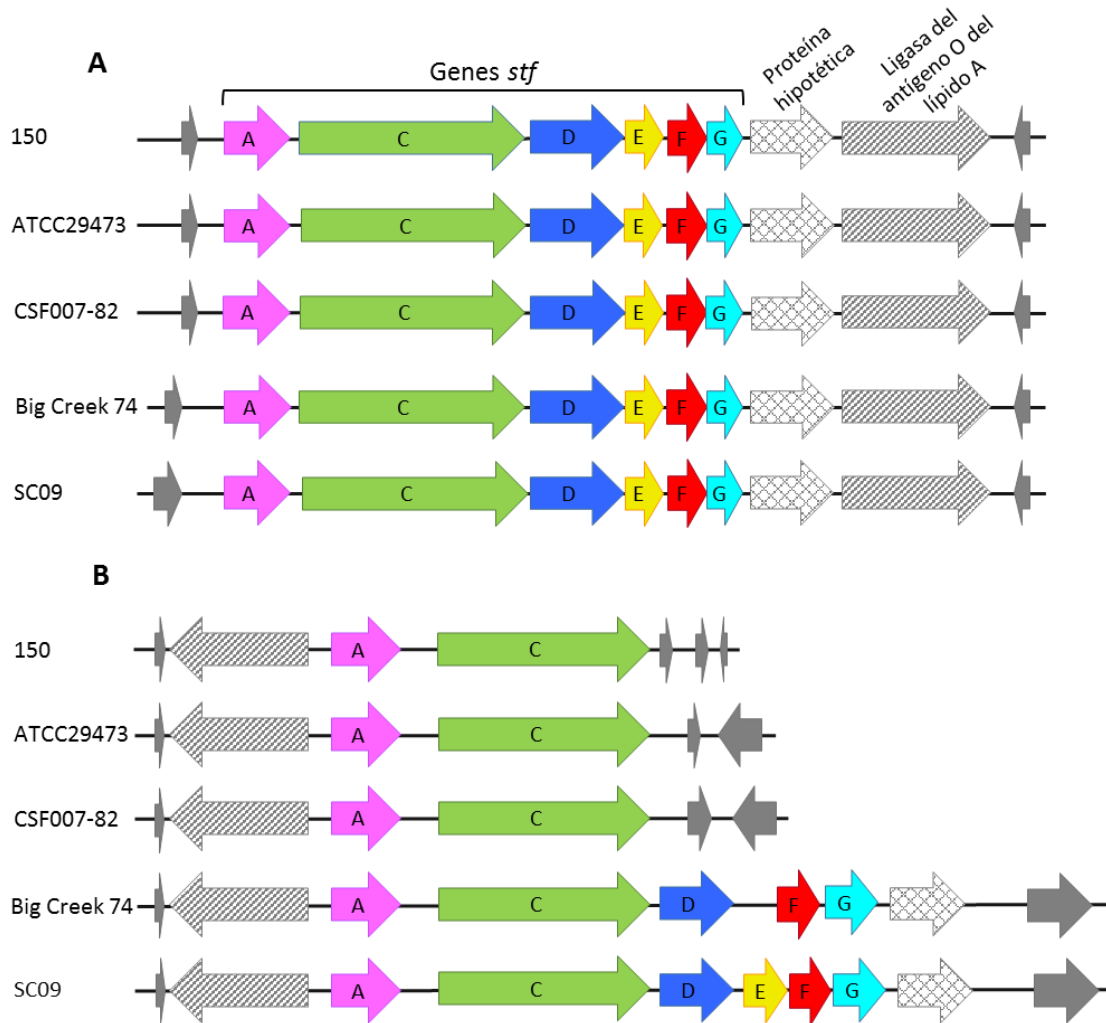
agentes antibacterianos. En este contexto, cabe mencionar el trabajo de **Welch y La Patra (2016)** en el que determinaron que el LPS de *Y. ruckeri* serotipo O1 es necesario y suficiente para inducir una respuesta inmune protectora en trucha arcoíris, demostrando así la eficacia de su utilización en las vacunas contra la ERM.

Otros genes a destacar que son exclusivos de las cepas de serotipo O1, son aquellos que codifican una bacteriocina similar a la colicina Ib de *E. coli* (WP\_062877260) y factores de virulencia ya descritos como un sistema de secreción de tipo IV, previamente analizado por **Méndez y col., 2009** y una invasina presente en otras enterobacterias como *Y. pestis* (EIR59646), *Y. pseudotuberculosis* (WP\_050128752) y *E. tarda* (WP\_047059316).

### 5.1.2. Genes compartidos de forma exclusiva por las cepas *Y. ruckeri* Big Creek y SC09

Algunos de los genes específicos de las cepas Big Creek y SC09 (**tabla 3.3**) están relacionados con fimbrias, elementos bacterianos considerados habitualmente como factores de virulencia. Dentro de este grupo, se encuentran 4 genes implicados en la síntesis de fimbrias de tipo I similares en su conjunto al sistema Stf de *S. Typhimurium*, asociado con diferencias en virulencia y rango de hospedador de esta bacteria (**Emmerth y col., 1999**). Los genomas de ambas cepas presentan además una copia adicional de este cluster, la cual, es compartida también por el resto de cepas analizadas (**figura 5.1.A**). De la copia que es propia de Big Creek y SC09, los 2 primeros genes, *stfA* y *stfC*, también se encuentran en las demás cepas (**figura 5.1.B**), por lo que pudiera ser que dicha copia se originara por duplicación de la anterior, presente en los cinco genomas, y que en las cepas de serotipo O1 hubiera tenido lugar una delección de algunos genes.

Adyacente a estos genes *stf*, se encuentra un gen con función desconocida seguido de otro que codifica una ligasa del antígeno O del lípido A. Este último se localiza en el extremo 5' del cluster y en el mismo sentido de la transcripción en una de las copias (**figura 5.1.A**), pero en el extremo 3' y sentido opuesto de la transcripción en la otra (**figura 5.1.B**). Por otro lado el gen *stfE* también está ausente en una de las copias de *Y. ruckeri* Big Creek (**figura 5.1.B**). Es decir, parece que una de las copias del cluster es fruto de varios reordenamientos génicos, por lo que podría no ser funcional (**figura 5,1.B**).

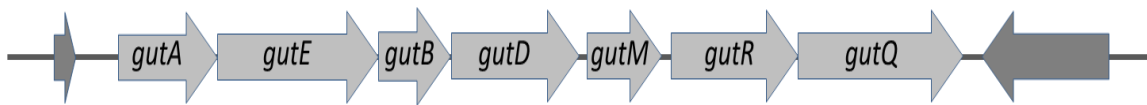


**Figura 5.1.** Análisis del cluster *stf* de *Y. ruckeri*, implicado en la síntesis de fimbrias de tipo I. **A)** Copia presente en todos los genomas analizados. **B)** Copia completa exclusivamente en Big Creek 74 (a excepción del gen *stfE*) y SC09, estando parcialmente truncada en las cepas 150, ATCC29473 y CSF007-82. A: *stfA*; C: *stfC*; D: *stfD*; E: *stfE*; F: *stfF*; G: *stfG*. La ligasa del antígeno O del lípido A ha sufrido una translocación y una inversión en una de las copias.

Se han identificado como exclusivos de las cepas *Y. ruckeri* SC09 y Big Creek, tres genes pertenecientes a la familia de toxinas con actividad insecticida, descrita por primera vez en *P. luminescens* (Sheets y Aktories, 2016). Los productos proteicos deducidos de estos genes en *Y. ruckeri* son similares a las proteínas TcdA, TcdB y TccC3 de *V. parahaemolyticus*, patógeno causante de necrosis hepatopancreática aguda en camarones peneidos (Tang y Ligthner, 2014). El análisis genómico de varias cepas de *Y. pestis*, *Y. enterocolítica* y *Y. pseudotuberculosis* reveló, en algunas de ellas, la presencia estos genes formando parte de una isla de patogenicidad denominada *tc-PAI*<sup>ve</sup> en el cromosoma bacteriano (Fuchs y col., 2008), a diferencia de *Serratia sp.* y *Y. frederiksenii*, en las que los genes que codifican este complejo de toxinas con actividad insecticida se localizan en un plásmido (Dodd y col., 2006). En *Y. ruckeri* Big Creek y SC09, esta región se encuentra flanqueada por elementos genéticos móviles y presenta un porcentaje GC del 54,2 %, valor muy distante del resto del genoma que es

aproximadamente 47,5 %. Estos hechos en conjunto, sumado a la evidencia de que en otras especies estos genes se localizan en plásmidos y en islas de patogenicidad, sugieren que se trata de una región genética móvil, adquirida probablemente por transferencia horizontal.

Por otro lado, se encontró que las cepas Big Creek 74 y SC09 comparten de forma exclusiva un cluster de 7 genes similar al *gutAEBDMRQ* de *E. coli*, implicado en la utilización de sorbitol (**figura 5.2.**), característica que se asocia a las cepas de *Y. ruckeri* del clásico serotipo II, equivalente al actual O2, (Davies y Frerichs, 1989). Los 3 primeros genes de este cluster, *gutAEB*, codifican las subunidades que conforman el transportador de sorbitol perteneciente al sistema fosfotransferasa dependiente de fosfoenolpiruvato (PTS), encargado de la incorporación y posterior fosforilación del sorbitol. El gen *gutD* codifica la enzima sorbitol 6-fosfato 2-deshidrogenasa que sintetiza D-fructosa 6-fosfato a partir de D-sorbitol 6-fosfato, mientras que *gutM* y *gutR* son 2 reguladores transcripcionales implicados en la activación y represión del operón *gut*, respectivamente. En el extremo 3' de *gutR* se localiza *gutQ*, el cual codifica una arabinosa 5-fosfato isomerasa implicada tanto en la síntesis de LPS como en la regulación de forma indirecta del operón *gut* (Meredith y Woodard, 2005). En el patógeno de plantas *Erwinia amylovora*, la presencia de este operón se ha asociado a la virulencia, pudiendo contribuir además a la especificidad de hospedador (Aldridge y col., 1997).



**Figura 5.2.** Organización genética del operón *gut* en las cepas *Y. ruckeri* Big Creek y SC09, implicado en la utilización del sorbitol. *gutAEB*: transportador de tipo PTS encargado de la incorporación y fosforilación del sorbitol; *gutD*: sorbitol 6-fosfato 2-deshidrogenasa; *gutM*: activador del operón; *gutR*: represor del operón; *gutQ*: arabinosa 5-fosfato isomerasa implicada en la síntesis de LPS.

Otro gen a destacar entre aquellos que son comunes a ambas cepas, es un regulador transcripcional perteneciente a la familia LysR. Este tipo de reguladores, modulan la expresión de diversos genes incluyendo aquellos implicados en la virulencia, el metabolismo, *quorum sensing* o motilidad (Maddocks y Oyston, 2008).

### 5.1.3. Genes únicos de la cepa *Y. ruckeri* Big Creek

Entre los genes únicos de la cepa *Y. ruckeri* Big Creek con una función conocida (**tabla 3.4**), se encuentran algunos pertenecientes a sistemas RM, reguladores transcripcionales, varias transferasas o proteínas implicadas en la biosíntesis de LPS. Entre otros, es de destacar el gen que codifica la subunidad proteolítica ClpP de la proteasa Clp dependiente de ATP, una enzima reguladora en diferentes bacterias, relacionada también con la virulencia, adaptación al ambiente y resistencia a

antibióticos en microorganismos como *S. aureus* (Frees y col., 2014) o el patógeno de peces *P. fluorescens* (Liu y col., 2015). Como ya se ha comentado anteriormente, es posible que algunos de estos genes únicos de Big Creek sean los responsables de su adaptación a salmón, puesto que los hospedadores de los que se aislaron las otras 4 cepas en estudio fueron trucha arcoíris y pez gato.

#### 5.1.4. Genes únicos de la cepa *Y. ruckeri* SC09

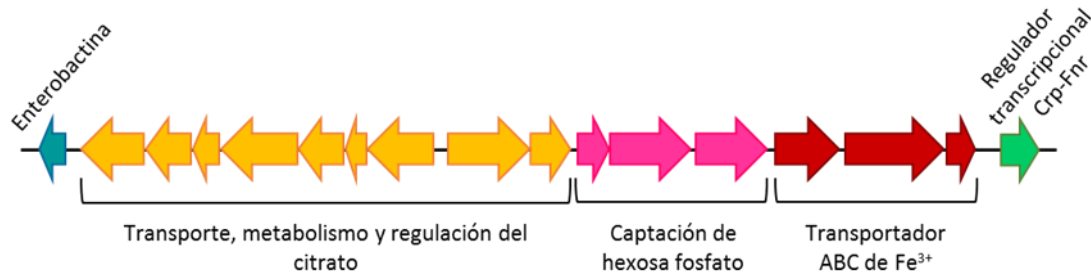
En el panel de genes exclusivos de la cepa *Y. ruckeri* SC09 (tabla 3.5), se encuentran muchos relacionados con la conjugación o sistemas de secreción, algunos pertenecientes a sistemas de RM, además de toxinas, entre otros.

Resulta interesante, el gen que codifica una timidilato sintasa, una enzima asociada a la virulencia en varios microorganismos como *S. aureus* (Kriegeskorte y col., 2014) o *S. Typhimurium*. En esta última especie, la mutación de este gen resulta en la incapacidad de la bacteria para crecer en líneas celulares de macrófagos y epiteliales humanas Hep-2, así como en la atenuación de la virulencia en infecciones de ratón. Por otro lado, merece la pena destacar un cluster de 12 genes relacionados con la biosíntesis de polisacárido de la pared celular, en particular del antígeno-O. La asociación de este último con la virulencia ha sido ampliamente estudiada en bacterias Gram-negativas (Bazaka y col., 2011).

Igual que se sugirió para Big Creek, entre estos genes exclusivos de la cepa SC09 pueden encontrarse aquellos responsables de la adaptación al hospedador donde fue aislada, el pez gato.

#### 5.1.5. Identificación de genes ausentes en el genoma de la cepa *Y. ruckeri* ATCC 29473 y presentes en las otras cuatro cepas estudiadas

De las cinco cepas incluidas en el estudio, la ATCC29473, cepa tipo, fue definida como avirulenta. En este sentido, resulta de gran interés analizar los genes de los que carece esta cepa pero que están presentes en las demás, con el fin de dilucidar la base genética de su atenuación. Así, se encontraron un total de 21 genes (tabla 3.6) que codifican proteínas con una función ya descrita, y que, probablemente, se hayan perdido durante la evolución de esta cepa. Curiosamente, 17 de estos 21 genes se encuentran adyacentes en los genomas de las otras cepas virulentas, formando una región de 19,5 Kb (figura 5.3). Esta región contiene un regulador transcripcional de la familia Crp-Fnr, un enzima relacionado con el sideróforo enterobactina y 3 agrupaciones génicas diferentes: una formada por 3 genes implicados en el transporte de hierro; 3 genes relacionados con la captación de hexosa fosfato; y un cluster de 9 genes implicados en la captación y metabolismo del citrato. Considerando que la mayoría de estos genes están relacionados con la virulencia en otras bacterias (Gray y col., 2006; Moisi y col., 2013; Urbany y Neuhaus, 2008), es posible que la ausencia de esta región pudiera explicar en cierta manera la atenuación de la cepa *Y. ruckeri* ATCC29473. Esta información puede resultar de interés para futuros estudios de la virulencia a nivel intraespecífico en *Y. ruckeri*.



**Figura 5.3.** Agrupación de 17 genes ausente exclusivamente en la cepa *Y. ruckeri* ATCC29473. En azul: sideróforo tipo enterobactina; en amarillo: genes implicados en el transporte, metabolismo y regulación del citrato; en rosa: genes relacionados con la captación de hexosa fosfato; en granate: genes relacionados con el transporte de hierro; en verde: regulador transcripcional de la familia Crp-Fnr.

## 5.2. Expresión diferencial de genes de *Y. ruckeri* en respuesta a cambios de temperatura.

### 5.2.1. Validación del método: Integración, estabilidad y efecto del transposón Tn5luxlac en el crecimiento de la bacteria

En este estudio, se ha construido con éxito el vector pUTluxlac portador del transposón Tn5luxlac, que contiene los operones *luxABCDE* y *lacZY*, ambos sin promotor ni terminador de la transcripción.

Los resultados obtenidos mediante Southern blot mostraron que el transposon Tn5luxlac se integra al azar en el cromosoma de *Y. ruckeri* y que de forma general, la región del plásmido pUTluxlac que no contiene el transposón no se inserta en el ADN de la bacteria, perdiéndose en el proceso de transposición y favoreciéndose así la estabilidad del transposón una vez éste se ha integrado en el genoma. No obstante, hay que señalar que entre los mutantes seleccionados, se identificaron 2 clones que portaban en el en su ADN el gen de la transposasa, *tnp*, perteneciente al plásmido y situado contiguo al transposón, por lo que se deduce que en algunas ocasiones el plásmido si puede incorporarse al genoma de la bacteria.

Por otro lado, el hecho de que después de más de 100 generaciones el número de células resistentes a kanamicina de un transconjugante de la genoteca seleccionado al azar, fuera similar al obtenido en medio sin el antibiótico indica que, al menos, en *Y. ruckeri*, este sistema de transposición es estable a lo largo del tiempo, como era de esperar, puesto que el gen que codifica la transposasa, responsable de la transposición, queda en el plásmido que, al ser incapaz de replicarse en *Y. ruckeri*, se pierde.

La expresión de los genes *lux* con la consecuente producción de luminiscencia, es un proceso energéticamente costoso para la bacteria, lo cual podría tener un efecto negativo en su crecimiento. No obstante, la curva de crecimiento de varios de los mutantes que tenían integrado en su genoma el transposón Tn5luxlac fue semejante a la de la cepa parental, indicando que la expresión del operón *lux* contenido en este

transposón, cuando se encuentra en una única copia en el genoma, no afecta al crecimiento de *Y. ruckeri*.

Una ventaja que tiene la utilización de sistemas indicadores de expresión génica que se integran en el genoma de la bacteria, en relación a los presentes en plásmidos replicativos, como el utilizado previamente en *Y. ruckeri* (Méndez y Guijarro, 2013), es la estabilidad de los genes indicadores, ya que para su mantenimiento no es necesaria la presencia de procesos de selección con antibiótico. Además, estos sistemas también ofrecen la posibilidad de cuantificar la actividad de promotores, en este caso a través de la emisión de luminiscencia o de la cuantificación de la actividad  $\beta$ -galactosidasa, al encontrarse en una única copia, a diferencia de lo que ocurre cuando estos operones están integrados en plásmidos multicopia en los que, la actividad enzimática es resultado de expresión de un mismo promotor presente en un número de copias desconocido.

A la vista de las propiedades y características que presenta el vector pUT*luxlac* y teniendo en cuenta que puede replicarse en cualquier cepa de *E. coli* que posea la proteína Pir y comportarse como suicida en ausencia de ella, este vector constituye una herramienta útil para la introducción del transposón Tn5*luxlac*, de forma estable, sin afectar al crecimiento, en otras bacterias Gram negativas además de en *Y. ruckeri*, con el fin de construir genotecas de mutantes portadores de fusiones transcripcionales y estudiar la expresión de los genes seleccionados mediante la cuantificación de la luminiscencia o la actividad  $\beta$ -galactosidasa.

### 5.2.2. Identificación de genes que se expresan más a 18 °C que a 28 °C

De los 10.434 mutantes analizados, procedentes de las dos genotecas obtenidas mediante transposición, se seleccionaron un total de 168 clones que presentaron una mayor actividad  $\beta$ -galactosidasa en medio EMB a 18 °C que a 28 °C.

No fue posible la identificación mediante secuenciación de todos los clones seleccionados en la genoteca tanto de cefotaxime como de eritromicina. Esto es probablemente consecuencia de que, a pesar de haber utilizado diferentes enzimas de restricción en la digestión del ADN genómico de los mutantes para posteriormente integrarlo en el plásmido pUC19 para su secuenciación, en algunos casos el fragmento de DNA, resultante de la restricción fue demasiado grande para su clonación. Por otro lado, como es habitual en este tipo de análisis, un porcentaje importante de los mutantes secuenciados resultaron ser idénticos a otro previamente identificado. En estos casos, el sitio de inserción del transposón fue el mismo, lo que podría indicar que estos clones proceden de una célula inicial que después de la conjugación se dividió.

