



CENTRO INTERNACIONAL DE ESTUDOS  
DE DOUTORAMENTO E AVANZADOS  
DA USC (CIEDUS)

TESIS DE DOCTORADO

**Controversias taxonómicas  
del género *Edwardsiella*:  
*E. tarda* vs. *E. piscicida***

Noemí Buján Gómez

ESCUELA DE DOCTORADO INTERNACIONAL  
PROGRAMA DE DOCTORADO EN AVANCES EN BIOLOGÍA  
MICROBIANA Y PARASITARIA

SANTIAGO DE COMPOSTELA

2018





**DECLARACIÓN DEL AUTOR DE LA TESIS**  
**Controversias taxonómicas del género *Edwardsiella*:**  
***E. tarda* vs. *E. piscicida***

Dña. Noemí Buján Gómez,

*Presento mi tesis, siguiendo el procedimiento adecuado al Reglamento, y declaro que:*

- 1) La tesis abarca los resultados de la elaboración de mi trabajo.*
- 2) En su caso, en la tesis se hace referencia a las colaboraciones que tuvo este trabajo.*
- 3) La tesis es la versión definitiva presentada para su defensa y coincide con la versión enviada en formato electrónico.*
- 4) Confirmando que la tesis no incurre en ningún tipo de plagio de otros autores ni de trabajos presentados por mí para la obtención de otros títulos.*

*En Santiago de Compostela, 9 de Octubre de 2018*

Fdo. Noemí Buján Gómez





## AUTORIZACIÓN DEL DIRECTOR / TUTOR DE LA TESIS

### Controversias taxonómicas del género *Edwardsiella: E. tarda vs. E. piscicida*

Dña. Beatriz Magariños Ferro  
Dña. Alicia Estévez Toranzo

INFORMAN:

*Que la presente tesis, corresponde con el trabajo realizado por Dña. Noemí Buján Gómez, bajo nuestra dirección, y autorizamos su presentación, considerando que reúne los requisitos exigidos en el Reglamento de Estudios de Doctorado de la USC, y que como directoras de ésta no incurre en las causas de abstención establecidas en Ley 40/2015.*

*En Santiago de Compostela, 9 de Octubre de 2018*

Fdo.  
Beatriz Magariños Ferro

Fdo.  
Alicia Estévez Toranzo





## DECLARACIÓN DE CONFLICTO DE INTERESES

### Controversias taxonómicas del género *Edwardsiella: E. tarda vs. E. piscicida*

Dña. Noemí Buján Gómez,

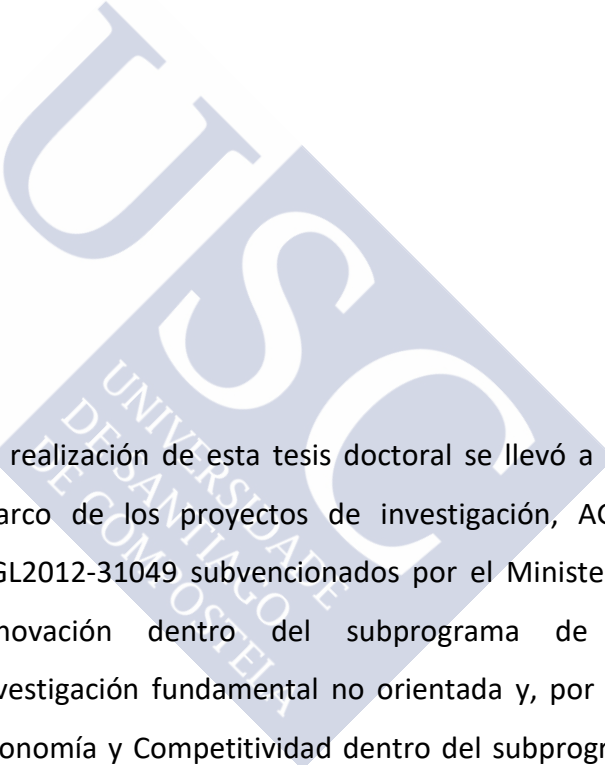
**Declaro:**

- 1) No tener ningún conflicto de intereses relevante en lo que concierne al contenido presentado en esta tesis doctoral.
- 2) Que parte de los estudios aquí presentados se basan en información ya existente, que no contiene datos de carácter personal, y por tanto el estudio no necesita la evaluación e informe previo del comité de ética de la investigación.

*En Santiago de Compostela, 9 de Octubre de 2018*

Fdo. Noemí Buján Gómez

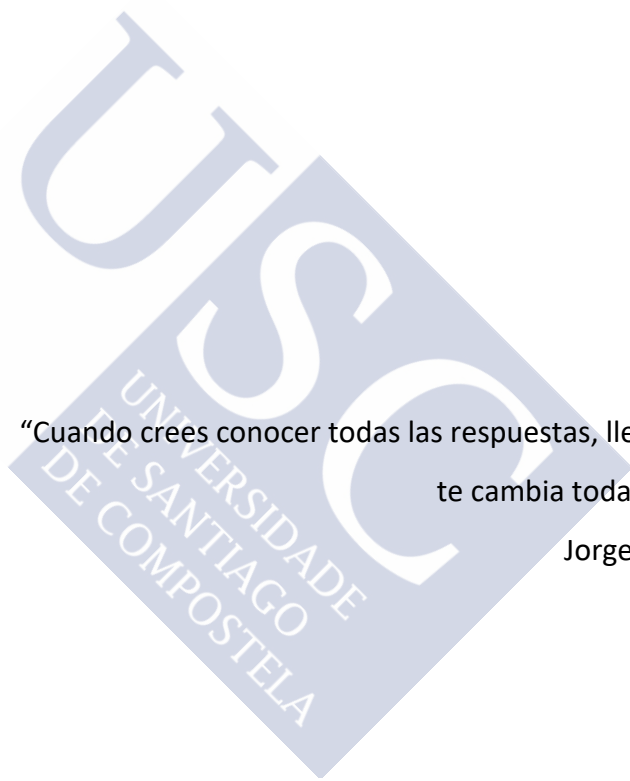




La realización de esta tesis doctoral se llevó a cabo dentro del marco de los proyectos de investigación, AGL2009-08859 y AGL2012-31049 subvencionados por el Ministerio de Ciencia e Innovación dentro del subprograma de proyectos de investigación fundamental no orientada y, por el Ministerio de Economía y Competitividad dentro del subprograma retos de la sociedad.

Durante el desarrollo del mismo, he disfrutado de una beca FPI del Ministerio de Ciencia e Innovación (BES-2010-037413).





“Cuando crees conocer todas las respuestas, llega el universo y te cambia todas las preguntas”

Jorge Francisco Pinto





**En memoria de mi abuelo.**

**A David.**



## AGRADECIMIENTOS

Los que me conocen saben lo que me ha costado llegar a este punto, pero por fin he llegado. Lágrimas, sudor, gritos, morros, desesperación, orzuelos, ... antes de dar las gracias quiero pedir perdón por todo esto, porque cuando uno está mal hace sufrir a todo aquel que lo rodea, así que PERDÓN. Dicen que la familia está para aguantarnos sobre todo en los malos momentos y en realidad eso es lo que tengo en mi trabajo, una gran “comunidad microlobuna” compuesta por todo tipo de elementos:

Por un lado tenemos a los padres, no me cabe duda que Beatriz Magariños es mi madre, ella es la que se ha llevado la peor parte en estos años. Gritos, contestaciones, malas caras, refunfuños, ... como buena madre en múltiples ocasiones me ha respondido con un “tu verás” y ha aguantado cosas que probablemente no debería, por ello no puedo dejar de estarle eternamente agradecida y por no dejar de creer en mí hasta cuando yo había dejado de hacerlo. Mi padre sería Alicia E. Toranzo, esa persona a la que no le hace falta elevar la voz, que con una mirada pone orden y te callas, esa persona que azuza a tu madre para que venga a reñirte cuando las miradas no funcionan. GRACIAS a las dos por la paciencia infinita y todos los conocimientos que habéis intentando transmitirme, *maloserá* que no me quede con alguno que ya sabéis lo difícil que me pongo a veces. Hemos llegado al fin de esta etapa, más vale tarde que nunca.

Continuando con mi familia tenemos al abuelo Juan L. Barja, que no es porque sea el que más años tiene, sino porque es al que recurres cuando estás perdida como gallina sin cabeza, porque es el que te dice que todo tiene arreglo, porque nunca te llama por tu nombre a la primera, porque es el que siempre tiene esa solución imposible, porque te enseña cosas que no sabes para que valen hasta que lo sabes, porque es el que tiene las ideas más alocadas que acaban en congresos, tesinas, artículos y demás. Con él empecé mi andadura en esto de la microbiología, con una “juanada” que dió mucho de sí. Muchas gracias Juan por todo, en el universo no podría haber dos como tú porque implosionaría, pero sin ti esta familia no estaría unida.

El tito Jesús L. Romalde es el que te riñe, el que se toma una copa contigo, el que se ríe de tus tonterías y el que hace entrar en razón a toda esta familia de locos (aunque a él también le llega). Gracias por ese apoyo incondicional y esas correcciones de no acabar.

Como ya está en el lado oscuro, a la tita y madrina Sabela le corresponde estar en este párrafo. Una madrina siempre es lo mejor de una familia, nunca grita pero te hace pasar por el aro, es una gran confidente cuando las cosas van mal y te enseña la gran parte de lo que debes saber en esta vida. Has sido y eres la madrina de mucha gente en este laboratorio, gracias por enseñarme a coger una pipeta, por estar ahí siempre, por tu tiempo y por tu inagotable paciencia. Espero que el entusiasmo que profesas hacia tu trabajo no se termine nunca porque eso es lo que nos transmites a los demás y tiene mucho mérito.

En esta gran comunidad también tenemos familiares emigrados como las titas Carmen, Rox, Mari, Nuria, Ale, Asmine y el tito David. Muchas gracias por esos años maravillosos, nuestras aventuras y vuestras enseñanzas. A la tita Ana quiero darle las gracias por aguantar ese desorden de los primeros años y por enseñarme a dar mis primeros pasos en un laboratorio. A las tías Celsa y Berta por ocuparse del trabajo más engorroso y por los ánimos. Que decir de los primos!! Grandes compañeros en las buenas y las malas, no me imagino este trabajo sin vosotros, sin ese *true love* que nos profesamos, Mike, Kikito, Imen, Aide, Diego gallu, Sergio, Alberto y Rubén gracias por todo y por ese tomamos una caña y nos vamos que mañana es martes, y finalmente llegar a trabajar después de dormir 4 horas. Ahora ya no es tan así pero que nos quiten lo *bailao*. Gracias a la prima madrileña por esos días de confesiones que hacen las jornadas más llevaderas, la que te espera ... suerte amiga!!!! Ja ja ja ja. Si me he dejado a alguien atrás mil perdones, pero las gracias a esta familia las voy a cerrar con mi hermano, con mi Zape, con Javi. Mi pájaro, es con el que me peleo todos los santos días pero que es mi debilidad porque, aunque no seas consciente me echaste la mano en uno de mis peores momentos y me ayudaste a levantar cabeza, suena muy ñoño pero no sabes lo mucho que te quiero, gracias por estar ahí.

Quiero dar las gracias a los vecinitos Andrea, Manu, Pedro, Pedro "que naseu", Celia y Hugo, por los "cafeses", las risas y por esa pared que nos divide que es más un confesionario que una pared. Gracias a Isiña porque además de todo lo dicho me llevo una gran amiga, te echo mucho de menos, pero sé que es mejor así.

Gracias a mis amigos porque una vida sin amigos no es vida, porque ellos te entienden como nadie. Hemos vivido muchos momento buenos y malos y me gustaría que siguieran aumentando, muchas gracias por ser parte de lo que hoy soy. Quiero hacer una mención

especial a Alba, aquella “malota” de las últimas filas de aquel aula de instituto que acabó siendo una de mis mejores amigas, tú sabes mejor que nadie lo que es esto y sobran las palabras para darte las gracias cuando hay un te quiero. Doy gracias también a que el Sr. Pepe no sea doctor y que no pueda hacer preguntas durante la tesis (en el caso de que pueda venir) porque no saldríamos nunca de esa sala, y una pregunta.

Dar las gracias a todos mis compañeros del Departamento de Microbiología II, llegué muerta de miedo por mi torpeza, por estar en una gran ciudad y por no conocer a nadie, y me fui queriendo volver (cosa que hice) y encantada con Madrid. Gracias a Ana y a Jose por esas tardes con Alma, os quiero chicos. Gracias también a mi galleguina madrileña, porque ella mejor que nadie sabía lo que era subir “parriba” y bajar “pabajo” en esa tierra de castilla, y gracias por seguir conmigo en el día a día, *quérote*.

I remember that day of June 2013, in which I was crying during the Santiago de Compostela-Auburn trip, as if it were yesterday. It was horrible. But they cannot describe better those six months than the tears that accompanied me during the trip Auburn-Santiago de Compostela. Thank you for expanding my knowledge, for making me feel at home and for making me grow as a person. You do not know how happy I was with you, thank you very much. Cova gracias por acogerme en tu casa, por hacerme compañía, por hacer posible uno de mis sueños, aprender a montar a caballo, gracias por las cenas, por preocuparte por mí, ... Muchísimas gracias.

Gracias a toda mi familia por apoyarme en toda esta locura y no desesperar; y perdón por querer arrancaros la cabeza cada vez que me preguntabais “y la tesis pa’cuando”. Quiero dar las gracias también a esas personas que el trece de octubre pasarán, oficialmente, a formar parte de mi familia, gracias por esos “ti non te preocupes que xa che queda pouco”. A David, porque hubo días en los que a él le hacía más ilusión que a mí que fuera doctora, días en los que sino tiré la toalla fue por él. Gracias por estar a mi lado y aguantar el encierro en casa y gracias por no mandarme a la mierda en esos cambios de humor. En resumen, gracias por hacerme feliz.

Muchas gracias a todos los que estuvisteis, estáis y estaréis a mi lado, gracias a todos porque si hoy soy como soy, es gracias a vosotros, y a mi unicornio por supuesto. Wiiiiiiii



## PUBLICACIONES

**Buján N**, Toranzo AE, Magariños B (2018) *Edwardsiella piscicida*: a relevant bacterial pathogen for cultured fish. Dis Aquat Organ, doi: [org/10.3354/dao03281](https://doi.org/10.3354/dao03281)

**Buján N**, Balboa S, Romalde JL, Toranzo AE, Magariños B (2018) Population genetic and evolution analysis of controversial genus *Edwardsiella* by multilocus sequence typing. Mol Phylogenet Evol, 127: 513-521

**Buján N**, Mohammed H, Balboa S, Romalde JL, Toranzo AE, Arias CR, Magariños B (2018) Genetic studies to re-affiliate *Edwardsiella tarda* fish isolates to *Edwardsiella piscicida* and *Edwardsiella anguillarum* species. Syst Appl Microbiol, 41: 30-37

**Buján N**, Lasa A, Toranzo AE, Magariños B (2017) Draft genome sequence of the fish strain *Edwardsiella tarda* NCIMB 2034. Genome Announc, doi: [10.1128/genomeA.00359-17](https://doi.org/10.1128/genomeA.00359-17)

**Buján N**, Toranzo AE, Magariños B (2017) Draft genome sequence of *Edwardsiella piscicida* strain ACC35.1 isolated from diseased turbot (*Scophthalmus maximus*) in Europe. Genome Announc, doi: [10.1128/genomeA.01626-16](https://doi.org/10.1128/genomeA.01626-16)

**Buján N**, Hernández-Haro C, Monteoliva L, Gil C, Magariños B (2015) Comparative proteomic study of *Edwardsiella tarda* strains with different degrees of virulence. J Proteomics, 127: 310-320

## OTRAS PUBLICACIONES RELACIONADAS

Reichley SR, Ware C, Steadman J, Gaunt PS, García JC, LaFrentz BR, Thachil A, Waldbieser GC, Stine CB, **Buján N**, Arias CR, Loch T, Welch TJ, Cipriano RC, Greenway TE, Khoo LH, Wise DJ, Lawrence ML, Griffin MJ (2017) Comparative phenotypic and genotypic analysis of *Edwardsiella* isolates from different hosts and geographic origins, with emphasis on isolates formerly classified as *E. tarda*, and evaluation of diagnostic methods. J Clin Microbiol, 55: 3466-3491

Castro N, Osorio CR, **Buján N**, Fuentes JC, Rodríguez J, Romero M, Jiménez C, Toranzo AE, Magariños B (2016) Insights into the virulence-related genes of *Edwardsiella tarda* isolated from turbot in Europe: genetic homogeneity and evidence for vibrioferrin production. J Fish Dis, 39: 565-576

Romero M, Muras A, Mayer C, **Buján N**, Magariños B, Otero A (2014) *In vitro* quenching of fish pathogen *Edwardsiella tarda* AHL production using marine bacterium *Tenacibaculum* sp. strain 20J cell extracts. Dis Aquat Organ, 108: 217-225

# Índice:

<b>ABREVIATURAS</b> .....	<b>31</b>
<b>SUMMARY</b> .....	<b>35</b>
<b>RESUMEN</b> .....	<b>37</b>
<b>RESUMO</b> .....	<b>39</b>
<b>1 INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>43</b>
1.1 LA ACUICULTURA.....	43
1.1.1 Producción piscícola.....	44
1.1.2 Enfermedades bacterianas .....	47
1.2 ASPECTOS GENERALES SOBRE EL GÉNERO <i>Edwardsiella</i> .....	48
1.2.1 Historia, taxonomía y filogenia .....	49
1.2.2 Descripción de las especies del género <i>Edwardsiella</i> .....	53
1.3 DESCRIPCIÓN DE LA ESPECIE <i>Edwardsiella piscicida</i> .....	58
1.3.1 Caracterización bioquímica y serológica.....	59
1.3.2 Caracterización molecular.....	60
1.3.3 Patogénesis y factores de virulencia.....	61
1.3.3.1 Signos clínicos y cambios fisiológicos en los peces.....	61
1.3.3.2 Factores de virulencia .....	62
1.3.3.2.1 La importancia del hierro en la virulencia.....	66
1.3.4 Técnicas de diagnóstico .....	68
1.3.5 Control y prevención.....	69
1.4 TÉCNICAS DE TIPADO GENÉTICO Y FILOGENÉTICAS.....	69
1.4.1 Técnicas basadas en el análisis de perfiles genéticos .....	70
1.4.2 Técnicas basadas en la secuenciación de genes seleccionados.....	73
1.5 TÉCNICAS DE SECUENCIACIÓN MASIVA .....	75
1.5.1 Análisis del genoma bacteriano .....	75
1.6 PROTEÓMICA DE EXPRESIÓN DIFERENCIAL .....	78
1.6.1 Técnicas proteómicas de expresión diferencial.....	78
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	<b>85</b>
<b>3 CARACTERIZACIÓN MOLECULAR Y FILOGENIA DEL GÉNERO <i>Edwardsiella</i></b> .....	<b>89</b>
3.1 MATERIALES Y MÉTODOS.....	90

3.1.1	Polimorfismo en la Longitud de Fragmentos Amplificados (AFLP) .....	90
3.1.1.1	Condiciones de cultivo y extracción de ADN .....	92
3.1.1.2	Protocolo de AFLP .....	93
3.1.2	Análisis de Secuencias Multigénicas (MLSA).....	94
3.1.2.1	Amplificación y secuenciación de los genes.....	94
3.1.2.2	Análisis filogenético.....	96
3.1.3	Secuenciación de genoma completo .....	97
3.1.3.1	Extracción del ADN para el estudio de genoma completo.....	97
3.1.3.2	Ensamblaje, anotación y análisis de los genomas.....	98
3.2	RESULTADOS.....	99
3.2.1	Identificación de especies y análisis epidemiológico mediante AFLP.....	99
3.2.2	Análisis del gen ARNr 16S y de las Secuencias Multigénicas (MLSA).....	102
3.2.2.1	Evaluación del gen ARNr 16S como herramienta taxonómica en el género <i>Edwardsiella</i> .....	102
3.2.2.2	Análisis de las Secuencias Multigénicas .....	104
3.2.2.3	Resolución de los genes analizados.....	109
3.2.3	Identificación de especies mediante análisis de genoma completo.....	112
3.3	DISCUSIÓN .....	114
<b>4</b>	<b>ESTUDIO DE LA ESTRUCTURA Y EVOLUCIÓN DE LA POBLACIÓN DEL GÉNERO <i>Edwardsiella</i></b> .....	<b>121</b>
4.1	MATERIALES Y MÉTODOS.....	122
4.1.1	Amplificación y secuenciación de los genes.....	122
4.1.2	Análisis de la estructura poblacional.....	123
4.1.2.1	Cálculo de índices de variabilidad .....	123
4.1.2.2	Análisis del equilibrio de ligamiento .....	124
4.1.2.3	Estudio de la estructura poblacional.....	125
4.1.2.4	Estudio de la recombinación y mutación .....	126
4.1.2.5	Genealogía clonal .....	128
4.1.2.6	Flujo genético de la población.....	128
4.1.2.7	Historia demográfica de la población.....	130
4.2	RESULTADOS.....	134
4.2.1	Descripción de la población y análisis de la diversidad.....	134
4.2.2	Estudio del equilibrio de ligamiento .....	136

4.2.3	Estudio de la estructura de la población.....	136
4.2.4	Análisis de la recombinación y mutación.....	141
4.2.5	Genealogía clonal.....	148
4.2.6	Flujo génico e historia demográfica de la población .....	151
4.3	DISCUSIÓN.....	153
<b>5</b>	<b>BÚSQUEDA DE FACTORES DE VIRULENCIA MEDIANTE APLICACIONES PROTEÓMICAS .....</b>	<b>161</b>
5.1	MATERIALES Y MÉTODOS.....	162
5.1.1	Tecnología 2D-DIGE.....	162
5.1.1.1	Aislados y condiciones de crecimiento .....	162
5.1.1.2	Extracción de proteínas.....	162
5.1.1.3	Diseño experimental, marcaje y electroforesis.....	163
5.1.1.4	Adquisición de imágenes y análisis .....	165
5.1.1.5	Identificación de proteínas mediante MALDI-TOF/TOF.....	166
5.1.1.6	Validación de las proteínas más relevantes.....	167
5.1.2	Tecnología TMT6plex™ .....	169
5.1.2.1	Aislados y condiciones de crecimiento .....	169
5.1.2.2	Extracción de proteínas, diseño experimental y marcaje .....	169
5.1.2.3	Identificación de proteínas mediante cromatografía líquida y espectrofotómetro de masas (LC/MC).....	171
5.2	RESULTADOS.....	173
5.2.1	Tecnología 2D-DIGE.....	173
5.2.1.1	Validación de las proteínas más relevantes.....	184
5.2.2	Tecnología TMT6plex™ .....	187
5.2.2.1	Efecto del hierro en el crecimiento y proteoma de <i>E. piscicida</i> .....	187
5.2.2.2	Proteínas relacionadas con el hierro.....	190
5.3	DISCUSIÓN.....	192
<b>6</b>	<b>DISCUSIÓN GENERAL .....</b>	<b>201</b>
<b>7</b>	<b>CONCLUSIONES / CONCLUSIONS .....</b>	<b>207</b>
<b>8</b>	<b>BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>211</b>
<b>9</b>	<b>ANEXOS.....</b>	<b>243</b>
9.1	Anexo 1.....	243
9.2	Anexo 2.....	247