En algunos de los clones seleccionados, la inserción del transposón tuvo lugar en genes contiguos o pertenecientes a un mismo cluster. Este es el caso de cuatro *loci* que forman parte de un cluster implicado en la síntesis del ácido legionamínico. Estos resultados establecen que la expresión de los genes pertenecientes a este cluster es

claramente mayor a 18°C que a 28°C confirmando la expresión diferencial del mencionado cluster en respuesta a temperatura.

Otro hecho interesante, es que uno de los genes identificados fue el codificante de la proteasa Yrp1 de *Y. ruckeri*, implicada en la virulencia y descrito previamente por **Fernández y col. (2003)** como un gen que se expresa más a 18 °C que a 28 °C, lo que indica que el sistema de selección empleado en la búsqueda de genes de *Y. ruckeri* con una mayor expresión a 18 °C que a 28 °C es adecuado.

El análisis de las secuencias obtenidas a partir de los mutantes seleccionados, permitió identificar los productos proteicos deducidos de los genes interrumpidos en cada caso. A continuación, se comentan las características más significativas de aquellos que resultaron de mayor interés, por el potencial papel que pudieran tener en relación con la virulencia de la bacteria o con su fisiología.

- **Genes relacionados con cambios ambientales**

Uno de los clones identificados de la genoteca tiene mutado el gen *yfiN* que codifica la enzima **diguanilato ciclasa YfiN** (OEU26487.1), situada en la membrana interna de las bacterias e implicada en la síntesis del mensajero di-GMP cíclico (c-di-GMP), una molécula cuya función principal es controlar la transición entre los estilos de vida sésil y motil en respuesta a cambios ambientales (**Römbli y col., 2013**). En *P. aeruginosa*, patógeno oportunista causante de fibrosis quística, así como en *E. coli* uropatogénica, el operón *yfiBNR* está implicado en la formación de biofilm, lo que se correlaciona con la colonización y persistencia de la infección en estos patógenos (**Xu y col., 2016; Raterman y col., 2013**).

Otros dos genes relacionados con la adaptación al ambiente son los que codifican una **glicosiltransferasa** (OEU24749.1) y una **metiltransferasa dependiente de S-adenosil metionina** (SAM). Estos genes se encuentran contiguos en el genoma de *Y. ruckeri* 150, separados tan solo por 5 pb, lo que indica que muy probablemente estén formando un operón, y que por tanto, el promotor seleccionado en ambos casos haya sido el mismo. En la literatura, existen varios ejemplos de glicosiltransferasas asociadas a la virulencia, como son las codificadas por los genes *lgtB* y *lex-1* del patógeno porcino *Haemophilus parasuis*, implicadas en la síntesis de lipooligosacáridos, un tipo de LPS característico de algunas bacterias Gram-negativas. Los mutantes defectivos en estas enzimas presentaron lipooligosacáridos truncados y una marcada reducción en la adherencia y capacidad invasiva de células PK-15 de cerdo (**Zhou y col., 2016**). Además, *Streptococcus mutans*, posee 3 glicosiltransferasas, que son consideradas factores mayores de virulencia por su implicación en la síntesis del exopolisacárido de la matriz que conforma el biofilm y que contribuye de forma relevante al desarrollo de la caries (**Bowen y Koo, 2011**). Un gran número de toxinas descritas en bacterias como *Clostridium difficile*, *E. coli*, *Legionella sp.*, *Photorhabdus sp.* y también *Yersinia sp.*, tienen actividad glicosiltransferasa (**Wang y col., 2016; Jank y col., 2015a**). En *Y. ruckeri*, se ha caracterizado recientemente la toxina Afp18 (antifeeding profage like protein 18) y se ha demostrado que la inyección de su

dominio glucosiltransferasa en embriones de pez cebra, bloquea el proceso de gastrulación (Jank y col., 2015b). Por otro lado, está descrito que la metiltransferasa dependiente de SAM Rv1405c de *Mycobacterium tuberculosis*, con una mayor expresión del gen que la codifica *in vivo*, juega un papel importante en la adaptación de la bacteria al ambiente hostil dentro de los macrófagos, y se cree que esté implicada en la biosíntesis o estabilidad de la pared bacteriana (Healy y col., 2015). Ye y col., (2016), asociaron la presencia de una metiltransferasa dependiente de SAM, entre otros factores, a cepas hipervirulentas de *K. pneumoniae* causantes de absceso hepático piógeno invasivo. Por todo lo expuesto, cabe pensar que este operón en *Y. ruckeri* tenga cierta relevancia en términos de virulencia.

- **Reguladores transcripcionales**

Entre los clones secuenciados, se han localizado 3 reguladores transcripcionales, que merecen especial atención por ser claves en la respuesta bacteriana a señales tanto intra como extracelulares, y por lo tanto, en la capacidad de adaptación al entorno.

Uno de ellos codifica una **Serina/Treonina proteína quinasa** (OEU26573), homóloga al factor regulador anti sigma RsbW de *Y. frederiksenii*, cuya función es la de regular el factor de transcripción alternativo sigma B, que a su vez regula una variedad de procesos como la esporulación, la respuesta al estrés, la biosíntesis de flagelos, la producción de pigmentos y la virulencia (Hughes y Mathee., 1998). Un segundo clon que resultó muy interesante fue el mutante en el gen que codifica una **proteína reguladora de respuesta** (OEU25024) **homóloga a YsrR** de *Y. enterocolitica*. Este gen forma parte del sistema de dos componentes YsrRS, que en *Y. enterocolitica* regula la expresión del sistema de secreción de tipo III (SSTIII) Ysa-Ysp, de localización cromosómica (Walker y Miller, 2004) En el genoma de *Y. ruckeri* 150, los genes homólogos a los del sistema *ysa-ysp* se localizan adyacentes al extremo 5' del gen *ysrR*. Muchas bacterias patógenas utilizan SSTIII para inyectar proteínas efectoras en el citosol de la célula huésped con el objetivo de modular diversas funciones celulares en beneficio del patógeno (Galán y col., 2014). De hecho, el sistema *ysa-ysp* se localiza tan solo en cepas de *Y. enterocolitica* pertenecientes al biotipo 1B, el más virulento, estando ausente en otros biotipos así como en especies de *Yersinia* consideradas no patógenas, como son *Y. aldovae*, *Y. kristensenii*, *Y. bercovieri*, *Y. frederiksenii*, *Y. inetermedia* y *Y. moratelli*, (Foultier y col., 2002). El hecho de que en *Y. enterocolitica* el sistema *ysa-ysp* esté activo tan solo a baja temperatura, junto con que la mutación en el gen *ysaV* resultara en una disminución de la virulencia de esta bacteria en ratones cuando fue inoculada por vía oral, pero no por vía intraperitoneal, sugiere que este sistema tiene un papel relevante en la fase temprana del proceso infeccioso (Haller y col., 2000).

Otro regulador identificado es el represor *acrR*, el cual se discutirá ampliamente en el **apartado 5.5.1.**



- **Transporte de moléculas**

El intercambio de moléculas entre el interior y el exterior celular, es básico para el correcto funcionamiento de la célula. Relacionados con este proceso, se han identificado 3 genes inducidos específicamente a 18 °C.

Uno de ellos codifica una **proteína transportadora de magnesio, cobalto y níquel**, denominada **MgtE** (OEU26742). Además de estar implicada en el transporte de los citados elementos, en el patógeno oportunista *P. aeruginosa* es capaz de modular la virulencia (Anderson y col., 2010; Coffey y col., 2014). Concretamente la proteína MgtE inhibe la expresión de genes del SSTIII, lo que disminuye la citotoxicidad del patógeno pero favorece el establecimiento del biofilm durante la fibrosis quística (Anderson y col., 2010).

El segundo gen identificado codifica un **transportador de la superfamilia MFS** (OEU26751). La superfamilia MSF está formada por un grupo muy extenso de transportadores secundarios, y tiene un papel crucial en multitud de procesos fisiológicos, transportando un amplio espectro de sustratos a través de la membrana vía difusión facilitada, simporte o antiporte (Yan, 2015). En *V. cholerae* estos sistemas de expulsión están implicados además de en la resistencia a antibióticos, en la virulencia de la bacteria (Chen y col., 2013). En *Y. ruckeri*, junto al gen que codifica este transportador se sitúa otro, en su extremo 5', que codifica un regulador de la familia LysR, lo que sugiere que esta proteína podría estar modulando su expresión.

Finalmente, se seleccionó un mutante en el gen que codifica la **fosfoporina PhoE** (OEU26976), un tipo de canal de difusión anión-selectivo inducido bajo limitación de fosfato. Aunque otras porinas, como OmpC y OmpF, han sido descritas como relacionadas con la virulencia en multitud de trabajos (Bernardini y col., 1993; Tsai y col., 2011; Hejair y col., 2017), en el caso de PhoE, apenas hay información al respecto, y esta relación no está clara. Así, por ejemplo, en *S. Typhimurium*, a pesar de que *phoE* es inducido *in vivo*, no está implicado en la virulencia de la bacteria en un modelo murino (Janssen y col., 1995), sin embargo, en *V. cholerae* se ha establecido que la fosfoporina VCA1008, que comparte un 69 % de similaridad en su secuencia nucleotídica con PhoE de *E. coli* (Goulart y col., 2009), juega un papel esencial en la invasión de ratón (Osorio y col., 2004).

- **Transporte y metabolismo de carbohidratos**

En este grupo se encuentra el mutante en el gen *mglA*, que codifica la proteína identificada como el **componente MglA**, de unión a ATP, **de un transportador ABC de galactosa/metilgalactósido** (OUE26755.1). Este gen forma parte del operón *mglBAC* encargado de la captación y transporte de galactosa al interior celular (Harayama y col., 1983). En *Y. ruckeri*, al igual que en otras enterobacterias, en el extremo 5' del operón *mglBAC*, se encuentra el gen *galS* que codifica un represor del mismo.

Merece la pena destacar también, un mutante en el gen que codifica ella **enzima 4- $\alpha$ -glucanotransferasa, MalQ** (OEU26314.1). Este gen forma parte del operón *malPQ*, en el que *malP* codifica una maltodextrina fosforilasa. En el extremo 5' del operón y en sentido opuesto de la transcripción, se encuentra el gen *malT*, que codifica el regulador transcripcional positivo MalT, y que junto con *malPQ*, forma parte del regulón maltosa. Este sistema es el responsable de la adquisición y metabolismo de polímeros de glucosa (maltodextrinas), los cuales se cree que son el sustrato nutricional de preferencia de *E. coli* tanto en sus hospedadores como en el medio ambiente (Boos y Shuman, 1998). En *V. cholerae* se ha visto que la maltosa tiene un papel importante en la regulación de la expresión de genes de virulencia, y *malQ* es esencial para la producción de estos factores regulados por maltosa, así como para la completa virulencia de la bacteria (Lang y col., 1994). El metabolismo de los azúcares se ha asociado a la capacidad de colonización en distintos patógenos como *E. amylovora* o *Streptococcus* del grupo A (Bogs y Geider, 2000; Shelburne y col., 2008), por lo que sería necesario la realización de ensayos de virulencia para determinar si alguno de los genes descritos en este apartado juega un papel similar en *Y. ruckeri*.

- **Componentes de la membrana o pared celular**

Relacionados con la envuelta celular se identificaron 6 clones:

Tres de ellos, tienen interrumpidos los genes que codifican una **D-glicero-D-manoheptosa 1-fosfato guanosiltransferasa** (OEU25698.1), una **UDP-N-acetilglucosamina 4, 6 deshidratasa** (OUE25693.1) y una proteína de membrana con posible función de **polimerasa del antígeno O** (ABY48117.1). Estos genes se encuentran incluidos en un cluster relacionado con la síntesis del ácido legionamínico, componente del LPS. Este cluster, tal y como se describió en el **apartado 5.1.1**, se encuentra en las cepas de serotipo O1 de *Y. ruckeri* incluidas en este trabajo pero no en los demás serotipos. Como también se ha comentado anteriormente, resulta curioso que este cluster no se encuentra en otras especies de *Yersinia*, pero sí en múltiples bacterias acuáticas, muchas de ellas patógenas. En *V. fisheri* se ha relacionado el LPS con la colonización del órgano luminiscente de su hospedador simbiote, la sepia *Euprymna scolopes* (Post y col., 2012).

Por otro lado, se encontró un mutante que tiene interrumpido un gen que codifica una **glicosiltransferasa** (OEU24187.1), anotada por mediante el programa RAST como proteína **ArnC** de **resistencia a polimixina**. La polimixina es un antibacteriano producido por *Paenibacillus polymyxa*, una bacteria Gram positiva aislada de suelo, raíces de plantas y sedimentos marinos (Lal y Tabacchioni, 2009). En clínica, la polimixina se utiliza en determinados casos contra bacterias multirresistentes (Evans y col., 1999). En *Y. ruckeri*, el gen *arnC* se encuentra flanqueado en su extremo 5' por una glicosil translocasa (flipasa) y en el 3', por otra glicosiltransferasa. Ambos genes, en el mismo sentido de transcripción que *arnC*, se solapan 3 pb con éste, lo que sugiere que pueden formar un operón. Además, en conjunto, estos 3 genes tiene un porcentaje GC de 37,6 %, muy distante del valor medio GC del genoma de *Y. ruckeri* 150 que se encuentra en el 47,4 %. Junto a esto, hay que señalar que este cluster de *Y. ruckeri* es

similar al que está presente en los fagos ST64T y ST104 de *Salmonella* (según el análisis mediante el programa RAST), lo que apoya la teoría de que estos genes pudieran haber sido adquiridos por *Y. ruckeri* mediante transfección a partir de bacterias portadoras de los mismos que cohabiten con *P. polymyxa*.

Otros genes con mayor expresión a 18 °C que a 28 °C son los codificantes de **una O-aciltransferasa** de polisacáridos de superficie (OEU26581.1) y una **polisacárido deacetilasa** (OEU25943.1), posiblemente implicada en la síntesis de peptidoglicano. Esta última proteína, no parece tener ortólogos en otras especies del género *Yersinia* y sin embargo, sí en bacterias acuáticas como *Photobacterium jeanii*, *V. vulnificus*, *Vibrio fortis*, o *Flavobacterium succinicans* con las que comparte un 70 %, 64 %, 62 % y 51 % de identidad, respectivamente. En *Streptococcus iniae*, la polisacárido deacetilasa Pdi es esencial para la virulencia de este patógeno, siendo los mutantes en *pdi*, más sensibles al efecto de la lisozima y a la fagocitosis disminuyendo su capacidad de adhesión y colonización (Milani y col., 2010)

- **Osmorregulación**

**OsmY** (OEU26500), es una proteína periplásmica y el gen que la codifica es inducible en condiciones de hiperosmolaridad (Yim y Villarejo., 1992). Este gen será posteriormente analizado en el **apartado 5.5.1.2.**

- **Otros genes identificados**

En este grupo se encuentra un mutante en el gen que codifica la **antitoxina StbD** (OUE25145.1), del sistema TA StbD/E. Los sistemas TA, tal y como se describe en el **apartado 5.1.1.**, favorecen el mantenimiento de regiones génicas durante la segregación. Aunque usualmente estos sistemas están asociados a plásmidos de bajo número de copia, donde la pérdida del mismo supone la ausencia de la antitoxina y la consecuente activación de la toxina que inducirá la muerte celular, también se pueden encontrar formando parte del cromosoma bacteriano (Guglielmini y col., 2008; Fozo y col., 2010; Leplae y col., 2011) donde están implicados en la estabilización de elementos conjugativos integrativos (Wozniak y Waldor, 2009), disminuyendo las deleciones a gran escala (Szekeres y col., 2007), actuando como un sistema anti-fagos (Fineran y col., 2009; Blower y col., 2011) o como un mecanismo de control que ayuda a la bacteria a hacer frente a distintos tipos de estrés (Gerdes y col., 2005, Nieto y col., 2010; Liroy y col., 2012). Si bien es cierto que durante mucho tiempo se pasó por alto la posibilidad de que los sistemas TA pudieran estar implicados en la virulencia, son cada vez más los estudios que los relacionan directa o indirectamente con el proceso patológico ocasionado por diversas bacterias (para revisión Lobato-Márquez y col., 2016). En *Y. ruckeri* 150, concretamente, el locus *stbD* se encuentra flanqueado por genes *tra* y *trb*, relacionados con la transferencia de plásmidos por conjugación, lo que sugiere que en este caso pueda estar implicado en la estabilidad de este sistema de transferencia horizontal.

Otro clon identificado, tiene mutado el locus que codifica la **proteína de transposición C, TnsC** (OEU24391.1), similar al de la proteína Tn7 del transposón *Tn7*, cuya función es regular la transposición de la transposasa heterodimérica Tn7 codificada por los genes *tnsA* y *tnsB* con los que se encuentra en operón (Choi y col., 2014). Los transposones tipo *Tn7* están extendidos en diversas bacterias y pueden actuar a modo de sistema base sobre los que se inicia la formación de islas de patogenicidad, permitiendo su posterior transposición a lugares determinados del cromosoma (*attTn7*) (Parks y Peters., 2007; Peters y col., 2014).

Uno de los tranconjugantes seleccionados tiene interrumpido el gen *damX*, el cual se encuentra formando parte de un operón que contiene genes con funciones heterogéneas. La proteína **DamX** (EEP98349.1), que contiene un dominio de unión a peptidoglicano denominado PSOR, parece estar implicada en el proceso de división celular (López-Garrido y col., 2010; Arrends y col., 2010). En *S. Typhimurium*, mutantes defectivos en *damX* resultaron ser más sensibles a sales biliares (López-Garrido y col., 2010), lo que sugiere que esta proteína pudiera tener un papel en la resistencia de la bacteria a las sales biliares y por ello una relación indirecta con la virulencia en patógenos intestinales. Además, mutaciones en *damX* han sido asociadas a deficiencias en la invasión, en *Salmonella typhi* (Leclerc y col., 1998) y *E. coli* uropatogénica (Khandige y col., 2016).

Varios de los genes identificados codifican proteínas hipotéticas. No obstante, en ocasiones, analizando su contexto genético puede inferirse aunque sea de forma teórica su función. Así, el gen que codifica la **proteína hipotética OEU24382**, se encuentra probablemente formando operón con el gen codificante de una GTP pirofosfoquinasa, homóloga a RelA/SpoT, con el que se solapa en 3 pb. Esta proteína se activa en situaciones de estrés por falta de nutrientes y a su vez, activa la síntesis del análogo de guanosina hiperfosforilado (p)ppGpp, que actúa de segundo mensajero desencadenando lo que se conoce como respuesta estricta (stringent response) que provoca efectos pleiotrópicos (Brown y col., 2016). Esta respuesta está asociada a la virulencia en multitud de bacterias (Klinkenberg y col., 2010; Nguyen y col., 2011; Zhu y col., 2016). Por otro lado, se ha observado que la **proteína hipotética OEU24387** posee un dominio PDDEXK\_7 (pfam04411), perteneciente a la familia de las nucleasas, cuya función se cree que es la restricción dependiente de metilación. Este gen parece ser el segundo de un operón en el que el primer componente codifica una proteína homóloga a una ATPasa tipo AAA implicada en la reparación del ADN. Finalmente, la **proteína hipotética KGA49879** parece estar formando operón con una celulosa sintasa, otras dos proteínas hipotéticas y una  $\beta$ -manosidasa, lo que sugiere que podría tener relación con el metabolismo de los azúcares.

Otro de los clones seleccionados tiene interrumpido un gen que codifica una **glucógeno fosforilasa** (OEU26568.1), que en *Y. ruckeri* parece encontrarse en operón con los genes que codifican una probable aciltransferasa, situado en el extremo 5' y una proteína hipotética en el extremo 3'. En hongos, se ha asociado la actividad

glucógeno fosforilasa a la virulencia, tal es el caso de *Magnaporthe oryzae*, (Badaruddin y col., 2013).

Como se ha mencionado previamente en este mismo apartado, uno de los genes identificados fue el codificante de la **metaloproteasa Yrp1** (CAC3917.1). Este gen, ya había sido estudiado por nuestro grupo de investigación mediante la aplicación de la tecnología IVET, habiéndose determinado en su momento la mayor inducción de su expresión a 18 °C respecto a 28 °C, además de su implicación en la virulencia de *Y. ruckeri* (Fernández y col., 2003).