# Índice de Figuras:

<b>Figura 1.</b>	Evolución de la producción mundial de la pesca de captura y acuicultura. Figura original.....	43
<b>Figura 2.</b>	Producción acuícola mundial de animales acuáticos y plantas. Los productos no alimenticios fueron excluidos. Figura original.....	44
<b>Figura 3.</b>	Infección bacteriana. Figura original.....	63
<b>Figura 4.</b>	Estructuras de la enterobactina y vibrioferrina. Figura original.....	67
<b>Figura 5.</b>	Flujo de trabajo del análisis de polimorfismos en la longitud de fragmentos amplificados (AFLP). Figura original.....	72
<b>Figura 6.</b>	Flujo de trabajo de la electroforesis diferencial en gel de dos dimensiones (2D-DIGE). Figura original.....	79
<b>Figura 7.</b>	Resumen del flujo de trabajo para TMT. Figura original.....	81
<b>Figura 8.</b>	Dendograma generado a partir de los análisis de AFLP de los 57 aislados del género <i>Edwardsiella</i> agrupados al 74% de similitud (línea gris). Figura extraída de Buján y col. 2018b, permiso cedido por la editorial Elsevier.....	100
<b>Figura 9.</b>	Dendograma generado a partir de los análisis de AFLP de los 57 aislados del género <i>Edwardsiella</i> agrupados al 34% de similitud (línea gris). Figura original.....	101
<b>Figura 10.</b>	Árboles filogenéticos obtenidos mediante los métodos de NJ (A) y ML (B) basados en la secuencia parcial del gen ARNr 16S del género <i>Edwardsiella</i> . Barra, número de sustituciones nucleotídicas por sitio. En los nodos se muestran los valores de <i>bootstrap</i> iguales o mayores al 70% como porcentaje de 1000 pseudoréplicas. Figura modificada de Buján y col. 2018b, permiso cedido por la editorial Elsevier.....	103
<b>Figura 11.</b>	Árboles obtenidos mediante los métodos de NJ y ML basados en las secuencias parciales de los genes <i>adk</i> , <i>atpD</i> , <i>dnaJ</i> , <i>glnA</i> , <i>hsp60</i> y <i>tuf</i> del género <i>Edwardsiella</i> . Figura extraída de Buján y col. 2018b, permiso cedido por la editorial Elsevier.....	107
<b>Figura 12.</b>	Árboles obtenidos mediante los métodos de NJ (A) y ML (B) basados en la concatenación de las secuencias parciales de los genes <i>adk</i> , <i>atpD</i> , <i>dnaJ</i> , <i>glnA</i> , <i>hsp60</i> y <i>tuf</i> del género <i>Edwardsiella</i> . Figura modificada de Buján y col. 2018b, permiso cedido por la editorial Elsevier.....	108
<b>Figura 13.</b>	Resolución taxonómica en relación al rango de similitudes (%) intraespecíficas (blanco) e interespecíficas (punteado). Figura extraída de Buján y col. 2018b, permiso cedido por la editorial Elsevier.....	111
<b>Figura 14.</b>	Resultados de OrthoANI calculados con los genomas disponibles del género <i>Edwardsiella</i> . Figura original.....	112
<b>Figura 15.</b>	Estructura de la población de <i>Edwardsiella</i> , <i>snap shot</i> obtenido mediante el algoritmo eBURST. Figura modificada de Buján y col. 2018a, permiso cedido por la editorial Elsevier.....	137
<b>Figura 16.</b>	<i>Dot graph</i> basado en regla de mayoría por consenso del 50%. Figura modificada de Buján y col. 2018a, permiso cedido por la editorial Elsevier.....	138

<b>Figura 17.</b>	Red construida mediante el algoritmo MJ generada a partir de la secuencia de los 10 genes concatenados. Figura modificada de Buján y col. 2018a, permiso cedido por la editorial Elsevier. ....	139
<b>Figura 18.</b>	Árboles filogenéticos obtenidos mediante los métodos de NJ (A) y ML (B) basados en en la concatenación de las secuencias parciales de los genes <i>adk</i> , <i>atpD</i> , <i>dnaJ</i> , <i>gapA</i> , <i>glnA</i> , <i>hsp60</i> , <i>phoR</i> , <i>pyrG</i> , <i>rpoA</i> y <i>tuf</i> para del género <i>Edwardsiella</i> . Figura modificada de Buján y col. 2018a, permiso cedido por la editorial Elsevier. ....	140
<b>Figura 19.</b>	<i>Splits</i> generados para cada uno de los genes individuales A) <i>adk</i> B) <i>atpD</i> C) <i>dnaJ</i> D) <i>gapA</i> E) <i>glnA</i> F) <i>hsp60</i> G) <i>phoR</i> H) <i>pyrG</i> I) <i>rpoA</i> J) <i>tuf</i> . Figura modificada de Buján y col. 2018a, permiso cedido por la editorial Elsevier. ....	144
<b>Figura 20.</b>	<i>Split</i> generado para la secuencia concatenada de cada uno de los STs. Figura modificada de Buján y col. 2018a, permiso cedido por la editorial Elsevier. ....	145
<b>Figura 21.</b>	Gráfica de los parámetros $r/m$ (A) y $\rho/\theta$ (B) obtenidos mediante el programa ClonalFrame con un nivel de significación del 95% para el género <i>Edwardsiella</i> . Figura modificada de Buján y col. 2018a, permiso cedido por la editorial Elsevier. ....	146
<b>Figura 22.</b>	Árbol filogenético basado en la concatenación de las secuencias parciales de los genes <i>adk</i> , <i>atpD</i> , <i>gapA</i> , <i>dnaJ</i> , <i>glnA</i> , <i>hsp60</i> , <i>phoR</i> , <i>pyrG</i> , <i>rpoA</i> , y <i>tuf</i> del género <i>Edwardsiella</i> construido mediante los métodos de NJ y ML. Figura modificada de Buján y col. 2018a, permiso cedido por la editorial Elsevier. ....	147
<b>Figura 23.</b>	Genealogía clonal (A) y eventos evolutivos producidos en cada uno de los nodos (B) obtenidos mediante el programa ClonalFrame. Figura modificada de Buján y col. 2018a, permiso cedido por la editorial Elsevier. ....	150
<b>Figura 24.</b>	Correlograma para las frecuencias alélicas individuales obtenido mediante la representación gráfica de la dispersión del índice de Moran I. Figura modificada de Buján y col. 2018a, permiso cedido por la editorial Elsevier. ....	151
<b>Figura 25.</b>	Diseño experimental para el análisis del proteoma mediante TMT6plex™. Figura original. ....	170
<b>Figura 26.</b>	Esquema de la estructura de un sistema de nanocromatografía conectado a un analizador triple-TOF. Figura original. ....	172
<b>Figura 27.</b>	Imágenes obtenidas del programa DeCyder de la pareja de fluorocromos Cy3/Cy5 de los 4 geles DIGE. Figura original. ....	174
<b>Figura 28.</b>	Imagen representativa del gel de referencia 2D teñido con azul de coomasie. Figura modificada de Buján y col. 2015, permiso cedido por la editorial Elsevier. ...	175
<b>Figura 29.</b>	Imagen representativa del gel de referencia 2D teñido con azul de coomasie. Figura modificada de Buján y col. 2015, permiso cedido por la editorial Elsevier. ...	176
<b>Figura 30.</b>	Figura resumen de los resultados obtenidos por 2D-DIGE. Figura original. ....	183
<b>Figura 31.</b>	Clasificación funcional de las proteínas de expresión diferencial identificadas. Figura original. ....	184
<b>Figura 32.</b>	Crecimiento de los aislados ACC35.1 y NCIMB 2034 en medio de movilidad. Figura modificada de Buján y col. 2015, permiso cedido por la editorial Elsevier. ...	185

<b>Figura 33.</b>	Perfiles de crecimiento de los aislados ACC35.1 y NCIMB 2034 a diferentes concentraciones de polimixina B. Figura modificada de Buján y col. 2015, permiso cedido por la editorial Elsevier. ....	186
<b>Figura 34.</b>	Alineamiento de las secuencias de aminoácidos del gen <i>sod</i> de los aislados ACC35.1 correspondiente a <i>sodI</i> y NCIMB 2034 a <i>sodII</i> . Figura tomada de Buján y col. 2015, permiso cedido por la editorial Elsevier. ....	186
<b>Figura 35.</b>	Efectos de la disponibilidad de hierro sobre el crecimiento del aislado ACC35.1 <i>E. piscicida</i> . Figura original. ....	187
<b>Figura 36.</b>	Clasificación de las proteínas identificadas en el experimento TMT6plex según las tres comparaciones. Figura original. ....	189





# Índice de Tablas:

<b>Tabla 1.</b>	Producción (en toneladas) acuícola de peces comestibles procedentes de la acuicultura continental, marina y costera por continente. ....	45
<b>Tabla 2.</b>	Principales especies cultivadas (en toneladas) de los 25 países que engloban más del 95% de la producción acuícola (continental, marina y costera).....	46
<b>Tabla 3.</b>	Características bioquímicas diferenciales entre <i>E. tarda</i> , <i>E. hoshinae</i> y <i>E. ictaluri</i> .....	51
<b>Tabla 4.</b>	Características bioquímicas diferenciales entre las especies de <i>Edwardsiella</i> . ....	52
<b>Tabla 5.</b>	Primeras descripciones en pez de <i>E. tarda</i> . ....	54
<b>Tabla 6.</b>	Primeras descripciones de <i>E. hoshinae</i> . ....	55
<b>Tabla 7.</b>	Primeras descripciones de <i>E. ictaluri</i> .....	56
<b>Tabla 8.</b>	Primeras descripciones de <i>E. anguillarum</i> . ....	58
<b>Tabla 9.</b>	Características bioquímicas de <i>E. piscicida</i> . ....	59
<b>Tabla 10.</b>	Primeros aislamientos de <i>E. piscicida</i> . ....	61
<b>Tabla 11.</b>	Herramientas bioinformáticas usadas en la comparación de genomas. ....	76
<b>Tabla 12.</b>	Aislados de <i>Edwardsiella</i> utilizadas para llevar acabo el análisis mediante AFLP y MLSA, indicando su origen geográfico, su hospedador y el año de aislamiento. ....	91
<b>Tabla 13.</b>	Programa de PCR utilizado en la amplificación selectiva para AFLP. ....	94
<b>Tabla 14.</b>	Cebadores y condiciones de PCR utilizados para la amplificación de los genes seleccionados para el análisis MLSA. ....	96
<b>Tabla 15.</b>	Cepas de <i>Edwardsiella tarda</i> indicando su origen geográfico, su hospedador y el año de aislamiento, cuyo genoma completo fue analizado.....	97
<b>Tabla 16.</b>	Porcentajes de similitud obtenidos para el gen ARNr 16S en base a las diferencias en el número total de nucleótidos entre las cepas tipo del género <i>Edwardsiella</i> . ....	102
<b>Tabla 17.</b>	Porcentajes de similitud obtenidos en base a las diferencias en el número total de nucleótidos de las secuencias concatenadas entre los grupos definidos del género <i>Edwardsiella</i> . ....	110
<b>Tabla 18.</b>	Comparación de resultados del cálculo de ANI utilizando el algoritmo OrthoANI y DDH <i>in silico</i> entre los genomas disponibles del género <i>Edwardsiella</i> . ....	113
<b>Tabla 19.</b>	Cebadores utilizados para la amplificación de los genes empleados en el análisis MLST. ....	122
<b>Tabla 20.</b>	Contenido G+C % mol de los fragmentos génicos utilizados. ....	134
<b>Tabla 21.</b>	Número de alelos y variaciones nucleotídicas. ....	135
<b>Tabla 22.</b>	Valores de diversidad nucleotídicas.....	135
<b>Tabla 23.</b>	Perfil alélico del esquema de MLST establecido para el género <i>Edwardsiella</i> . ....	136

<b>Tabla 24.</b> Número de eventos de recombinación detectados mediante el programa DNASP5.....	141
<b>Tabla 25.</b> Resumen de los estadísticos utilizados para el análisis demográfico de la población para el género <i>Edwardsiella</i> .....	152
<b>Tabla 26.</b> Diseño experimental para el ensayo de DIGE. ....	164
<b>Tabla 27.</b> Manchas proteicas con expresión diferencial entre el aislado ACC35.1 y la cepa NCIMB 2034 (ACC35.1 vs. NCIMB2034). ....	177
<b>Tabla 28.</b> Manchas proteicas identificadas con expresión diferencial reasignadas a la categoría de comunes manualmente (ACC35.1 vs. NCIMB2034). ....	180
<b>Tabla 29.</b> Proteínas de expresión diferencial relacionadas con el hierro en el aislado <i>E. piscicida</i> ACC35.1 bajo diferentes condiciones de disponibilidad de este elemento. ....	191



## ABREVIATURAS

<b>2D-DIGE:</b>	Electroforesis diferencial en gel de dos dimensiones ( <i>Two-Dimensional Difference in-Gel Electrophoresis</i> )
<b>ACN:</b>	acetonitrilo ( <i>ACetoNitrile</i> )
<b>AFLP:</b>	polimorfismos en la longitud de fragmentos amplificados ( <i>Amplified Fragment Length Polymorphism</i> )
<b>AHL:</b>	N-Acil Homoserin-Lactona
<b>AIC:</b>	criterio de información de Akaike ( <i>Akaike Information Criterion</i> )
<b>AMP:</b>	pequeña proteína antimicrobiana ( <i>AntiMicrobioal Peptide/Protein</i> )
<b>ANI:</b>	promedio de identidad nucleotídica ( <i>Average Nucleotide Identity</i> )
<b>AT:</b>	tipo alélico ( <i>Allelic Type</i> )
<b>ATCC:</b>	colección americana de cultivos tipo ( <i>American Type Culture Collection</i> )
<b>BIC:</b>	criterio de información bayesiano ( <i>Bayesian Information Criterion</i> )
<b>BOX-PCR:</b>	amplificación por PCR de elementos repetitivos BOX
<b>BSA:</b>	seroalbúmina bovina ( <i>Bovine Serum Albumin</i> )
<b>BVA:</b>	análisis de las variaciones biológicas ( <i>Biological Variation Analysis</i> )
<b>CC:</b>	complejo clonal ( <i>Clonal complex</i> )
<b>CDC:</b>	centro de prevención y control de enfermedades ( <i>Centers for Disease Control and Prevention</i> ) (Estados Unidos)
<b>CECT:</b>	Colección Española de Cultivos Tipo
<b>CNB-CSIC:</b>	Centro Nacional de Biotecnología- Consejo Superior de Investigaciones Científicas
<b>cps:</b>	eventos por segundo ( <i>counts per second</i> )
<b>CUR:</b>	cortina de gas ( <i>CURtain gas</i> )
<b>DC:</b>	agar citrato desoxicolato ( <i>Desoxycholate Citrate</i> )
<b>DDH:</b>	hibridación ADN-ADN <i>in vitro</i> ( <i>in vitro DNA-DNA hybridization</i> )
<b>DIA:</b>	análisis diferencial en gel ( <i>Differential In gel Analysis</i> )
<b>DLV:</b>	variación de locus doble ( <i>Doble locus variable</i> )
<b>DO:</b>	Densidad Óptica
<b>DP:</b>	potencial de desagregación ( <i>Disaggregation Potential</i> )

<b>DSMZ:</b>	colección alemana de cultivos tipo ( <i>Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen</i> )
<b>DTT:</b>	ditiotreititol ( <i>DiThioThreitol</i> )
<b>ERIC-PCR:</b>	amplificación por PCR de secuencias palindrómicas intergénicas de enterobacterias ( <i>Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus</i> )
<b>ESC:</b>	septicemia entérica del pez gato ( <i>Enteric Septicemia of Catfish</i> )
<b>Evp:</b>	proteína de virulencia de <i>Edwardsiella</i> ( <i>Edwardsiella virulence protein</i> )
<b>FAO:</b>	organización de las Naciones Unidas para la alimentación y la agricultura ( <i>Food and Agriculture Organization of the United Nations</i> )
<b>FDR:</b>	tasa de falsos descubrimientos ( <i>False Discovery Rate</i> )
<b>GBDP:</b>	distancia genómica filogenética por BLAST ( <i>Genome BLAST Distance Phylogeny</i> )
<b>GEM:</b>	modelo metabólico a escala genómica ( <i>Genomic-scale Metabolic Model</i> )
<b>HGT:</b>	transferencia horizontal de genes ( <i>Horizontal Gene Transfer</i> )
<b>HSPs:</b>	pares de segmento de alta puntuación ( <i>High Scoring Segment Pairs</i> )
$I_A$ :	índice de asociación ( <i>Index of Association</i> )
<b>IBD:</b>	aislamiento por distancia ( <i>Isolation by distance</i> )
<b>ICAT:</b>	etiqueta de afinidad codificada por isótopos ( <i>Isotope-Coded Affinity Tag</i> )
<b>IDA:</b>	adquisición independiente de la información ( <i>Information-Dependent Acquisition</i> )
<b>IHT:</b>	temperatura del calentador de interfaz ( <i>Interface Heater Temperature</i> )
$\hat{I}_A$ :	índice de asociación estandarizado ( <i>Standardized Index of Association</i> )
<b>i<sup>2</sup>DDH:</b>	hibridación ADN-ADN <i>in silico</i> ( <i>in silico DNA-DNA Hybridization</i> )
<b>iTRAQ:</b>	etiqueta isotópica para la cuantificación relativa y absoluta ( <i>isotope Tag for Relative and Absolute Quantitation</i> )
<b>LC/MC:</b>	cromatografía líquida y espectrofotómetro de masas ( <i>Liquid Chromatography-Mass Spectrometry</i> )
<b>LC-ESI-MS/MS:</b>	cromatografía líquida-electrospray-espectrometría de masas en tándem ( <i>Liquid Chromatography-ElectroSpray Ionization-tandem Mass Spectrometry</i> )
<b>LD<sub>50</sub>:</b>	dosis letal a la cual se muere la mitad de los organismos ( <i>Lethal Dose</i> )
<b>MALDI-TOF:</b>	espectrometría de masas mediante ionización de desorción laser asistida por matriz y analizador de tiempo de vuelo ( <i>Matrix Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight</i> )
<b>MCMC:</b>	Montecarlo basado en cadenas de Markov (Markov Chain Monte Carlo)
<b>MJ:</b>	<i>Median Joining</i>

<b>ML:</b>	máxima verosimilitud ( <i>Maximum likelihood</i> )
<b>MLEE:</b>	electroforesis de enzimas multilocus ( <i>MultiLocus Enzyme Electrophoresis</i> )
<b>MLSA:</b>	análisis multigénico de secuencias ( <i>MultiLocus Sequence Analysis</i> )
<b>MLST:</b>	tipado multigénico de secuencia ( <i>MultiLocus Sequence Typing</i> )
<b>MLVA:</b>	análisis multigénico del número variable de repeticiones en tándem ( <i>MultiLocus Variable number tandem repeat Analysis</i> )
<b>NCIMB:</b>	Colección Nacional de Bacterias de Interés Industrial, Marino y Alimentario ( <i>National Collection of Industrial, Food and Marine Bacteria</i> ) (Reino Unido)
<b>NJ:</b>	<i>Neighbor joining</i>
<b>PBS:</b>	tampón fosfato salino
<b>PCM-UCM:</b>	Unidad de Proteómica del Parque Científico de Madrid en la Universidad Complutense de Madrid
<b>PFGE:</b>	electroforesis en campo pulsante ( <i>Pulsed Field Gel Electrophoresis</i> )
<b>Phi:</b>	índice de homeoplasia a pares ( <i>pairwise homoplasmy index</i> )
<b>PMF:</b>	análisis de las masas de los péptidos ( <i>Peptide Mass Fingerprinting</i> )
<b>PMSF:</b>	fluoruro de fenilmetilsulfonilo ( <i>PhenylMethylSulfonyl Fluoride</i> )
<b>qPCR:</b>	PCR en tiempo real ( <i>quantitative Polymerase Chain Reaction</i> )
<b>RAPD:</b>	amplificación aleatoria de ADN polimórfico ( <i>Random Amplification of Polymorphic DNA</i> )
<b>RAST:</b>	anotación rápida usando tecnología de subsistema ( <i>Rapid Annotation using Subsystem Technology</i> )
<b>REP-PCR:</b>	amplificación por PCR de elementos palindrómicos extragénicos repetitivos ( <i>Repetitive Element Palindromic</i> )
<b>RFLP:</b>	polimorfismos en la longitud de fragmentos de restricción ( <i>Restriction Fragment Length Polymorphisms</i> )
<b>R<sub>min</sub>:</b>	número mínimo de eventos de recombinación
<b>ROS:</b>	especies reactivas al oxígeno ( <i>Reactive Oxygen Species</i> )
<b>RPS:</b>	supervivencia relativa porcentual ( <i>Relative Percentage of Survival</i> )
<b>SDS:</b>	dodecilsulfato sódico ( <i>Sodium Dodecyl Sulfate</i> )
<b>SILAC:</b>	etiquetado isotópico estable con aminoácidos en cultivo celular ( <i>Stable Isotope labeling with Amino acids in Cell culture</i> )
<b>SLV:</b>	variación de un único locus ( <i>Single locus variable</i> )
<b>SNP:</b>	polimorfismo de nucleótido simple ( <i>Single Nucleotide Polimorphism</i> )

ST:	tipo de secuencia ( <i>Sequence Type</i> )
T3SS:	sistema de secreción tipo III ( <i>Type III Secretion System</i> )
T6SS:	sistema de secreción tipo VI ( <i>Type VI Secretion System</i> )
TAE:	tampón Tris-Acetato-EDTA
TCA:	ácido tricloroacético ( <i>TriChloroacetic Acid</i> )
TCEP:	tris (2-carboxietil) fosfina [ <i>Tris (2-CarboxyEthyl) Phosphine</i> ]
TMT:	etiqueta masiva en tándem ( <i>Tandem Mass Tag</i> )
TSA:	agar tripticasa-soja ( <i>Trypticase Soy Agar</i> )
TSA-1:	agar tripticasa-soja al 1% de NaCl ( <i>1% NaCl Trypticase Soy Agar</i> )
TSB-1:	caldo tripticasa-soja al 1% de NaCl ( <i>1% NaCl Trypticase Soy Broth</i> )
UFC:	Unidad Formadora de Colonias
UPGMA:	método de grupo de pares no ponderado con media aritmética ( <i>Unweighted Pair-Group Method with Arithmetic mean</i> )
VNTR:	número variable de repeticiones en tándem ( <i>Variable-Number Tandem Repeat</i> )
WGS:	secuenciación completa del genoma ( <i>Whole Genome Sequence</i> )
XLD:	agar xilosa lisina desoxicolato ( <i>Xylose Lysine Desoxycholate agar</i> )



## SUMMARY

The *Edwardsiella* genus is composed by five species, four of them of great importance for aquaculture due to their implication in several infectious outbreaks. This genus appeared with the description of the species *E. tarda* in the 1960s, and following with the description of the species *E. hoshinae* and *E. ictaluri* at the beginning of the 1980s. More recently, two species, *E. piscicida* and *E. anguillarum*, were incorporated by the reclassification of isolates previously identified as *E. tarda*.

Due to the presence of different genetic groups within the *E. tarda* species and after the descriptions of the new species, taxonomic and genotypic studies were carried out. Although the AFLP and MLSA results obtained showed that these techniques are good taxonomic tools capable of discern among species, only the MLSA was able to establish relationships among the isolates and their hosts or geographical origin. Despite of these results, the sequence of *dnaJ* gene was the most resolutive taxonomic tool.

To understand the dispersion of the *Edwardsiella* genus, its evolution mechanisms and a possible specialization, population genetic studies by MLST were conducted. The results indicated that the mutation is the most common evolutionary event although its repercussion in the general evolutionary process is the same that the recombination. In addition, the population showed a high genetic discontinuity probably due to the high number of mutations.

The virulence factors are important to know the virulence mechanism in pathogenic bacteria and to develop prevention and treatment strategies. Employing the comparative proteomic tools, 2D-DIGE and TMT6plex, proteins relate with the virulence process of *E. piscicida* were identified. As results of 2D-DIGE analysis, proteins such as FliC, HtpG and ArnA which functions are related to antibiotic resistance and/or mechanisms of resistance to the host's defenses were reported as virulence factors.

By comparison of *E. piscicida* proteomes obtained under different iron growth conditions, it was verified that proteins related to iron uptake were overexpressed in restrictive conditions of this element.



## RESUMEN

El género *Edwardsiella* está compuesto por cinco especies, cuatro de ellas de gran importancia para la acuicultura debido a su implicación en varios brotes infecciosos. Este género empezó con la descripción de la especie *E. tarda* en la década de 1960, y luego con la descripción de las especies *E. hoshinae* y *E. ictaluri* a principios de los años ochenta. Más recientemente, se describieron las especies *E. piscicida* y *E. anguillarum*, en base a la reclasificación de aislados previamente identificados como *E. tarda*.

Debido a la presencia de diferentes grupos genéticos dentro de la especie *E. tarda* y a la descripción de las nuevas especies, se llevaron a cabo estudios taxonómicos y genotípicos para esclarecer las controversias generadas. Aunque los resultados de AFLP y MLSA obtenidos mostraron que estas técnicas son buenas herramientas taxonómicas capaces de discernir entre las especies, solamente el MLSA resultó de utilidad para establecer relaciones entre los aislados y sus hospedadores o su origen geográfico. A pesar de estos resultados, la secuenciación del gen *dnaJ* fue la herramienta taxonómica más resolutive.

Para comprender la dispersión del género *Edwardsiella*, sus mecanismos de evolución y una posible especialización, se realizaron estudios genéticos poblacionales mediante MLST. Los resultados indicaron que la mutación es el evento evolutivo más común, aunque su repercusión en el proceso evolutivo general es la misma que la recombinación. Además, la población mostró una alta discontinuidad genética probablemente debido al alto número de mutaciones.

Los factores de virulencia son importantes para conocer el mecanismo de infección en bacterias patógenas y, para desarrollar estrategias de prevención y tratamiento. Empleando las herramientas de proteómica comparativa, 2D-DIGE y TMT6plex, se identificaron varias proteínas relacionadas con el proceso de virulencia de *E. piscicida*. El análisis 2D-DIGE, mostró que proteínas como FliC, HtpG y ArnA, relacionadas con la resistencia a los antibióticos y/o los mecanismos de resistencia a las defensas del hospedador, forman parte del elenco de los factores de virulencia de *E. piscicida*.

Mediante la comparación de los proteomas de *E. piscicida* obtenidos en diferentes condiciones de crecimiento en las que se modifica la disponibilidad de hierro, se verificó que las proteínas relacionadas con la captación de hierro se sobreexpresan en condiciones restrictivas de este elemento.



## RESUMO

O xénero *Edwardsiella* está composto por cinco especies, catro delas de gran importancia para a acuicultura debido a súa participación en varios brotes infecciosos. Este xénero comezou coa descrición da especie *E. tarda* en 1960, e continuou coa descrición da especie *E. hoshinae* e *E. ictaluri* a principios dos anos oitenta. Máis recentemente, describíronse as especies *E. piscicida* e *E. anguillarum*, baseadas na reclasificación de cepas previamente identificadas como *E. tarda*.

Debido á presenza de diferentes grupos xenéticos dentro da especie *E. tarda* e a descrición das novas especies, realizáronse estudos taxonómicos e xenotípicos para aclarar as controversias xeradas. Aínda que os resultados do AFLP e MLSA obtidos mostraron que estas técnicas son boas ferramentas taxonómicas capaces de discernir entre as especies, só o MLSA demostrou ser útil para establecer relacións entre as cepas e os seus hospedeiros ou a súa orixe xeográfica. A pesar destes resultados, a secuenciación do xene *dnaJ* foi a ferramenta taxonómica máis resolutive.

Para comprender a dispersión do xénero *Edwardsiella*, os seus mecanismos de evolución e unha posible especialización, os estudos xenéticos da poboación realizáronse empregando a técnica MLST. Os resultados indicaron que a mutación é o evento evolutivo máis común, aínda que a súa repercusión no proceso evolutivo xeral é a mesma que teñen os eventos de recombinación. Ademais, a poboación mostrou unha alta discontinuidade xenética probablemente debido ao elevado número de mutacións.

Os factores de virulencia son importantes para coñecer o mecanismo de infección nas bacterias patóxenas e, para desenvolver estratexias de prevención e tratamento. Usando as ferramentas de proteómica comparativa, 2D-DIGE e TMT6plex, identificáronse varias proteínas relacionadas co proceso de virulencia de *E. piscicida*. A análise realizada mediante 2D-DIGE, mostrou que proteínas como Flic, HtpG e ArnA, relacionadas coa resistencia a antibióticos e/ou dos mecanismos de resistencia ás defensas do hospedeiro, forman parte do elenco de factores de virulencia de *E. piscicida*.

Ao comparar os proteomas de *E. piscicida* obtidos baixo diferentes condicións de crecemento nas que se modifica a dispoñibilidade de ferro, verificouse que as proteínas relacionadas coa captación de ferro se sobreexpresan en condicións restritivas deste elemento.





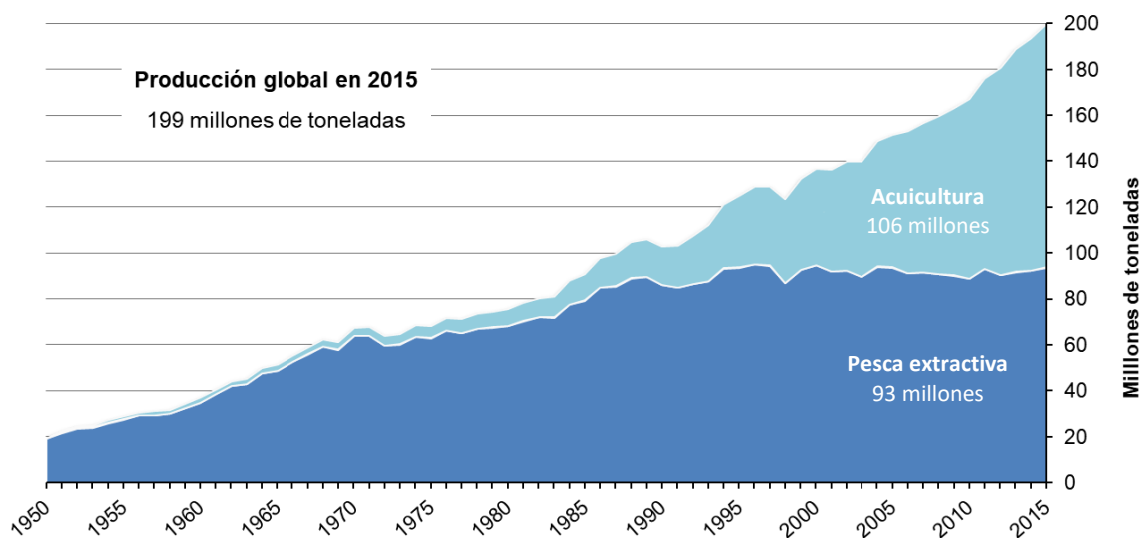
**Capítulo 1:**  
**INTRODUCCIÓN**



# 1 INTRODUCCIÓN

## 1.1 LA ACUICULTURA

El término acuicultura está definido por la FAO (*Food and Agriculture Organization of the United Nations*) como “el cultivo de organismos acuáticos en áreas continentales o costeras, que implica por un lado la intervención en el proceso de crianza para mejorar la producción y por el otro la propiedad individual o empresarial del *stock* cultivado”. Las referencias más antiguas sobre la acuicultura datan del 3800 a.C. en la antigua China, pero no es hasta mitad del siglo XX cuando se inicia una evolución hacia la producción industrial. Ante la estabilidad de la producción de la pesca de captura desde finales de los 80, la acuicultura ha sido la responsable del crecimiento del suministro de pescado para el consumo humano (Figura 1), siendo la producción acuícola superior a la de la pesca extractiva desde 2013 (datos extraídos de [www.fao.org/fishery/statistics/es](http://www.fao.org/fishery/statistics/es)).

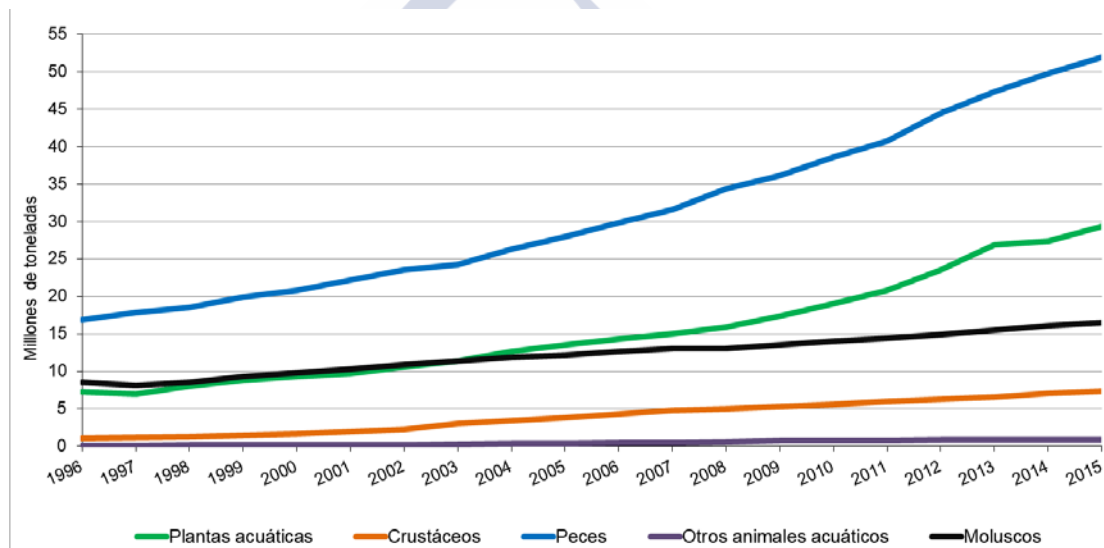


**Figura 1.** Evolución de la producción mundial de la pesca de captura y acuicultura. Datos extraídos de [www.fao.org/fishery/statistics/es](http://www.fao.org/fishery/statistics/es). Figura original.

La acuicultura es probablemente el sector de producción de alimentos con crecimiento más acelerado convirtiéndose en una actividad socioeconómica relevante dando empleo a

más de 18 millones de personas (datos del 2014; FAO, 2016) en todo el mundo. La oferta mundial *per capita* de pescado alcanzó un máximo histórico de 20 kg en 2014, gracias a un intenso crecimiento de la acuicultura, que en la actualidad representa el 50% de todo el pescado destinado al consumo humano. Cabe destacar que el aumento de consumo de pescado no solo se produjo en los países desarrollados, sino también en aquellos con bajos ingresos y déficit de alimentos.

La producción acuícola en 2015 ascendió a 105,9 millones de toneladas, con un valor estimado de primera venta de 167.700 millones de USD. Aproximadamente la mitad de toda la producción mundial de acuicultura en 2015 consistió en pescado, unos 51,9 millones de toneladas, seguida por las plantas acuáticas, los moluscos y los crustáceos (Figura 2).



**Figura 2.** Producción acuícola mundial de animales acuáticos y plantas. Los productos no alimenticios fueron excluidos. Datos extraídos de [www.fao.org/fishery/statistics/es](http://www.fao.org/fishery/statistics/es). Figura original.

### 1.1.1 Producción piscícola

En la actualidad se cultivan más de 350 especies de peces lo que constituye el 60% de los ingresos de la producción total de la acuicultura. China sigue siendo líder indiscutible en producción acuícola mundial con 61,5 millones de toneladas de producción en 2015 y con gran diferencia sobre el segundo país en producción, Indonesia, que produjo 15,6 millones de toneladas. La gran ventaja de China respecto al resto de países, se debe, por un lado, a

la enorme población de ese país (1.371 millones de habitantes) con una destacada cultura de consumo de productos acuáticos y, por otro lado, a los miles de años de la práctica en la acuicultura. La acuicultura continental es el tipo de operación acuícola más habitual en el mundo (Tabla 1), suponiendo el 65 % del incremento de la producción pesquera en el período 2005-2014. Existen dos marcadas excepciones al auge de la acuicultura continental, los países de América del Sur, donde se ha reducido ligeramente la producción y Europa, donde el alto consumo de peces marinos ha hecho que los valores se inviertan. Entre los países que lideran la lista de productores continentales nos volvemos a encontrar con el gigante asiático, China, seguido de India e Indonesia (más de 27, 4,6 y 2,9 millones de toneladas respectivamente), mientras que la producción marina continúa liderada por China (1,6 millones de toneladas), seguida de cerca por Noruega (1,3 millones de toneladas) y por Chile en el tercer puesto con más de 820.000 toneladas.

**Tabla 1.** Producción (en toneladas) acuícola de peces comestibles procedentes de la acuicultura continental, marina y costera por continente. Datos extraídos de [www.fao.org/fishery/statistics/es](http://www.fao.org/fishery/statistics/es).

Continente	Acuicultura continental	Acuicultura marina y costera	TOTAL
África	1.749.712	15.152	1.764.864
América	1.017.534	1.003.191	2.020.726
Asia	41.849.837	3.855.936	45.705.772
Europa	475.253	1.863.068	2.338.321
Oceanía	5.013	72.775	77.788
<b>SUBTOTAL</b>	<b>45.097.349</b>	<b>6.810.122</b>	<b>51.907.471</b>

El desarrollo de la acuicultura ha superado el crecimiento demográfico, lo que ha dado lugar a un incremento de la producción acuícola *per capita* en los últimos tres decenios en la mayoría de regiones. El comercio de pescado es especialmente relevante para los países en vías de desarrollo, a pesar de que tienen menor acceso a la tecnología que los países desarrollados, y en algunos casos representa más de la mitad del valor total de los productos básicos comercializados (FAO, 2016). A pesar de que los primeros países productores de acuicultura poseen industrias intensivas con productos de alto valor comercial para exportar a otros mercados, parte de la población de estos países tienen

bajos ingresos y deficiencias alimentarias. En 2015, más del 95% de la producción piscícola fue generada solamente por 25 países (Tabla 2).

**Tabla 2.** Principales especies cultivadas (en toneladas) de los 25 países que engloban más del 95% de la producción acuícola (continental, marina y costera). Datos extraídos de [www.fao.org/fishery/statistics/es](http://www.fao.org/fishery/statistics/es).

País (1-12)	País (13-25*)
Especie piscícolas	Especie piscícolas
China Carpa herbívora ( <i>Ctenopharyngodon idellus</i> ) Carpa plateada ( <i>Hypophthalmichthys molitrix</i> ) Carpa cabezona ( <i>H. nobilis</i> )	<b>Tailandia</b> Tilapia del Nilo ( <i>Oreochromis niloticus</i> ) Bagre híbrido ( <i>Clarias gariepinus</i> x <i>C. macrocephalus</i> ) Carpa barbuda plateada ( <i>Barbonymus gonionotus</i> )
<b>Indonesia</b> Tilapia del Nilo ( <i>Oreochromis niloticus</i> ) Bagres ( <i>Clarias spp.</i> ) Carpa común ( <i>Cyprinus carpio</i> )	<b>Brasil</b> Tilapia del Nilo ( <i>Oreochromis niloticus</i> ) Cachama ( <i>Colossoma macropomum</i> ) Híbrido cachamoto ( <i>C. macropomum</i> x <i>P. brachypomus</i> )
<b>India</b> Carpa catla ( <i>Catla catla</i> ) Rohu ( <i>Labeo rohita</i> ) Carpa de Mrigal ( <i>Cirrhinus mrigala</i> )	<b>Malasia</b> Bagres ( <i>Clarias spp.</i> ) Tilapias ( <i>Oreochromis spp.</i> ) Barramundi ( <i>Lates calcarifer</i> )
<b>Vietnam</b> Pangas ( <i>Pangasius spp.</i> ) Ciprinidos ( <i>Cyprinidae</i> ) Tilapias ( <i>Oreochromis spp.</i> )	<b>Ecuador</b> Tilapia del Nilo ( <i>Oreochromis niloticus</i> ) Trucha arcoíris ( <i>Oncorhynchus mykiss</i> ) Cachama roja ( <i>Piaractus brachypomus</i> )
<b>Filipinas</b> Sabalote ( <i>Chanos chanos</i> ) Tilapia del Nilo ( <i>Oreochromis niloticus</i> ) Tilapias ( <i>Oreochromis spp.</i> )	<b>Estados Unidos</b> Pez gato ( <i>Ictalurus punctatus</i> ) Trucha arcoíris ( <i>Oncorhynchus mykiss</i> ) Salmón del Atlántico ( <i>Salmo salar</i> )
<b>Bangladesh</b> Panga ( <i>Pangasius hypophthalmus</i> ) Tilapias ( <i>Oreochromis spp.</i> ) Rohu ( <i>Labeo rohita</i> )	<b>Irán</b> Trucha arcoíris ( <i>Oncorhynchus mykiss</i> ) Carpa plateada ( <i>Hypophthalmichthys molitrix</i> ) Carpa común ( <i>Cyprinus carpio</i> )
<b>Corea del Sur</b> Halibut bastardo ( <i>Paralichthys olivaceus</i> ) Chancharro coreano ( <i>Sebastes schlegeli</i> ) Mújol ( <i>Mugil cephalus</i> )	<b>Nigeria</b> Bagre africano del Norte ( <i>Clarias gariepinus</i> ) Bagres ( <i>Clarias spp.</i> ) Tilapias ( <i>Oreochromis spp.</i> )
<b>Noruega</b> Salmón del Atlántico ( <i>Salmo salar</i> ) Trucha arcoíris ( <i>Oncorhynchus mykiss</i> ) Halibut del atlántico ( <i>Hippoglossus hippoglossus</i> )	<b>Taiwan</b> Tilapias ( <i>Oreochromis spp.</i> ) Sabalote ( <i>Chanos chanos</i> ) Meros ( <i>Epinephelus spp.</i> )
<b>Egipto</b> Tilapia del Nilo ( <i>Oreochromis niloticus</i> ) Múgeles ( <i>Mugilidae</i> ) Ciprinidos ( <i>Cyprinidae</i> )	<b>España</b> Lubina ( <i>Dicentrarchus labrax</i> ) Trucha arcoíris ( <i>Oncorhynchus mykiss</i> ) Doarda ( <i>Sparus aurata</i> )
<b>Japón</b> Medregal japonés ( <i>Seriola quinqueradiata</i> ) Dorada ( <i>Sparus aurata</i> ) Anguila japonesa ( <i>Anguilla japonica</i> )	<b>México</b> Tilapias ( <i>Oreochromis spp.</i> ) Trucha arcoíris ( <i>Oncorhynchus mykiss</i> ) Atún azul ( <i>Thunnus orientalis</i> )
<b>Chile</b> Salmón del Atlántico ( <i>Salmo salar</i> ) Salmón del Pacífico ( <i>Oncorhynchus kisutch</i> ) Trucha arcoíris ( <i>O. mykiss</i> )	<b>Reino Unido</b> Salmón del Atlántico ( <i>Salmo salar</i> ) Trucha arcoíris ( <i>Oncorhynchus mykiss</i> ) Trucha común ( <i>Salmo trutta</i> )
<b>Myarman</b> Rohu ( <i>Labeo rohita</i> ) Carpa del Mrigal ( <i>Cirrhinus mrigala</i> ) Carpa catla ( <i>Catla catla</i> )	<b>Francia</b> Trucha arcoíris ( <i>Oncorhynchus mykiss</i> ) Carpa común ( <i>Cyprinus carpio</i> ) Lubina ( <i>Dicentrarchus labrax</i> )

(n-n) orden descendiente de producción. \*Corea del Norte ocupa la posición 15 en la lista, su ausencia en la tabla se debe a la falta de datos más precisos de producción

La alta producción de los países asiáticos hace que las especies más cultivadas en todo el mundo sean las pertenecientes a las familias *Cyprinidae* y *Siluridae*, concretamente la carpa plateada, la carpa cabezona y los bagres. Le sigue muy de cerca el cultivo de la tilapia del Nilo, especie natural de Egipto que fue introducida en numerosos países debido a su alto rendimiento económico.

Se prevé que en el futuro, la acuicultura sea la responsable del aumento de la producción de alimentos acuáticos y del consumo de pescado, sin embargo, hay muchos factores que afectan a las perspectivas de este sector. Entre ellos nos encontramos los conflictos asociados con la tierra y el agua; los piensos, el suministro de material de repoblación (Carius y col., 2004) y los recursos genéticos; la integridad medioambiental y los problemas relativos a las enfermedades; la elaboración y adopción de tecnologías de cultivo nuevas y mejoradas; el mercado, el comercio y la inocuidad alimentaria; el cambio climático; los obstáculos relacionados con el capital de inversión; y los problemas que puedan originarse de prácticas acuícolas que no estén guiadas ni supervisadas (FAO, 2016).

### 1.1.2 Enfermedades bacterianas

Debido principalmente al carácter intensivo de los sistemas de producción acuícola, el cual implica mantener en confinamiento altas densidades poblacionales, las enfermedades infecciosas de peces cultivados representan uno de los mayores factores de riesgo limitantes del éxito y viabilidad de la acuicultura por su elevada mortalidad y/o morbilidad (Toranzo y col., 2005). Se estima que al menos el 10% del total de los animales acuáticos cultivados mundialmente se pierden directamente como efecto de enfermedades infecciosas ocasionadas por parásitos, bacterias, virus y hongos.

Dado que las bacterias pueden sobrevivir largos períodos en el medio acuático independientemente de sus huéspedes, las enfermedades bacterianas se han convertido en importantes impedimentos para la acuicultura, especialmente cuando la temperatura del agua es cálida.

Hasta el momento los principales patógenos bacterianos de peces pertenecen a los siguientes géneros (Pridgeon y Klesius, 2012): *Aeromonas*, *Aliivibrio*, *Chlamydia*,

*Edwardsiella*, *Flavobacterium*, *Francisella*, *Photobacterium*, *Piscirickettsia*, *Pseudomonas*, *Tenacibaculum*, *Vibrio*, *Yersinia*, *Lactococcus*, *Renibacterium* y *Streptococcus*. Todos estos agentes etiológicos afectan a multitud de especies de interés económico como son anguila, carpas, dorada, lenguado, lubina, pez gato, rodaballo, seriola, salmón, tilapia y trucha. Es bien sabido que las enfermedades en los peces producen con frecuencia importantes pérdidas en la acuicultura, de manera más específica, los brotes de enfermedades habrían costado al sector acuícola decenas de miles de millones de dólares en los últimos 20 años (Kobayashi y Brummett, 2014).

Para el control de las enfermedades bacterianas se han empleado agentes antibióticos, ya sea mediante alimentación o administración por baño y, el uso frecuente de estos compuestos antimicrobianos ha desarrollado resistencias por parte de los patógenos, lo que plantea serios desafíos para la salud y la seguridad animal (Cunha, 2009). La alternativa más común al uso de estos compuestos es la prevención de las infecciones mediante estrategias de vacunación. La utilización de vacunas ha demostrado ser altamente eficaz en la prevención de enfermedades bacterianas llevando ya en el mercado más de treinta años. Sin embargo, la acuicultura intensiva ha provocado que, una vez solventados ciertos problemas infecciosos, emerjan nuevas enfermedades o nuevos grupos serológicos y/o genéticos en especies ya conocidas, frente a las que las medidas de prevención desarrolladas son ineficaces.

Para poder minimizar las pérdidas económicas causadas por estos agentes bacterianos y poder diseñar nuevos procedimientos de actuación, es importante conocer todos los aspectos de estos microorganismos.

## 1.2 ASPECTOS GENERALES SOBRE EL GÉNERO *Edwardsiella*

El género *Edwardsiella* es ampliamente conocido por su capacidad de producir septicemias en gran variedad de hospedadores. Entre ellos podemos encontrar organismos tan dispares como los humanos, un amplio rango de peces, mamíferos marinos e incluso aves y reptiles (Abbott y Janda, 2006; González-Fuentes y col., 2010; Cools y col., 2013). A lo largo del tiempo, las especies del género *Edwardsiella* han sido causantes de numerosas

pérdidas en la economía piscícola (Mohanty y Sahoo, 2007; Hawke y col., 2013) y, recientemente, los problemas asociados a este género han vuelto a ser comunes (Camus y col., 2016; Fogelson y col., 2016; Shafiei y col., 2016).

### 1.2.1 Historia, taxonomía y filogenia

El género *Edwardsiella* pertenece a la familia *Enterobacteriaceae* en base a sus características bioquímicas (Brenner, 1984), a la presencia del antígeno común a enterobacterias o “antígeno Kunin” (Mäkelä y Mayer, 1976) y a la hibridación ADN-ADN con otros géneros pertenecientes a dicha familia (Brenner, 1977). Actualmente este género está compuesto por cinco especies, *E. tarda*, *E. hoshinae*, *E. ictaluri*, *E. piscicida* y *E. anguillarum*. A excepción de *E. hoshinae*, el resto de las especies han sido descritas como causantes de patologías en peces, tanto en el sector de la acuicultura (Mohanty y Sahoo, 2007) como en el medio natural (Baya y col., 1997).