Otro de los genes identificados que merece ser destacado es el que codifica una proteína perteneciente a la **familia de exoenzimas ADP-ribosil transferasas** (KGA50131.1). La ADP-ribosilación, es un proceso de modificación postraduccional muy conservado a lo largo de la evolución en procariontes y eucariontes, en el cual se altera la función y/o interacción de las proteínas (Grimaldi y col., 2015; Abplanalp y Hottiger, 2017). Muchas toxinas bacterianas pertenecen a esta familia de proteínas, como la Toxina iota de *Clostridium perfringens*, C2 y C3 de *Clostridium botulinum*, CDT de *Clostridium difficile*, DT de *Corinebacterium diphtheriae*, ExoA, ExoS y ExoT de *P. aeruginosa*, CT de *V. cholerae*, etc (Virulence factors of bacterial pathogens database: <http://www.mgc.ac.cn/VFs/>)

Finalmente, mencionar el gen que codifica la **esterasa YqiA** (AJI94468), el cual parece ser el último de un operón de 4 genes, cuyos otros integrantes codifican una ADP-ribosa pirofosfatasa (*yqiE*), una proteína de membrana (*yqiB*) y una AMPc fosfodiesterasa (*cpdA*). El gen que codifica esta última proteína parece estar implicado en la generación de AMPc, molécula que regula distintos procesos celulares, entre ellos, la expresión de numerosos factores de virulencia, como los genes *ctAB* y *tcpPH* de *V. cholerae* que codifican las toxinas CT y CTP, respectivamente (Skorupski y Taylor, 1997), o *vvhE* y *vvhBA* de *V. vulnificus* que codifican una metaloproteasa y una hemolisina, respectivamente (Choi y col., 2002; Jeong y col., 2001).

En conclusión, tras este proceso, podemos establecer que 7 de los 11 mutantes de *Y. ruckeri* analizados desde el punto de vista su virulencia, fueron atenuados, lo cual, junto con la selección de un mutante en el gen que codifica la proteasa Yrp, ya definida previamente como implicada en la virulencia de *Y. ruckeri* (Fernández y col., 2003), apoya el supuesto de que en bacterias patógenas de animales ectotermos, un número importante de genes relacionados con el proceso infeccioso, tienen una expresión mayor a temperaturas por debajo de su óptimo de crecimiento. En este sentido, varios genes que codifican proteínas de similar función a las identificadas en este trabajo, también han sido descritos como inducidos a baja temperatura. Así, entre los genes identificados por Bresolin y col. (2006), en *Y. enterocolitica*, se encontraron los que codifican un transpostador de magnesio y una probable porina. Entre los genes identificados en *P. syringae* por Arvizu-Gómez y col. (2013) como de expresión mayor a 18 °C que a 28 °C, se encuentran los relacionados con dos transposasas similares a Tn7, un transportador tipo MFS y un regulador transcripcional perteneciente a la familia LysR.

### 5.2.3. Caracterización fenotípica de los clones seleccionados en presencia de cefotaxima

Los mutantes de la genoteca construida con el transposón Tn5*luxlac* que fueron seleccionados en presencia del antibiótico cefotaxima, así como la cepa *Y. ruckeri* 150CTX, presentaron una serie de fenotipos diferenciales en relación a la cepa parental. Todos los clones estudiados presentaron agregación celular en medio líquido, formaron colonias en medio sólido que tenían afinidad por el colorante negro sudán, que se une principalmente a lípidos, y mostraron una mayor resistencia a antimicrobianos de diferente naturaleza. A nivel celular, también mostraron una morfología con aspecto filamentoso. No obstante, a diferencia del resto de los fenotipos, que fueron estables en ausencia de agentes selectivos, este último solo se pudo observar cuando las células eran cultivadas en presencia de cefotaxima, tal y como ha sido descrito para otras cefalosporinas en bacterias como *P. aeruginosa* (Labro y col., 1988) o *K. pneumoniae* (Kadurugamuwa y col., 1988). El hecho de que todos estos fenotipos estaban presentes también en la cepa 150CTX, parece indicar que la exposición a este antibiótico provocaba en las bacterias algún cambio en su envuelta celular. En este contexto, es sabido que la composición de la membrana externa de las bacterias Gram-negativas puede verse alterada durante la exposición a antimicrobianos (Lin y col., 2010; Moffatt y col., 2010; Suh y col., 2017), siendo una de las más modificaciones más frecuentes, la de la expresión de genes que codifican algunas porinas, o la restricción de su función debido a mutaciones (Pagés y col., 2008). En *E. coli*, las porinas mayoritarias OmpC y OmpF, muy similares en secuencia pero con distinto tamaño de poro (Nikaido, 2003), han sido asociadas en múltiples ocasiones a la resistencia a antibióticos. Así, la reducción en la expresión de *ompC* en esta bacteria tras la exposición a concentraciones subinhibitorias de kanamicina, contribuye a la resistencia a dicho antibiótico (Agafitei y col., 2010). De forma similar, la resistencia a cefalosporinas en *E. coli* y *S. Typhimurium* es consecuencia de una disminución en la expresión de la porina OmpC o de ésta en conjunto con OmpF (Medeiros y col., 1987; Lou y col., 2011; Pantel y col., 2016). Los resultados del perfil de resistencia a antibióticos de las células de *Y. ruckeri* previamente expuestas a concentraciones subinhibitorias de cefotaxima, presentan un perfil de resistencia a antimicrobianos diferencial, acorde con este planteamiento.

Además de los fenotipos descritos anteriormente, la característica más sorprendente que mostraron las cepas de *Y. ruckeri* expuestas a cefotaxima, fue la atenuación total en su virulencia, no siendo ninguna de las ensayos capaz de establecer un proceso infeccioso en alevines de trucha arcoíris cuando eran inoculadas por vía intraperitoneal en una dosis de  $10^2$  ufc, equivalente a la  $DL_{50}$  de la cepa parental, e incluso cuando esta dosis se elevó a  $10^7$  ufc. Durante estos ensayos, las cepas de *Y. ruckeri* utilizadas, no solo no produjeron mortalidad alguna de los individuos, sino que tampoco las bacterias pudieron ser recuperadas de los tejidos de los peces a las 48-72 h

postinfección. Parece por tanto, que la bacteria es eliminada por el sistema inmunológico poco después de la inoculación. Como se ha comentado anteriormente, la modificación en la permeabilidad de la membrana externa debido a la pérdida de determinadas porinas, puede resultar en un aumento de la resistencia a los antibióticos que penetren en la célula utilizando esa vía. La reducción en la expresión del gen *ompC* tras la exposición a concentraciones subinhibitorias de diferentes antibióticos o la pérdida total de la proteína OmpC por mutación en el gen correspondiente, además de un aumento en la resistencia a algunos antibióticos, suele conducir a una disminución en la virulencia de la bacteria. Ejemplos de ello se pueden encontrar en los trabajos de **Bernardini y col., 1993; Tsai y col., 2011; Pantel y col., 2016; Hejair y col., 2017,**

Con intención de averiguar si las porinas estaban involucradas tanto en la modificación de la resistencia a antimicrobianos como en la disminución de la virulencia de *Y. ruckeri*, se secuenciaron los genes que codifican las 4 porinas, *ompC*, *ompC2*, *ompF* y *phoE* similares a OmpC de *E. coli*, identificadas en el genoma de la cepa *Y. ruckeri* 150, tanto en la cepa parental como en 150CTX. El resultado indicó que las cepas de *Y. ruckeri* tratadas con concentraciones subinhibitorias de este antibiótico, no presentaban ninguna alteración en la secuencia de los genes en relación a la de aquellos de la cepa parental. Es por ello que cabe deducir que si alguna alteración existía en las citadas porinas, ésta debería estar a nivel de proteína, bien en su cantidad en la célula o en algún tipo de modificación postraducciona. Partiendo de este supuesto, se realizó un análisis del perfil proteico de las cepas *Y. ruckeri* 150 y 150CTX mediante SDS-PAGE, el cual mostró claramente la ausencia de 2 bandas de entre 8-20 KDa y 30-45 KDa, en la cepa 150CTX, que había sido expuesta al antibiótico. Teniendo en cuenta que los tamaños de las 4 porinas anteriores se sitúan aproximadamente entre los 40-41 KDa, pudiera ser que la banda de mayor tamaño fuera alguna de ellas. No obstante, la comparación futura de ambas cepas mediante separación bidimensional de proteínas, permitirá conocer con más precisión aquellas que aparezcan como diferenciales entre ellas.

A pesar del interés, para su estudio, que tienen los efectos del antibiótico cefotaxima en *Y. ruckeri*, lo cierto es que los mutantes seleccionados de la genoteca en presencia de este antibiótico, aunque válidos desde el punto de vista de su expresión diferencial en respuesta a temperatura, no son apropiados para el estudio de la implicación del gen inactivado en la fisiología y virulencia de la bacteria. Por esta razón, los 2 mutantes seleccionados para su caracterización con una mayor profundidad, pertenecen a la genoteca que había sido obtenida utilizando eritromicina como agente selectivo. Estos clones, tienen inactivados el gen *osmY* y el regulador transcripcional *acrR*, ambos con mayor expresión a 18 °C que a 28 °C. Mientras que el primer mutante fue elegido por su atenuación en la virulencia y por la relación directa del gen inactivado con el proceso infeccioso, el segundo resultó interesante para validar los estudios de regulación génica durante el establecimiento del proceso infeccioso.

#### 5.2.4. Caracterización fenotípica del mutante *Y. ruckeri* *acrR*<sup>-</sup>

Este mutante tiene interrumpido por el transposón Tn5*luxlac* el gen *acrR* que codifica la proteína reguladora AcrR, un represor local de la bomba de expulsión de productos tóxicos AcrAB-TolC. En *Y. ruckeri*, al igual que ocurre en *E. coli* y otras enterobacterias, el gen *acrR* se encuentra en un cluster junto con el operón *acrAB*, localizándose el gen *tolC* en otro lugar del cromosoma bacteriano (Grkovic y col., 2002).

La activación de la expresión del operón *acrAB* está mediada por los reguladores transcripcionales globales MarA, SoxS y Rob (Grkovic y col., 2002) además de por condiciones generales de estrés (Ma y col., 1996). Estas mismas condiciones estresantes, activan aún con más fuerza la expresión de *acrR* (Ma y col., 1996), cuyo producto proteico juega un papel modulador secundario sobre *acrAB*, evitando una expresión exacerbada de este operón (Ma y col., 1996). Además, AcrR, también regula negativamente la expresión de su propio gen (Su y col., 2007). En *Y. ruckeri*, la represión de la transcripción de *acrR* por su propio producto proteico parece clara, ya que durante los ensayos de regulación, la cepa complementada *acrR*<sup>+</sup>, a diferencia del mutante *acrR*<sup>-</sup>, no produjo luminiscencia alguna tanto en los experimentos *in vivo* como *in vitro*, indicando que la expresión de *acrR* se encontraba reprimida en este clon, probablemente por estar el citado gen en multicopia dentro del plásmido pGBM5. Como miembro de la familia TetR de reguladores transcripcionales, para ejercer su acción reguladora, el represor AcrR se une a una secuencia operadora que se sitúa en la región intergénica existente entre su propio gen y *acrAB* (Deng y col., 2013). Esta interacción bloquea la unión de la ARN polimerasa a la secuencia promotora de los genes regulados, impidiendo así la transcripción de los mismos. La región operadora consiste en una secuencia palindrómica incompleta de en torno a 24 pb, la cual se encuentra bien conservada en enterobacterias (Rodionov y col., 2001). En el presente trabajo, se ha identificado mediante análisis *in silico*, una secuencia de 13 nucleótidos que probablemente forme parte del operador de AcrR en *Y. ruckeri*, ya que es idéntica a los 13 primeros nucleótidos de la región de unión del represor al ADN en *E. coli* (Su y col., 2007).

La unión de determinadas moléculas, como por ejemplo algunos antibióticos, al regulador AcrR, provoca en él un cambio conformacional que afecta a su capacidad de interaccionar con el ADN, liberándolo del mismo, y por lo tanto permitiendo la transcripción del operón *acrAB* que hasta ese momento se encontraba reprimido (Deng y col., 2013). Un ejemplo de ello se encuentra en la bacteria patógena de peces *E. tarda*, en la que la expresión de este gen es inducida por los compuestos acrilflavina y metilviológeno (Hou y col., 2009). Contrariamente, la adición de acrilflavina al medio de cultivo del mutante *Y. ruckeri* *acrR*<sup>-</sup>, resultó en una disminución de la actividad del promotor de *acrR* lo que indica que el proceso de regulación en ausencia de la proteína represora, se rige por un mecanismo diferente al de *E. tarda*. El hecho de que la expresión del gen *acrR* no aumente en presencia de acrilflavina, concuerda con la



mayor sensibilidad a este compuesto mostrada por la cepa (**figura 4.17 D**). Todo ello indica que, la acrilflavina no interactúa con el represor AcrR de *Y. ruckeri*, permaneciendo éste unido a la región operadora y bloqueando así la expresión del operón *acrAB* y la suya propia.

Como ya se ha mencionado anteriormente, diferentes factores ambientales pueden inducir la sobreexpresión del operón *acrAB*. En este contexto, se ha visto que la temperatura juega un papel en la expresión de este operón. Así, **Kong y col. (2017)** demostraron que en *Laribacter hongkongiensis*, patógeno humano y de peces, la expresión del operón *acrAB* era mayor a 20 °C que a 37 °C. Del mismo modo, **Seoane y Levi (1995)** demostraron que en *E. coli* la transcripción de *acrAB* era mayor a 30 °C que a 37 °C, sugiriendo un papel de las bombas de multiresistencia en la adaptación al medio ambiente más que al tracto intestinal humano. Por el contrario, **Hartog y col. (2008)** vieron que en *S. Typhimurium* ocurría justamente lo contrario, la expresión del operón era mayor a la temperatura óptima de crecimiento de la bacteria, 37 °C, que a 30 °C, por lo que en este caso, la adaptación estaría orientada a aumentar las posibilidades de supervivencia de *Salmonella* en el interior del hospedador. Atendiendo a estos resultados, parece claro que la temperatura es un factor que regula la expresión de este sistema de expulsión de múltiples compuestos. En *Y. ruckeri*, la expresión de *acrR* es mayor a 18 °C, que a 28 °C. Acorde con **Ma y col. (1996)**, que establecen que distintas condiciones de estrés ambiental inducen la expresión de *acrAB* y *acrR*, sería de esperar que la temperatura entorno a la cual tiene lugar la infección, en el caso de *Y. ruckeri* 18 °C, sea un inductor del sistema, lo que favorecería el establecimiento de la bacteria en los tejidos del hospedador.

El sistema AcrAB-TolC de bacterias Gram-negativas, es responsable de la expulsión de numerosos compuestos de naturaleza diversa que resultan tóxicos para la bacteria. Entre ellos se encuentran antibióticos como tetraciclina, cloranfenicol, fluoroquinolonas,  $\beta$ -lactámicos, novobiocina, eritromicina, ácido fusídico o rifampicina, también colorantes catiónicos como bromuro de etidio, acrilflavina, cristal violeta o rodamina G6 y también surfactantes como SDS, sales biliares o Tween X-100 (**Nikaido, 1996**). Así, la inactivación de alguno de los genes del sistema, resulta en una mayor sensibilidad a una variedad de estos productos en distintas bacterias como *S. Typhimurium*, *Brucella suis* o *Y. ruckeri* (**Nikaido y Hall., 1998; Posadas y col., 2007; Navais, 2013**). Asimismo, la inactivación del represor *acrR* en *Y. ruckeri*, resultó en un aumento de la tolerancia de la bacteria frente a una batería de estos compuestos estructuralmente diferentes como la acrilflavina, ciprofloxacina, cloranfenicol, tetraciclina y el solvente orgánico n-hexano. Este resultado, indica que en ausencia del represor AcrR, la bomba AcrAB-TolC se encuentra desbloqueada y la célula aumenta su resistencia a compuestos que le resultan tóxicos, lo que ha sido apoyado por diversos autores (**Ma y col., 1996; Jellen-Ritter y Kern, 2001; Buckeley y col., 2006; Watanabe y Doukyu,**

2012). Además, el hecho de que la colonia del mutante *Y. ruckeri* *acrR*<sup>-</sup>, en medio TSA con el colorante azul de metileno, mostrara un aspecto blanquecino, a diferencia de las cepas parental y complementada que se tiñeron de azul (**figura 4.17 A**), corrobora que en el mutante la bomba *acrAB*-*TolC* se encuentra desbloqueada, favoreciendo la expulsión del colorante al exterior de la célula.

A pesar de que la bomba *AcrAB*-*TolC* participa en la expulsión de una gran variedad de compuestos, entre los que se encuentran incluso ciertos componentes derivados del hospedador como sales biliares, ácidos grasos, hormonas, productos del sistema inmune innato como péptidos catiónicos con acción antibacteriana, etc (**Ma y col., 1995; Ma y col., 1996; Thanassi y col., 1997; Burse y col., 2004; Elkins y Mullis, 2006; Hou y col., 2009; Padilla y col., 2010**), sí parece existir ciertas diferencias en cuanto a la especificidad del sistema según la especie bacteriana. Así la inactivación del gen *acrR* en *Y. ruckeri*, que como se vio incrementa la capacidad de resistencia a los compuestos en cuya expulsión la bomba está implicada, no resultó en una mayor resistencia a ciclohexano, a diferencia de lo que ocurre en *E. coli* donde la sobreexpresión del sistema *acrAB* aumenta la tolerancia a este compuesto (**Watanabe y Doukyu., 2014**). Tampoco el mutante *Y. ruckeri* *acrR*<sup>-</sup> mostró una resistencia mayor que la cepa parental a sales biliares o a los detergentes SDS o Tritón X-100. Sin embargo, cuando esta cepa fue complementada con el gen *acrR* en trans, aumentó la sensibilidad a las sales biliares, probablemente debido al efecto represor sobre la bomba *AcrAB*-*TolC*. En relación a lo anterior, mencionar que una mutación en el gen *acrA* de *Y. ruckeri* derivó en una mayor sensibilidad a las sales biliares, SDS y Tritón X-100 (**Navais, 2013**). Todo ello parece indicar que la bomba también está implicada en la expulsión de estos compuestos en esta bacteria. En el caso del mutante *Y. ruckeri* *acrR*<sup>-</sup>, pudo ocurrir, que el incremento en la tolerancia a estos surfactantes no fuera lo suficientemente elevado como para ser detectado en los ensayos realizados. Otra explicación, podría ser la existencia de sistemas adicionales, como otras bombas de expulsión, que participen junto a *AcrAB*-*TolC* en la resistencia a estos compuestos. En cualquier caso, el complejo sistema de regulación al que está sometido este sistema de expulsión dificulta en muchas ocasiones la interpretación de los resultados. De hecho, se ha observado que la sobreexpresión de *acrR* disminuye la producción de la molécula de señalización AI-2 en *E. tarda*, por lo que parece que *acrR*, no solo regula la expresión de *acrAB*, sino de otros sistemas celulares (**Hou y col., 2009**). Se ha sugerido que la bomba *AcrAB*-*TolC* podría transportar moléculas señal implicadas en el quorum sensing que no difunden fácilmente a través de la membrana (**Rahmati y col., 2002**).

*Y. ruckeri* es una bacteria cuyo proceso infeccioso parece iniciarse a través del tubo digestivo del pez (**Méndez y Guijarro., 2013**), un ambiente hostil al que las bacterias entéricas están adaptadas. Por ello, el sistema *AcrAB*-*TolC* podría ser clave para la colonización de este ambiente, tal y como ocurre en otras enterobacterias como *S. enterica* (**Lacroix y col., 1996; Prouty y col., 2004; Buckeley y col., 2006**). Varios

estudios demuestran que la interrupción de la expresión de la bomba AcrAB-TolC tiene un efecto atenuador de la virulencia de diversas bacterias patógenas Gram-negativas como son los patógenos humanos *S. Typhimurium* (Lacroix y col., 1996; Buckeley y col., 2006; Nishino y col., 2006), *K. pneumoniae* (Padilla y col., 2010), *Enterobacter cloacae* (Pérez y col., 2012), *Francisella turalensis* (Bina y col., 2008), el patógeno de peces *E. tarda* (Hou y col., 2009), o el patógeno de plantas *Erwinia amilovora* (Burse y col., 2004). El papel fisiológico de esta bomba podría ser la evasión de las moléculas perjudiciales para la bacteria, producidas por el hospedador, facilitando así la colonización de éste (Piddock, 2006). Sin embargo, hay excepciones a esta situación, como ocurre en *Y. pestis*, en la que, el sistema AcrAB no juega un papel esencial en el establecimiento de la infección (Lister y col., 2012). Se desconoce la implicación de la bomba AcrAB en la virulencia de *Y. ruckeri*, lo que sí se ha comprobado en este trabajo es que la mutación en el gen *acrR*, no supone una disminución de la virulencia de la bacteria en alevines de trucha arcoíris. Es decir, la sobreactivación de la bomba AcrAB-TolC no tiene un efecto atenuador de la virulencia de *Y. ruckeri*.