Entre los años 1959 y 1965, un nuevo grupo de bacilos Gram negativos, bien diferenciado dentro de la familia de las Enterobacterias, fue aislado por diversos autores que se dedicaron de forma independiente a su estudio. Entre estos años, el Centro de Prevención y Control de Enfermedades de los Estados Unidos (CDC) se dedicó al estudio de un grupo de cepas, mayoritariamente de origen humano, productoras de sulfuro de hidrógeno, indol positivas y manitol negativas, al que denominaron “biotipo 1483-59” (Abbott y Janda, 2006). En 1962, Sakazaki y Murata describieron el llamado “Grupo Asakusa” (nombrado en referencia a la clínica de Tokio donde habían sido aisladas), una colección de 256 cepas aisladas en su gran mayoría de serpientes que compartían propiedades con el “biotipo 1483-59”. Dos años después en Indiana, King y Adler (1964) aislaron de un paciente con gastroenteritis un grupo de bacterias, con características bioquímicas semejantes a las descritas anteriormente, al cual denominaron “Grupo Bartholemew” en referencia al lugar de aislamiento. Fue en 1965, cuando Ewing y col. agruparon todos estos aislados bajo un nuevo género llamado *Edwardsiella* en honor al microbiólogo estadounidense P.R. Edward, siendo la primera especie descrita *Edwardsiella tarda*. El nombre de esta especie se basa en la relativa inactividad que este microorganismo presenta a la hora de fermentar

carbohidratos. Mediante un estudio de hibridación ADN-ADN realizado por Brenner y col. (1974), se confirmó no sólo que *E. tarda* constituía un nuevo taxón dentro de la familia *Enterobacteriaceae*, sino que todos los grupos anteriormente mencionados correspondían a esta especie.

Durante el estudio de los diferentes grupos de *Edwardsiella*, Hoshina publicó en 1962 la descripción de la especie *Paracolobactrum anguillimortiferum*, una bacteria aislada de anguilas japonesas que poseía características bioquímicas idénticas a los aislados que posteriormente serían reconocidos como *E. tarda*. Sin embargo, debido a que Hoshina no depositó una cepa tipo y el cultivo original se extravió, este género no fue reconocido manteniéndose el término *Edwardsiella* sobre *Paracolobactrum*. Como el término "*anguillimortiferum*" había sido publicado anteriormente y por tanto tenía prioridad a nivel taxonómico sobre "*tarda*", Sakazaki y Tamura propusieron en 1975 el nombre *E. anguillimortifera* (Hoshina, 1962) comb. nov. Un año más tarde, Farmer y col. (1976) defendieron en base al primer principio del Código Internacional de Nomenclatura Bacteriana, el epíteto "*tarda*" ya que su uso era más extendido. Esta controversia fue zanjada en 1980 con la aprobación y publicación de la lista de nomenclatura bacteriana (Skerman y col., 1980) en la que *E. tarda* y *E. anguillimortifera* aparecen como sinónimos, siendo designada como especie tipo *E. tarda*.

Hasta 1980 *E. tarda* fue la única especie dentro del género *Edwardsiella*, año en el que Grimont y col. (1980) describieron un grupo de cepas fuertemente relacionadas con *E. tarda* pero que a diferencia de ésta eran capaces de utilizar como única fuente de carbono el malonato y el manitol. Decidieron denominar a esta especie aislada de reptiles y aves, *Edwardsiella hoshinae*, en honor al bacteriólogo Toshikazu Hoshina. En 1981, Hawke y col. (1981) aislaron el agente causal de la enfermedad conocida como septicemia entérica del pez gato que, aún hoy en día, provoca grandes pérdidas económicas en los cultivos de esta especie en Estados Unidos. Denominaron a esta especie como *E. ictaluri* en base al nombre científico del pez gato (*Ictalurus punctatus*).

Las tres especies del género se diferenciaban claramente entre sí por la capacidad de producir sulfuro de hidrógeno e indol, la utilización de malonato, la producción de ácido a partir de ciertos azúcares y movilidad (Tabla 3).

**Tabla 3.** Características bioquímicas diferenciales entre *E. tarda*, *E. hoshinae* y *E. ictaluri*.

PRUEBA	<i>E. tarda</i>	<i>E. hoshinae</i>	<i>E. ictaluri</i>
<b>Movilidad a 37°C</b>	+	-	-
<b>Utilización de malonato</b>	-	+	-
<b>Producción de:</b>			-
<b>Indol</b>	+	v	-
<b>H<sub>2</sub>S</b>	+	+	-
<b>Producción de ácido a partir de:</b>			
<b>D-manitol</b>	-	+	-
<b>Sacarosa</b>	-	+	-
<b>Trehalosa</b>	-	+	-

+ 90-100% de las cepas son positivas, - 0-10% de las cepas son positivas, v 11-89% de las cepas son positivas. Adaptado a partir de Grimont y col. (1980).

Las especies *E. hoshinae* y *E. ictaluri* son muy homogéneas fenotípicamente a diferencia de *E. tarda*. En 1980 Grimont y col. descubrieron que la especie *E. tarda* estaba dividida en dos grupos en base a las pruebas bioquímicas, *E. tarda* “típica” y “atípica”. Estos dos grupos se diferenciaban, entre otras pruebas, en la producción de ácido a partir de arabinosa y sacarosa, y en la resistencia a la polimixina. El avance de las técnicas moleculares ayudó a poner de manifiesto las diferencias genéticas intraespecíficas de la especie *E. tarda*. Fueron Yamada y Wakabayashi (1998, 1999) quienes, en base a los genes de la catalasa (*katB*) y de la superóxido dismutasa (*sodB*), dividieron a la especie en dos grupos, “patógena para peces” y “no patógena para peces”. Más tarde, las cepas patógenas para peces se diferenciaron en dos grupos basándose en la motilidad (Matsuyama y col., 2005) y en los genes fimbriales (Sakai y col., 2007, 2009c). Años después, el análisis de secuencia multigénica (MLSA, del inglés *MultiLocus Sequence Analysis*) y el genotipado de aislados de peces fenotípicamente clasificados como *E. tarda*, confirmó la existencia de dos taxones genéticos diferentes (Abayneh y col., 2012; Griffin y col., 2013). A raíz de estos estudios, Abayneh y col. (2013) describen la que sería la cuarta especie del género *Edwardsiella*, *E. piscicida*, denominada así debido a la alta mortalidad que causa en peces. Las pruebas bioquímicas diferenciales entre esta especie y *E. tarda* son muy escasas diferenciándose solamente en la degradación de  $\beta$ -metil- $\alpha$ -glucósido (Abayneh y col., 2013).

El estudio comparativo entre diferentes cepas de *Edwardsiella* realizado por Yang y col. (2012), resultó en la división de antiguos aislados de *E. tarda* en dos genogrupos (EdwGI y EdwGII), siendo EdwGI aislados pertenecientes a *E. piscicida*. Además, los estudios

filogenéticos realizados por estos autores mostraron un clúster nuevo dentro del genogrupo EdwGII. Este clúster fue confirmado por Griffin y col. (2014) mediante el análisis filogenético de las secuencias de la subunidad  $\beta$  de la ADN girasa (*gyrB*), renombrándolo como *E. piscicida-like*. Al año siguiente, este grupo se describe como la quinta especie del género *Edwardsiella*, *E. anguillarum* (Shao y col., 2015), que debe su nombre a la especie de pez de la que fue aislada, la anguila europea (*Anguilla anguilla*). Las diferencias bioquímicas más características entre *E. anguillarum* y *E. tarda* o *E. piscicida*, son la utilización del manitol, arabinosa y manosa (Tabla 4).

**Tabla 4.** Características bioquímicas diferenciales entre las especies de *Edwardsiella*.

PRUEBA	<i>E. tarda</i>	<i>E. hoshinae</i>	<i>E. ictaluri</i>	<i>E. piscicida</i>	<i>E. anguillarum</i>
<b>Voges-Proskauer</b>	-	-	-	-	+
<b>Producción de:</b>					
<b>Indol</b>	+	v	-	+	+
<b>H<sub>2</sub>S</b>	+	+	-	+	+
<b>Utilización de:</b>					
<b>D-manitol</b>	-	+	-	+	+
<b>L-arabinosa</b>	-	-	-	-	+
<b>Maltosa</b>	+	+	+	-	+
<b>Trehalosa</b>	-	+	-	-	-

+ 90-100% de las cepas son positivas, - 0-10% de las cepas son positivas, v 11-89% de las cepas son positivas. Adaptado a partir de Shao y col. (2015).

Debido a que las diferencias fenotípicas no son suficientemente fiables para poder diferenciar entre *E. tarda* y las dos especies más recientes (*E. piscicida* y *E. anguillarum*), varios autores (Abayneh y col., 2012; Griffin y col., 2013, 2017; Shao y col., 2015) emplearon el análisis de la secuencia del gen ARNr 16S (Roselló-Mora y Amann, 2001), para tratar de diferenciar las distintas especies. Sin embargo, los resultados mostraron las limitaciones del uso de este gen para la identificación de las especies del género *Edwardsiella*. Marcadores alternativos como el gen *gyrB* (Griffin y col., 2014) o el *sodB* (Yamada y Wakabayashi, 1999), presentan mayor poder de resolución, siendo congruentes con los estudios filogenéticos realizados con anterioridad (Yang y col., 2012; Abayneh y col., 2013; Shao y col., 2015). Los resultados de estos estudios filogenéticos soportan la reestructuración del género en cinco especies mostrando que las pruebas fenotípicas por sí solas pueden dar lugar a errores en la clasificación de los miembros del género *Edwardsiella*.

### 1.2.2 Descripción de las especies del género *Edwardsiella*

Al igual que otros miembros de la familia *Enterobacteriaceae*, las especies del género *Edwardsiella* presentan una morfología bacilar, son Gram negativas, catalasa positivas, oxidasa negativas y anaerobias facultativas. Su reservorio natural son los ambientes acuáticos, tanto en superficies de animales como en el agua (Du, 2007). Las particularidades de cada especie se describen a continuación:

***Edwardsiella tarda***: es la especie que ha causado más pérdidas económicas estando presentes a lo largo de los siete continentes (Meyer y Bullock, 1973; Van Damme y Vandepitte, 1980; Clavijo y col., 2002; Akinbowale y col., 2006; Alcaide y col., 2006; Leotta y col., 2009; Joh y col., 2011; Xu y Zhang, 2014). Esta especie se encuentra de forma natural en el tracto gastrointestinal de humanos, y en raras ocasiones puede causar gastroenteritis debidas a la manipulación o consumo de pescado crudo o poco cocinado (Leung y col., 2012). Además de ser un microorganismo ubicuo, *E. tarda* produce infecciones en multitud de organismos como mamíferos marinos (González-Fuentes y col., 2010; Cools y col., 2013), aves (Wang y col., 2012), reptiles (Sakazaki y Murata, 1962) incluso humanos (Bockemühl y col., 1971), aunque los hospedadores más habituales son los peces (Tabla 5). La edwardsiellosis es el nombre común para la enfermedad producida por *E. tarda* que se manifiesta en los peces con diversos síntomas generales como la natación errática y la boca y los opérculos abiertos indicando la falta de oxígeno. Otros síntomas típicos son branquias blanquecinas, excesiva secreción de mucus, erosión de las escamas, lesiones cutáneas, tumefacciones a nivel de los ojos y úlceras. En casos agudos puede existir también inflamación y hemorragias a nivel anal, e inflamación a nivel de la cavidad ventral. Cuando la enfermedad avanza, pueden aparecer úlceras a nivel muscular que acaban por formar graves heridas en las que se acumula gas y que causa la aparición de un olor desagradable (Castro, 2011). Sin embargo, estos síntomas son comunes en infecciones debidas a otros agentes bacterianos, por lo que no son de mucha ayuda en el diagnóstico de la enfermedad.

Tabla 5. Primeras descripciones en pez de *E. tarda*.

	<b>Especies<sup>1</sup></b>	<b>Referencias</b>
Anguila japonesa	<i>Anguilla japonica</i>	Hoshina, 1962
Sargo púrpura	<i>Evynnis tumifrons</i>	Hoshina, 1962
Perca americana	<i>Micropterus salmoides</i>	White y col., 1973
Pez gato	<i>Ictalurus punctatus</i>	Meyer y Bullock, 1973
Mújel	<i>Mugil cephalus</i>	Kusuda y col., 1976
Tilapia del Nilo	<i>Oreochromis niloticus</i>	Aoki y Kitao, 1981
Salmón real	<i>Oncorhynchus tshawytscha</i>	Amandi y col., 1982
Seriola	<i>Seriola gaingui</i>	Yasunaga y col., 1982
Pargo japonés	<i>Pagrus major</i>	Yasunaga y col., 1982
Platija	<i>Paralichthys olivaceus</i>	Nakatsugawa, 1983
Pez luchador	<i>Betta splendens</i>	Vladik y col., 1983
Carpa común o europea	<i>Cyprinus carpio</i>	Sae-Oui y col., 1984
Salmón atlántico	<i>Salmo salar</i>	Martin, 1984
Lubina rayada	<i>Morone saxatilis</i>	Herman y Bullock, 1986
Tilapia negra	<i>Oreochromis mossambicus</i>	Bragg, 1988
Góbido de arena	<i>Oxyeleotris marmoratus</i>	Supamataya, 1988
Anguila australiana	<i>Anguilla reinhardtii</i>	Eaves y col., 1990
Lubina	<i>Dicentrarchus labrax</i>	Blanch y col., 1990
Rodaballo	<i>Scophthalmus maximus</i>	Nougayrede y col., 1994
Trucha arcoíris	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	Reddacliff y col., 1996
Pez gato africano	<i>Clarias batrachus</i>	Sahoo y col., 1998
Ayu	<i>Plecoglossus altivelis</i>	Yamada y Wakabayashi, 1999
Perca trepadora	<i>Anabas testudineus</i>	Sahoo y col., 2000
Trucha de manantial	<i>Salvelinus fontinalis</i>	Uhland y col., 2000
Pez sapo	<i>Opsanus tau</i>	Horenstein y col., 2004
Anguila europea	<i>Anguilla anguilla</i>	Esteve y col., 2006
Anguila de pantano	<i>Monopterus albus</i>	Najiah y col., 2006
Barbo de Sumatra	<i>Puntius tetrazona</i>	Akinbowale y col., 2006
Pez gato japonés	<i>Silurus asotus</i>	Yu y col., 2009
Perca de jade	<i>Scortum barcoo</i>	Ye y col., 2010
Pez Óscar	<i>Astronotus ocellatus</i>	Wang y col., 2011
Barramundi	<i>Lates calcarifer</i>	Nadirah y col., 2012
Panga	<i>Pangasius hypophthalmus</i>	Nakhro y col., 2013
Carpa plateada	<i>Hypophthalmichthys molitrix</i>	Xu y Zhang, 2014
Híbrido de lubina rayada	<i>Morone chrysops</i> x <i>M. saxatilis</i>	Griffin y col., 2014
Sargo picudo	<i>Diplodus puntazzo</i>	Katharios y col., 2015
Bagre africano del Norte	<i>Clarias gariepinus</i>	Abraham y col., 2015
Ya-fish	<i>Schizothorax prenanti</i>	Zhou y col., 2016

<sup>1</sup> nombres científicos aceptados en la actualidad

A pesar de la rapidez de las infecciones y la elevada mortalidad en cultivos piscícolas causada por *E. tarda*, la edwardsiellosis se puede tratar con varios antibióticos conocidos como la tetraciclina y oxitetraciclina, el florfenicol y el ácido oxolínico. Sin embargo, se han

detectado cepas resistentes a alguno de estos compuestos en EEUU, Australia y Taiwán (Hilton y Wilson, 1980; Akinbowale y col., 2006; Lo y col., 2014) dificultando la eliminación del patógeno. Debido a estas resistencias las empresas acuícolas han puesto todo el esfuerzo por la prevención en lugar de tratamiento y debido a esto, se ha multiplicado la investigación de nuevas vacunas. Se han desarrollado todo tipo de vacunas contra esta infección, bacterinas mediante inmersión o por inyección intramuscular o intraperitoneal, bacterinas mezcladas con inmunoestimulantes, vacunas recombinantes, vacunas atenuadas e incluso vacunas multivalentes con excelentes resultados (Castro y col., 2008; Kwon y col., 2006; Kwon y col., 2007; Griffin y col., 2017).

***Edwardsiella hoshinae***: Desde la descripción de *E. hoshinae* (Grimont y col., 1980), los estudios sobre esta especie han sido muy escasos. A diferencia de otras especies del género *Edwardsiella*, *E. hoshinae* presenta características bioquímicas bien diferenciadas (Tabla 4) que permiten su identificación con escasas técnicas moleculares. En contraste con *E. tarda*, *E. hoshinae* habita en pocos nichos ecológicos como son las aves, los reptiles y el agua (Grimont y col., 1980) (Tabla 6). Aunque esta especie ha sido aislada a partir de heces (Farmer, 1999) o como parte de microbiota intestinal en humanos inmunodeprimidos (Christophy y col., 2017), el rol como patógeno tanto de humanos como de otros animales no ha sido descrita (Grimont y col., 1980; Farmer, 1999; Singh y col., 2004).

Tabla 6. Primeras descripciones de *E. hoshinae*.

Especies <sup>1</sup>		Referencia
Frailecillo	<i>Fratercula arctica</i>	Grimont y col., 1980
Lagartos	<i>Varanus</i> sp.	Grimont y col., 1980
Flamenco caribeño	<i>Phoenicopterus ruber</i>	Grimont y col., 1980
Geco	Desconocida	Janda y col., 1991
Colín de Virginia	<i>Colinus virginianus</i>	Singh y col., 2004

<sup>1</sup> nombres científicos aceptados en la actualidad

***Edwardsiella ictaluri***: esta especie es el agente causal de la septicemia entérica del pez gato (ESC), una enfermedad endémica del sureste de Estados Unidos (Plumb y Vinitnantharat, 1989) que causa pérdidas cuantiosas en los cultivos de este animal.

Aunque la mayor parte de los brotes referenciados de *E. ictaluri* han afectado al cultivo del pez gato, otras especies piscícolas han visto mermadas sus producciones debido a esta bacteria (Tabla 7), como por ejemplo la tilapia (Soto y col., 2012). Estudios genéticos recientes indican que, al contrario que en *E. tarda*, las cepas aisladas a partir de diferentes hospedadores, así como de diferentes regiones geográficas, presentan cierta diferenciación genética (Bader y col., 1998; Sakai y col., 2009d; Rogge y col., 2013; Griffin y col., 2016).

**Tabla 7.** Primeras descripciones de *E. ictaluri*.

<b>Especies<sup>1</sup></b>	<b>Referencias</b>
<b>Pez gato</b>	<i>Ictalurus punctatus</i> Hawke y col., 1981
<b>Pez cuchillo</b>	<i>Eigenmannia virescens</i> Kent y Lyons, 1982
<b>Danio</b>	<i>Devario devario</i> Waltman y col., 1985
<b>Barbo rosado</b>	<i>Pethia conchonius</i> Humphrey y col., 1986
<b>Pez gato andador</b>	<i>Clarias batrachus</i> Kasornchandra y col., 1987
<b>Panga</b>	<i>Pangasius hypophthalmus</i> Crumlish y col., 2002
<b>Tadpole madtom</b>	<i>Noturus gyrinus</i> Klesius y col., 2003
<b>Trucha arcoíris</b>	<i>Oncorhynchus mykiss</i> Keskin y col., 2004
<b>Barbú torito</b>	<i>Ameiurus nebulosus</i> Iwanowicz y col., 2006
<b>Ayu</b>	<i>Plecoglossus altivelis</i> Nagai y col., 2008
<b>Gigi</b>	<i>Tachysurus nudiceps</i> Sakai y col., 2009c
<b>Pez gato amarillo</b>	<i>Tachysurus fulvidraco</i> Ye y col., 2009
<b>Tilapia del Nilo</b>	<i>Oreochromis niloticus</i> Soto y col., 2012
<b>Pez cebra</b>	<i>Danio rerio</i> Hawke y col., 2013

<sup>1</sup> nombres científicos aceptados en la actualidad

Estudios iniciales sobre la supervivencia en la forma de vida libre de *E. ictaluri* sugieren que ésta especie, a diferencia de *E. tarda*, es un patógeno obligado (Plumb y Quinlan, 1986). Trabajos recientes han sido capaces de encontrar ADN de cepas de *E. ictaluri* en estanques vacíos de cría de peces gatos, sin embargo, no han podido demostrar que estos organismos sean viables (Griffin y col., 2017) por lo que la teoría inicial de Plumb y Quinlan se mantiene. En muestreos intestinales de varias aves piscívoras como la garceta nívea, la garza blanca o el cormorán orejudo, se detectó la presencia de *E. ictaluri* como parte de la microbiota sin causar daños en sus portadores, por lo que Taylor (1992) sugiere a estos organismos como vectores de transmisión de este patógeno.

Los brotes de ESC en el sureste de Estados Unidos comienzan con la subida de temperatura del agua (22-28°C) a finales de la primavera (Wise y col., 2004), aunque, a lo largo del año también se registran mortalidades (Plumb y Shoemaker, 1995). Los primeros síntomas de esta infección son la inapetencia y la natación errática, seguidos de los síntomas clínicos más comunes, úlceras blancas, petequias en la piel, abdomen hinchado, exoftalmia y meningoencefalitis (Griffin y col., 2017). En los peores casos, la meningoencefalitis puede llegar a causar perforaciones en el cráneo, siendo este síntoma lo que hace que la ESC sea fácilmente diferenciable de las infecciones producidas por *E. tarda* o *E. piscicida*. Los peces supervivientes a brotes de septicemia entérica del pez gato pueden sufrir infecciones crónicas en las cuales la bacteria sólo puede aislarse en el tejido cerebral (Hawke y Khoo, 2004). La diseminación de la bacteria se produce principalmente a partir de heces de otros peces infectados o por la putrefacción de peces muertos por ESC. Estas partículas liberadas son ingeridas por los peces sanos (transmisión horizontal) iniciando así el brote infeccioso (Klesius, 1994; Hawke y Khoo, 2004; Wise y col., 2008).

*E. ictaluri* es sensible a multitud de antibióticos (aminoglucósidos, cefalosporinas, penicilinas, quinolonas, tetraciclinas, ...) (Waltman y col., 1986), lo que facilita el control de la enfermedad y abarata los costes. Tan eficaz es el uso de estas sustancias que en Estados Unidos se han aprobado diferentes formulaciones [Romet® (Hoffman LaRoche) y Aquaflor® (Merck Animal Health)] para el control de esta septicemia. Como mecanismo de prevención ante infecciones de ESC durante las estaciones más calurosas, se recomienda la restricción alimentaria para prevenir el contagio mediante la ruta fecal/oral (Wise y col., 2004) con la consecuencia de la disminución de la producción. La primera vacuna atenuada permitida en la acuicultura en Estados Unidos se desarrolló para combatir la septicemia causada por *E. ictaluri*, que llegó a producir pérdidas anuales de unos 60 millones de dólares (Klesius y Shoemaker, 1999). A lo largo de los años se ha seguido investigando en este campo obteniendo otras vacunas efectivas para la protección frente a este patógeno (Thune y col., 1994; Shoemaker y col., 2002; Abdelhamed y col., 2013).

***Edwardsiella piscicida***: sus características fenotípicas, así como la patobiología es muy similar a *E. tarda*, debido a que la especie se definió a partir de los aislados denominados como *E. tarda* típicas. Comparaciones genómicas ponen de manifiesto que

muchas de las infecciones asociadas a *E. tarda* en realidad fueron causadas por *E. piscicida*. Los pormenores de esta especie serán detallados en el punto 1.3.

***Edwardsiella anguillarum***: es la especie más reciente de género (Shao y col., 2015), descrita a partir de aislados mal identificados como *E. tarda*. Al igual que su predecesora, *E. anguillarum* es un agente patógeno para los peces siendo su primer aislamiento en anguilas (Shao y col., 2015). A pesar de su reciente descubrimiento, esta especie ya ha sido aislada en varias especies piscícolas (Tabla 8).

**Tabla 8.** Primeras descripciones de *E. anguillarum*.

Especies <sup>1</sup>	Referencias
Sargo púrpura	<i>Evynnis tumifrons</i> Abayneh y col., 2012
Tilapia del Nilo	<i>Oreochromis niloticus</i> Griffin y col., 2014
Pargo japonés	<i>Pagrus major</i> Oguro y col., 2014
Anguila europea	<i>Anguilla anguilla</i> Shao y col., 2015
Anguila japonesa	<i>Anguilla japonica</i> Shao y col., 2015
Anguila moteada gigante	<i>Anguilla marmorata</i> Shao y col., 2015
Mero	<i>Epinephelus aeneus</i> Ucko y col., 2016

<sup>1</sup> nombres científicos aceptados en la actualidad

Los signos clínicos producidos por *E. anguillarum*, a falta de estudios más específicos, son los mismos que para *E. tarda*, natación errática, lesiones cutáneas, inflamación a nivel de la cavidad ventral, etc. Para la prevención de la enfermedad solamente hay un estudio (Takano y col., 2011) que demuestra la efectividad de una vacuna inactivada con formol, para el pargo rojo. La cepa utilizada para el desarrollo de esta vacuna estaba erróneamente identificada como *E. tarda*.