Finalmente indicar que el mutante *Y. ruckeri* *acrR*<sup>-</sup> mostró motilidad tipo *swimming* y *swarming* cuando la lactosa estaba presente en el medio de cultivo, no presentando la cepa parental motilidad alguna en estas condiciones. Este fenotipo revirtió en la cepa complementada. Recientemente, se ha establecido que AcrR participa en la regulación de la motilidad bacteriana mediada por flagelos, permitiendo a la célula escapar de los compuestos tóxicos (Kim y col., 2016). Por lo tanto, parece que el rol que esta proteína desempeña en la protección de la célula frente a elementos que le resultan perjudiciales, va más allá de la modulación de la expulsión de estos compuestos, estando implicada también en la quimiotaxis como mecanismo de escape de ambientes donde puedan existir compuestos que resultan nocivos. Así, en *E. coli*, la delección del gen *acrR*, incrementó la formación de flagelos y motilidad tipo *swimming* en comparación con la cepa salvaje, mientras que la motilidad tipo *swarming* no se vio afectada (Kim y col., 2016). Sin embargo, en el caso de la cepa mutante *Y. ruckeri* *acrR*<sup>-</sup>, la motilidad observada no fue el resultado de la mutación en el gen *acrR* sino consecuencia de la enzima  $\beta$ -galactosidasa, que escinde la lactosa en glucosa y galactosa, y que está codificada por el operón *lacZY* presente en el transposón Tn5*luxlac*. Esta afirmación se ve respaldada por el hecho de que la simple adición de glucosa al medio de cultivo hace que la cepa parental presente motilidad tanto de tipo *swimming* como *swarming*. La ausencia de movimiento en la cepa complementada AcrR<sup>+</sup> en presencia de lactosa se debe probablemente a la represión ejercida por parte de AcrR sobre el promotor del propio gen, como se puso de manifiesto en los experimentos de emisión de luminiscencia, que bloquea la expresión del operón *lacZY*, impidiendo la generación de glucosa a partir de la lactosa.

### 5.2.5 Caracterización fenotípica del mutante *Y. ruckeri* *osmY*<sup>-</sup>

*OsmY*, que ha sido definida como una proteína periplásmica cuya síntesis se induce en condiciones de hiperosmolaridad (Yim y Villarejo., 1992), posee el dominio proteico BON (pfam04972) repetido dos veces en su secuencia aminoacídica. Este dominio se encuentra en una familia de proteínas implicadas en la protección frente a shock osmótico, y se cree que su función es la de anclaje a la membrana.

El gen *osmY* en *Y. ruckeri*, al igual que sucede en otras enterobacterias como *Y. pestis*, *E.coli* o *S. Typhimurium*, se encuentra flanqueado en su extremo 5' por un gen que codifica una proteína denominada "factor de liberación de la cadena peptídica 3", y en su extremo 3' por un ORF de pequeño tamaño. En *E. coli*, Wassarman y col. (2001), observaron que este ORF, compartía ciertas características con los ARNs de pequeño tamaño, no codificantes (sARN). No obstante, estos autores consideraron que, en este caso, el ARN transcrito funcionaba como un ARNm que codifica una proteína de 53 aminoácidos muy conservada, la cual posee un dominio YtjA de función desconocida.

En *Y. ruckeri*, la expresión del gen *osmY* aumentó significativamente tras la adición de 1,5 % de NaCl al medio de cultivo, lo cual va en concordancia con los resultados obtenidos previamente en *E. coli* (Yim y col., 1994), y corrobora en cierto modo, que en el patógeno de peces, *OsmY* también debe tener alguna función de importancia durante la exposición al estrés osmótico. Las enterobacterias tienen que lidiar en el intestino con altas osmolaridades producidas por la secreción, por parte del hospedador, de sales biliares y otros elementos como péptidos catiónicos con acción antibacteriana. En este sentido, se ha visto que en *E. coli*, tanto las sales biliares como los péptidos catiónicos activan la transcripción de *osmY* (Bernstein y col., 1999; Oh y col., 2000).

El crecimiento del mutante *Y. ruckeri osmY*<sup>-</sup> en TSB con un 3 % de NaCl, fue ligeramente diferente al de la cepa parental. Curiosamente, la pendiente de la curva de crecimiento durante la fase exponencial fue mayor en el mutante que en la cepa parental, igualándose ambas DO<sub>600</sub> cuando los cultivos entraron en fase estacionaria. La reversión de este fenotipo no se consiguió con la introducción del gen *osmY* en trans, fue necesaria también la introducción del gen *ytjA* lo que resalta la importancia de este gen así como su vinculación con el gen *osmY*, con el que, a la vista de los resultados, y acorde con la estructura genética, probablemente se encuentra formando un operón.

En un intento de evidenciar aún más las diferencias de crecimiento existentes entre *Y. ruckeri osmY*<sup>-</sup> y la cepa parental en condiciones de alta osmolaridad, se evaluó el crecimiento de estas en medio sólido con NaCl. Sin embargo, en esta ocasión, no hubo diferencia alguna, lo cual parece razonable si pensamos que, en realidad, el momento de observación de las bacterias en medio sólido corresponde a la fase estacionaria de crecimiento en medio líquido, donde ambas cepas se comportaron de forma similar.

El hecho de que las diferencias en crecimiento solo aparezcan en una fase concreta de la curva, junto con la compleja regulación a la que está sometido el gen *osmY*, en la que están implicados factores como RpoS, que modula la expresión de una multitud de genes (Vijayakumar y col., 2004), invita a especular que la ausencia de OsmY en la célula mutante pueda desencadenar algún mecanismo regulatorio de compensación ante el estrés osmótico, que derive en un incremento temporal de la tasa de crecimiento mientras los valores de osmolaridad se reajustan a las condiciones fisiológicas. No obstante, el resultado final indica que no hay una diferencia significativa en el crecimiento entre la cepa parental y mutante lo que determina que al menos, en *Y. ruckeri* el gen *osmY* no juega un papel relevante en el mantenimiento del equilibrio osmótico.

En *Y. ruckeri*, la mutación del gen *osmY* afectó seriamente a la virulenta de la bacteria, siendo la cepa *Y. ruckeri osmY* incapaz de producir un proceso infeccioso en alevines de trucha arcoíris. El hecho de que en la cepa complementada con los genes *osmY* e *ytjA*, se recuperase parcial y no totalmente la virulencia puede ser debido a un efecto de dosis génica, al haber sido introducidos estos genes en un plásmido multicopia, o bien, es posible que el plásmido utilizado en la complementación sea inestable y se vaya perdiendo durante el proceso infeccioso. La relación, al menos indirecta, de la proteína OsmY con la virulencia, ha sido descrita previamente en otras bacterias patógenas intestinales como *S. Typhimurium*, *E. coli* o *Cronobacter zakazakii* (Bader y col., 2003; Ye y col., 2015; Dong y Schellhorn, 2009). A diferencia de en *E. coli*, Zheng y col. (2015) proponen que en *S. Typhimurium* OsmY podría jugar un papel, no en la fase inicial de la infección, donde tendría que sobrevivir al estrés por sales biliares y péptidos con acción antibacteriana en el tracto gastrointestinal, sino en la fase tardía donde favorecería la supervivencia y multiplicación de la bacteria en los macrófagos.

### 5.2.6. Expresión diferencial de los genes *acrR* y *osmY* en relación a los órganos de trucha arcoíris

La luminiscencia emitida por las cepas mutantes en los genes *acrR* y *osmY* permitió analizar su expresión en los diferentes tejidos del pez. Este análisis se abordó de tres formas distintas: en un medio de cultivo líquido con los órganos de trucha arcoíris en suspensión, en un medio de cultivo sólido con los órganos depositados en la superficie y directamente *in vivo* durante la infección en el pez. Respecto a esta última vía de estudio, cabe mencionar la imposibilidad de seguir el proceso infeccioso en un mismo individuo a lo largo del tiempo pues para visualizarlo mediante la emisión de la luminiscencia por parte de la bacteria, hay que proceder a sacrificar al individuo. Por ello, estos estudios plantean mayores dificultades de ejecución y análisis en comparación con otros modelos animales como el de ratón.

El análisis de la expresión *in vivo* del gen *acrR* se llevó a cabo monitorizando la luminiscencia emitida por el mutante *Y. ruckeri acrR-*, mientras que para estudiar la

expresión el gen *osmY* se utilizó la cepa complementada *osmY<sup>++</sup>*, debido a la incapacidad del mutante en este gen para producir un proceso infeccioso en el pez. Por otro lado, en estos ensayos, el mutante *Y. ruckeri* *acrR<sup>-</sup>* fue inoculado por vía intraperitoneal y por inmersión, a diferencia del mutante *osmY<sup>++</sup>* en el que se decidió no llevar a cabo la infección por esta última vía, debido a que para este clon, la reversión en cuanto a su capacidad virulenta mediante inyección intraperitoneal había sido tan solo parcial, y por tanto, no se esperaba un número significativo de individuos infectados por inmersión. Para ambas cepas, la luminiscencia comenzó a ser detectada a partir de las 48 h postinfección, sin duda debido a que antes de este tiempo la masa bacteriana no alcanzó el umbral necesario para que la luz emitida fuera detectada por el sistema IVIS Lumina (Méndez y Guijarro, 2013).

#### 5.2.6.1. Expresión diferencial del gen *acrR*

En los individuos inoculados con el mutante *Y. ruckeri* *acrR<sup>-</sup>*, independientemente de la vía de infección empleada, se apreciaron 2 patrones de luminiscencia generales: en algunos casos la mayor intensidad de luminiscencia se encontraba localizada en el hígado y la grasa que rodea las vísceras, en relación a otros tejidos u órganos; en otros casos, los peces mostraron una mayor luminiscencia en el intestino (figura 3.21). Méndez y Guijarro (2013), determinaron mediante luminiscencia la presencia de *Y. ruckeri* a lo largo del tubo digestivo durante el proceso infeccioso, lo cual apoya los resultados obtenidos con este mutante. Por otro lado, teniendo en cuenta que distintos compuestos tóxicos son capaces de inducir el sistema AcrAB-TolC (Ma y col., 1996; Hou y col., 2009), y que, el tejido adiposo y hepático son acumuladores de toxinas para el organismo (La Merrill y col., 2012, Gilbert y col., 2015), es posible que en estos órganos dicha maquinaria esté sobreexpresada, y por tanto la transcripción de *acrR* esté también muy activada para controlar el sistema. En este contexto, cabe la duda de si las diferencias de luminiscencia observadas *in vivo* son realmente debidas a diferencias de expresión del gen *acrR* en los distintos tejidos del pez, o por el contrario son producidas por una distribución preferencial de la bacteria en unos órganos respecto a otros. Los resultados de los ensayos de regulación en medio líquido en presencia de distintos órganos, corroboraron lo observado *in vivo*, por lo que parece claro que la mayor luminiscencia observada en el pez se debe a una mayor expresión de *acrR* en hígado y grasa, y no a una distribución preferencial de la bacteria en esos tejidos.

Los resultados de los ensayos con los órganos depositados sobre la superficie del medio, fueron en la misma línea que los anteriormente descritos, observándose una mayor luminiscencia alrededor del intestino e hígado. No obstante, resultó sorprendente que el tejido adiposo no indujera la expresión de *acrR*, a diferencia de lo ocurrido en medio líquido, con el tejido recién extirpado, e *in vivo*. Esto pudo ser debido a que en este caso, el tejido se ha mantenido durante más de 12 h en contacto

con el aire, y tal vez los procesos de oxidación alteran las características del tejido en relación a las que éste posee *in vivo*.

#### 5.2.6.2. Expresión diferencial del gen *osmY*

Los experimentos *in vivo* realizados con el mutante *osmY*<sup>-</sup> mostraron que durante los primeros días de la infección, la mayor intensidad de la luminiscencia se detectaba en el tubo digestivo, lo que puede corresponderse con una activación mediada por el estrés osmótico en ese órgano. Sin embargo, en algunos de los individuos muertos por septicemia, los valores más altos de luminiscencia fueron detectados en el tejido muscular, por lo que la expresión diferencial de *osmY* dentro del pez parece depender del estadio de la enfermedad. No obstante, la luminiscencia observada en el músculo podría ser fruto de una mayor densidad de la bacteria en este tejido durante las fases avanzadas de la enfermedad y no de una mayor inducción de la expresión de *osmY* en el mismo. Para resolver esta cuestión se realizaron ensayos *ex vivo* en medio sólido sobre el que se depositaron distintos órganos de trucha arcoíris. Con esta metodología, en la que el crecimiento confluyente de la bacteria en la superficie del medio hace que la concentración de ésta sea muy similar en todos los puntos, nuevamente, la mayor intensidad de luminiscencia fue detectada alrededor del músculo en relación a los demás órganos evaluados. Atendiendo al conjunto de resultados anteriores, podemos afirmar que el tejido muscular es un inductor de la síntesis de OsmY, lo cual apunta a la existencia de algún factor presente en el mismo, que activa la expresión de dicho gen. Por último, cuando se analizó la influencia de los órganos en suspensión en medio líquido, sobre la expresión del gen *osmY*, no solamente el músculo inducía su expresión, sino que también lo hacía la grasa y el hígado.

De forma general se puede decir que, el sistema de detección y cuantificación de la expresión genética basado en el operón *lux* que aquí se presenta, resulta útil en el análisis de la expresión de genes de *Y. ruckeri* en los distintos tejidos de trucha arcoíris, ya que en función del gen estudiado el patrón de expresión fue diferente. No obstante, pueden aparecer algunas discrepancias entre los análisis *in vitro* e *in vivo*, probablemente derivadas de las condiciones en las que se realiza cada ensayo y a las propias limitaciones que cada uno de ellos tiene.

En resumen, el vector pUT*luxlac*, portador del transposón Tn5*luxlac*, que contiene los operones *lux* y *lac* sin promotor ni terminador de la transcripción, resultó útil en la construcción de una genoteca de mutantes, en la que en muchos de los clones aislados se produjeron fusiones transcripcionales entre el promotor del gen interrumpido y dichos operones.

Este sistema, ofrece pues la posibilidad de, además de poder analizar directamente el efecto que ejerce la mutación de cada uno de los genes en la fisiología y virulencia de la bacteria, estudiar la regulación de su expresión.

El método de selección de mutantes en medio EMB mediante la detección de la actividad  $\beta$ -galactosidasa, permitió la identificación de un buen número de mutantes en genes cuya expresión fue mayor a 18 °C que a 28 °C, característica que se corroboró en medio líquido con el ensayo de la actividad  $\beta$ -galactosidasa. Sin duda la generación de nuevas genotecas y su análisis podría facilitar la identificación de nuevos genes con este tipo de regulación. Además, en función de las condiciones utilizadas en la selección, el sistema es útil para identificar otros genes relacionados o implicados en procesos metabólicos o de respuesta celular a cambios específicos.

Por otro lado, la detección de la luminiscencia emitida por estos mutantes, permitió valorar la actividad promotora de los genes de interés, siendo aplicable tanto para el estudio *in vitro*, en los que se determinó el efecto de distintos factores en los niveles de expresión génica, como para estudios *in vivo* y *ex vivo*. De esta forma, se pudieron determinar patrones de expresión diferenciales, de los distintos genes en relación a los tejidos de trucha arcoíris, lo cual supone una herramienta de gran utilidad para ahondar en la comprensión de la regulación de los genes que están implicados en el proceso infeccioso de esta bacteria.



## 6. Conclusiones



1<sup>a</sup>- El análisis comparativo de cinco genomas de *Y. ruckeri* reveló claras diferencias genéticas entre las cepas pertenecientes al serotipo O1 y las de serotipo O2, por lo que la adscripción a uno u otro serotipo no es meramente una diferencia debida a un número de antígenos. Estas diferencias quedan patentes en el hecho de que 268 genes fueron exclusivos de las primeras y 118 de las segundas.

2<sup>a</sup>- Mientras que las tres cepas de *Y. ruckeri* aisladas de trucha arcoíris resultan ser genéticamente similares entre ellas, la cepa Big Creek, aislada de salmón y la cepa SC09, aislada de pez gato, presentan 99 y 112 genes únicos, respectivamente, lo que apoya que la especificidad de hospedador tiene una base genética.

3<sup>a</sup>- Los resultados de la comparativa genómica indican que la cepa *Y. ruckeri* SC09, cuyo serotipo es desconocido, pertenece, probablemente, al serotipo O2, ya que en su genoma están presentes los genes implicados en la fermentación del sorbitol.

4<sup>a</sup>- La ausencia en la cepa tipo *Y. ruckeri* ATCC29473 de una región de ADN de 19,5 Kb, presente en el resto de las cepas virulentas estudiadas y compuesta por 17 genes, algunos de ellos directamente relacionados con la virulencia, puede explicar la incapacidad que tiene esta cepa para generar un proceso infeccioso en trucha arcoíris.

5<sup>a</sup>- El plásmido pUT mini-Tn5*luXlac* Km2, diseñado y generado en este trabajo, resultó útil para construir una genoteca de mutantes por transposición, posibilitando además el estudio de los factores que regulan los promotores de los genes interrumpidos mediante la cuantificación de la actividad  $\beta$ -galactosidasa y/o de la luminiscencia, tanto *in vitro* como *in vivo*.

6<sup>a</sup>- Se han identificado en *Y. ruckeri* un total de 40 genes diferentes, cuya expresión es mayor a 18 °C, temperatura entorno a la cual tiene lugar el proceso infeccioso, que a 28 °C, temperatura óptima de crecimiento de la bacteria, encontrándose que muchos de ellos están relacionados con la virulencia de la bacteria.

7<sup>a</sup>- La exposición de *Y. ruckeri* a concentraciones subinhibitorias del antibiótico cefotaxima, ocasionó la selección de clones que presentaron cambios en el perfil de proteínas analizadas mediante SDS-PAGE, diversas alteraciones fenotípicas como agregación celular, afinidad por el colorante negro sudán y diferencias en el perfil de resistencia a una batería de antibióticos, además de la pérdida de la virulencia.

8<sup>a</sup>- La expresión del gen *acrR*, que codifica el represor de la bomba de expulsión de productos tóxicos AcrAB-TolC, es mayor a 18 °C que a 28 °C. Su inactivación, confiere a la bacteria, una mayor resistencia a compuestos como acrilflavina, ciprofloxacina, cloranfenicol, tetraciclina y n-hexano.

9<sup>a</sup>- Aunque el gen *acrR* se expresa en los tejidos de trucha arcoíris, preferencialmente en hígado, tejido adiposo e intestino, su inactivación no tiene ningún efecto sobre la virulencia de *Y. ruckeri*.

10<sup>a</sup>- La expresión del gen *osmY* es mayor a 18 °C que a 28 °C y en presencia de NaCl. La reversión del efecto de su mutación solamente se da cuando además del propio gen

se introduce en el mutante el gen *ytjA*, situado en su extremo 3' y cuya función se desconoce.

11<sup>a</sup>- la cepa mutante de *Y. ruckeri* en el gen *osmY*, fue incapaz de desarrollar el proceso infeccioso en trucha arcoíris, lo que indica la importancia de este gen en la virulencia de la bacteria. La utilización de la cepa complementada con el propio gen, junto con el anteriormente mencionado *ytjA*, definió que la mayor actividad del gen, detectada a través de la luminiscencia, se produce en el tubo digestivo, durante las primeras fases de la infección, y en el músculo en estadios más avanzados.

## 7. Bibliografía



- Abplanalp, J. and Hottiger, M. O.** (2017) Cell fate regulation by chromatin ADP-ribosylation, *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 63, pp. 114–122.
- Agafitei, O., Kim, E. J., Maguire, T. and Sheridan, J.** (2010) The role of *Escherichia coli* porins OmpC and OmpF in antibiotic cross resistance induced by subinhibitory concentrations of kanamycin, *J. Exp. Microbiol. Immunol*, 14, pp. 34–39.
- Aguado-Urda, M., Gibello, A., Blanco, M. del M., Fernández-Garayzábal, J. F., López-Alonso, V. and López-Campos, G. H.** (2013) Global Transcriptome Analysis of *Lactococcus garvieae* Strains in Response to Temperature, *PLoS ONE*. Edited by W. van Schaik, 8(11), p. e79692.
- Alderman, D. J. and Hastings, T. S. (1998)** Antibiotic use in aquaculture: development of antibiotic resistance – potential for consumer health risks\*, *International Journal of Food Science & Technology*, 33(2), pp. 139–155.
- Aldridge, P., Metzger, M. and Geider, K.** (1997) Genetics of sorbitol metabolism in *Erwinia amylovora* and its influence on bacterial virulence, *Molecular and General Genetics MGG*, 256(6), pp. 611–619.
- Altinok, I., Grizzle, J. M. and Liu, Z.** (2001) Detection of *Yersinia ruckeri* in rainbow trout blood by use of the polymerase chain reaction, *Diseases of Aquatic Organisms*, 44(1), pp. 29–34.
- Ammendola, S., Pasquali, P., Pistoia, C., Petrucci, P., Petrarca, P., Rotilio, G. and Battistoni, A.** (2007) High-Affinity Zn<sup>2+</sup> Uptake System ZnuABC Is Required for Bacterial Zinc Homeostasis in Intracellular Environments and Contributes to the Virulence of *Salmonella enterica*, *Infection and Immunity*, 75(12), pp. 5867–5876.
- Andersson, D. I. and Hughes, D.** (2010) Antibiotic resistance and its cost: is it possible to reverse resistance?, *Nature Reviews Microbiology*.
- Anderson, G. G., Yahr, T. L., Lovewell, R. R. and OToole, G. A.** (2010) The *Pseudomonas aeruginosa* Magnesium Transporter MgtE Inhibits Transcription of the Type III Secretion System, *Infection and Immunity*, 78(3), pp. 1239–1249.
- Arends, S. J. R., Williams, K., Scott, R. J., Rolong, S., Popham, D. L. and Weiss, D. S.** (2010) Discovery and Characterization of Three New *Escherichia coli* Septal Ring Proteins That Contain a SPOR Domain: DamX, DedD, and RlpA, *Journal of Bacteriology*, 192(1), pp. 242–255.
- Arias, C. R., Olivares-Fuster, O., Hayden, K., Shoemaker, C. A., Grizzle, J. M. and Klesius, P. H.** (2007) First Report of *Yersinia ruckeri* Biotype 2 in the USA, *Journal of Aquatic Animal Health*, 19(1), pp. 35–40.
- Arvizu-Gómez, J. L., Hernández-Morales, A., Aguilar, J. R. P. and Álvarez-Morales, A.** (2013) Transcriptional profile of *P. syringae* pv. *phaseolicola* NPS3121 at low temperature: Physiology of phytopathogenic bacteria, *BMC microbiology*, 13(1), p. 81.

- Austin, D. A., Robertson, P. A. W. and Austin, B.** (2003) Recovery of a New Biogroup of *Yersinia ruckeri* from Diseased Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum), *Systematic and Applied Microbiology*, 26(1), pp. 127–131.
- Aziz, R. K., Bartels, D., Best, A. A., DeJongh, M., Disz, T., Edwards, R. A., Formis, K., Gerdes, S., Glass, E. M., Kubal, M., Meyer, F., Olsen, G. J., Olson, R., Osterman, A. L., Overbeek, R. A., McNeil, L. K., Paarmann, D., Paczian, T., Parrello, B., Pusch, G. D., Reich, C., Stevens, R., Vassieva, O., Vonstein, V., Wilke, A. and Zagnitko, O.** (2008) The RAST Server: Rapid Annotations using Subsystems Technology, *BMC Genomics*, 9(1), p. 75.
- Badaruddin, M., Holcombe, L. J., Wilson, R. A., Wang, Z.-Y., Kershaw, M. J. and Talbot, N. J.** (2013) Glycogen Metabolic Genes Are Involved in Trehalose-6-Phosphate Synthase-Mediated Regulation of Pathogenicity by the Rice Blast Fungus *Magnaporthe oryzae*, *PLoS Pathogens*. Edited by P. N. Dodds, 9(10), p. e1003604.
- Bader, M. W., Navarre, W. W., Shiau, W., Nikaido, H., Frye, J. G., McClelland, M., Fang, F. C. and Miller, S. I.** (2003) Regulation of *Salmonella typhimurium* virulence gene expression by cationic antimicrobial peptides: *Salmonella* response to antimicrobial peptides, *Molecular Microbiology*, 50(1), pp. 219–230.
- Baker, S., Duy, P. T., Nga, T. V. T., Dung, T. T. N., Phat, V. V., Chau, T. T., Turner, A. K., Farrar, J. and Boni, M. F.** (2013) Fitness benefits in fluoroquinolone-resistant *Salmonella Typhi* in the absence of antimicrobial pressure, *Elife*, 2, p. e01229.
- Balcázar, J. L., Vendrell, D., de Blas, I., Ruiz-Zarzuela, I., Muzquiz, J. L. and Girones, O.** (2008) Characterization of probiotic properties of lactic acid bacteria isolated from intestinal microbiota of fish, *Aquaculture*, 278(1-4), pp. 188–191.
- Barron, A., May, G., Bremer, E. and Villarejo, M.** (1986) Regulation of envelope protein composition during adaptation to osmotic stress in *Escherichia coli*, *Journal of Bacteriology*, 167(2), pp. 433–438.
- Bastardo, A., Ravelo, C. and Romalde, J. L.** (2012a) Highly sensitive detection and quantification of the pathogen *Yersinia ruckeri* in fish tissues by using real-time PCR, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 96(2), pp. 511–520.
- Bastardo, A., Ravelo, C. and Romalde, J. L.** (2012b) Multilocus sequence typing reveals high genetic diversity and epidemic population structure for the fish pathogen *Yersinia ruckeri*: MLST of *Yersinia ruckeri*, *Environmental Microbiology*, 14(8), pp. 1888–1897.
- Bazaka, K., Crawford, R. J., Nazarenko, E. L. and Ivanova, E. P.** (2011) Bacterial extracellular polysaccharides, *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 715, pp. 213–226.
- Bedran, T. B. L., Grignon, L., Spolidorio, D. P. and Grenier, D.** (2014) Subinhibitory Concentrations of Triclosan Promote *Streptococcus mutans* Biofilm Formation and Adherence to Oral Epithelial Cells, *PLoS ONE*. Edited by J. Kreth, 9(2), p. e89059.



- Abee, T. and Wouters, J. A.** (1999) Microbial stress response in minimal processing, *International journal of food microbiology*, 50(1), pp. 65–91.
- Benson, D. A., Clark, K., Karsch-Mizrachi, I., Lipman, D. J., Ostell, J. and Sayers, E. W.** (2015) GenBank, *Nucleic Acids Research*, 43(D1), pp. D30–D35.
- Benson, G.** (1999) Tandem repeats finder: a program to analyze DNA sequences, *Nucleic Acids Research*, 27(2), pp. 573–580.
- Bernardini, M. L., Sanna, M. G., Fontaine, A. and Sansonetti, P. J.** (1993) OmpC is involved in invasion of epithelial cells by *Shigella flexneri.*, *Infection and Immunity*, 61(9), pp. 3625–3635.
- Bernstein, C., Bernstein, H., Payne, C. M., Beard, S. E. and Schneider, J.** (1999) Bile salt activation of stress response promoters in *Escherichia coli*, *Current microbiology*, 39(2), pp. 68–72.
- Bina, X. R., Lavine, C. L., Miller, M. A. and Bina, J. E.** (2008) The AcrAB RND efflux system from the live vaccine strain of *Francisella tularensis* is a multiple drug efflux system that is required for virulence in mice, *FEMS Microbiology Letters*, 279(2), pp. 226–233.
- Birnboim, H. C. and Doly, J.** (1979) A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA, *Nucleic Acids Research*, 7(6), pp. 1513–1523.
- Bjarnason, J., Southward, C. M. and Surette, M. G.** (2003) Genomic Profiling of Iron-Responsive Genes in *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium by High-Throughput Screening of a Random Promoter Library, *Journal of Bacteriology*, 185(16), pp. 4973–4982.
- BLAST: Basic Local Alignment Search Tool** [Internet]. [citado 25 de abril de 2017]. Disponible en: <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>
- Blower, T. R., Pei, X. Y., Short, F. L., Fineran, P. C., Humphreys, D. P., Luisi, B. F. and Salmund, G. P. C.** (2011) A processed noncoding RNA regulates an altruistic bacterial antiviral system, *Nature Structural & Molecular Biology*, 18(2), pp. 185–190.
- Bogs, J. and Geider, K.** (2000) Molecular Analysis of Sucrose Metabolism of *Erwinia amylovora* and Influence on Bacterial Virulence, *Journal of bacteriology*, 182(19), pp. 5351–5358.
- Boos, W. and Shuman, H.** (1998) Maltose/maltodextrin system of *Escherichia coli*: transport, metabolism, and regulation, *Microbiology and molecular biology reviews: MMBR*, 62(1), pp. 204–229.
- Bowen, W. H. and Koo, H.** (2011) Biology of *Streptococcus mutans*-Glucosyltransferases: Role in Extracellular Matrix Formation of Cariogenic Biofilms, *Caries Research*, 45(1), pp. 69–86.

- Brenner, D. J., Krieg, N. R., Staley, J. T. and Garrity, G. M.** (2015) *Bergeys Manual® of Systematic Bacteriology - Volume 2: The* | George Garrity | Springer.
- Bresolin, G., Neuhaus, K., Scherer S., and Fuchs T. M.** (2006) Transcriptional Analysis of Long-Term Adaptation of *Yersinia enterocolitica* to Low-Temperature Growth, *Journal of bacteriology*, 188(8) p. 2945-2958.
- Brown, A., Fernández, I. S., Gordiyenko, Y. and Ramakrishnan, V.** (2016) Ribosome-dependent activation of stringent control, *Nature*.
- Brunt, J., Newaj-Fyzul, A. and Austin, B.** (2007) The development of probiotics for the control of multiple bacterial diseases of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), *Journal of Fish Diseases*, 30(10), pp. 573–579.
- Brüssow, H., Canchaya, C. and Hardt, W.-D.** (2004) Phages and the Evolution of Bacterial Pathogens: from Genomic Rearrangements to Lysogenic Conversion, *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 68(3), pp. 560–602.
- Buckley, A. M., Webber, M. A., Cooles, S., Randall, L. P., La Ragione, R. M., Woodward, M. J. and Piddock, L. J. V.** (2006) The AcrAB-TolC efflux system of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium plays a role in pathogenesis, *Cellular Microbiology*, 8(5), pp. 847–856.
- Burse, A., Weingart, H. and Ullrich, M. S.** (2004) The phytoalexin-inducible multidrug efflux pump AcrAB contributes to virulence in the fire blight pathogen, *Erwinia amylovora*, *Molecular plant-microbe interactions*, 17(1), pp. 43–54.
- Busch, R. A.** (1978) Protective vaccines for mass immunisation of trout, *Salmonid*, 1, pp. 10-22.
- Busch, R. A.** (1982). Enteric redmouth disease (*Yersinia ruckeri*). In: D. P. Anderson, M. Dorson, and Ph. Dubourget, eds. *Antigens of fish pathogens*. Collection Fondation Marcel Merieux, Lyon, France. pp. 201-222.
- Busch, R. A. and Lingg, A. J.** (1975) Establishment of an Asymptomatic Carrier State Infection of Enteric Redmouth Disease in Rainbow Trout (*Salmo gairdneri*), *Journal of the Fisheries Research Board of Canada*, 32(12), pp. 2429–2432.
- Çagırgan, H. and Tanrikul, T.** (1998) Testing the effectiveness of a *Yersinia* vaccine in infected and chemically treated juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*), *Journal of Applied Ichthyology*, 14(3-4), pp. 239–243.
- Capkin, E. and Altınok, I.** (2009) Effects of dietary probiotic supplementations on prevention/treatment of yersiniosis disease, *Journal of Applied Microbiology*, 106(4), pp. 1147–1153.
- Cascales, D., Guijarro, J. A., Reimundo, P., García-Torrico, A. I. and Méndez, J.** (2016) Genome Sequence of the Fish Pathogen *Yersinia ruckeri* Strain 150, Isolated from Diseased Rainbow Trout, *Genome Announcements*, 4(6), pp. e01331–16.

- Chabot, R., Antoun, H., Kloepper, J. W. and Beauchamp, C. J.** (1996) Root colonization of maize and lettuce by bioluminescent *Rhizobium leguminosarum* biovar phaseoli., *Applied and Environmental Microbiology*, 62(8), pp. 2767–2772.
- Chen, H. and Boutros, P. C.** (2011) VennDiagram: a package for the generation of highly-customizable Venn and Euler diagrams in R, *BMC bioinformatics*, 12(1), p. 35.
- Chen, P. E., Cook, C., Stewart, A. C., Nagarajan, N., Sommer, D. D., Pop, M., Thomason, B., Thomason, M. P. K., Lentz, S., Nolan, N. and others** (2010) Genomic characterization of the *Yersinia* genus, *Genome biology*, 11(1), p. R1.
- Chen, S., Wang, H., Katzianer, D. S., Zhong, Z. and Zhu, J.** (2013) LysR family activator-regulated major facilitator superfamily transporters are involved in *Vibrio cholerae* antimicrobial compound resistance and intestinal colonisation, *International Journal of Antimicrobial Agents*, 41(2), pp. 188–192.
- Choi, H. K., Park, N. Y., Kim, D. -i., Chung, H. J., Ryu, S. and Choi, S. H.** (2002) Promoter Analysis and Regulatory Characteristics of vvhBA encoding Cytolytic Hemolysin of *Vibrio vulnificus*, *Journal of Biological Chemistry*, 277(49), pp. 47292–47299.
- Choi, K. Y., Spencer, J. M. and Craig, N. L.** (2014) The Tn7 transposition regulator TnsC interacts with the transposase subunit TnsB and target selector TnsD, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111(28), pp. E2858–E2865.
- ClustalW2 < Multiple Sequence Alignment < EMBL-EBI** [Internet]. [citado 25 de abril de 2017]. Disponible en: <http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>
- Coffey, B. M., Akhand, S. S. and Anderson, G. G.** (2014) MgtE is a dual-function protein in *Pseudomonas aeruginosa*, *Microbiology*, 160(Pt\_6), pp. 1200–1213.
- Contag, C. H., Contag, P. R., Mullins, J. I., Spilman, S. D., Stevenson, D. K. and Benaron, D. A.** (1995) Photonic detection of bacterial pathogens in living hosts, *Molecular microbiology*, 18(4), pp. 593–603.
- Coquet, L., Cosette, P., Quillet, L., Petit, F., Junter, G.-A. and Jouenne, T.** (2002) Occurrence and Phenotypic Characterization of *Yersinia ruckeri* Strains with Biofilm-Forming Capacity in a Rainbow Trout Farm, *Applied and Environmental Microbiology*, 68(2), pp. 470–475.
- Cossarini-Dunier, M.** (1986) Protection against enteric redmouth disease in rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson, after vaccination with *Yersinia ruckeri* bacterin, *Journal of Fish Diseases*, 9(1), pp. 27–33.
- Dahiya, I. and Stevenson, R. M. W.** (2010b) The UvrY response regulator of the BarA–UvrY two-component system contributes to *Yersinia ruckeri* infection of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*), *Archives of Microbiology*, 192(7), pp. 541–547.

- Dahiya, I. and Stevenson, R. M. W.** (2010a) The ZnuABC operon is important for *Yersinia ruckeri* infections of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), *Journal of Fish Diseases*, 33(4), pp. 331–340.
- Daligault, H. E., Davenport, K. W., Minogue, T. D., Bishop-Lilly, K. A., Broomall, S. M., Bruce, D. C., Chain, P. S., Coyne, S. R., Frey, K. G., Gibbons, H. S., Jaissle, J., Koroleva, G. I., Ladner, J. T., Lo, C.-C., Munk, C., Palacios, G. F., Redden, C. L., Rosenzweig, C. N., Scholz, M. B. and Johnson, S. L.** (2014) Whole-Genome *Yersinia* sp. Assemblies from 10 Diverse Strains, *Genome Announcements*, 2(5), pp. e01055–14–e01055–14.
- Daly, J. G., Lindvik, B., Stevenson, R. M. W. and others** (1986) Serological heterogeneity of recent isolates of *Yersinia ruckeri* from Ontario and British Columbia., *Diseases of Aquatic Organisms*, 1(2), pp. 151–153.
- Darling, A. C., Mau, B., Blattner, F. R. and Perna, N. T.** (2004) Mauve: multiple alignment of conserved genomic sequence with rearrangements, *Genome research*, 14(7), pp. 1394–1403.
- Davies, R. L.** (1990) O-serotyping of *Yersinia ruckeri* with special emphasis on European isolates, *Veterinary Microbiology*, 22(4), pp. 299–307.
- Davies, R. L.** (1991a) Clonal analysis of *Yersinia ruckeri* based on biotypes, serotypes and outer membrane protein-types, *Journal of Fish Diseases*, 14(2), pp. 221–228.
- Davies, R. L.** (1991b) *Yersinia ruckeri* produces four iron-regulated outer membrane proteins but does not produce detectable siderophores, *Journal of Fish Diseases*, 14(5), pp. 563–570.
- Davies, R. L. and Frerichs, G. N.** (1989) Morphological and biochemical differences among isolates of *Yersinia ruckeri* obtained from wide geographical areas, *Journal of Fish Diseases*, 12(4), pp. 357–365.
- De Lastours, V., Bleibtreu, A., Chau, F., Burdet, C., Duval, X., Denamur, E. and Fantin, B.** (2014) Quinolone-resistant *Escherichia coli* from the faecal microbiota of healthy volunteers after ciprofloxacin exposure are highly adapted to a commensal lifestyle, *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 69(3), pp. 761–768.
- De Lorenzo, V., Herrero, M., Jakubzik, U. and Timmis, K. N.** (1990) Mini-Tn5 transposon derivatives for insertion mutagenesis, promoter probing, and chromosomal insertion of cloned DNA in gram-negative eubacteria., *Journal of bacteriology*, 172(11), pp. 6568–6572.
- Del Cerro, A., Marquez, I. and Guijarro, J. A.** (2002) Simultaneous Detection of *Aeromonas salmonicida*, *Flavobacterium psychrophilum*, and *Yersinia ruckeri*, Three Major Fish Pathogens, by Multiplex PCR, *Applied and Environmental Microbiology*, 68(10), pp. 5177–5180.

- Deng, W., Li, C. and Xie, J.** (2013) The underlying mechanism of bacterial TetR/AcrR family transcriptional repressors, *Cellular Signalling*, 25(7), pp. 1608–1613.
- Denton, J. E., Yousef, M. K., Yousef, I. M. and Kuksis,** (1974) Bile acid composition of rainbow trout, *Salmo gairdneri*, *Lipids*, 9(12), pp. 945–951.
- Deshmukh, S., Raida, M. K., Dalsgaard, I., Chettri, J. K., Kania, P. W. and Buchmann, K.** (2012) Comparative protection of two different commercial vaccines against *Yersinia ruckeri* serotype O1 and biotype 2 in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*), *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 145(1-2), pp. 379–385.
- Dodd, S. J., Hurst, M. R. H., Glare, T. R., OCallaghan, M. and Ronson, C. W.** (2006) Occurrence of sep Insecticidal Toxin Complex Genes in *Serratia* spp. and *Yersinia frederiksenii*, *Applied and Environmental Microbiology*, 72(10), pp. 6584–6592.
- Dong, T. and Schellhorn, H. E.** (2009) Global effect of RpoS on gene expression in pathogenic *Escherichia coli* O157:H7 strain EDL933, *BMC Genomics*, 10(1), p. 349.
- Elkins, C. A. and Mullis, L. B.** (2006) Mammalian Steroid Hormones Are Substrates for the Major RND- and MFS-Type Tripartite Multidrug Efflux Pumps of *Escherichia coli*, *Journal of Bacteriology*, 188(3), pp. 1191–1195.
- Emmerth, M., Goebel, W., Miller, S. I. and Hueck, C. J.** (1999) Genomic Subtraction Identifies *Salmonella typhimurium* Prophages, F-Related Plasmid Sequences, and a Novel Fimbrial Operon, *stf*, Which Are Absent in *Salmonella typhi*, *Journal of bacteriology*, 181(18), pp. 5652–5661.
- Evans, M. E., Feola, D. J. and Rapp, R. P.** (1999) Polymyxin B sulfate and colistin: old antibiotics for emerging multiresistant gram-negative bacteria, *Annals of Pharmacotherapy*, 33(9), pp. 960–967.
- Ewing, W. H., Ross, A. J., Brenner, D. J. and Fanning, G. R.** (1978) *Yersinia ruckeri* sp. nov., the redmouth (RM) bacterium, *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 28(1), pp. 37–44.
- FAO** (ed.) (2016) Contributing to food security and nutrition for all. Rome (The state of world fisheries and aquaculture, 2016).
- Fernandez, L., Lopez, J. R., Secades, P., Menendez, A., Marquez, I. and Guijarro, J. A.** (2003) *In Vitro* and *In Vivo* Studies of the Yrp1 Protease from *Yersinia ruckeri* and Its Role in Protective Immunity against Enteric Red Mouth Disease of Salmonids, *Applied and Environmental Microbiology*, 69(12), pp. 7328–7335.
- Fernandez, L., Marquez, I. and Guijarro, J. A.** (2004) Identification of Specific *In Vivo*-Induced (ivi) Genes in *Yersinia ruckeri* and Analysis of Ruckerbactin, a Catecholate Siderophore Iron Acquisition System, *Applied and Environmental Microbiology*, 70(9), pp. 5199–5207.