### 1.3 DESCRIPCIÓN DE LA ESPECIE *Edwardsiella piscicida*

Como ya hemos dicho anteriormente, esta especie fue descrita en el año 2013 por Abayneh y col. (2013) a partir de aislados erróneamente identificados como *E. tarda*. En este apartado se describen los datos generales recogidos de la literatura hasta el comienzo de la tesis doctoral.

### 1.3.1 Caracterización bioquímica y serológica

*E. piscicida*, al igual que los miembros de la familia *Enterobacteriaceae*, es un bacilo de 2  $\mu\text{m}$  (Camus y col., 2016) Gram negativo, oxidasa negativo, catalasa positivo y anaerobio facultativo. En su gran mayoría las cepas son móviles presentando flagelos peritricos.

Las características bioquímicas (Tabla 9) son similares a *E. tarda* y *E. anguillarum* por lo que no son útiles para la identificación de esta especie. Es un organismo mesófilo por lo que su temperatura óptima de crecimiento oscila entre los 28 y los 30°C, aunque puede crecer entre 15 y 42°C (la temperatura máxima varía entre aislados) (Castro, 2011). Además, este microorganismo es halófilo facultativo con un rango de crecimiento entre 0 y 5% de sal (NaCl) y presenta una ligera  $\beta$ -hemólisis cuando la bacteria se cultiva a 30°C en agar sangre (5% sangre bovina) (Abayneh y col., 2013).

Los estudios serológicos para *E. piscicida* son escasos y fueron realizados previamente a la descripción de la especie con cepas mal identificadas como *E. tarda*. Así, Castro y col. (2006) describieron dos serotipos diferentes, grupo 1 y grupo 2, los cuales eran diferenciables por ensayos dot-blot pero no por microtitulación. Además, demostraron que los aislados obtenidos a partir de los brotes de edwardsiellosis en rodaballo en Europa formaban parte del grupo 1, mientras que los demás aislados analizados procedentes de diferentes regiones del mundo (Asia y Norteamérica) y hospedadores pertenecían al grupo 2.

Tabla 9. Características bioquímicas de *E. piscicida*.

PRUEBAS		PRUEBAS	
Movilidad	+	L-ramnosa	-
Citocromo oxidasa	-	Maltosa	v
Catalasa	+	D-manosa	+
Lisina descarboxilasa	+	D-galactosa	+
Ornitina descarboxilasa	+	$\beta$ -metilo-D-glucósido	-
Rojo de metilo	+	Tween 80	v
Voges-Proskauer	-	L-fucosa	v
Citrato de Simmons	v	Ácido acético	-
Producción de:		Ácido cítrico	-
Indol	+	Ácido fórmico	-
H <sub>2</sub> S	+	D-ácido glucosamina	v
Gas a partir de glucosa	+	Ácido $\alpha$ -cetobutírico	-
Degradación de:		Ácido $\alpha$ -cetobutírico	-
Gelatina	-	Ácido quínico	-

PRUEBAS		PRUEBAS	
Ácido a partir de:		Ácido bromosuccínico	v
D-glucosa	+	Glucuronamida	v
D-manitol	-	L-asparaguina	+
L-arabinosa	-	Ácido L-aspártico	v
Lactosa	-	Ácido L-glutámico	v
L-ramnosa	-	Ácido glicil-L- aspártico	v
D-sorbitol	-	Ácido glicil-L- glutámico	v
Sacarosa	-	L-prolina	-
Trehalose	-	L-serina	v
Utilización de:		Uridina	v
D-manitol	-	Glicerol	v
L-arabinosa	-	D, L- $\alpha$ -glicerol	v

+ 90-100% de los aislados positivos, - 0-10% de los aislados positivos, v 11-89% de los aislados positivos. Recopilado de: Abayneh y col., (2014).

### 1.3.2 Caracterización molecular

Hasta la actualidad, varios autores han publicado diversos estudios sobre la variabilidad genética de *E. piscicida*. Mediante las técnicas de tipado de amplificación aleatoria de ADN polimórfico (RAPD, del inglés, *Random Amplification of Polymorphic DNA*) con los cebadores P3 y P6, de amplificación de secuencias palindrómicas intergénicas de enterobacterias (ERIC-PCR, del inglés *Enterobacterial repetitive intergenic consensus*) y de amplificación de elementos repetitivos BOX (BOX-PCR), Castro y col. (2006) encontraron que las cepas aisladas de rodaballo en Europa formaban un clúster independiente del resto de cepas con diferentes orígenes geográficos. Además, utilizando la técnica de amplificación de elementos repetitivos REP (REP-PCR) y los cebadores P4 y P5 para RAPD, este clúster se dividía en dos grupos sin relación aparente, pero manteniendo la independencia del resto de aislados. Sin embargo, el trabajo realizado por Griffin y col. (2013) con cepas, en su mayoría, de pez gato empleando algunas de las técnicas anteriores, no mostró la existencia de grupos relacionados según su origen geográfico.

Técnicas más complejas como el análisis multigénico del número variable de repeticiones en tándem (MLVA, del inglés *MultiLocus Variable number tandem repeat Analysis*) mostró un alto poder discriminatorio (Abayneh y col., 2014) en la especie *E. piscicida*, permitiendo la agrupación geográfica de los diferentes aislados.

### 1.3.3 Patogénesis y factores de virulencia

Al igual que *E. tarda*, *E. piscicida* es una especie bacteriana ubicua y capaz de infectar a multitud de organismo acuáticos (Tabla 10) causando grandes pérdidas económicas.

Tabla 10. Primeros aislamientos de *E. piscicida*.

Especies <sup>1</sup>	Referencia
Besugo	<i>Pragus major</i> Matsuyama y col., 2005*
Koi	<i>Cyprinus carpio</i> Matsuyama y col., 2005*
Rodaballo	<i>Scophthalmus maximus</i> Xiao y col., 2008*
Anguila europea	<i>Anguilla anguilla</i> Abayneh y col., 2013
Pez gato japonés	<i>Silurus asotus</i> Abayneh y col., 2013
Armadillo	<i>Platydoras armatulus</i> Shetty y col., 2014*
Panga	<i>Pangasius hypophthalmus</i> Shetty y col., 2014*
Pez gato	<i>Ictalurus punctatus</i> Griffin y col., 2014
Pez gato azul	<i>Ictalurus furcatus</i> Griffin y col., 2014
Pez gato híbrido	<i>I. punctatus x I. furcatus</i> Griffin y col., 2014
Platija	<i>Paralichthys olivaceus</i> Oguro y col., 2014
Tilapia	<i>Oreochromis niloticus</i> Griffin y col., 2014
Tetra Serpae	<i>Hyphessobrycon eques</i> Shao y col., 2015
Lavareto	<i>Coregonus lavaretus</i> Shafiei y col., 2016
Perca americana	<i>Micropterus salmoides</i> Folgenson y col., 2016
Raya "round ribbontail"	<i>Taeniura meyeni</i> Camus y col., 2016
Barramundi	<i>Lates calcarifer</i> Loch y col., 2017
Perca americana de boca pequeña	<i>Micropterus dolomieu</i> Reichley y col., 2017
Trucha arcoíris	<i>Oncorhynchus mykiss</i> Reichley y col., 2017
Trucha común	<i>Salmo trutta</i> Reichley y col., 2017

<sup>1</sup> nombres científicos aceptados en la actualidad, \*trabajos realizados con aislados anteriormente clasificados como *E. tarda*

Probablemente, con el avance de la reclasificación de aislados mal identificados como *E. tarda*, el número de hospedares aumentará considerablemente.

#### 1.3.3.1 Signos clínicos y cambios fisiológicos en los peces

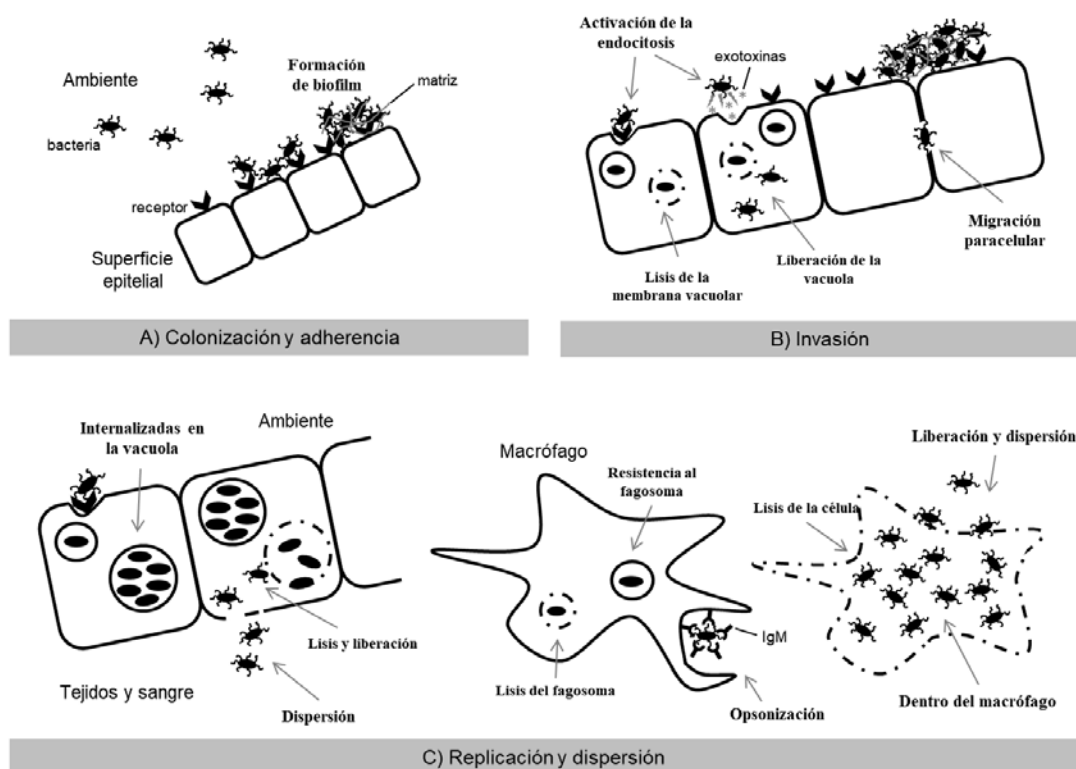
La septicemia producida por *E. piscicida*, también conocida como edwardsiellosis, presenta una sintomatología ligeramente diferente según la especie de pez afectada. De forma general, los peces infectados por la enfermedad comparten síntomas típicos de otras infecciones bacterianas como natación errática, lesiones cutáneas, branquias blanquecinas, tumefacciones a nivel de los ojos, excesiva secreción de mucus, erosión de

las escamas y úlceras. En casos graves puede aparecer inflamación y hemorragias a nivel anal, y en la cavidad ventral. Cuando la enfermedad avanza, pueden aparecer úlceras a nivel muscular que acaban formando graves heridas en las que se acumula gas, el cual causa la aparición de un olor desagradable.

Como hemos dicho, existen variaciones pequeñas entre las características sintomáticas relacionadas con diferentes especies. En el pez gato se desarrollan úlceras hemorrágicas en la base del cráneo (Griffin y col., 2017) mientras que en las anguilas (*Anguilla anguilla*), los síntomas específicos se evidencian internamente mediante granulomas en el hígado y petequias en el músculo (Abayneh y col., 2013). En la perca americana (*Micropterus salmoides*) se han descrito parches blancos en el mucus, así como lesiones necróticas en el pedúnculo caudal y granulomas en el hígado y riñón (Folgelson y col., 2016). En el lavareto (*Coregonus lavaretus*) el hígado aparece moteado y presenta necrosis al igual que el riñón, además también se puede apreciar cierta peritonitis (Shafiei y col., 2016). En la platija lo más destacable son las úlceras supurativas y en el pez gato japonés una fuerte distensión abdominal y abscesos con fluido purulento en el riñón (Griffin y col., 2017). Recientemente se ha descrito un brote en cultivo de barramundi donde los individuos afectados presentaban raros eritemas con pérdidas de escamas (Loch y col., 2017).

### 1.3.3.2 Factores de virulencia

Podemos definir factor de virulencia como el mecanismo o componente de un microorganismo patógeno que causa daño en el hospedador con el fin de establecer una infección. En general podemos clasificarlos en tres categorías: 1) factores que promueven la colonización de la superficie del huésped; 2) factores implicados en la invasión y replicación; 3) sistemas de secreción y 4) otros componentes de la pared celular. La virulencia de un patógeno puede implicar uno o múltiples factores que se encargan de entrar en contacto con el huésped, evadir el sistema inmune, sobrevivir y proliferar en el hospedador y diseminarse a nuevos tejidos para comenzar el proceso de infección (Figura 3). La entrada al hospedador de un microorganismo es muy importante ya que cuanto más rápido invada y colonice, antes podrá alcanzar el nivel de población adecuado para combatir la respuesta inmune de dicho hospedador.



**Figura 3.** Infección bacteriana. A) Las células bacterianas se adhieren a la superficie del huésped mediante adhesinas, uniones de proteínas y la formación de biopelículas. B) La célula bacteriana posee un sistema de secreción que inyecta moléculas en la célula huésped, algunos de las cuales causan la reorganización del citoesqueleto, que envuelve a la bacteria. Proteínas de superficie bacteriana se unen a los receptores en la superficie celular e induce su propia endocitosis en la célula. Otra bacteria invade el espacio entre dos células al alterar las moléculas de unión intercelulares. C) En el citosol del huésped o macrófago, las bacterias lisan la membrana vacuolar o/y se multiplican en el fagosoma, antes de ser liberadas y dispersadas. Figura original.

La patogénesis de *Edwardsiella piscicida* es un proceso multifactorial regulado por diversos factores como la producción de hemolisinas (Wang y col., 2010b), la habilidad de resistir la capacidad fagocítica del suero, la capacidad de invadir células epiteliales, ... (Srinivasa Rao y col., 2003). A continuación, se citan los principales mecanismos de virulencia descritos:

**1) Factores que promueven la colonización del huésped:** el contacto y la adherencia al hospedador son los principales pasos durante una infección. *E. piscicida* presenta diferentes adhesinas en la superficie celular como flagelinas (FliC, FlgD) (Liu y col 2012; He y col. 2012; Park y col., 2011; Liu y col., 2017b), proteínas fimbriales (FimA) (Srinivasa y col., 2003) y otras adhesinas autotransportadas (AIDA) (Sakai y col., 2009b). La formación de

biopelículas favorece el inicio de una infección e incluso la supervivencia en el interior del hospedador; en *E. piscicida* proteínas como FliC (mencionada anteriormente) o como los factores sigma (RpoS) están implicados en el desarrollo de estos tapetes (He y col. 2012; Xiao y col., 2009).

**2) Factores implicados en la invasión y replicación:** Una vez colonizada la superficie del hospedador es necesario la invasión de los tejidos del mismo. En *E. piscicida* ha sido identificada la invasina Inv1 (Li y col., 2012) y, además, han sido detectadas diferentes hemolisinas y sus precursores (EthA, EthB y SlyA) (Janda y col., 1991; Wang y col., 2009b; Kumar y col., 2010; Xiao y col., 2012). Para poder sobrevivir y posteriormente multiplicar su número, los microorganismos tienen una serie de mecanismos para contrarrestar las defensas del hospedador. Bajo condiciones de estrés la resistencia al suero o la replicación en macrófagos es vital. *E. piscicida* sobreexpresa proteínas de la familia de las catalasas (Xiao y col., 2012; Han y col., 2006), proteínas de choque térmico (HtpG y Hsp60) (Dang y col., 2011) y superóxido dismutasas (SodB y SodC) (Han y col., 2006; Gao y col., 2016) para contrarrestar los efectos de las defensas del hospedador. Otro factor notorio para la supervivencia de cualquier microorganismo es la adquisición de hierro, micronutriente que las bacterias necesitan secuestrar de las células del hospedador. Debido a su importancia, este factor será tratado en el siguiente apartado.

**3) Sistemas de secreción:** los sistemas de secreción son usados por multitud de microorganismos para liberar factores de virulencia dentro del hospedador, así como en otros aspectos de la patogenicidad (Tan y col., 2005). *E. piscicida* posee factores de virulencia similares a muchas enterobacterias, como los sistemas de secreción tipo III (T3SS) y VI (T6SS), reguladores de *quorum sensing*, exotoxinas y exoenzimas (Leung y col., 2012). El sistema de secreción tipo III está implicado en la formación de los flagelos en *E. piscicida*, además tres de las proteínas que conforman este sistema, EseB, EseC y EseD, están relacionadas con la translocación de proteínas efectoras en las células infectadas del hospedador (Srinivasa y col., 2004). Por otra parte, el sistema de secreción tipo VI está relacionado con la secreción de las proteínas del complejo Evp (del inglés, *Edwardsiella virulence protein*) (Tan y col., 2005; Chakraborty y col., 2011), del cual han sido

identificadas EvpA, EvpB y EvpC, proteínas implicadas en la virulencia de *E. piscicida*, aunque aún se desconocen los detalles de sus funciones (Srinivasa y col., 2004).

Se conoce como *quorum sensing* el mecanismo por el que numerosas bacterias Gram negativas se comunican entre sí mediante pequeñas moléculas autoinducidas como las N-acil-L-homoserina lactonasas o AHLs. Este proceso está considerado factor de virulencia en *E. piscicida* ya que ayuda a incrementar el número de bacterias en el interior del hospedador y así avanzar la infección (Leung y col., 2012).

**4) Otros componentes de la pared celular:** la pared celular es el primer componente en entrar en contacto con el hospedador por lo que la efectividad de este primer contacto es muy importante. Como ya hemos mencionado, las adhesinas situadas en la pared son fundamentales para comenzar la infección, pero además de estas moléculas podemos encontrarnos con otros factores de virulencia. Proteínas como OmpA, involucrada en la defensa frente al sistema inmune del hospedador, o TolC, especialmente importante en la resistencia a antibióticos, son esenciales en la virulencia de *E. piscicida* (Liu y col., 2013).

En otras enterobacterias se ha demostrado que la lipoproteína Lpp, además de una mera función estructural, está implicada en la inhibición de la actividad bactericida de algunos péptidos o pequeñas proteínas antimicrobianas (AMPs, del inglés *Antimicrobial Peptide/Protein*) (Chang y col., 2012). Sin embargo, en *E. piscicida* esta función inhibitoria no ha sido todavía descrita.

Como hemos visto, está claramente demostrado que la virulencia de *E. piscicida* comprende numerosos factores activados mediante complejas rutas de inducción donde se involucran otros efectores. Aunque hay multitud de trabajos, hasta el momento estos se centran en el estudio de los sistemas de secreción T3SS y T6SS y sus reguladores de expresión (Srinivasa y col., 2004; Tan y col., 2005; Jobichen y col., 2010; Chakraborty y col., 2011; Leung y col., 2012; Lv y col., 2012).

### 1.3.3.2.1 La importancia del hierro en la virulencia

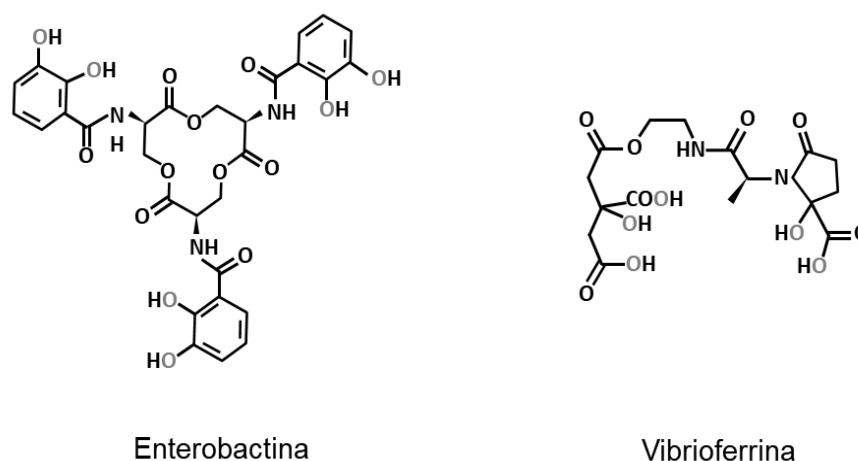
El hierro es un nutriente esencial en el crecimiento bacteriano que existe en dos estados redox,  $\text{Fe}^{+2}$  y  $\text{Fe}^{+3}$ , y que además puede adoptar otros estados en función del ligando (Andrews y col., 2003). Estas características hacen del hierro un elemento altamente versátil para su incorporación en proteínas participando en diversas reacciones. Aunque el hierro sea uno de los elementos más abundantes de la Tierra no todas sus formas son asimilables ya que, el  $\text{Fe}^{+3}$  se oxida en presencia de oxígeno y pH básico volviéndose insoluble y por tanto, no biodisponible. Debido a su baja biodisponibilidad, cualquier ser vivo ha de tener un sistema de adquisición y acumulación de hierro estrictamente controlado (Wandersman y Delepelaire, 2004).

Las bacterias necesitan una concentración de hierro entre  $10^{-7}$  y  $10^{-5}$  M para poder crecer (Andrews y col., 2003) y en caso de las bacterias patógenas este hierro ha de ser adquirido de las fuentes del hospedador. Es importante que los microorganismos patógenos cuenten con sistemas efectivos de captación del hierro que se encuentra fuertemente asociado a la hemoglobina, la albúmina y otras moléculas del hospedador, ya que de ello depende su supervivencia y desarrollo en su interior (Weinberg, 1995). Para obtener este hierro no disponible, las bacterias han desarrollado diferentes mecanismos que se pueden dividir en dos grupos:

**1) mecanismo de unión directa de la transferrina a los receptores de membrana celular:** en las enterobacterias, el hierro disponible es interiorizado mediante receptores, conocidos como TbpA y TbpB, asociados al complejo Ton (Larsen y col., 1996). La proteína TbpB, situada en la membrana externa, reconoce la transferrina unida al hierro y, TbpA introduce  $\text{Fe}^{+3}$  al periplasma utilizando la energía dada por el complejo Ton. Hasta la escritura de esta tesis, los estudios sobre los complejos y/o receptores de *E. piscicida* que captan hierro o proteínas ligadas a él, son nulos.

**2) mecanismos de captación de hierro mediado por sideróforos:** los sideróforos son ligandos de hierro de baja masa molecular (<1000Da) que se caracterizan por unirse al hierro con alta afinidad y especificidad (Andrews y col., 2003). Estas moléculas son,

mayormente, secretadas al exterior en condiciones limitantes de hierro. Los trabajos iniciales sobre la producción de sideróforos en *E. piscicida* indican que el sideróforo producido por esta bacteria era diferente a los descritos en otras enterobacterias (enterobactinas) (Igarashi y col., 2002). Castro y col., (2016) analizaron la estructura de esta molécula y llegaron a la conclusión de que *E. piscicida* produce sideróforos de tipo hidroxamato más similares a la vibrioferrina, cuya estructura difiere fuertemente de las enterobactinas (Figura 4).



**Figura 4.** Estructuras de la enterobactina y vibrioferrina. Los átomos quelantes de hierro en cada estructura se resaltan en gris. Figura original.

La vibrioferrina fue descrita por primera vez en *Vibrio parahaemolyticus* (Yamamoto y col., 1994), se caracteriza por tener una afinidad por el hierro menor que sus homólogos y debido a esto la unión  $\text{Fe}^{+3}$ -sideróforo es muy sensible a la fotólisis (Castro y col., 2016). Se conoce que los mismos receptores mencionados en el punto 1) (TbpA y TbpB) son los responsables de captar e internalizar los sideróforos en diversas especies de bacterias Gram negativas pero el mecanismo de captación en *E. piscicida* aún no ha sido descrito. Estos receptores son regulados por la disponibilidad ambiental de hierro, ya que en ausencia de hierro sustancias perjudiciales para la bacteria como colicinas o antibióticos podrían unirse a ellos. Aunque estas pequeñas moléculas son esenciales para la supervivencia de *E. piscicida* en el interior del pez, su importancia en la virulencia no está clara (Kokubo y col., 1990; Mathew y col., 2001; Igarashi y col., 2002).

A pesar de que estos sideróforos no se hayan descrito como un punto clave en la patogénesis, el hierro si es un factor de virulencia importante ya que la expresión de

multitud de proteínas implicadas en la virulencia, está regulada directa o indirectamente por la disposición del este elemento, como los sistemas T3SS y T6SS regulados por el regulador de absorción férrica o *fur* (Leung y col., 2012).

### 1.3.4 Técnicas de diagnóstico

A pesar de los síntomas específicos y su facilidad para reconocerlos, no es posible diferenciar una infección causada por *E. piscicida* de cualquier otra patología bacteriana por lo que la sintomatología no es útil para el diagnóstico.

La metodología clásica basada en las pruebas bioquímicas convencionales en tubo y placa no es suficiente para diferenciar entre *E. piscicida*, *E. tarda* y *E. anguillarum*. Tampoco son fiables los medios de cultivo que se empleaban para la diferenciación de *E. tarda* (McConkey, XLD (Xylose-Lysine-Desoxycholate), DC (Desoxycholate Citrate),...) ya que, al igual que el diagnóstico tradicional no consiguen diferenciar entre las tres especies mencionadas. Nos encontramos con los mismos resultados en aquellos medios que incorporan detectores de H<sub>2</sub>S, debido a que a excepción de *E. ictaluri*, las otras especies producen H<sub>2</sub>S.

Los sistemas comerciales como los sistemas miniaturizados tipo API20E (Biomérieux), útiles en la identificación de otros microorganismos, no son válidos para identificar *E. piscicida* ya que no presenta un perfil diferenciado de *E. tarda* o *E. anguillarum*. El análisis de los ácidos grasos por *Sherlock Microbial Identification System* (MIDI) (Reichley y col., 2017) y el análisis proteómico llevado a cabo por MALDI-TOF-MS (*Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time Of Flight Mass Spectrometry*) identifican los aislados de *E. piscicida* como *E. tarda* (Fogelson y col., 2016).

Debido a las controversias taxonómicas generadas por el uso de estas metodologías, las técnicas que manejan el ADN se convirtieron en la clave para la correcta identificación de las especies del género *Edwardsiella*. Griffin y col. (2014) propusieron la amplificación parcial del gen de la subunidad beta de la girasa (*gyrB*) como PCR específica para la detección de *E. piscicida*, y más tarde, Reichley y col. (2015) describieron una PCR en

tiempo real (qPCR) que además de identificar *E. piscicida* es capaz de cuantificar la carga bacteriana que porta el pez.

### 1.3.5 Control y prevención

Para minimizar cualquier infección bacteriana lo primordial es el mantenimiento de los parámetros fisicoquímicos del agua de los tanques de cultivo en valores adecuados, así como el cuidado de las condiciones sanitarias de la instalación y el mantenimiento de los períodos de cuarentena cuando se introducen individuos importados.

El uso de antibióticos constituye una de las estrategias más extendidas para el control de enfermedades bacterianas en la acuicultura debido a su fácil administración y bajo coste. Los estudios *in vitro* sobre la susceptibilidad de *E. piscicida* a varios agentes quimioterapéuticos indican que las cepas bacterianas aisladas de diferentes huéspedes y regiones geográficas mostraron un patrón similar, siendo susceptibles a un gran número de compuestos químicos como los antibióticos de uso común: la enrofloxacina, la oxitetraciclina o el florfenicol (Shafiei y col., 2016).

Debido al abuso de la utilización de los antibióticos, las bacterias han ido creando resistencias y la legislación se ha vuelto más restrictiva con su utilización, por lo que una alternativa eficiente a esta metodología es el desarrollo de vacunas. Hasta el momento se han elaborado vacunas recombinantes (Sun y col., 2010; 2011), vacunas atenuadas (Yang y col., 2015; Lv y col., 2012), vacunas de ADN (Jiao y col., 2009; Liu y col. 2017a), y vacunas con la estructura exterior de la célula o vacunas fantasma (Know y col., 2006; 2007) con valores de RPS (supervivencia relativa porcentual) superiores al 60%.

## 1.4 TÉCNICAS DE TIPADO GENÉTICO Y FILOGENÉTICAS

Hoy en día los métodos clásicos de identificación así como los estudios fenotípicos han quedado relegados al apoyo de técnicas más avanzadas como son los estudios de tipado genético basados en la amplificación de diferentes secciones del genoma; los estudios multigénicos que analizan, mediante dendogramas y otras herramientas, las secuencias

parciales obtenidas a partir de varios genes esenciales (*housekeeping*) así como la concatenación de las mismas; y el estudio de la secuenciación del genoma completo. Todas estas técnicas nos aproximan a un conocimiento mayor y más fiable sobre los microorganismos.

### 1.4.1 Técnicas basadas en el análisis de perfiles genéticos

70

En el genoma de cualquier organismo se encuentran secuencias de ADN repetidas que pueden ser empleadas para el diseño de cebadores que amplifiquen diferentes regiones, dando lugar, a perfiles bandeados específicos de cada especie, incluso propios de cada cepa. Anteriormente hemos mencionado diferentes técnicas basadas en la amplificación de estos fragmentos ya sea de forma arbitraria, como el RAPD, o de forma más específica como el ERIC-PCR, el REP-PCR y el BOX-PCR, todas ellas comúnmente utilizadas para el genotipado bacteriano inclusive los miembros del género *Edwardsiella*. El análisis de VNTR (del inglés, *variable-number tandem repeat*) llamado MLVA (del inglés, *Multiple Loci VNTR Analysis*) es empleado para el seguimiento de microorganismos patógenos ya que es capaz de establecer diferencias entre cepas muy próximas genéticamente. Aparte de su elevada resolución presenta la ventaja de que los datos pueden ser digitalizados, almacenados y compartidos (Lindstedt y col., 2013). Este método ha sido utilizado en el estudio de multitud de organismos incluida la especie *E. piscicida* (Abayneh y col., 2014). Los resultados demuestran el alto poder discriminatorio del método ya que no solo diferencia los aislados según su origen al igual que el MLSA realizado por el mismo autor (Abayneh y col., 2012), sino que además es capaz de diferenciar los diferentes brotes epidémicos dentro de la misma zona geográfica. Estos datos revelan que esta aproximación puede ser muy útil en el estudio de la epidemiología de *E. piscicida*.

Variantes a estos procedimientos son los que previa o posterior a la amplificación, se somete el genoma a una digestión con enzimas de restricción. Dentro de este grupo tenemos la amplificación de fragmentos de restricción (RFLP, del inglés, *restriction fragment length polymorphisms*) en el que secuencias específicas de nucleótidos son reconocidas y cortadas por enzimas de restricción cuyo patrón de bandeo resultante

difiere entre individuos, lo que hace que esta técnica sea útil tanto para la taxonomía como para el genotipado (Acharya y col., 2007). A parte del RFLP, los perfiles generados mediante electroforesis en campo pulsante (PFGE, del inglés, *Pulsed Field Gel Electrophoresis*) también permiten conocer la clonalidad de diferentes aislados en situaciones epidémicas con tiempo y espacio definido. Yang y col. (2013) aplicaron esta técnica a cepas identificadas como *E. tarda* consiguiendo dividir las cepas aisladas de humanos de las de peces; además, los clústeres identificados en este estudio se corresponden hoy en día con las especies *E. tarda*, *E. piscicida* y *E. anguillarum*. Además de la capacidad genotípica y taxonómica del PFGE, Kim y col. (2013) demostraron como este procedimiento es capaz de identificar perfiles propios de cepas virulentas pudiendo ser empleados en la predicción de la patogenicidad. Durante años la herramienta molecular más útil para establecer la huella genética de cualquier bacteria ha sido la digestión con enzimas de restricción de alta frecuencia de corte o AFLP (del inglés, *Amplified Fragment Length Polymorphism*), una técnica relativamente sencilla, rápida y reproducible, que analiza simultáneamente muchos *loci* y detecta un mayor número de marcadores de ADN polimórfico que cualquier otro método basado en la PCR (Figura 5) (Vos y col., 1995). Debido a que los marcadores se generan en condiciones de alta selectividad, es menos probable que presenten falsos positivos. Los trabajos más comunes que implican esta herramienta están enfocados en el estudio de la variabilidad intraespecífica y en el genotipado de especies. En el estudio realizado sobre la especie *E. ictaluri* no solo se pudo dividir a las cepas según su origen geográfico, sino que los perfiles entre esta especie y *E. tarda* eran completamente diferentes pudiendo establecer unos perfiles patrones para *E. ictaluri* (Sakai y col., 2009d).

A) Digestión de ADN genómico con enzimas de restricción

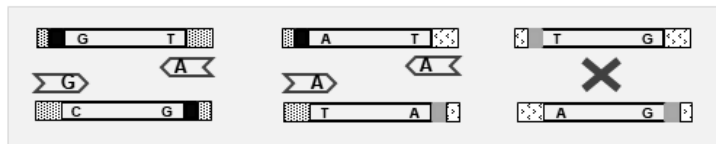


Fragmentos de restricción

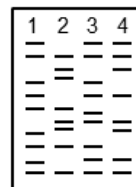
B) Ligación del adaptador a la enzima de restricción



C) PCR selectiva



D) Electroforesis de los productos de PCR



Patrones de huella dactilar

Figura 5. Flujo de trabajo del análisis de polimorfismos en la longitud de fragmentos amplificados (AFLP). Figura original.



Aunque todas estas técnicas son reproducibles, el intercambio de información entre diferentes grupos de investigación no es fiable ya que la metodología utilizada implica la realización *in situ* de los experimentos con todas las muestras que se quieran comparar. Por ello, a la hora de realizar estudios comparativos entre diferentes laboratorios las técnicas basadas en la secuenciación y el uso de las bases de datos disponibles resultan más adecuadas.

### 1.4.2 Técnicas basadas en la secuenciación de genes seleccionados

Ante las limitaciones de las técnicas anteriores han surgido aquellas que se basan en la amplificación de regiones internas de ciertos genes con su posterior secuenciación, lo que facilita la manipulación de datos a nivel global a la vez que aporta mayor información. La amplificación parcial del gen ARNr 16S ha sido la llave para la identificación bacteriana debido a sus regiones conservadas y a su reticencia a ser envuelto en procesos de transferencia horizontal (HGT, *Horizontal Gene Transfer*). Para la descripción de nuevas especies se estableció el límite de similitud del 97% (Stackebrandt y Goebel, 1994) lo que dio lugar a muchas identificaciones erróneas debido a que en muchos géneros la similitud de este gen entre especies es superior al 99%. En la actualidad la secuenciación de este gen no se considera suficiente para la descripción de especies sin embargo se necesitan estudios más resolutivos en los que se utilizan la concatenación de secuencias de varios genes esenciales.

El tipado de secuencia multigénica (MLST, del inglés *MultiLocus Sequence Typing*) fue usado por primera vez por Maiden y col. (1998) y permitió estudiar la epidemiología y la estructura poblacional de cepas de *Neisseria meningitidis* aisladas de portadores enfermos y sanos. Esta técnica está basada en el principio desarrollado en el análisis de isoenzimas (MLEE, del inglés, *MultiLocus Enzyme Electrophoresis*) en el que se estudia la movilidad electroforética de un número concreto de enzimas metabólicas en geles de almidón o poliacrilamida. En el MLST se secuencian fragmentos internos de genes esenciales que codifican enzimas metabólicas, los cuales no están sometidos a presión selectiva, lo que permite detectar variaciones neutras. Es un marcador molecular epidemiológico desarrollado y diseñado para identificar clones y/o líneas clonales (identificación de grupos poblacionales con independencia de pequeñas variaciones que pueden generarse geográfica y/o temporalmente). Tanto el elevado poder de resolución de la técnica como su potencial aplicación en estudios filogenéticos y de genética evolutiva y poblacional favorecieron su desarrollo e inclusión en los estudios de taxonomía bacteriana, así como la creación de diferentes bases de datos para su uso *in silico* (Aanensen y Spratt, 2005; Jolley y Maiden, 2010). Hasta el momento se han realizado dos estudios para especies del género *Edwardsiella* (Yang y col., 2013; Shao y col., 2015) aunque en ambos casos solamente se ha

usado como método filogenético obviando su potencial epidemiológico. Los seis genes empleados por Yang y col. (*adk*, *aspA*, *dnaK*, *fusA*, *glyA*, *mdh* y *tpi*) dieron lugar a la división de las cepas de *E. tarda* en tres grupos diferentes que se corresponden actualmente con *E. tarda*, *E. piscicida* y *E. anguillarum*. Es más, los aislados de *E. piscicida* y *E. anguillarum* se agruparon en dos complejos clonales independientes al igual que las cepas de *E. ictaluri*. Los resultados del análisis de MLST realizado por Shao y col. (2015) con diferentes genes esenciales (*adk*, *aroE2*, *dnaK*, *metG*, *phoR*, *pyrG*), arrojaron la existencia de una nueva especie, *E. anguillarum*, descrita en este trabajo.

74

Una variante del MLST son los análisis de secuencia multigénica (MLSA, del inglés, *MultiLocus Sequence Analysis*) que a lo largo de la última década han ido ganando importancia hasta convertirse en una herramienta obligatoria para los estudios taxonómicos debido a su gran poder de resolución, tanto para la delimitación de especies bacterianas como para establecer relaciones filogenéticas entre las mismas. Esta aproximación consiste en la concatenación de las secuencias parciales de al menos 4 genes esenciales (*housekeeping*) con diferente tasa de evolución (Stackebrandt y col., 2002) para evitar el posible efecto de la recombinación y de procesos de transferencia horizontal (Kämpfer y Glaeser, 2012). Hasta el momento no existe un conjunto universal de genes que permita la clasificación de todos los procariontes por lo que se debe definir la mejor combinación de genes esenciales para cada grupo taxonómico. Brady y col. (2008) establecieron un esquema de MLSA (*gyrB*, *rpoB*, *atpD* e *infB*) para los miembros de la familia *Enterobacteriaceae* con el fin de intentar resolver los problemas taxonómicos causados por la filogenia basada en el ARNr 16S. Consecuentemente, el estudio dio lugar a una reclasificación y creación de nuevos géneros enmendando así la caótica situación. La mala clasificación de la especie *E. tarda* se puso de manifiesto por los estudios de MLSA llevados a cabo por Yang y col. (2012) y Abayneh y col. (2012). El primer autor utilizó para su esquema los 6 genes esenciales *glyA*, *mdh*, *pgi*, *fusA*, *aspA* y *tpi*; el resultado fue la división de los aislados identificados como *E. tarda* en dos grandes clústeres considerados genogrupos (EdwGI y EdwGII). Abayneh y col. (2012) secuenciaron los genes esenciales *adk*, *dnaK*, *gyrB*, *phoR*, *pyrG*, *metG*, *mdh* y *aroE2*, y los análisis realizados con la secuencia concatenada mostraron una agrupación según el origen geográfico de los aislados, así

como dos grandes clústeres separados monofiléticamente correspondientes a los dos genogrupos mencionados. A raíz de estos datos, Abayneh y col. (2013) describieron la especie *E. piscicida* poniendo de manifiesto la necesidad de estudiar profundamente la filogenia del género *Edwardsiella*.

## 1.5 TÉCNICAS DE SECUENCIACIÓN MASIVA

En la era genómica, disponemos de una gran cantidad de herramientas informáticas para procesar la información genética en bases de datos de acceso público, y la tendencia para comparar diferentes aislados con múltiples fines es la secuenciación completa de genomas (WGS, del inglés, *Whole genome sequence*) (Ritcher y Roselló-Mora, 2009). Desde la descripción del primer genoma de *Haemophilus influenzae* en el año 1995 (Fleischmann y col., 1995) el número de genomas depositados en las bases de datos ha crecido exponencialmente hasta alcanzar cifras superiores a 80.000 (GOLD). Este incremento se debe a la reducción de costes haciendo posible el acceso a un mayor número de laboratorios, y al avance de las técnicas de secuenciación como la plataforma de alto rendimiento NGS (del inglés, *Next Generation Sequencing*) que han sustituido a la secuenciación clásica que empleaba el método de Sanger. Las nuevas tecnologías hacen lecturas más cortas que el método Sanger aunque de mayor calidad, en consecuencia es necesario aumentar la cobertura y el número de *contigs* para cerrar un genoma.

Debido al desarrollo de nuevas tecnologías de secuenciación y a la complejidad para analizar los datos generados, se desarrollan a la par nuevas herramientas bioinformáticas para el tratamiento de los datos extraídos, por ejemplo, de la secuenciación de genomas y metagenomas.

### 1.5.1 Análisis del genoma bacteriano

Antes de la aparición de la secuenciación de genomas completos, la técnica clave para definir nuevos taxones era la hibridación ADN-ADN *in vitro* (DDH), método muy lento y engorroso. La disponibilidad de miles de genomas ha beneficiado a la Taxonomía,

Sistemática y Filogenia ya que ha facilitado la comparación *in silico* de los mismos. En los diferentes métodos empleados para analizar la similitud a nivel genómico se establecen valores para delimitar especies nuevas pudiendo correlacionarse estos valores con los obtenidos por la hibridación *in vitro* (Tabla 11). El primer método creado para la comparación de genomas fue el valor Promedio de Identidad Nucleotídica (ANI) descrito por Konstantinidis y Tiedje (2005), el cual se puede calcular empleando algoritmos diferentes: ANIb, utilizado por Goris y col. (2007) o el desarrollado por Richter y Rosselló-Mora (2009), ANIm, el cual emplea el software MUMmer (Kurtz y col., 2004) para agilizar el cálculo.

Los algoritmos ANI no tienen base teórica para simular la hibridación recíproca que se realiza con la DDH, por lo que Lee y col. (2015) propusieron un nuevo algoritmo (OrthoANI) para resolver este problema. A diferencia de los métodos de cálculo de valores ANI originales, los obtenidos mediante el algoritmo OrthoANI son idénticos obteniéndose un único valor ya que el software sólo tiene en cuenta los pares de fragmentos ortólogos para el cálculo.

Otro de los métodos es el índice GBDP (del inglés, *Genome BLAST Distance Phylogeny*) (Henz y col., 2005). A diferencia de los anteriores, este genoma no es fragmentado si no que se alinean las secuencias de ambos genomas empleando BLAST (Alstchul y col., 1990) o BLAST+ (Camacho y col., 2009) para obtener un conjunto de HSPs (del inglés, *High Scoring Segment Pairs*), que son los usados para el cálculo de la distancia. Este algoritmo fue mejorado por Meier-Kolthoff y col. (2013) aplicando modelos estadísticos con estimación de intervalos de confianza. Este método es el empleado por el GGDC (*Genome-to-Genome Distance Calculator*) y conserva el valor delimitado para la hibridación clásica (70%), lo que hace la interpretación de los resultados más sencilla.

**Tabla 11.** Herramientas bioinformáticas usadas en la comparación de genomas.

Método	Umbrales	Herramientas
ANI	95-96%	JSpecies
OrthoANI	95-96%	OrthoANI
GBDP	70%	Genome-to-genome-distance-calculator

El genoma típico bacteriano está formado por 5 millones de pares de bases (pb) que codifican para 5000 proteínas aproximadamente. El tamaño de los genomas depositados en las bases de datos de las especies del género *Edwardsiella* es de unos 3.800.000 pb. En gran medida, las cepas de los genomas depositados no han sido caracterizadas fenotípica y fisiológicamente por lo que Kottmann y col. (2008) desarrollaron unos estándares mínimos que deben ser incluidos con la secuencia. La diversidad genética entre genomas dentro de una misma especie es mayor de lo esperado, es decir, las diferentes cepas que lo componen pueden ser ligeramente diferentes en términos de su contenido génico, como por ejemplo los 2000 genomas de la especie *E. coli* (Land y col., 2015). Muchos genomas contienen un gran número de pseudogenes que han perdido cualquier tipo de función.

Entre la información destacable que podemos obtener con la secuenciación del genoma bacteriano está el conjunto de reacciones y rutas metabólicas, pudiéndose detectar funciones específicas en el metabolismo bacteriano de cada especie (Francke y col., 2005). Para la reconstrucción del metabolismo y poder establecer la relación entre genotipo y fenotipo se aplican los modelos conocidos como GEM (del inglés, *Genomic-scale Metabolic Model*) (Thiele y Palsson, 2010). Entre las aplicaciones de estos modelos nos encontramos con los estudios en evolución microbiana, la ingeniería metabólica o aplicaciones biomédicas (Bordbar y col., 2014; Monk y Palsson, 2014). Una de las herramientas online para la generación y análisis de los GEM es el Model SEED (Henry y col., 2010) que se basa en la anotación generada por el servicio de RAST (*Rapid Annotation using Subsystem Technology*) (Aziz y col., 2008).

La secuenciación completa de los genomas también puede jugar un papel muy importante en el análisis de brotes infecciosos (Sánchez-Busó y col., 2016) puesto que, con las metodologías adecuadas se pueden realizar estudios de tipado, búsqueda de genes de resistencia y/o de virulencia y de SNPs (*Single Nucleotide Polimorphism*) (Sánchez-Busó y col., 2015).

## 1.6 PROTEÓMICA DE EXPRESIÓN DIFERENCIAL

Como ya hemos mencionado, la secuenciación de genomas ha permitido el estudio de las funciones metabólicas, sin embargo, aún se desconoce la función biológica de muchas proteínas codificadas. La proteómica es uno de los campos que establece una relación entre las secuencias genómicas y su comportamiento biológico, constituyendo una herramienta importante en el análisis funcional de genes de función desconocida.

78

El término “proteoma” se empleó por primera vez en 1995 y se refiere a “la dotación completa de proteínas expresadas por un individuo, tejido, cultivo celular, ..., en un momento determinado y bajo condiciones específicas” (Wilkins, 1995). A diferencia del genoma, el proteoma es dinámico, debido a que un mismo gen puede dar lugar a distintas proteínas según las condiciones de crecimiento o los procesos de diferenciación realizados por las células. Además, las proteínas están sometidas a cambios post-traduccionales por lo que un mismo gen puede expresar varias proteínas diferentes.

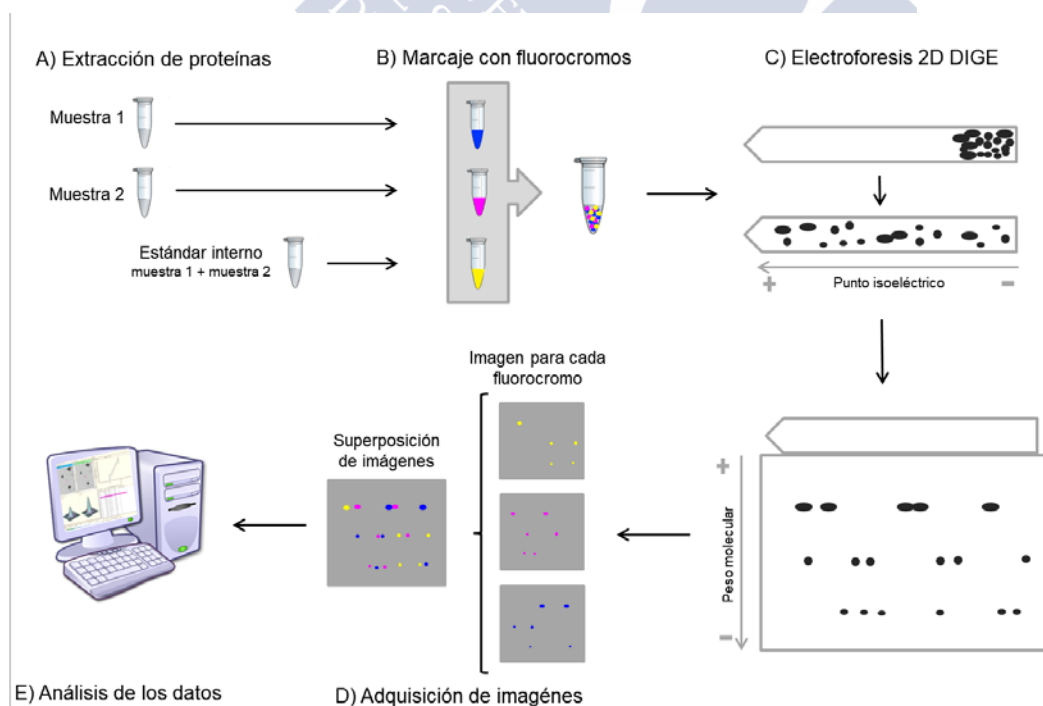
La proteómica es el estudio del proteoma y la proteómica de expresión diferencial es la identificación y/o cuantificación relativa de las proteínas que sufren alteraciones estables o transitorias, en sus niveles de expresión a consecuencia de alteraciones fisiopatológicas o inducidas por agentes externos (Reales-Calderón, 2013).