- Fernandez, L., Prieto, M. and Guijarro, J. A.** (2007) The iron- and temperature-regulated haemolysin YhIA is a virulence factor of *Yersinia ruckeri*, *Microbiology*, 153(2), pp. 483–489.
- Fernandez, L., Secades, P., Lopez, J. R., Márquez, I. and Guijarro, J. A.** (2002) Isolation and analysis of a protease gene with an ABC transport system in the fish pathogen *Yersinia ruckeri*: insertional mutagenesis and involvement in virulence, *Microbiology*, 148(7), pp. 2233–2243.
- Fineran, P. C., Blower, T. R., Foulds, I. J., Humphreys, D. P., Lilley, K. S. and Salmond, G. P.** (2009) The phage abortive infection system, ToxIN, functions as a protein–RNA toxin–antitoxin pair, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(3), pp. 894–899.
- Fonseca, A. P.** (2004) Effect of subinhibitory concentration of piperacillin/tazobactam on *Pseudomonas aeruginosa*, *Journal of Medical Microbiology*, 53(9), pp. 903–910.
- Foultier, B., Troisfontaines, P., Müller, S., Opperdoes, F. R. and Cornelis, G. R.** (2002) Characterization of the *ysa* pathogenicity *locus* in the chromosome of *Yersinia enterocolitica* and phylogeny analysis of type III secretion systems, *Journal of Molecular Evolution*, 55(1), pp. 37–51.
- Fouz, B., Zarza, C. and Amaro, C.** (2006) First description of non-motile *Yersinia ruckeri* serovar I strains causing disease in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), cultured in Spain, *Journal of fish diseases*, 29(6), pp. 339–346.
- Fozo, E. M., Makarova, K. S., Shabalina, S. A., Yutin, N., Koonin, E. V. and Storz, G.** (2010) Abundance of type I toxin–antitoxin systems in bacteria: searches for new candidates and discovery of novel families, *Nucleic Acids Research*, 38(11), pp. 3743–3759.
- Francis, K. P., Joh, D., Bellinger-Kawahara, C., Hawkinson, M. J., Purchio, T. F. and Contag, P. R.** (2000) Monitoring Bioluminescent *Staphylococcus aureus* Infections in Living Mice Using a Novel luxABCDE Construct, *Infection and Immunity*, 68(6), pp. 3594–3600.
- Francis, K. P., Yu, J., Bellinger-Kawahara, C., Joh, D., Hawkinson, M. J., Xiao, G., Purchio, T. F., Caparon, M. G., Lipsitch, M. and Contag, P. R.** (2001) Visualizing Pneumococcal Infections in the Lungs of Live Mice Using Bioluminescent *Streptococcus pneumoniae* Transformed with a Novel Gram-Positive lux Transposon, *Infection and Immunity*, 69(5), pp. 3350–3358.
- Frees, D., Gerth, U. and Ingmer, H.** (2014) Clp chaperones and proteases are central in stress survival, virulence and antibiotic resistance of *Staphylococcus aureus*, *International Journal of Medical Microbiology*, 304(2), pp. 142–149.
- Fuhrmann, H., Bohm, K. H. and Schlotfeldt, H.-J.** (1983) An outbreak of enteric redmouth disease in West Germany, *Journal of Fish Diseases*, 6(3), pp. 309–311.

- Furones, M. D., Gilpin, M. J., Alderman, D. J. and Munn, C. B.** (1990) Virulence of *Yersinia ruckeri* serotype I strains is associated with a heat sensitive factor (HSF) in cell extracts, FEMS microbiology letters, 66(1-3), pp. 339–343.
- Fuchs, T. M., Bresolin, G., Marcinowski, L., Schachtner, J. and Scherer, S.** (2008) Insecticidal genes of *Yersinia spp.*: taxonomical distribution, contribution to toxicity towards *Manduca sexta* and *Galleria mellonella*, and evolution, BMC Microbiology, 8, p. 214.
- Gabbianelli, R., Scotti, R., Ammendola, S., Petrarca, P., Nicolini, L. and Battistoni, A.** (2011) Role of ZnuABC and ZinT in *Escherichia coli* O157: H7 zinc acquisition and interaction with epithelial cells, BMC microbiology, 11(1), p. 36.
- Galán, J. E., Lara-Tejero, M., Marlovits, T. C. and Wagner, S.** (2014) Bacterial Type III Secretion Systems: Specialized Nanomachines for Protein Delivery into Target Cells, Annual Review of Microbiology, 68(1), pp. 415–438.
- Garcia, J. A., Dominguez, L., Larsen, J. L. and Pedersen, K.** (1998) Ribotyping and plasmid profiling of *Yersinia ruckeri*, Journal of applied microbiology, 85(6), pp. 949–955.
- Garneau, J. E., Dupuis, M.-È., Villion, M., Romero, D. A., Barrangou, R., Boyaval, P., Fremaux, C., Horvath, P., Magadán, A. H. and Moineau, S.** (2010) The CRISPR/Cas bacterial immune system cleaves bacteriophage and plasmid DNA, Nature, 468(7320), pp. 67–71.
- NCBI Genome** [Internet]. [citado 25 de abril de 2017]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/browse/>
- NCBI Genbank** [Internet]. [citado 25 de abril de 2017]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>
- Gerdes, K., Christensen, S. K. and Løbner-Olesen, A.** (2005) Prokaryotic toxin-antitoxin stress response loci, Nature Reviews Microbiology, 3(5), pp. 371–382.
- Gibello, A., Blanco, M. M., Moreno, M. A., Cutuli, M. T., Domenech, A., Domínguez, L. and Fernández-Garayzábal, J. F.** (1999) Development of a PCR Assay for Detection of *Yersinia ruckeri* in Tissues of Inoculated and Naturally Infected Trout, Applied and Environmental Microbiology, 65(1), pp. 346–350.
- Gilbert, J. M., Baduel, C., Li, Y., Reichelt-Brushett, A. J., Butcher, P. A., McGrath, S. P., Peddemors, V. M., Hearn, L., Mueller, J. and Christidis, L.** (2015) Bioaccumulation of PCBs in liver tissue of dusky *Carcharhinus obscurus*, sandbar *C. plumbeus* and white *Carcharodon carcharias* sharks from south-eastern Australian waters, Marine Pollution Bulletin, 101(2), pp. 908–913.
- Glenn, R. A., Taylor, P. W., Pelton, E. H., Gutenberger, S. K., Ahrens, M. A., Marchant, L. M. and Hanson, K. C.** (2014) Genetic Evidence of Vertical Transmission

and Cycling of *Yersinia ruckeri* in Hatchery-Origin Fall Chinook Salmon *Oncorhynchus tshawytscha*, *Journal of Fish and Wildlife Management*, 6(1), pp. 44–54.

**Gomes, D. L. R., Peixoto, R. S., Barbosa, E. A. B., Napoleao, F., Sabbadini, P. S., dos Santos, K. R. N., Mattos-Guaraldi, A. L. and Hirata, R.** (2013) SubMICs of penicillin and erythromycin enhance biofilm formation and hydrophobicity of *Corynebacterium diphtheriae* strains, *Journal of Medical Microbiology*, 62(Pt\_5), pp. 754–760.

**Goulart, C. L., Lery, L. M. S., Diniz, M. M. P., Vianez-Junior, J. L., Neves-Ferreira, A. G. C., Perales, J., Bisch, P. M. and von KrÄger, W. M. A.** (2009) Molecular analysis of VCA1008: a putative phosphoprotein of *Vibrio cholerae*, *FEMS Microbiology Letters*, 298(2), pp. 241–248.

**Gray, M. J., Freitag, N. E. and Boor, K. J.** (2006) How the Bacterial Pathogen *Listeria monocytogenes* Mediates the Switch from Environmental Dr. Jekyll to Pathogenic Mr. Hyde, *Infection and Immunity*, 74(5), pp. 2505–2512.

**Green, M. and Austin, B.** (1982) The identification of *Yersinia ruckeri* and its relationship to other representatives of the Enterobacteriaceae, *Aquaculture*, 34(3-4), pp. 185–192.

**Grimaldi, G., Corda, D. and Catara, G.** (2015) From toxins to mammalian enzymes: the diversity of mono-ADP-ribosylation, *Frontiers in Bioscience (Landmark Edition)*, 20, pp. 389–404.

**Grissa, I., Vergnaud, G. and Pourcel, C.** (2007) CRISPRFinder: a web tool to identify clustered regularly interspaced short palindromic repeats, *Nucleic Acids Research*, 35(Web Server issue), pp. W52–57.

**Grkovic, S., Brown, M. H. and Skurray, R. A.** (2002) Regulation of Bacterial Drug Export Systems, *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 66(4), pp. 671–701.

**Guglielmini, J., Szpirer, C. Y. and Milinkovitch, M. C.** (2008) Automated Discovery and Phylogenetic Analysis of New Toxin-Antitoxin Systems, *BMC Microbiology*, 8(1), p. 104.

**Guijarro, J. A., Cascales, D., García-Torrico, A. I., García-Domínguez, M. and Méndez, J.** (2015) Temperature-dependent expression of virulence genes in fish-pathogenic bacteria, *Frontiers in Microbiology*, 6.

**Guilvout, I., Quilici, M. L., Rabot, S., Lesel, R. and Mazigh, D.** (1988) BamHI restriction endonuclease analysis of *Yersinia ruckeri* plasmids and their relatedness to the genus *Yersinia* 42-to 47-megadalton plasmid., *Applied and environmental microbiology*, 54(10), pp. 2594–2597.

**Haller, J. C., Carlson, S., Pederson, K. J. and Pierson, D. E.** (2000) A chromosomally encoded type III secretion pathway in *Yersinia enterocolitica* is important in virulence, *Molecular Microbiology*, 36(6), pp. 1436–1446.



- Han, Y., Liu, L., Fang, N., Yang, R. and Zhou, D.** (2013) Regulation of pathogenicity by noncoding RNAs in bacteria, *Future Microbiology*, 8(5), pp. 579–591.
- Harayama, S., Bollinger, J., Iino, T. and Hazelbauer, G. L.** (1983) Characterization of the *mgl* operon of *Escherichia coli* by transposon mutagenesis and molecular cloning., *Journal of bacteriology*, 153(1), pp. 408–415.
- Harmache, A., LeBerre, M., Droineau, S., Giovannini, M. and Bremont, M.** (2006) Bioluminescence Imaging of Live Infected Salmonids Reveals that the Fin Bases Are the Major Portal of Entry for Novirhabdovirus, *Journal of Virology*, 80(7), pp. 3655–3659.
- Hesami, S., Metcalf, D. S., Lumsden, J. S. and Macinnes, J. I.** (2011) Identification of cold-temperature-regulated genes in *Flavobacterium psychrophilum*, *Applied and Environmental Microbiology*, 77(5), pp. 1593–1600.
- Hartog, E., Ben-Shalom, L., Shachar, D., Matthews, K. R. and Yaron, S.** (2008) Regulation of *marA*, *soxS*, *rob*, *acrAB* and *micF* in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium, *Microbiology and Immunology*, 52(12), pp. 565–574.
- Hathroubi, S., Fontaine-Gosselin, S.-è., Tremblay, Y. D. N., Labrie, J. and Jacques, M.** (2015) Sub-inhibitory concentrations of penicillin G induce biofilm formation by field isolates of *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Veterinary Microbiology*, 179(3-4), pp. 277–286.
- Healy, C., Golby, P., MacHugh, D. E. and Gordon, S. V.** (2016) The MarR family transcription factor Rv1404 coordinates adaptation of *Mycobacterium tuberculosis* to acid stress via controlled expression of Rv1405c, a virulence-associated methyltransferase, *Tuberculosis*, 97, pp. 154–162.
- Hejair, H. M. A., Zhu, Y., Ma, J., Zhang, Y., Pan, Z., Zhang, W. and Yao, H.** (2017) Functional role of *ompF* and *ompC* porins in pathogenesis of avian pathogenic *Escherichia coli*, *Microbial Pathogenesis*, 107, pp. 29–37.
- Held, T. K., Adamczik, C., Trautmann, M. and Cross, A. S.** (1995) Effects of MICs and sub-MICs of antibiotics on production of capsular polysaccharide of *Klebsiella pneumoniae*., *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 39(5), pp. 1093–1096.
- Hengge-Aronis, R., Lange, R., Henneberg, N. and Fischer, D.** (1993) Osmotic regulation of *rpoS*-dependent genes in *Escherichia coli*., *Journal of Bacteriology*, 175(1), pp. 259–265.
- Hou, J., Hu, Y., Zhang, M. and Sun, L.** (2009) Identification and characterization of the *AcrR/AcrAB* system of a pathogenic *Edwardsiella tarda* strain, *The Journal of General and Applied Microbiology*, 55(3), pp. 191–199.
- Hughes, K. T. and Mathee, K.** (1998) The anti-sigma factors, *Annual Review of Microbiology*, 52, pp. 231–286.

- Hunter, V. A., Knittel, M. D. and Fryer, J. L.** (1980) Stress-induced transmission of *Yersinia ruckeri* infection from carriers to recipient steelhead trout *Salmo gairdneri* Richardson, *Journal of Fish Diseases*, 3(6), pp. 467–472.
- Hurst, M. R. H., OCallaghan, M. and Glare, T. R.** (2003) Peripheral sequences of the *Serratia entomophila* pADAP virulence-associated region, *Plasmid*, 50(3), pp. 213–229.
- McArdle J.F., Dooley Martyn C.** (1985) Isolation of *Yersinia ruckeri* type 1 (Hagerman strain) from goldfish *Carassius auratus*. (L.), *Bulletin of the European Association of Fish Pathologists*.
- Jank, T., Belyi, Y. and Aktories, K.** (2015a) Bacterial glycosyltransferase toxins: Glycosyltransferase toxins, *Cellular Microbiology*, 17(12), pp. 1752–1765.
- Jank, T., Eckerle, S., Steinemann, M., Trillhaase, C., Schimpl, M., Wiese, S., van Aalten, D. M. F., Driever, W. and Aktories, K.** (2015b) Tyrosine glycosylation of Rho by *Yersinia toxin* impairs blastomere cell behaviour in zebrafish embryos, *Nature Communications*, 6, p. 7807.
- Janssen, R., Verjans, G. M., Kusters, J. G. and Tommassen, J.** (1995) Induction of the *phoE* promoter upon invasion of *Salmonella typhimurium* into eukaryotic cells, *Microbial Pathogenesis*, 19(4), pp. 193–201.
- Jellen-Ritter, A. S. and Kern, W. V.** (2001) Enhanced Expression of the Multidrug Efflux Pumps AcrAB and AcrEF Associated with Insertion Element Transposition in *Escherichia coli* Mutants Selected with a Fluoroquinolone, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 45(5), pp. 1467–1472.
- Jeong, H. S., Jeong, K. C., Choi, H. K., Park, K.-J., Lee, K.-H., Rhee, J. H. and Choi, S. H.** (2001) Differential expression of *Vibrio vulnificus* elastase gene in a growth phase-dependent manner by two different types of promoters, *Journal of Biological Chemistry*, 276(17), pp. 13875–13880.
- Jin, S., Song, Y. N., Deng, W. Y., Gordon, M. P. and Nester, E. W.** (1993) The regulatory VirA protein of *Agrobacterium tumefaciens* does not function at elevated temperatures., *Journal of bacteriology*, 175(21), pp. 6830–6835.
- Joh, S. J., Kweon, C. H., Kim, M. J., Kang, M. S., Jang, H. and Kwon, J. H.** (2010) Characterization of *Yersinia ruckeri* isolated from the farm-cultured eel *Anguilla japonica* in Korea, *Korean Journal of Veterinary Research*.
- Johnson, S. L., Daligault, H. E., Davenport, K. W., Jaissle, J., Frey, K. G., Ladner, J. T., Broomall, S. M., Bishop-Lilly, K. A., Bruce, D. C., Coyne, S. R., Gibbons, H. S., Lo, C.-C., Munk, A. C., Rosenzweig, C. N., Koroleva, G. I., Palacios, G. F., Redden, C. L., Xu, Y., Minogue, T. D. and Chain, P. S.** (2015) Thirty-Two Complete Genome Assemblies of Nine *Yersinia* Species, Including *Y. pestis*, *Y. pseudotuberculosis*, and *Y. enterocolitica*: TABLE 1, *Genome Announcements*, 3(2), pp. e00148–15.

- Kadurugamuwa, J. L., Anwar, H., Brown, M. R., Hengstler, B., Kunz, S. and Zak, O.** (1988) Influence of cephalosporins and iron on surface protein antigens of *Klebsiella pneumoniae* in vivo., *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 32(3), pp. 364–368.
- Kadurugamuwa, J. L., Sin, L., Albert, E., Yu, J., Francis, K., DeBoer, M., Rubin, M., Bellinger-Kawahara, C., Parr, T. R. and Contag, P. R.** (2003) Direct Continuous Method for Monitoring Biofilm Infection in a Mouse Model, *Infection and Immunity*, 71(2), pp. 882–890.
- Kaplan, J. B.** (2011) Antibiotic-induced biofilm formation, *The International Journal of Artificial Organs*, 34(9), pp. 737–751.
- Keeling, S. E., Johnston, C., Wallis, R., Brosnahan, C. L., Gudkovs, N. and McDonald, W. L.** (2012) Development and validation of real-time PCR for the detection of *Yersinia ruckeri*: *Yersinia ruckeri* real-time PCR, *Journal of Fish Diseases*, 35(2), pp. 119–125.
- Khandige, S., Asferg, C. A., Rasmussen, K. J., Larsen, M. J., Overgaard, M., Andersen, T. E. and Møller-Jensen, J.** (2016) DamX Controls Reversible Cell Morphology Switching in Uropathogenic *Escherichia coli*, *mBio*, 7(4), pp. e00642–16.
- Kim, D.-H. and Austin, B.** (2006) Innate immune responses in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum) induced by probiotics, *Fish & Shellfish Immunology*, 21(5), pp. 513–524.
- Kim, Y. J., Im, S. Y., Lee, J. O. and Kim, O. B.** (2016) Potential Swimming Motility Variation by AcrR in *Escherichia coli*, *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 26(10), pp. 1824–1828.
- Klinkenberg, L. G., Lee, J., Bishai, W. R. and Karakousis, P. C.** (2010) The Stringent Response Is Required for Full Virulence of *Mycobacterium tuberculosis* in Guinea Pigs, *The Journal of Infectious Diseases*, 202(9), pp. 1397–1404.
- Kong, H.-K., Law, H.-W., Liu, X., Law, C. O., Pan, Q., Gao, L., Xiong, L., Lau, S. K., Woo, P. C. and chi kong Lau, T.** (2017) Transcriptomic Analysis of *Laribacter hongkongensis* Reveals Adaptive Response Coupled with Temperature, *PLoS one*, 12(1), p. e0169998.
- Konkel, M. E. and Tilly, K.** (2000) Temperature-regulated expression of bacterial virulence genes, *Microbes and Infection*, 2(2), pp. 157–166.
- Kotetishvili, M., Kreger, A., Wauters, G., Morris, J. G., Sulakvelidze, A. and Stine, O. C.** (2005) Multilocus Sequence Typing for Studying Genetic Relationships among *Yersinia Species*, *Journal of Clinical Microbiology*, 43(6), pp. 2674–2684.
- Kriegeskorte, A., Block, D., Drescher, M., Windmuller, N., Mellmann, A., Baum, C., Neumann, C., Lore, N. I., Bragonzi, A., Liebau, E., Hertel, P., Seggewiss, J., Becker, K., Proctor, R. A., Peters, G. and Kahl, B. C.** (2014) Inactivation of *thyA* in

*Staphylococcus aureus* Attenuates Virulence and Has a Strong Impact on Metabolism and Virulence Gene Expression, *mBio*, 5(4), pp. e01447–14–e01447–14.

**Kumar, G., Menanteau-Ledouble, S., Saleh, M. and El-Matbouli, M.** (2015) *Yersinia ruckeri*, the causative agent of enteric redmouth disease in fish, *Veterinary Research*, 46(1).

**La Merrill et al** (2012) Toxicological Function of Adipose Tissue: Focus on Persistent Organic Pollutants, *Environmental Health Perspectives*, 121(2), pp. 162–169.

**Labro, M. T., Babin-Chevaye, C. and Hakim, J.** (1988) Influence of subinhibitory concentrations of ceftriaxone on opsonization and killing of *Pseudomonas aeruginosa* by human neutrophils, *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 22(3), pp. 341–352.

**Lacroix, F. J., Cloeckaert, A., Grépinet, O., Pinault, C., Popoff, M. Y., Waxin, H. and Pardon, P.** (1996) *Salmonella typhimurium* *acrB*-like gene: identification and role in resistance to biliary salts and detergents and in murine infection, *FEMS microbiology letters*, 135(2-3), pp. 161–167.

**Laemmli, U. K.** (1970) Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4, *Nature*, 227(5259), pp. 680–685.

**Lal, S. and Tabacchioni, S.** (2009) Ecology and biotechnological potential of *Paenibacillus polymyxa*: a minireview, *Indian Journal of Microbiology*, 49(1), pp. 2–10.

**Lane, M. C., Alteri, C. J., Smith, S. N. and Mobley, H. L.** (2007) Expression of *flagella* is coincident with uropathogenic *Escherichia coli* ascension to the upper urinary tract, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(42), pp. 16669–16674.

**Lang, H., Jonson, G., Holmgren, J. and Palva, E. T.** (1994) The maltose regulon of *Vibrio cholerae* affects production and secretion of virulence factors., *Infection and immunity*, 62(11), pp. 4781–4788.

**Leclerc, G. J., Tartera, C. and Metcalf, E. S.** (1998) Environmental regulation of *Salmonella typhi* invasion-defective mutants, *Infection and immunity*, 66(2), pp. 682–691.

**Leplae, R., Geeraerts, D., Hallez, R., Guglielmini, J., Dreze, P. and Van Melderen, L.** (2011) Diversity of bacterial type II toxin-antitoxin systems: a comprehensive search and functional analysis of novel families, *Nucleic Acids Research*, 39(13), pp. 5513–5525.

**Lin, X.-M., Yang, J.-N., Peng, X.-X. and Li, H.** (2010) A Novel Negative Regulation Mechanism of Bacterial Outer Membrane Proteins in Response to Antibiotic Resistance, *Journal of Proteome Research*, 9(11), pp. 5952–5959.

**Lioy, V. S., Machon, C., Tabone, M., Gonzalez-Pastor, J. E., Daugelavicius, R., Ayora, S. and Alonso, J. C.** (2012) The  $\zeta$  Toxin Induces a Set of Protective Responses and Dormancy, *PLOS ONE*, 7(1), p. e30282.

- Lister, I. M., Raftery, C., Meccas, J. and Levy, S. B.** (2012) *Yersinia pestis* *acrAB*-*tolC* in Antibiotic Resistance and Virulence, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 56(2), pp. 1120–1123.
- Liu, L., Chi, H. and Sun, L.** (2015) *Pseudomonas fluorescens*: identification of Fur-regulated proteins and evaluation of their contribution to pathogenesis, *Diseases of Aquatic Organisms*, 115(1), pp. 67–80.
- Liu, T., Wang, K.-Y., Wang, J., Chen, D.-F., Huang, X.-L., Ouyang, P., Geng, Y., He, Y., Zhou, Y. and Min, J.** (2016) Genome Sequence of the Fish Pathogen *Yersinia ruckeri* SC09 Provides Insights into Niche Adaptation and Pathogenic Mechanism, *International Journal of Molecular Sciences*, 17(4), p. 557.
- Lobato-Márquez, D., Díaz-Orejas, R. and García-del Portillo, F.** (2016) Toxin-antitoxins and bacterial virulence, *FEMS Microbiology Reviews*. Edited by K. Gerdes, 40(5), pp. 592–609.
- Lopez-Garrido, J., Cheng, N., Garcia-Quintanilla, F., Garcia-del Portillo, F. and Casadesus, J.** (2010) Identification of the *Salmonella enterica* *damX* Gene Product, an Inner Membrane Protein Involved in Bile Resistance, *Journal of Bacteriology*, 192(3), pp. 893–895.
- Lorian, V. and Atkinson, B.** (1984) Bactericidal effect of polymorphonuclear neutrophils on antibiotic-induced filaments of gram-negative bacilli, *The Journal of Infectious Diseases*, 149(5), pp. 719–727.
- Lou, H., Chen, M., Black, S. S., Bushell, S. R., Ceccarelli, M., Mach, T., Beis, K., Low, A. S., Bamford, V. A., Booth, I. R., Bayley, H. and Naismith, J. H.** (2011) Altered Antibiotic Transport in *OmpC* Mutants Isolated from a Series of Clinical Strains of Multi-Drug Resistant *E. coli*, *PLoS ONE*. Edited by H. W. van Veen, 6(10), p. e25825.
- Luo, R., Liu, B., Xie, Y., Li, Z., Huang, W., Yuan, J., He, G., Chen, Y., Pan, Q., Liu, Y., Tang, J., Wu, G., Zhang, H., Shi, Y., Liu, Y., Yu, C., Wang, B., Lu, Y., Han, C., Cheung, D. W., Yiu, S.-M., Peng, S., Xiaoqian, Z., Liu, G., Liao, X., Li, Y., Yang, H., Wang, J., Lam, T.-W. and Wang, J.** (2012) SOAPdenovo2: an empirically improved memory-efficient short-read de novo assembler, *GigaScience*, 1, p. 18.
- Ma, D., Alberti, M., Lynch, C., Nikaido, H. and Hearst, J. E.** (1996) The local repressor *AcrR* plays a modulating role in the regulation of *acrAB* genes of *Escherichia coli* by global stress signals, *Molecular microbiology*, 19(1), pp. 101–112.
- Ma, D., Cook, D. N., Alberti, M., Pon, N. G., Nikaido, H. and Hearst, J. E.** (1995) Genes *acrA* and *acrB* encode a stress-induced efflux system of *Escherichia coli*, *Molecular microbiology*, 16(1), pp. 45–55.
- Maddocks, S. E. and Oyston, P. C. F.** (2008) Structure and function of the LysR-type transcriptional regulator (LTTR) family proteins, *Microbiology*, 154(12), pp. 3609–3623.

- Mahan, M. J., Tobias, J. W., Slauch, J. M., Hanna, P. C., Collier, R. J. and Mekalanos, J. J.** (1995) Antibiotic-based selection for bacterial genes that are specifically induced during infection of a host, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 92(3), pp. 669–673.
- Manna, SK., Samantha, S., Das, MK. and Mishra, SS.** (2003) An outbreak of *Yersinia ruckeri* septicemia in indian major carps. *J. England fish soc India*, 35. 28-31 pp.
- Manen, D., Pugeon, M., Damay, P. and Geiselmann, J.** (1997) A sensitive reporter gene system using bacterial luciferase based on a series of plasmid cloning vectors compatible with derivatives of pBR322, *Gene*, 186(2), pp. 197–200.
- Medeiros, A. A., OBrien, T. F., Rosenberg, E. Y. and Nikaido, H.** (1987) Loss of OmpC porin in a strain of *Salmonella typhimurium* causes increased resistance to cephalosporins during therapy, *The Journal of Infectious Diseases*, 156(5), pp. 751–757.
- Meighen, E. A. and Szittner, R. B.** (1992) Multiple repetitive elements and organization of the lux operons of luminescent terrestrial bacteria., *Journal of Bacteriology*, 174(16), pp. 5371–5381.
- Méndez, J., Fernandez, L., Menendez, A., Reimundo, P., Perez-Pascual, D., Navais, R. and Guijarro, J. A.** (2009) A Chromosomally Located traHIJKLMN Operon Encoding a Putative Type IV Secretion System Is Involved in the Virulence of *Yersinia ruckeri*, *Applied and Environmental Microbiology*, 75(4), pp. 937–945.
- Méndez, J., Reimundo, P., Perez-Pascual, D., Navais, R., Gomez, E. and Guijarro, J. A.** (2011) A Novel cdsAB Operon Is Involved in the Uptake of L-Cysteine and Participates in the Pathogenesis of *Yersinia ruckeri*, *Journal of Bacteriology*, 193(4), pp. 944–951.
- Méndez, J. and Guijarro, J. A.** (2013) In vivo monitoring of *Yersinia ruckeri* in fish tissues: progression and virulence gene expression: In vivo *Yersinia ruckeri* progression, *Environmental Microbiology Reports*, 5(1), pp. 179–185.
- Méndez, J., Reimundo, P., Pérez-Pascual, D., Navais, R., Gómez, E., Cascales, D. and Guijarro, J. A.** (2012) An overview of virulence-associated factors of Gram-negative fish pathogenic Bacteria, in *Health and Environment in Aquaculture*. InTech.
- Méndez, J.** (2012) *Yersinia ruckeri*: genes relacionados con la virulencia y progresión del proceso infeccioso. Tesis Doctoral. Universis de Oviedo
- Meredith, T. C. and Woodard, R. W.** (2005) Identification of GutQ from *Escherichia coli* as a D-Arabinose 5-Phosphate Isomerase, *Journal of Bacteriology*, 187(20), pp. 6936–6942.
- Milani, C. J. E., Aziz, R. K., Locke, J. B., Dahesh, S., Nizet, V. and Buchanan, J. T.** (2010) The novel polysaccharide deacetylase homologue Pdi contributes to virulence of the aquatic pathogen *Streptococcus iniae*, *Microbiology*, 156(2), pp. 543–554.

- Moisi, M., Lichtenegger, S., Tutz, S., Seper, A., Schild, S. and Reidl, J.** (2013) Characterizing the Hexose-6-Phosphate Transport System of *Vibrio cholerae*, a Utilization System for Carbon and Phosphate Sources, *Journal of Bacteriology*, 195(8), pp. 1800–1808.
- Miller, J. H.** (1972) *Experiments in molecular genetics*. Cold Spring Harbor New York Laboratory press, pp. 354.
- Moffatt, J. H., Harper, M., Harrison, P., Hale, J. D. F., Vinogradov, E., Seemann, T., Henry, R., Crane, B., St. Michael, F., Cox, A. D., Adler, B., Nation, R. L., Li, J. and Boyce, J. D.** (2010) Colistin Resistance in *Acinetobacter baumannii* Is Mediated by Complete Loss of Lipopolysaccharide Production, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 54(12), pp. 4971–4977.
- Morrison, M. J. and Imperiali, B.** (2014) The Renaissance of *Bacillosamine* and Its Derivatives: Pathway Characterization and Implications in Pathogenicity, *Biochemistry*, 53(4), pp. 624–638.
- Navais, R., Méndez, J., Cascales, D., Reimundo, P. and Guijarro, J. A.** (2014) The heat sensitive factor (HSF) of *Yersinia ruckeri* is produced by an alkyl sulphatase involved in sodium dodecyl sulphate (SDS) degradation but not in virulence, *BMC microbiology*, 14(1), p. 221.
- Navais, R.** (2013) Genes de *Yersinia ruckeri* relacionados con el proceso infeccioso y con el "Factor sensible al calor" (HSF). Tesis Doctoral. Universidad de Oviedo
- Nelson, M. C., LaPatra, S. E., Welch, T. J. and Graf, J.** (2015) Complete Genome Sequence of *Yersinia ruckeri* Strain CSF007-82, Etiologic Agent of Red Mouth Disease in Salmonid Fish, *Genome Announcements*, 3(1), pp. e01491–14.
- Neubauer, H. and Sprague, L. D.** (2015) Strains of *Yersinia wautersii* should continue to be classified as the "Korean Group" of the I complex and not as a separate species, *INTERNATIONAL JOURNAL OF SYSTEMATIC AND EVOLUTIONARY MICROBIOLOGY*, 65(Pt 2), pp. 732–733.
- Nguyen, D., Joshi-Datar, A., Lepine, F., Bauerle, E., Olakanmi, O., Beer, K., McKay, G., Siehnel, R., Schafhauser, J., Wang, Y., Britigan, B. E. and Singh, P. K.** (2011) Active Starvation Responses Mediate Antibiotic Tolerance in Biofilms and Nutrient-Limited Bacteria, *Science*, 334(6058), pp. 982–986.
- Nieto, C., Sadowy, E., de la Campa, A. G., Hryniewicz, W. and Espinosa, M.** (2010) The relBE2Spn toxin-antitoxin system of *Streptococcus pneumoniae*: role in antibiotic tolerance and functional conservation in clinical isolates, *PloS One*, 5(6), p. e11289.
- Nikaido, H.** (1994) Prevention of drug access to bacterial targets: permeability barriers and active efflux, *Science (New York, N.Y.)*, 264(5157), pp. 382–388.
- Nikaido, H.** (1996) Multidrug efflux pumps of gram-negative bacteria., *Journal of bacteriology*, 178(20), p. 5853.

- Nikaido, H.** (2003) Molecular Basis of Bacterial Outer Membrane Permeability Revisited, *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 67(4), pp. 593–656.
- Nikaido, H. and Hall, J. A.** (1998) Overview of bacterial ABC transporters, *Methods in Enzymology*, 292, pp. 3–20.
- Nishino, K., Latifi, T. and Groisman, E. A.** (2006) Virulence and drug resistance roles of multidrug efflux systems of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium, *Molecular Microbiology*, 59(1), pp. 126–141.
- Oh, J. T., Cajal, Y., Skowronska, E. M., Belkin, S., Chen, J., Van Dyk, T. K., Sasser, M. and Jain, M. K.** (2000) Cationic peptide antimicrobials induce selective transcription of *micF* and *osmY* in *Escherichia coli*, *Biochimica Et Biophysica Acta*, 1463(1), pp. 43–54.
- Ohtani, M., Villumsen, K. R., Strøm, H. K. and Raida, M. K.** (2014) 3D Visualization of the Initial *Yersinia ruckeri* Infection Route in Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*) by Optical Projection Tomography, *PLoS ONE*. Edited by D. Zhou, 9(2), p. e89672.
- Osorio, C. G., Martinez-Wilson, H. and Camilli, A.** (2004) The *ompU* Paralogue *vca1008* Is Required for Virulence of *Vibrio cholerae*, *Journal of Bacteriology*, 186(15), pp. 5167–5171.
- Padilla, E., Llobet, E., Domenech-Sanchez, A., Martinez-Martinez, L., Bengoechea, J. A. and Alberti, S.** (2010) *Klebsiella pneumoniae* AcrAB Efflux Pump Contributes to Antimicrobial Resistance and Virulence, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 54(1), pp. 177–183.
- Pagès, J.-M., James, C. E. and Winterhalter, M.** (2008) The porin and the permeating antibiotic: a selective diffusion barrier in Gram-negative bacteria, *Nature Reviews Microbiology*, 6(12), pp. 893–903.
- Pantel, A., Dunyach-Remy, C., Essebe, C. N., Mesureur, J., Sotto, A., Pagès, J.-M., Nicolas-Chanoine, M.-H. and Lavigne, J.-P.** (2016) Modulation of Membrane Influx and Efflux in *Escherichia coli* Sequence Type 131 Has an Impact on Bacterial Motility, Biofilm Formation, and Virulence in a *Caenorhabditis elegans* Model, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 60(5), pp. 2901–2911.
- Parks, A. R. and Peters, J. E.** (2007) Transposon Tn7 Is Widespread in Diverse Bacteria and Forms Genomic Islands, *Journal of Bacteriology*, 189(5), pp. 2170–2173.
- Perez, A., Poza, M., Fernandez, A., del Carmen Fernandez, M., Mallo, S., Merino, M., Rumbo-Feal, S., Cabral, M. P. and Bou, G.** (2012) Involvement of the AcrAB-TolC Efflux Pump in the Resistance, Fitness, and Virulence of *Enterobacter cloacae*, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 56(4), pp. 2084–2090.
- Peters, J. E., Fricker, A. D., Kapili, B. J. and Petassi, M. T.** (2014) Heteromeric transposase elements: generators of genomic islands across diverse bacteria, *Molecular Microbiology*, 93(6), pp. 1084–1092.



- Petrarca, P., Ammendola, S., Pasquali, P. and Battistoni, A.** (2010) The Zur-Regulated ZinT Protein Is an Auxiliary Component of the High-Affinity ZnuABC Zinc Transporter That Facilitates Metal Recruitment during Severe Zinc Shortage, *Journal of Bacteriology*, 192(6), pp. 1553–1564.
- Piddock, L. J.** (2006) Multidrug-resistance efflux pumps? not just for resistance, *Nature Reviews Microbiology*, 4(8), pp. 629–636.
- Posadas, D. M., Martin, F. A., Sabio y Garcia, J. V., Spera, J. M., Delpino, M. V., Baldi, P., Campos, E., Cravero, S. L. and Zorreguieta, A.** (2007) The TolC Homologue of *Brucella suis* Is Involved in Resistance to Antimicrobial Compounds and Virulence, *Infection and Immunity*, 75(1), pp. 379–389.
- Post, D. M. B., Yu, L., Krasity, B. C., Choudhury, B., Mandel, M. J., Brennan, C. A., Ruby, E. G., McFall-Ngai, M. J., Gibson, B. W. and Apicella, M. A.** (2012) O-antigen and Core Carbohydrate of *Vibrio fischeri* Lipopolysaccharide: COMPOSITION AND ANALYSIS OF THEIR ROLE IN *EUPRYMNA SCOLOPES* LIGHT ORGAN COLONIZATION, *Journal of Biological Chemistry*, 287(11), pp. 8515–8530.
- Prouty, I. E., Brodsky, A. M., Falkow, S. and Gunn, J. S.** (2004) Bile-salt-mediated induction of antimicrobial and bile resistance in *Salmonella typhimurium*, *Microbiology*, 150(4), pp. 775–783.
- Putman, M., van Veen, H. W. and Konings, W. N.** (2000) Molecular Properties of Bacterial Multidrug Transporters, *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 64(4), pp. 672–693.
- Rahmati, S., Yang, S., Davidson, A. L. and Zechiedrich, E. L.** (2002) Control of the AcrAB multidrug efflux pump by quorum-sensing regulator SdiA, *Molecular Microbiology*, 43(3), pp. 677–685.
- Raida, M. K., Larsen, J. L., Nielsen, M. E. and Buchmann, K.** (2003) Enhanced resistance of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), against *Yersinia ruckeri* challenge following oral administration of *Bacillus subtilis* and *B. licheniformis* (BioPlus2B), *Journal of Fish Diseases*, 26(8), pp. 495–498.
- Randall, L. P. and Woodward, M. J.** (2002) The multiple antibiotic resistance (mar) locus and its significance, *Research in Veterinary Science*, 72(2), pp. 87–93.
- Rateman, E. L., Shapiro, D. D., Stevens, D. J., Schwartz, K. J. and Welch, R. A.** (2013) Genetic Analysis of the Role of yfiR in the Ability of *Escherichia coli* CFT073 To Control Cellular Cyclic Dimeric GMP Levels and To Persist in the Urinary Tract, *Infection and Immunity*, 81(9), pp. 3089–3098.
- Ratledge, C. and Dover, L. G.** (2000) Iron metabolism in pathogenic bacteria, *Annual Review of Microbiology*, 54, pp. 881–941.