### 1.6.1 Técnicas proteómicas de expresión diferencial

Una de las aplicaciones más importantes de la proteómica es el estudio de los perfiles de expresión proteica en cantidad relativa de una cepa y compararla con otras más virulentas, o la misma cepa en distintas condiciones de crecimiento (Aebersold y Mann, 2003; Blackstock y col., 1999). Estas aproximaciones pueden realizarse en base a la comparación entre geles bidimensionales o bien a la comparación sin gel, basada en el marcaje a nivel de proteína o a nivel de péptido.

**Proteómica en gel:** Los extractos proteicos obtenidos en las distintas condiciones de estudio se separan en geles bidimensionales distintos. En estos geles las proteínas se detectan por diferentes métodos (tinción Coomassie, tinción de plata, Sypro Rubi, ...) y en

las imágenes obtenidas, el tamaño y la intensidad de la mancha proteica están directamente relacionados con la cantidad de proteína. Para detectar aquellas manchas proteicas con cambios en su expresión es necesario un análisis informático. Esta técnica es muy limitada ya que la comparación se realiza entre diferentes geles dando lugar a numerosos errores y a una difícil cuantificación de las proteínas. Para solventar estos problemas, se ha desarrollado la técnica 2D-DIGE (del inglés, *Two-Dimensional Difference in-Gel Electrophoresis*) (Tonge y col., 2001), en la que previamente a la separación de las proteínas, cada una de las muestras se marca con un fluorocromo distinto, Cy3 o Cy5; y el estándar interno (creado a partir de una mezcla de todas las muestras que van a ser analizadas) se marca con Cy2. Los extractos proteicos marcados se mezclan y se separan en el mismo gel bidimensional, que se excita con distintas longitudes de onda para obtener la imagen correspondiente a cada una de las muestras (Figura 6) (Reales-Calderón, 2013). El hecho de que las muestras se separen en el mismo gel y el uso de un estándar interno disminuye la variabilidad experimental gel a gel y facilita el uso de un programa de análisis de imagen (DeCyder) para la cuantificación automática y precisa ya que los fluorocromos permiten la cuantificación (Monteoliva y col., 2004).



**Figura 6.** Flujo de trabajo de la electroforesis diferencial en gel de dos dimensiones (2D-DIGE). Figura original.

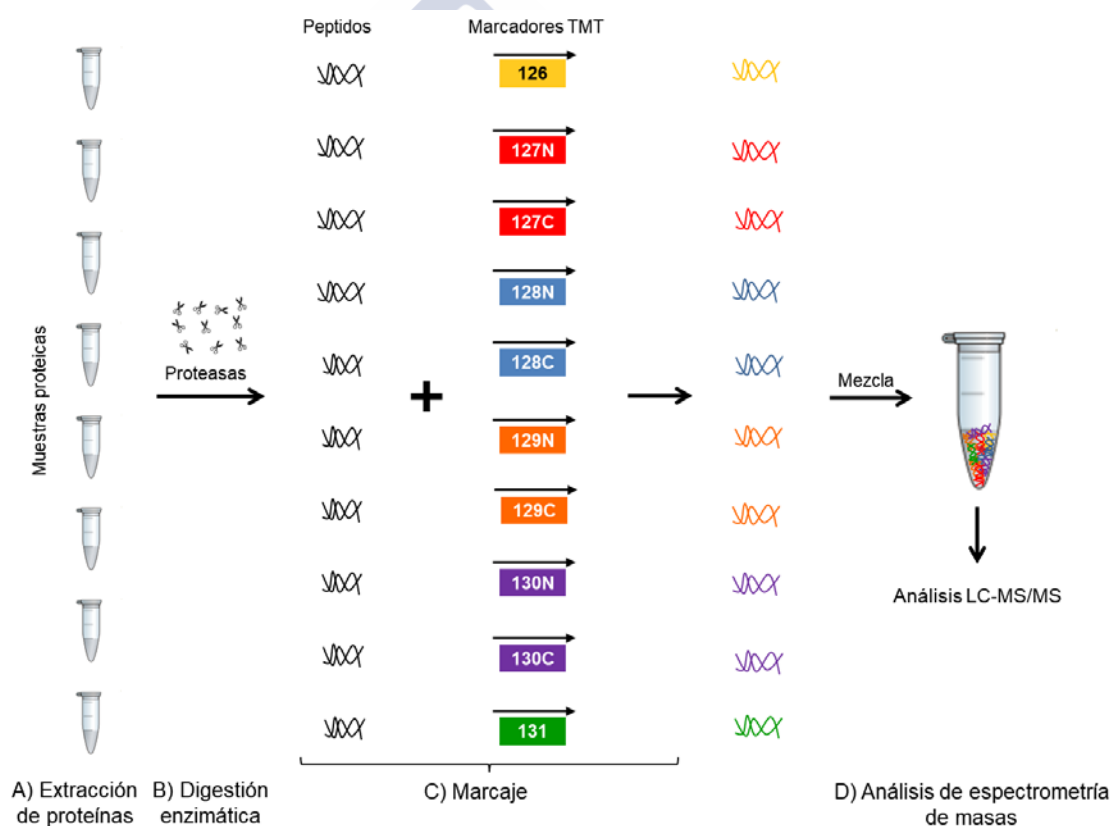
Posteriormente, las manchas proteicas han de ser identificadas mediante espectrometría de masas que proporciona medidas precisas de la masa molecular ( $m$ ) y de la carga de proteínas o péptidos ( $z$ ) en una muestra. Sin embargo, basarse únicamente en la relación  $m/z$  es un error ya que existen numerosos factores (procesamientos pre o postraduccionales) que interfieren en la masa molecular de una proteína respecto a la masa teórica. Para subsanar este error, la identificación mediante el análisis de las masas de los péptidos o huella peptídica (PMF, *Peptide Mass Fingerprinting*), se realiza por comparación de la masa peptídica obtenida con la masa calculada teóricamente a partir de la secuencia de aminoácidos de péptidos o proteínas conocidos. Uno de los métodos más comunes para la identificación de proteínas por huella peptídica es la utilización del espectrómetro tipo MALDI-TOF (Patterson y col., 1995).

**Proteómica “sin gel”:** Las técnicas de cuantificación relativa “sin gel” se basan en la incorporación de una versión distinta (ligera o pesada) de un reactivo con varios átomos de diferentes isótopos estables no radiactivos ( $^{12}\text{C}/^{13}\text{C}$ ,  $^{14}\text{N}/^{15}\text{N}$ ,  $^1\text{H}/^2\text{H}$ ,  $^{16}\text{O}/^{18}\text{O}$ ) en las proteínas o péptidos a comparar (Reales-Calderón, 2013). Esto permite la cuantificación relativa por comparación de la intensidad de los picos del espectro. Debido al gran número de péptidos en una muestra, solo una parte pueden ser analizados lo que limita mucho el número de proteínas que pueden ser identificadas en la muestra.

Existen distintas metodologías de marcaje que incorporan los isótopos en diferentes momentos de la obtención de la muestra: durante el cultivo celular (SILAC, *Stable Isotope labeling with Amino acids in Cell culture*) (Ong y col., 2002), después de la extracción de proteínas (ICAT, *Isotope-Coded Affinity Tag*) (Gygi y Aebersold, 2000), durante la digestión enzimática (digestión con agua pesada) (Aebersold y Mann, 2003), o incluso tras la digestión enzimática (iTRAQ, *Isotope Tag for Relative and Absolute Quantitation* y TMT, *Tandem Mass Tag*) (Ross y col., 2004; Thompson y col., 2003).

La tecnología TMT es un tipo de marcaje isobárico estable que se utiliza en espectrometría de masas para realizar una cuantificación relativa de las proteínas mediante el marcaje de las muestras con hasta 10 isótopos diferentes, pudiendo comparar hasta 10 muestras biológicas en una sola carrera (Figura 7). Este marcaje también conserva la información relacionada con las modificaciones post-traduccionales, permitiendo cuantificar las

diferentes modificaciones en nuestras muestras. El sistema se caracteriza porque la cuantificación se produce en la fragmentación de los péptidos (MS/MS). El reactivo está compuesto por un grupo *reporter* cargado (permite la cuantificación en el espectro de fragmentación del péptido), un grupo peptídico reactivo amino terminal y un grupo neutro que compensa la masa del reactivo (Thompson y col., 2010). Cuando se fragmenta el reactivo TMT lo hace dando lugar a los marcadores de 126, 127 (127C y 127N), 128 (128C y 128N), 129 (129C y 129N), 130 (130C y 130N) y 131 Da, respectivamente y, el área bajo la curva de estos picos es proporcional a la abundancia relativa de cada uno de ellos aunque para una cuantificación absoluta, alguna de las muestras debe contener una concentración conocida de los péptidos a cuantificar.



**Figura 7.** Resumen del flujo de trabajo para TMT. LC-MS/MS, espectrometría de masas en tándem acoplada a la cromatografía de líquidos. Figura original.

Como ya hemos dicho, estas aproximaciones son muy útiles para detectar factores de virulencia ya que podemos comparar cepas o especies del mismo género con diferentes potenciales patogénicos y saber concretamente que proteínas expresadas pueden ser las causantes de dichas diferencias. Además, podemos comparar un mismo aislado en

condiciones de crecimiento diferentes y ver cómo afectan las limitaciones de nutrientes al comportamiento real de la célula bajo condiciones de estrés producidas en los procesos de infección.





Capítulo 2:  
OBJETIVOS



## 2 OBJETIVOS

Dada la reciente controversia que ha generado la descripción de las dos últimas especies del género *Edwardsiella*, *E. piscicida* y *E. anguillarum*, una correcta y amplia caracterización genética de los aislados evitará identificaciones erróneas con la especie *E. tarda*.

Un mayor conocimiento de los factores de virulencia implicados en la patogénesis de *E. piscicida* ayudará a enfocar de manera efectiva las medidas para la prevención y control de la edwardsiellosis causada por este patógeno. Hasta el momento, no existen estudios en los que se evalúe el efecto de la disponibilidad de hierro en la especie *E. piscicida* ni de los mecanismos de esta bacteria para poder obtener este microelemento en el interior del pez.

Con estas premisas, los objetivos que nos planteamos en este trabajo fueron:

- 1) La caracterización genética y el estudio filogenético del género *Edwardsiella*.
- 2) El estudio poblacional del género *Edwardsiella*.
- 3) La búsqueda de factores de virulencia de la especie *E. piscicida* mediante herramientas proteómicas.

La consecución de estos objetivos permitirá, no solo actualizar los conocimientos sobre la especie *E. piscicida*, sino también zanjar la controversia taxonómica entre *E. piscicida* y *E. tarda*.





## Capítulo 3: CARACTERIZACIÓN MOLECULAR Y FILOGENIA DEL GÉNERO *Edwardsiella*

### Trabajos publicados:

Buján N y col. (2018) Genetic studies to re-affiliate *Edwardsiella tarda* fish isolates to *Edwardsiella piscicida* and *Edwardsiella anguillarum* species. **Syst Appl Microbiol**, 41: 30-37

Buján N y col. (2017) Draft genome sequence of the fish strain *Edwardsiella tarda* NCIMB 2034. **Genome Announc**, doi:10.1128/genomeA.00359-17

Buján N y col. (2017) Draft genome sequence of *Edwardsiella piscicida* strain ACC35.1 isolated from diseased turbot (*Scophthalmus maximus*) in Europe. **Genome Announc**, doi:10.1128/genomeA.01626-16



### 3 CARACTERIZACIÓN MOLECULAR Y FILOGENIA DEL GÉNERO

#### *Edwardsiella*

Los marcadores moleculares permiten el estudio de la variabilidad genética tanto inter como intraespecíficamente y pueden ser útiles para investigar numerosos aspectos como la epidemiología o la taxonomía de una especie o género. Los polimorfismos genéticos detectados mediante la aplicación de ciertas técnicas moleculares (ERIC-PCR, BOX-PCR, RAPD, AFLP, ...) permite establecer marcadores moleculares para la identificación de especies. Su sensibilidad llega a ser tan alta que incluso permiten diferenciar individuos de la misma especie. De todas estas herramientas, el estudio de la amplificación de fragmentos polimórficos llevados a cabo mediante AFLP combina la especificidad y poder resolutivo de la digestión con enzimas de restricción con la velocidad y facilidad de la detección de polimorfismos mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR, del inglés *Polymerase Chain Reaction*), sin necesidad de disponer de información previa del genoma a estudiar (Vos y col., 1995).

Una herramienta indispensable para los estudios taxonómicos es el análisis de secuencia multigénica (MLSA, del inglés *Multilocus sequence analysis*). Esta técnica consiste en la concatenación de las secuencias parciales de varios genes esenciales (*housekeeping*) con diferente tasa de evolución. El número de genes a estudiar no está establecido, aunque se recomienda usar más de 5 genes para evitar el posible efecto de la recombinación y de procesos de transferencia horizontal (HGT, *Horizontal Gene Transfer*) (Kämpfer y Glaeser, 2012). Esta aplicación es útil tanto para la clasificación y/o identificación de los microorganismos como para la inferencia de relaciones filogenéticas gracias a su alto poder resolutivo. Debido a que la variabilidad genética en cada género, incluso dentro de cada especie, es muy diversa no es posible establecer un conjunto universal de genes aplicable a todos los grupos taxonómicos de procariontes, por lo que hay que definir una combinación de genes específicos para cada uno de ellos.

Una de las técnicas más usadas en taxonomía basada en la utilización del genoma completo era la hibridación ADN-ADN *in vitro* (DDH), que actualmente ha sido sustituida por la hibridación *in silico* (isDDH) gracias a la posibilidad de secuenciar genomas completos. Este avance supone la eliminación de cualquier variación en los valores debido a la manipulación del investigador haciéndola una herramienta fácilmente reproducible.

En este capítulo nos hemos centrado en el estudio filogenético del género *Edwardsiella* tras la descripción de las dos nuevas especies: *E. piscicida* y *E. anguillarum*. En una primera aproximación, se analizaron los fragmentos polimórficos originados por la digestión de enzimas mediante la técnica AFLP de diversos aislados del género *Edwardsiella*. Posteriormente, se amplificaron los genes esenciales *adk*, *atpD*, *dnaJ*, *glnA*, *Y-hsp60* y *tuf* y se llevó a cabo su análisis para comprobar cuáles serían los mejores candidatos para desarrollar un esquema de MLSA. Además de estos genes se estudió la utilidad del gen ARNr 16S como herramienta taxonómica. La selección de estos once genes se realizó teniendo en cuenta que todos ellos habían sido utilizados previamente para el estudio de otras especies de la familia *Enterobacteriaceae* (Kotetishvili y col., 2005; Paradis y col., 2005; Pham y col., 2007; McQuiston y col., 2008; Abayneh y col., 2012; Griffin y col., 2013). También se ha tenido en cuenta que todos ellos presentan un tamaño adecuado para ser secuenciados, cantidad suficiente de sitios informativos, una copia única a lo largo del genoma y una tasa de evolución más alta que el gen ARNr 16S pero lo suficientemente lenta para proporcionar información filogenética.

## 3.1 MATERIALES Y MÉTODOS

### 3.1.1 Polimorfismo en la Longitud de Fragmentos Amplificados (AFLP)

Para el análisis de las huellas genéticas elaboradas mediante la técnica AFLP se seleccionaron 52 aislados identificados previamente como *E. tarda* provenientes de diferentes puntos geográficos, hospedadores y brotes epidémicos y 5 cepas de colección

de diferentes especies del género (Tabla 12) a excepción de *E. anguillarum* (no existía en el momento del análisis).

**Tabla 12.** Aislados de *Edwardsiella* utilizadas para llevar a cabo el análisis mediante AFLP y MLSA, indicando su origen geográfico, su hospedador y el año de aislamiento.

Cepas	Especie	Hospedador	Origen	Año
CECT 849 <sup>T</sup>	<i>E. tarda</i>	Heces humanas	Estados Unidos	1959
NCIMB 2034	<i>E. tarda</i>	Pez desconocido	Estados Unidos	1977
HL1.1	<i>E. tarda</i>	<i>Scophthalmus maximus</i>	Holanda	2004
HL8.1	<i>E. tarda</i>	<i>S. maximus</i>	Holanda	2005
HL10.1	<i>E. tarda</i>	<i>S. maximus</i>	Holanda	2005
HL12.1	<i>E. tarda</i>	<i>S. maximus</i>	Holanda	2005
HL21.2	<i>E. tarda</i>	<i>S. maximus</i>	Holanda	2006
HL21.3	<i>E. tarda</i>	<i>S. maximus</i>	Holanda	2006
ACC35.1	<i>E. tarda</i>	<i>S. maximus</i>	Portugal	2005
ACC36.1	<i>E. tarda</i>	<i>S. maximus</i>	Portugal	2005
ACC51.1	<i>E. tarda</i>	<i>S. maximus</i>	Portugal	2006
ACC69.1	<i>E. tarda</i>	<i>S. maximus</i>	Portugal	2006
ACC70.1	<i>E. tarda</i>	<i>S. maximus</i>	Portugal	2006
ACC121.1	<i>E. tarda</i>	<i>S. maximus</i>	Portugal	2009
RM288.1	<i>E. tarda</i>	<i>S. maximus</i>	España	2006
RM289.1	<i>E. tarda</i>	<i>S. maximus</i>	España	2006
RM296.1	<i>E. tarda</i>	<i>S. maximus</i>	España	2006
RM300.1	<i>E. tarda</i>	<i>S. maximus</i>	España	2006
RBR7.1	<i>E. tarda</i>	<i>S. maximus</i>	Portugal	2008
RBR14.1	<i>E. tarda</i>	<i>S. maximus</i>	Portugal	2008
ACR326.1	<i>E. tarda</i>	<i>S. maximus</i>	España	2009
ACR345.1	<i>E. tarda</i>	<i>S. maximus</i>	España	2009
ACR355.1	<i>E. tarda</i>	<i>S. maximus</i>	España	2009
ACR359.1	<i>E. tarda</i>	<i>S. maximus</i>	España	2009
CAQ3.9	<i>E. tarda</i>	<i>S. maximus</i>	España	2009
CAQ6.1	<i>E. tarda</i>	<i>S. maximus</i>	España	2009
CAQ9.10	<i>E. tarda</i>	<i>S. maximus</i>	España	2009
Fr1372	<i>E. tarda</i>	<i>S. maximus</i>	Francia	2012
Fr1398	<i>E. tarda</i>	<i>S. maximus</i>	Francia	2012
Fr373.1	<i>E. tarda</i>	<i>S. maximus</i>	Francia	2012
Fr373.2	<i>E. tarda</i>	<i>S. maximus</i>	Francia	2012
Fr373.4	<i>E. tarda</i>	<i>S. maximus</i>	Francia	2012
Fr373.7	<i>E. tarda</i>	<i>S. maximus</i>	Francia	2012
Fr430.3	<i>E. tarda</i>	<i>S. maximus</i>	Francia	2012
Fr430.4	<i>E. tarda</i>	<i>S. maximus</i>	Francia	2012
Fr430.7	<i>E. tarda</i>	<i>S. maximus</i>	Francia	2012
Fr430.14	<i>E. tarda</i>	<i>S. maximus</i>	Francia	2012
ACR419.1	<i>E. tarda</i>	<i>Solea senegalensis</i>	España	2010
CH1.1	<i>E. tarda</i>	<i>S. maximus</i>	China	2011

Cepas	Especie	Hospedador	Origen	Año
EDK1	<i>E. tarda</i>	<i>Anguilla japonica</i>	Japón	1981
E-11-2	<i>E. tarda</i>	<i>A. japonica</i>	Japón	1981
FL4-53-4K	<i>E. tarda</i>	<i>Morone saxatilis</i>	Estados Unidos	1997
ET001	<i>E. tarda</i>	<i>Pagellus bogaraveo</i>	Japón	2002
ET006	<i>E. tarda</i>	<i>P. bogaraveo</i>	Japón	2002
ET009	<i>E. tarda</i>	<i>P. bogaraveo</i>	Japón	2002
V12	<i>E. tarda</i>	<i>Anguilla anguilla</i>	España	2003
81.48	<i>E. tarda</i>	<i>Ictalurus punctatus</i>	Estados Unidos	1979
FL3-22	<i>E. tarda</i>	<i>Pterophyllum scalare</i>	Estados Unidos	1994
KGE7901	<i>E. tarda</i>	<i>Tilape nilotica</i>	Japón	1979
07BS	<i>E. tarda</i>	<i>T. nilotica</i>	Japón	1979
9.8	<i>E. tarda</i>	<i>Morone saxatilis</i>	Estados Unidos	1986
WFE1	<i>E. tarda</i>	<i>Paralichthys olivaceus</i>	Japón	2002
WFE10	<i>E. tarda</i>	<i>P. olivaceus</i>	Japón	2002
205/03	<i>E. tarda</i>	<i>Spaurus aurata</i>	España	2003
NCIMB 14824 <sup>T</sup>	<i>E. piscicida</i>	<i>A. anguilla</i>	Noruega	1989
CECT 885 <sup>T</sup>	<i>E. ictaluri</i>	<i>I. punctatus</i>	Estados Unidos	1976
DSMZ 13771 <sup>T</sup>	<i>E. hoshinae</i>	<i>Fratercula arctica</i>	Francia	1980
DSM 27202 <sup>T†</sup>	<i>E. anguillarum</i>	<i>Anguilla marmorata</i>	China	2008
93-146*	<i>E. ictaluri</i>	<i>I. punctatus</i>	USA	1993
FL6-60*	<i>E. piscicida</i>	<i>M. saxatilis</i>	USA	1994
C07-087*	<i>E. piscicida</i>	<i>I. punctatus</i>	USA	2007
EIB202*	<i>E. piscicida</i>	<i>A. anguilla</i>	China	2006

\*Genomas completos de los cuales se extrajeron los genes empleados para el MLSA, †este aislado no fue utilizado en el análisis AFLP

### 3.1.1.1 Condiciones de cultivo y extracción de ADN

Todos los aislados se cultivaron en placas de agar tripticasa-soja suplementado con el 1% de NaCl (TSA-1, del inglés *Trypticase Soy Agar*) a 25°C durante 24 h. Posteriormente se inocularon tubos de ensayo con 5 ml de caldo tripticasa-soja suplementado igualmente con 1% de NaCl (TSB-1, del inglés *Trypticase Soy Broth*), en las mismas condiciones que anteriormente. El ADN cromosómico se extrajo mediante el kit comercial *DNeasy blood and tissue* (Quiagen) siguiendo el protocolo del fabricante. El ADN extraído se cuantificó en el biofotómetro Nanodrop (ND-1000) *spectrophotometer* (Thermo Scientific, Nanodrop Technologies), se diluyó hasta una concentración final de 20ng/μl y posteriormente se conservó a -20°C.

### 3.1.1.2 Protocolo de AFLP

Para comenzar con la restricción enzimática se preparó una mezcla por reacción de 1,25  $\mu\text{l}$  de tampón 10x *Buffer E* (Promega), 1  $\mu\text{l}$  (10 unidades) de la enzima de restricción *Taq*  $\alpha$  I (Promega) y 4,25  $\mu\text{l}$  de agua miliQ estéril. Posteriormente se añadieron 5  $\mu\text{l}$  de ADN cromosómico y se incubaron 1 h a 65°C, pasado este tiempo se incorporó 1  $\mu\text{l}$  (10 unidades) de la enzima *Hind*III y se incubó 1 h a 37°C seguido de otra incubación de 20 min a 80°C.

Los adaptadores *Hind*III y *Taq*I se añadieron a una concentración final de 0,04 y 0,4  $\mu\text{M}$  respectivamente, junto al tampón 10x *DBA Ligase Buffer* (Promega) y agua miliQ estéril. La ligación de los fragmentos se realizó mezclando 0,5  $\mu\text{l}$  de ligasa T4 *DNA Ligase* (Promega) con 12  $\mu\text{l}$  de la mezcla anterior y 12,5  $\mu\text{l}$  del ADN digerido. A continuación, se incubaron a 20°C durante 2 h.