- Ratray, E. A., Prosser, J. I., Glover, L. A. and Killham, K.** (1995) Characterization of rhizosphere colonization by luminescent *Enterobacter cloacae* at the population and single-cell levels., *Applied and Environmental Microbiology*, 61(8), pp. 2950–2957.
- Reed, L. J. and Muench, H.** (1938) A SIMPLE METHOD OF ESTIMATING FIFTY PER CENT ENDPOINTS, *American Journal of Epidemiology*, 27(3), pp. 493–497.
- Rodgers, C. J.** (2001) Resistance of *Yersinia ruckeri* to antimicrobial agents in vitro, *Aquaculture*. (Annual Review of Fish Diseases Volume 8), 196(3–4), pp. 325–345.
- Rodionov, D. A., Gelfand, M. S., Mironov, A. A. and Rakhmaninova, A. B.** (2001) Comparative approach to analysis of regulation in complete genomes: multidrug resistance systems in gamma-proteobacteria, *Journal of molecular microbiology and biotechnology*, 3(2), pp. 319–324.
- Romalde, J. L., Barja, J. L., Magariños, B. and Toranzo, A. E.** (1994) Starvation-Survival Processes of the Bacterial Fish Pathogen *Yersinia ruckeri*, *Systematic and Applied Microbiology*, 17(2), pp. 161–168.
- Romalde, J. L., Magariños, B., Barja, J. L. and Toranzo, A. E.** (1993) Antigenic and molecular characterization of *Yersinia ruckeri* proposal for a new intraspecies classification, *Systematic and Applied Microbiology*, 16(3), pp. 411–419.
- Romalde, J. L. and Toranzo, A. E.** (1993) Pathological activities of *Yersinia ruckeri*, the enteric redmouth (ERM) bacterium, *FEMS microbiology letters*, 112(3), pp. 291–299.
- Romalde, J. L. and Toranzo, A. E.** (1991) Evaluation of the API-20E system for the routine diagnosis of the enteric redmouth disease, *Bull. Eur. Assoc. Fish Pathol.*, 11, pp. 147-149.
- Römbling, U., Galperin, M. Y. and Gomelsky, M.** (2013) Cyclic di-GMP: the first 25 years of a universal bacterial second messenger, *Microbiology and molecular biology reviews: MMBR*, 77(1), pp. 1–52.
- Rosenberg, E. Y., Bertenthal, D., Nilles, M. L., Bertrand, K. P. and Nikaido, H.** (2003) Bile salts and fatty acids induce the expression of *Escherichia coli* AcrAB multidrug efflux pump through their interaction with Rob regulatory protein: Binding of bile salts to Rob regulates AcrAb expression, *Molecular Microbiology*, 48(6), pp. 1609–1619.
- Ross, A. J., Rucker, R. R. and Ewing, W. H.** (1966) Description of a *bacterium* associated with redmouth disease of rainbow trout (*Salmo gairdneri*), *Canadian journal of microbiology*, 12(4), pp. 763–770.
- Roux, D., Danilchanka, O., Guillard, T., Cattoir, V., Aschard, H., Fu, Y., Angoulvant, F., Messika, J., Ricard, J.-D., Mekalanos, J. J., Lory, S., Pier, G. B. and Skurnik, D.** (2015) Fitness cost of antibiotic susceptibility during bacterial infection, *Science Translational Medicine*, 7(297), pp. 297ra114–297ra114.
- Rucker, R. R.** (1966) Redmouth disease of rainbow trout (*Salmo gairdneri*)., *Bulletin - Office international des épizooties*, 65(5), pp. 825–830.

- Sabri, M., Houle, S. and Dozois, C. M.** (2009) Roles of the Extraintestinal Pathogenic *Escherichia coli* ZnuACB and ZupT Zinc Transporters during Urinary Tract Infection, *Infection and Immunity*, 77(3), pp. 1155–1164.
- Saleh, M., Soliman, H. and El-Matbouli, M.** (2008) Loop-mediated isothermal amplification as an emerging technology for detection of *Yersinia ruckeri* the causative agent of enteric red mouth disease in fish, *BMC Veterinary Research*, 4(1), p. 31.
- Saleh, M., Soliman, H. and El-Matbouli, M.** (2015) Gold nanoparticles as a potential tool for diagnosis of fish diseases, *Methods in Molecular Biology* (Clifton, N.J.), 1247, pp. 245–252.
- Sambrook, J., Russell, D. and Sambrook, J.** (2001) *Molecular cloning: a laboratory manual*. Third ed. Cold Spring Harbor Laboratory. Cold Spring Harbor, N.Y.
- Savin, C., Martin, L., Bouchier, C., Filali, S., Chenau, J., Zhou, Z., Becher, F., Fukushima, H., Thomson, N. R., Scholz, H. C. and Carniel, E.** (2014) The *Yersinia pseudotuberculosis* complex: Characterization and delineation of a new species, *Yersinia wautersii*, *International Journal of Medical Microbiology*, 304(3-4), pp. 452–463.
- Schumann, W.** (2012) Thermosensor systems in eubacteria, *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 739, pp. 1–16.
- Secades, P. and Guijarro, J. A.** (1999) Purification and characterization of an extracellular protease from the fish pathogen *Yersinia ruckeri* and effect of culture conditions on production, *Applied and environmental microbiology*, 65(9), pp. 3969–3975.
- Seoane, A. S. and Levy, S. B.** (1995) Characterization of MarR, the repressor of the multiple antibiotic resistance (mar) operon in *Escherichia coli.*, *Journal of bacteriology*, 177(12), pp. 3414–3419.
- Shaowu, L., Di, W., Hongbai, L. and Tongyan, L.** (2013) Isolation of *Yersinia ruckeri* strain H01 from farm-raised Amur Sturgeon *Acipenser schrencki* in China, *Journal of Aquatic Animal Health*, 25(1), pp. 9–14.
- Sheets, J. and Aktories, K.** (2016) Insecticidal Toxin Complexes from *Photorhabdus luminescens*, in. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg.
- Shelburne, S. A., Keith, D. B., Davenport, M. T., Horstmann, N., Brennan, R. G. and Musser, J. M.** (2008) Molecular characterization of group A *Streptococcus maltodextrin* catabolism and its role in pharyngitis, *Molecular Microbiology*, 69(2), pp. 436–452.
- Sica, M. G., Brugnoli, L. I., Marucci, P. L. and Cubitto, M. A.** (2012) Characterization of probiotic properties of lactic acid bacteria isolated from an estuarine environment for application in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum) farming, *Antonie van Leeuwenhoek*, 101(4), pp. 869–879.

- Simon, R., Priefer, U. and Pühler, A.** (1983) A Broad Host Range Mobilization System for *In Vivo* Genetic Engineering: Transposon Mutagenesis in Gram Negative Bacteria, *Nature Biotechnology*, 1(9), pp. 784–791.
- Siwicki, A. K., Morand, M., Jr, J. C. F., Nissen, S., Kazun, K. and Glombski, E.** (2001) Influence of HMB (beta-hydroxy-beta-methylbutyrate) on antibody secreting cells (ASC) after *in vitro* and *in vivo* immunization with the anti-*Yersinia ruckeri* vaccine of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*), *Veterinary Research*, 32(5), pp. 491–498.
- Skorupski, K. and Taylor, R. K.** (1997) Cyclic AMP and its receptor protein negatively regulate the coordinate expression of cholera toxin and toxin-coregulated pilus in *Vibrio cholerae*, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 94(1), pp. 265–270.
- Smirnova, A., Li, H., Weingart, H., Aufhammer, S., Burse, A., Finis, K., Schenk, A. and Ullrich, M.** (2001) Thermoregulated expression of virulence factors in plant-associated bacteria, *Archives of Microbiology*, 176(6), pp. 393–399.
- Smith, A. M., Goldring, O. L. and Dear, G.** (1987) The production and methods of use of polyclonal antisera to the pathogenic organisms *Aeromonas salmonicida*, *Yersinia ruckeri* and *Renibacterium salmoninarum*, *Journal of Fish Biology*, 31.
- Sousa, J. A., Magarinos, B., Eiras, J. E., Toranzo, A. E., Romalde, J. L. and others** (2001) Molecular characterization of Portuguese strains of *Yersinia ruckeri* isolated from fish culture systems, *Journal of Fish Diseases*, 24(3), pp. 151–160.
- Srikhanta, Y. N., Fox, K. L. and Jennings, M. P.** (2010) The phasevarion: phase variation of type III DNA methyltransferases controls coordinated switching in multiple genes, *Nature Reviews Microbiology*, 8(3), pp. 196–206.
- Stave, J. W., Cook, T. M. and Roberson, B. S.** (1987) Chemiluminescent responses of striped bass, *Morone saxatilis* (Walbaum), phagocytes to strains of *Yersinia ruckeri*, *Journal of Fish Diseases*, 10(1), pp. 1–10.
- Steinmann, R. and Dersch, P.** (2013) Thermosensing to adjust bacterial virulence in a fluctuating environment, *Future Microbiology*, 8(1), pp. 85–105.
- Stevenson, R., Flett, D. and Raymond, B. T.** (1993) Enteric redmouth (ERM) and other enterobacterial infections of fish, *Bacterial diseases of fish*, pp. 80–105.
- Stevenson, R. M. W. and Airdrie, D. W.** (1984) Serological variation among *Yersinia ruckeri* strains, *Journal of Fish Diseases*, 7(4), pp. 247–254.
- Su, C.-C., Rutherford, D. J. and Edward, W. Y.** (2007) Characterization of the multidrug efflux regulator AcrR from *Escherichia coli*, *Biochemical and biophysical research communications*, 361(1), pp. 85–90.
- Suh, M.-J., Keasey, S. L., Brueggemann, E. E. and Ulrich, R. G.** (2017) Antibiotic-dependent perturbations of extended spectrum beta-lactamase producing *Klebsiella pneumoniae* proteome, *PROTEOMICS*, p. 1700003.

- Szekeres, S., Dauti, M., Wilde, C., Mazel, D. and Rowe-Magnus, D. A.** (2007) Chromosomal toxin-antitoxin loci can diminish large-scale genome reductions in the absence of selection, *Molecular Microbiology*, 63(6), pp. 1588–1605.
- Tan, S. Y., Dutta, A., Jakubovics, N. S., Ang, M. Y., Siow, C. C., Mutha, N. V., Heydari, H., Wee, W. Y., Wong, G. J. and Choo, S. W.** (2015) *Yersinia* Base: a genomic resource and analysis platform for comparative analysis of *Yersinia*, *BMC Bioinformatics*, 16(1).
- Tang K.F., Lightner D.V.** (2014) Homologues of insecticidal toxin complex genes within a genomic island in the marine bacterium *Vibrio parahaemolyticus*, *FEMS Microbiology Letters*, 361(1), pp. 34–42.
- Tao, Z., Zhou, T., Zhou, S. and Wang, G.** (2016) Temperature-regulated expression of type VI secretion systems in fish pathogen *Pseudomonas plecoglossicida* revealed by comparative secretome analysis, *FEMS Microbiology Letters*, 363(22).
- Temprano, A., Yugueros, J., Hernanz, C., Sanchez, M., Berzal, B., Luengo, J. M. and Naharro, G.** (2001) Rapid identification of *Yersinia ruckeri* by PCR amplification of *yrul-yrur* quorum sensing, *Journal of Fish Diseases*, 24(5), pp. 253–261.
- Thanassi, D. G., Cheng, L. W. and Nikaido, H.** (1997) Active efflux of bile salts by *Escherichia coli*, *Journal of bacteriology*, 179(8), pp. 2512–2518.
- Thorsen, B. K., Enger, Ø., Norland, S. and Hoff, K. A.** (1992) Long-term starvation survival of *Yersinia ruckeri* at different salinities studied by microscopical and flow cytometric methods., *Applied and environmental microbiology*, 58(5), pp. 1624–1628.
- Tinsley, J. W., Lyndon, A. R. and Austin, B.** (2011) Antigenic and cross-protection studies of biotype 1 and biotype 2 isolates of *Yersinia ruckeri* in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum): Antigenic studies of *Yersinia ruckeri*, *Journal of Applied Microbiology*, 111(1), pp. 8–16.
- Tobback, E., Decostere, A., Hermans, K., Haesebrouck, F. and Chiers, K.** (2007) *Yersinia ruckeri* infections in salmonid fish, *Journal of fish diseases*, 30(5), pp. 257–268.
- Trcek, J., Fuchs, T. M. and Trulzsch, K.** (2010) Analysis of *Yersinia enterocolitica* invasins expression in vitro and in vivo using a novel luxCDABE reporter system, *Microbiology*, 156(9), pp. 2734–2745.
- Tsai, Y.-K., Fung, C.-P., Lin, J.-C., Chen, J.-H., Chang, F.-Y., Chen, T.-L. and Siu, L. K.** (2011) *Klebsiella pneumoniae* Outer Membrane Porins OmpK35 and OmpK36 Play Roles in both Antimicrobial Resistance and Virulence, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 55(4), pp. 1485–1493.
- Tsukagoshi, N. and Aono, R.** (2000) Entry into and Release of Solvents by *Escherichia coli* in an Organic-Aqueous Two-Liquid-Phase System and Substrate Specificity of the AcrAB-TolC Solvent-Extruding Pump, *Journal of Bacteriology*, 182(17), pp. 4803–4810.

- Urbany, C. and Neuhaus, H. E.** (2008) Citrate uptake into *Pectobacterium atrosepticum* is critical for bacterial virulence, *Molecular plant-microbe interactions*, 21(5), pp. 547–554.
- Vendrell, D., Balcázar, J. L., Calvo, A. C., de Blas, I., Ruiz-Zarzuela, I., Gironés, O. and Múzquiz, J. L.** (2009) Quantitative analysis of bacterial adhesion to fish tissue, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 71(2), pp. 331–333.
- VFDB: Virulence Factors of Bacterial Pathogens** [Internet]. [citado 25 de abril de 2017]. Disponible en: <http://www.mgc.ac.cn/VFs/main.htm>
- Vijayakumar, S. R. V., Kirchoff, M. G., Patten, C. L. and Schellhorn, H. E.** (2004) RpoS-Regulated Genes of *Escherichia coli* Identified by Random lacZ Fusion Mutagenesis, *Journal of Bacteriology*, 186(24), pp. 8499–8507.
- Villumsen, K. R., Neumann, L., Ohtani, M., Strøm, H. K. and Raida, M. K.** (2014) Oral and Anal Vaccination Confers Full Protection against Enteric Redmouth Disease (ERM) in Rainbow Trout, *PLoS ONE*. Edited by R. Manganeli, 9(4), p. e93845.
- Waidmann, M. S., Bleichrodt, F. S., Laslo, T. and Riedel, C. U.** (2011) Bacterial luciferase reporters: The Swiss army knife of molecular biology, *Bioengineered Bugs*, 2(1), pp. 8–16.
- Walker, K. A. and Miller, V. L.** (2004) Regulation of the Ysa Type III Secretion System of *Yersinia enterocolitica* by YsaE/SycB and YsrS/YsrR, *Journal of Bacteriology*, 186(13), pp. 4056–4066.
- Wang, X., Kim, Y., Hong, S. H., Ma, Q., Brown, B. L., Pu, M., Tarone, A. M., Benedik, M. J., Peti, W., Page, R. and Wood, T. K.** (2011) Antitoxin MqsA helps mediate the bacterial general stress response, *Nature Chemical Biology*, 7(6), pp. 359–366.
- Wang, S., Rustandi, R. R., Lancaster, C., Hong, L. G., Thiriot, D. S., Xie, J., Secore, S., Kristopeit, A., Wang, S.-C. and Heinrichs, J. H.** (2016) Toxicity assessment of *Clostridium difficile* toxins in rodent models and protection of vaccination, *Vaccine*, 34(10), pp. 1319–1323.
- Wassarman, K. M., Repoila, F., Rosenow, C., Storz, G. and Gottesman, S.** (2001) Identification of novel small RNAs using comparative genomics and microarrays, *Genes & development*, 15(13), pp. 1637–1651.
- Watanabe, R. and Doukyu, N.** (2012) Contributions of mutations in *acrR* and *marR* genes to organic solvent tolerance in *Escherichia coli*, *AMB Express*, 2(1), p. 58.
- Watanabe, R. and Doukyu, N.** (2014) Improvement of organic solvent tolerance by disruption of the *lon* gene in *Escherichia coli*, *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 118(2), pp. 139–144.
- Weber, B., Chen, C. and Milton, D. L.** (2010) Colonization of fish skin is vital for *Vibrio anguillarum* to cause disease: Colonization of fish skin by *V. anguillarum*, *Environmental Microbiology Reports*, 2(1), pp. 133–139.

- Welch, T. J. and LaPatra, S.** (2016) *Yersinia ruckeri* lipopolysaccharide is necessary and sufficient for eliciting a protective immune response in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum), *Fish & Shellfish Immunology*, 49, pp. 420–426.
- Welch, T. J. and Wiens, G. D.** (2005) Construction of a virulent, green fluorescent protein-tagged *Yersinia ruckeri* and detection in trout tissues after intraperitoneal and immersion challenge, *Diseases of aquatic organisms*, 67(3), pp. 267–272.
- Willumsen, B.** (1989) Birds and wild fish as potential vectors of *Yersinia ruckeri*, *Journal of Fish Diseases*, 12(3), pp. 275–277.
- Woodcock, D. M., Crowther, P. J., Doherty, J., Jefferson, S., DeCruz, E., Noyer-Weidner, M., Smith, S. S., Michael, M. Z. and Graham, M. W.** (1989) Quantitative evaluation of *Escherichia coli* host strains for tolerance to cytosine methylation in plasmid and phage recombinants., *Nucleic Acids Research*, 17(9), pp. 3469–3478.
- Wozniak, R. A. F. and Waldor, M. K.** (2009) A Toxin–Antitoxin System Promotes the Maintenance of an Integrative Conjugative Element, *PLoS Genetics*. Edited by J. Casadesús, 5(3), p. e1000439.
- Xu, M., Yang, X., Yang, X.-A., Zhou, L., Liu, T.-Z., Fan, Z. and Jiang, T.** (2016) Structural insights into the regulatory mechanism of the *Pseudomonas aeruginosa* YfiBNR system, *Protein & Cell*, 7(6), pp. 403–416.
- Ye, Y., Gao, J., Jiao, R., Li, H., Wu, Q., Zhang, J. and Zhong, X.** (2015) The Membrane Proteins Involved in Virulence of *Cronobacter sakazakii* Virulent G362 and Attenuated L3101 Isolates, *Frontiers in Microbiology*, 6.
- Ye, M., Tu, J., Jiang, J., Bi, Y., You, W., Zhang, Y., Ren, J., Zhu, T., Cao, Z., Yu, Z., Shao, C., Shen, Z., Ding, B., Yuan, J., Zhao, X., Guo, Q., Xu, X., Huang, J. and Wang, M.** (2016) Clinical and Genomic Analysis of Liver Abscess-Causing *Klebsiella pneumoniae* Identifies New Liver Abscess-Associated Virulence Genes, *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 6.
- Yim, H. H., Brems, R. L. and Villarejo, M.** (1994) Molecular characterization of the promoter of *osmY*, an *rpoS*-dependent gene., *Journal of bacteriology*, 176(1), pp. 100–107.
- Yim, H. H. and Villarejo, M.** (1992) *osmY*, a new hyperosmotically inducible gene, encodes a periplasmic protein in *Escherichia coli*., *Journal of bacteriology*, 174(11), pp. 3637–3644.
- Zebian, N., Merx-Jacques, A., Pittock, P. P., Houle, S., Dozois, C. M., Lajoie, G. A. and Creuzenet, C.** (2016) Comprehensive analysis of flagellin glycosylation in *Campylobacter jejuni* NCTC 11168 reveals incorporation of legionaminic acid and its importance for host colonization, *Glycobiology*, 26(4), pp. 386–397.

**Zheng, X., Ji, Y., Weng, X. and Huang, X.** (2015) RpoS-Dependent Expression of OsmY in *Salmonella enterica* serovar Typhi: Activation Under Stationary Phase and SPI-2-Inducing Conditions, *Current Microbiology*, 70(6), pp. 877–882.

**Zhou, Y., Liang, Y., Lynch, K. H., Dennis, J. J. and Wishart, D. S.** (2011) PHAST: A Fast Phage Search Tool, *Nucleic Acids Research*, 39(suppl), pp. W347–W352.

**Zhou, Q., Feng, S., Zhang, J., Jia, A., Yang, K., Xing, K., Liao, M. and Fan, H.** (2016) Two Glycosyltransferase Genes of *Haemophilus parasuis* SC096 Implicated in Lipooligosaccharide Biosynthesis, Serum Resistance, Adherence, and Invasion, *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 6.

**Zhu, J., Zhang, T., Su, Z., Li, L., Wang, D., Xiao, R., Teng, M., Tan, M. and Zhou, R.** (2016) (p)ppGpp synthetases regulate the pathogenesis of zoonotic *Streptococcus suis*, *Microbiological Research*, 191, pp. 1–11.