A partir de este ADN ligado se realizó la amplificación selectiva utilizando dos cebadores específicos, el cebador H00A (5'-GACTGCGTACCAGCTTA-3') marcado con el fluorocromo IR700 para LI-COR (Lincon), y el cebador T000 (5'-CGATGAGTCCTGACCGAA-3'), correspondientes a los extremos terminales de los cortes específicos realizados por las enzimas *Hind*III y *Taq*I respectivamente. La reacción se llevó a cabo en un volumen final de 10  $\mu\text{l}$  empleando 1,5  $\mu\text{l}$  de ADN ligado, tampón 10x *Amplification Buffer* (Roche), polimerasa *Taq Polymerase* (Roche) y la mezcla de desoxirribonucleótidos trifosfatos (Fisher) en un termociclador PTC-200 DNA-Engine *thermocycler* (MJ Research) siguiendo el programa de PCR descrito en la Tabla 13. En cada grupo de PCR se incluyó un control negativo (sin añadir ADN ligado).

Se corroboró la amplificación mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% en TAE, teñido con RedSafe (20.000x) (iNtRON Biotechnology) y visualizado con luz ultravioleta en un transiluminador GelDoc (Bio-Rad). Posteriormente, se realizó la electroforesis en el analizador *NEN Global Edition IR2 DNA Analyzer* (LI-COR) siguiendo las instrucciones del fabricante.

**Tabla 13.** Programa de PCR utilizado en la amplificación selectiva para AFLP.

	Paso	Temperatura (°C)	Tiempo (s)
Ciclo 1	Desnaturalización	94	60
	Hibridación	65	30
	Elongación	72	60
Ciclo 2 al 12	Desnaturalización	94	30
	Hibridación	64,3 (-0,7°C/ciclo)	30
	Elongación	72	60
Ciclo 13 al 24	Desnaturalización	94	30
	Hibridación	56	30
	Elongación	72	60

Las imágenes adquiridas fueron procesadas mediante el programa informático BioNumerics v7.0 (Applied Maths NV), y los niveles de similitud entre los patrones obtenidos fueron calculados por el coeficiente de correlación de Pearson ( $r$ ). Usando el mismo programa se llevó a cabo el análisis de distancias genéticas con el método del grupo de pares no ponderado (UPGMA, del inglés *Unweighted Pair-Group Method with Arithmetic mean*). El valor para delimitar la similitud de los grupos de *E. tarda* fue del 74% mientras que para ver la resolución de la capacidad taxonómica de la técnica fue del 34%.

### 3.1.2 Análisis de Secuencias Multigénicas (MLSA)

Se utilizaron un total de 52 aislados identificados previamente como *E. tarda* con diferente origen geográfico, hospedador y año de aislamiento, 6 cepas de diferentes especies del género *Edwardsiella* y, 4 genomas completos de *E. ictaluri* y *E. piscicida* (Tabla 12).

#### 3.1.2.1 Amplificación y secuenciación de los genes

Se llevó a cabo el estudio de la secuencia del gen ARNr 16S y seis genes esenciales, *adh* (adenilato quinasa), *atpD* (subunidad  $\beta$  de la ATPasa), *dnaJ* (proteína de choque térmico 40 kD), *glnA* (glutamina sintetiza), *Y-hsp60* (proteína de choque térmico 60 kD) y *tuf* (factor de elongación Tu).

La extracción del ADN cromosómico se realizó a partir de cultivos puros utilizando el sistema comercial InstaGene™ Matrix (Bio-Rad). Las células bacterianas se resuspendieron

a partir de cultivos sólidos de TSA-1 en 1 ml de agua destilada tri-estéril y se centrifugaron durante 1 min a 12000 rpm, descartando el sobrenadante. Los sedimentos se resuspendieron en 200 µl de la matriz InstaGene™ y se incubaron durante 30 min a 56°C. A continuación, las muestras se agitaron en un vórtex durante 10 segundos y se calentaron a 100°C durante 8 min. Se agitaron nuevamente en el vórtex y por último se centrifugaron 3 min a 12000 rpm. La concentración del ADN se midió tres veces para cada muestra en un biofotómetro (BioPhotometer, Eppendorff), se ajustó a 1000 ng/µl y se conservó a -20°C para su posterior uso.

Los cebadores utilizados para la amplificación de cada uno de los genes se muestran en la Tabla 15. Para amplificar el gen ARNr 16S las condiciones de PCR fueron: 95°C durante 4 min, seguido de 30 ciclos de amplificación, 1 min a 95°C, 1 min a 55°C, 1:30 min a 72°C, y una elongación final de 5 min a 72°C. En el caso de los genes esenciales las condiciones generales fueron: 95°C durante 5 min, seguido de 35 ciclos de amplificación, 45 s a 95°C, 45 s a temperaturas entre 45 y 60°C según el gen (ver Tabla 14), 1 min a 72°C, y una elongación final de 5 min a 72°C.

Se comprobó la amplificación parcial de los genes mediante electroforesis en geles de agarosa al 1% en TAE, teñidos con RedSafe (20.000x) (iNtRON Biotechnology) y visualizados con luz ultravioleta en un transiluminador GelDoc (Bio-Rad).

Las reacciones de secuenciación se realizaron en el servicio de secuenciación Stabvida DNA Lab (Portugal) para todos los genes. La pareja de electroferogramas (cebadores directo y reverso) obtenidos para cada gen se ensamblaron utilizando el programa SeqMan del paquete informático Lasergene (DNA Star Ltd) y se corrigieron manualmente. Posteriormente, se verificó que las secuencias obtenidas se correspondían con los genes secuenciados mediante una búsqueda en las bases de datos públicas Blast (Altschul y col., 1990) y, en el caso de la secuencia obtenida para el gen ARNr 16S, EzBioCloud (Yoon y col., 2017). Los porcentajes de similitud de los genes individuales, así como los del concatenado, se obtuvieron mediante el programa Megalign (Lasergene, DNA Star Ltd).

**Tabla 14.** Cebadores y condiciones de PCR utilizados para la amplificación de los genes seleccionados para el análisis MLSA.

Gen	Cebador	Secuencia del cebador (5'-3')	Longitud (pb)	Tamaño utilizado (pb)	Tª de hibridación (°C)	Referencia
ARNr 16S	pA	AGAGTTTGATCCTGGCTCAG	1500	1151	55	Edwards y col., (1989)
	pH	AAGGAGGTGATCCAGCCGCA				
<i>adk</i>	<i>adkF</i>	ATTCCGCAGATCTCCAC	508	474	55	Buján y col., 2018
	<i>adkR</i>	TTCACATAGCGAGTATTGC				
<i>atpD</i>	A1	RTIATIGGIGCIGTIRTIGAYGT	884	642	45	Paradis y col., (2005)
	A2	TCRTCIGCIGGIACRTAIAYIGC				
<i>dnaJ</i>	1F	GATYTRCGHTAYAACATGGA	758	728	52	Pham y col. (2007)
	2R	TTCACRCCRTYDAAGAARC				
<i>glnA</i>	<i>glnA-1</i>	CGATTGGTGGCTGGAAAGG	530	494	52	Kotetishvili y col., (2005)
	<i>glnA-2</i>	TTGGTCATRGTRTTGAAGCG				
Y- <i>hsp60</i>	Y- <i>hsp60-1</i>	GACGTNGTAGAAGGTATGYA	565	539	52	Kotetishvili y col., (2005)
	Y- <i>hsp60-2</i>	CGCCGCCAGCCAGTTTAGC				
<i>tuf</i>	T1	AAYATGATACIGGIGCIGCICA	884	753	60	Paradis y col., (2005)
	T2	CCIACIGTICKICRCCYTCRCG				

### 3.1.2.2 Análisis filogenético

El alineamiento múltiple de las secuencias en pauta se llevó a cabo mediante el programa MEGA7 (Kumar y col., 2016). Los alineamientos resultantes de las secuencias nucleotídicas se revisaron visualmente para identificar los nucleótidos con posiciones inciertas, principalmente en los extremos de las secuencias, y poder así corregirlo u omitirlo. Se utilizaron los parámetros de alineamiento aplicados por defecto en MEGA7. Debido a que las secuencias de los genes codificantes de proteínas presentan diferente pauta de lectura, se alineó cada gen de manera individual, y posteriormente se realizó el concatenando de las secuencias.

El análisis filogenético se realizó mediante métodos basados en distancias, caracteres y probabilidades. Cada gen individual, así como la concatenación de las secuencias génicas, se analizaron mediante *Neighbor Joining* (NJ) y *Máxima Verosimilitud* (ML). Estos análisis se realizaron utilizando el programa MEGA7 aplicando el modelo evolutivo Kimura-2-

*parameter* (Kimura, 1980) en el caso del análisis por NJ. En el caso de ML, para cada gen se determinó el mejor modelo evolutivo de sustitución nucleotídica mediante el mismo programa informático usando el Criterio de Información Bayesiano (BIC, del inglés *Bayesian Information Criterion*). El BIC es una aproximación derivada del estimador asintóticamente no sesgado Criterio de Información Akaike (AIC, del inglés *Akaike Information Criterion*), que elige el modelo verdadero entre un número de modelos finitos (Schwarz, 1978). Los porcentajes de similitud de los genes individuales, así como del concatenado se obtuvieron mediante el programa MegAlign (Lasergene, DNA Star Ltd).

### 3.1.3 Secuenciación de genoma completo

Para llevar a cabo estudios taxonómicos mediante el empleo de genoma completo se seleccionaron tres cepas de *E. tarda* con diferente origen geográfico, hospedador y año de aislamiento (Tabla 15).

**Tabla 15.** Cepas de *Edwardsiella tarda* indicando su origen geográfico, su hospedador y el año de aislamiento, cuyo genoma completo fue analizado.

Cepa	Especie	Hospedador	Origen	Año
NCIMB 2034	<i>E. tarda</i>	Pez desconocido	Estados Unidos	1977
ACC35.1	<i>E. tarda</i>	<i>S. maximus</i>	Portugal	2005
FL3-22	<i>E. tarda</i>	<i>Pterophyllum scalare</i>	Estados Unidos	1994

#### 3.1.3.1 Extracción del ADN para el estudio de genoma completo

La extracción del ADN genómico se llevó a cabo mediante el kit comercial DNeasy Blood & Tissue Handbook (Qiagen) siguiendo las instrucciones del fabricante con las siguientes modificaciones: 1) la incubación con el tampón de lisis AL se realizó a 56°C en agitación con vórtex ocasional hasta que el homogenado se viró transparente, 2) la elución del ADN se realizó con agua precalentada a 60°C en lugar de utilizar el tampón de elución AE y, 3) se dejó incubando a temperatura ambiente durante 10 min antes de la elución. Además, se realizaron varias extracciones paralelas de cada muestra para obtener la mayor

concentración de ADN posible. Dicha concentración se determinó utilizando el espectrofotómetro Eppendorf BioPhotometer (Eppendorf). La pureza de las muestras se determinó por el cociente de las absorbancias a  $A_{260}$  y  $A_{280}$ , valores entre 1,65 y 1,9 se relacionan con un grado de pureza adecuado. Una disminución del coeficiente significa que nuestra muestra tiene un exceso de proteínas, mientras que, un aumento se debe a la contaminación por ARN. Todos los ADN genómicos se ajustaron a las concentraciones requeridas por los servicios de secuenciación.

### 3.1.3.2 Ensamblaje, anotación y análisis de los genomas

La secuenciación del genoma del aislado ACC35.1 fue llevado a cabo por Lifesequencing S.L. (Valencia, España) utilizando el secuenciador de segunda generación 454 GS-FLX (Life Sciences/Roche) que obtiene lecturas simples. Dichas lecturas fueron ensambladas con el programa informático Newbler v 2.7 (Miller y col., 2010) por el mismo servicio.

El ADN purificado de la cepa *E. tarda* NCIMB 2034 fue secuenciado por Macrogen, Inc. (Seúl, Corea del Sur) y el genoma del aislado FL3-22 fue obtenido por Sistemas Genómicos S.L. (Valencia, España) mediante la plataforma *Illumina*, que obtiene lecturas pareadas a partir de una biblioteca genómica de 8 kpb (8 mil pares de bases) de tamaño de inserto. Las lecturas para ambos genomas fueron cortadas para eliminar los adaptadores y los fragmentos con baja calidad de secuencia mediante el programa informático Trimmomatic 0.32 (Bolger y col., 2014). Las lecturas restantes se usaron para el ensamblaje del genoma llevado a cabo con la herramienta de ensamblado *de novo* SPAdes 3.6.2 (Nurk y col., 2013), y el programa QUAST (Gurevich y col., 2013) fue utilizado para evaluar el ensamblaje resultante.

Posteriormente, se realizó la anotación de todos los genomas utilizando el programa de anotación automática *on line* RAST (Aziz y col., 2008).

Para realizar los estudios comparativos del género *Edwardsiella* se emplearon los genomas disponibles en bases de datos públicas: *E. piscicida* C07-087 (NC\_020796), EIB202 (NC\_013508), S11-285 (NZ\_CP016044.1), RSB1309 (NZ\_BAYU01000001.1), JF1305 (NZ\_BAYT01000001.1), ETW41 (NZ\_CP019440.1) y FL6-60 (NC\_017318); *E. tarda* ATCC 15947<sup>T</sup> (NZ\_BANW00000000.1), FL95-01 (NZ\_CP011359.1), ASE201307 (NZ\_MBLV00000000.1), ATCC 23685 (NZ\_ADGK00000000.1), DT (NZ\_AFJJ00000000.1),

FDAARGOS370 (NZ\_PDDV00000000.1) y KC-Pc-HB1 (NZ\_CP023706.1); *E. anguillarum* ET080813<sup>T</sup> (CP006664.1); *E. ictaluri* 93-146 (NC\_012779.2), MS-17-156 (NZ\_CP028813.1) y RUSVM-1 (NZ\_CP020466.1); *E. hoshinae* ATCC 35051<sup>T</sup> (NZ\_CP016043.1) y *Edwardsiella* sp. EA181011 (NZ\_CP011364.1) y LADL05-105 (NZ\_CP011516.1).

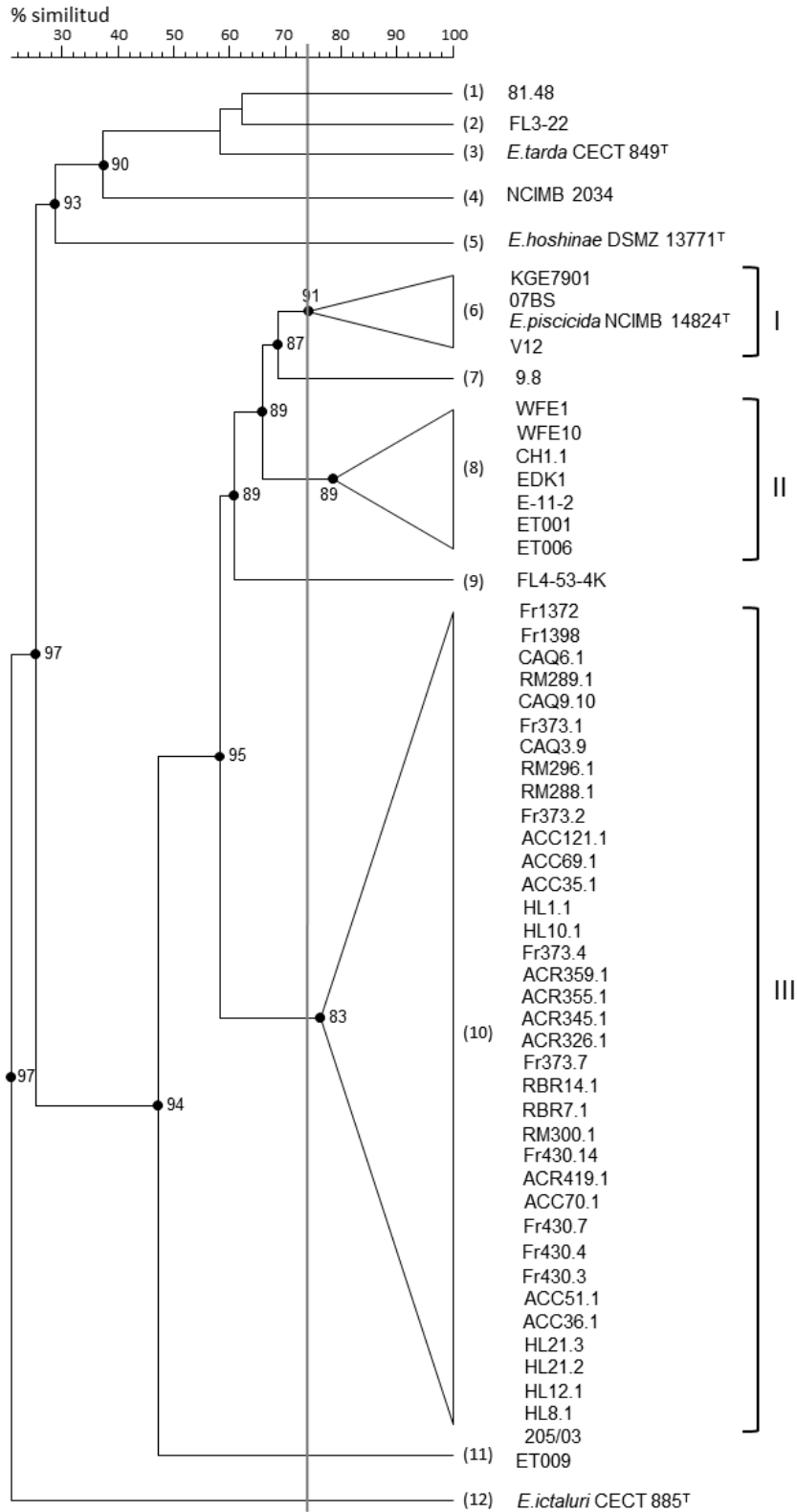
Con el fin de confirmar la correcta identificación de los aislados analizados mediante la comparación genómica, se realizó la hibridación ADN-ADN *in silico* (*isDDH*, del inglés *in silico DNA-DNA Hybridization*) entre ellos a través de *genome-to-genome distance calculator* (GGDC2.1) (Auch y col., 2010a y b; Meier-Kolthoff y col., 2013), cuyo valor umbral para asignar dos aislados a la misma especie es 70%. Para estudiar la similitud entre las secuencias de los genomas se utilizó el algoritmo OrthoANI (Lee y col., 2015) cuyo valor de corte para englobar a dos aislados en la misma especie es el 96%.

## 3.2 RESULTADOS

### 3.2.1 Identificación de especies y análisis epidemiológico mediante AFLP

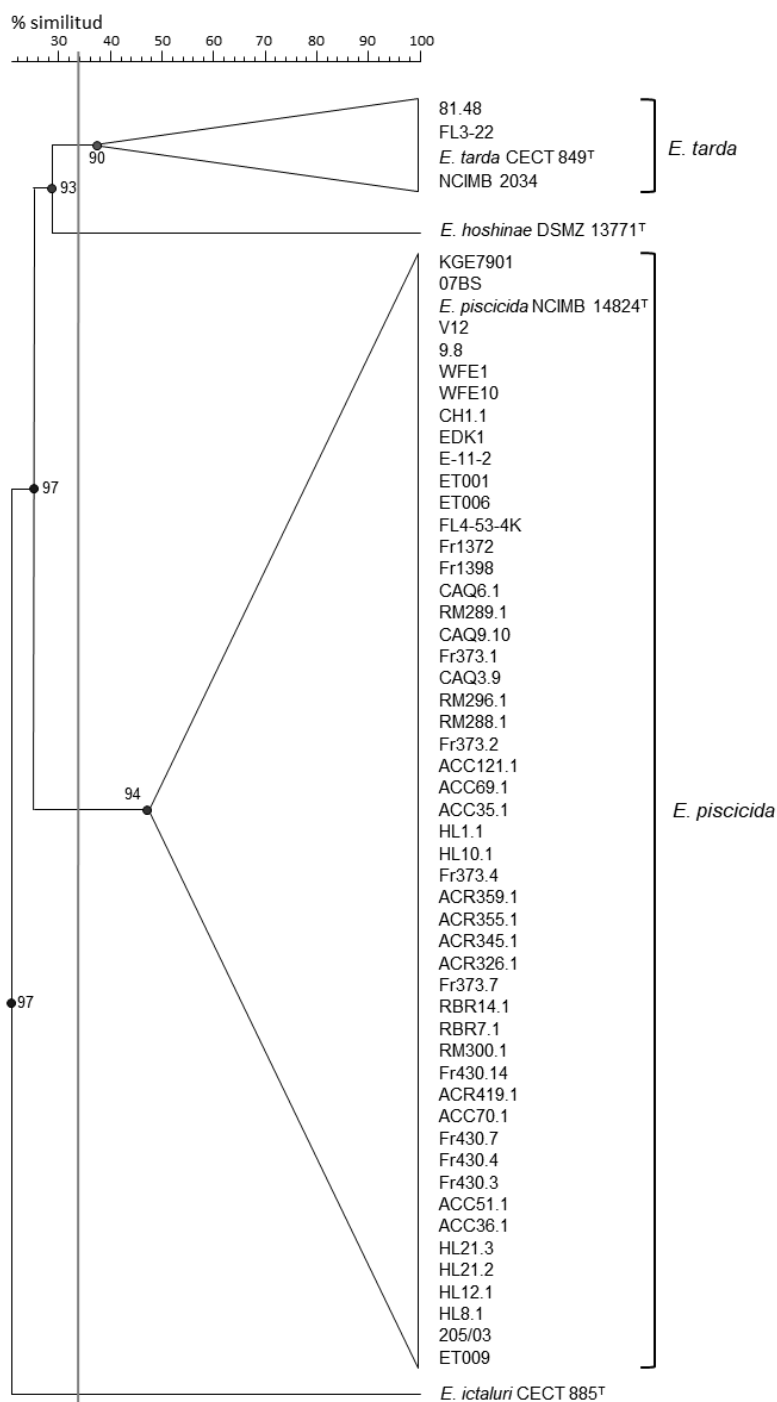
Los patrones obtenidos por AFLP de los 57 aislados analizados presentaron entre 45 y 65 bandas cuyo tamaño oscila entre los 50 y 700 pb (pares de bases). Se determinó la aplicación de un umbral del 74% similitud para poder ver las variaciones intraespecíficas de los 57 perfiles generados (Anexo I). Las agrupaciones realizadas a partir de este corte, dieron lugar a tres grupos y 9 perfiles con un solo representante cada uno (Figura 8).

Las cepas tipo de *E. tarda*, *E. hoshinae* y *E. ictaluri* presentaron perfiles únicos (3, 5 y 12 respectivamente). Además, otros aislados presentaron perfiles únicos como el 81.48, FL3-22, 9.8, el FL4-53-4K, ET009 y la cepa de referencia NCIMB 2034. Por el contrario, la cepa tipo *E. piscicida* NCIMB 14824<sup>T</sup> comparte grupo con otros tres aislados identificados previamente como *E. tarda* (grupo I). La gran parte de aislados asignados a la especie *E. tarda* formaron dos grupos, el grupo II está compuesto por representantes de obtenidos de varios hospedadores en China y Japón, mientras que el grupo III comprende 37 aislados provenientes de Europa obtenidos de rodaballo a excepción del aislado 205/03 que proviene de dorada.



**Figura 8.** Dendrograma generado a partir de los análisis de AFLP de los 57 aislados del género *Edwardsiella* agrupados al 74% de similitud (línea gris). Los números se corresponden a los diferentes perfiles de AFLP y los grupos fueron designados como I, II y III. El número mostrado junto al círculo negro es la correlación cofenética de cada rama. Figura extraída de Buján y col. 2018b, permiso cedido por la editorial Elsevier.

Si establecemos un porcentaje de similitud más restrictivo en el cual las cepas tipo de cada especie se mantienen separadas (34%) (Figura 9), se observa que la mayoría de las cepas anteriormente identificadas como *E. tarda* se agrupan con la cepa tipo de *E. piscicida* sugiriendo una reclasificación de estos aislados como *E. piscicida*.



**Figura 9.** Dendrograma generado a partir de los análisis de AFLP de los 57 aislados del género *Edwardsiella* agrupados al 34% de similitud (línea gris). Los grupos muestran los aislados que pertenecen a cada especie. El número mostrado junto al círculo negro es la correlación cofenética de cada rama. Figura original.

### 3.2.2 Análisis del gen ARNr 16S y de las Secuencias Multigénicas (MLSA)

#### 3.2.2.1 Evaluación del gen ARNr 16S como herramienta taxonómica en el género *Edwardsiella*

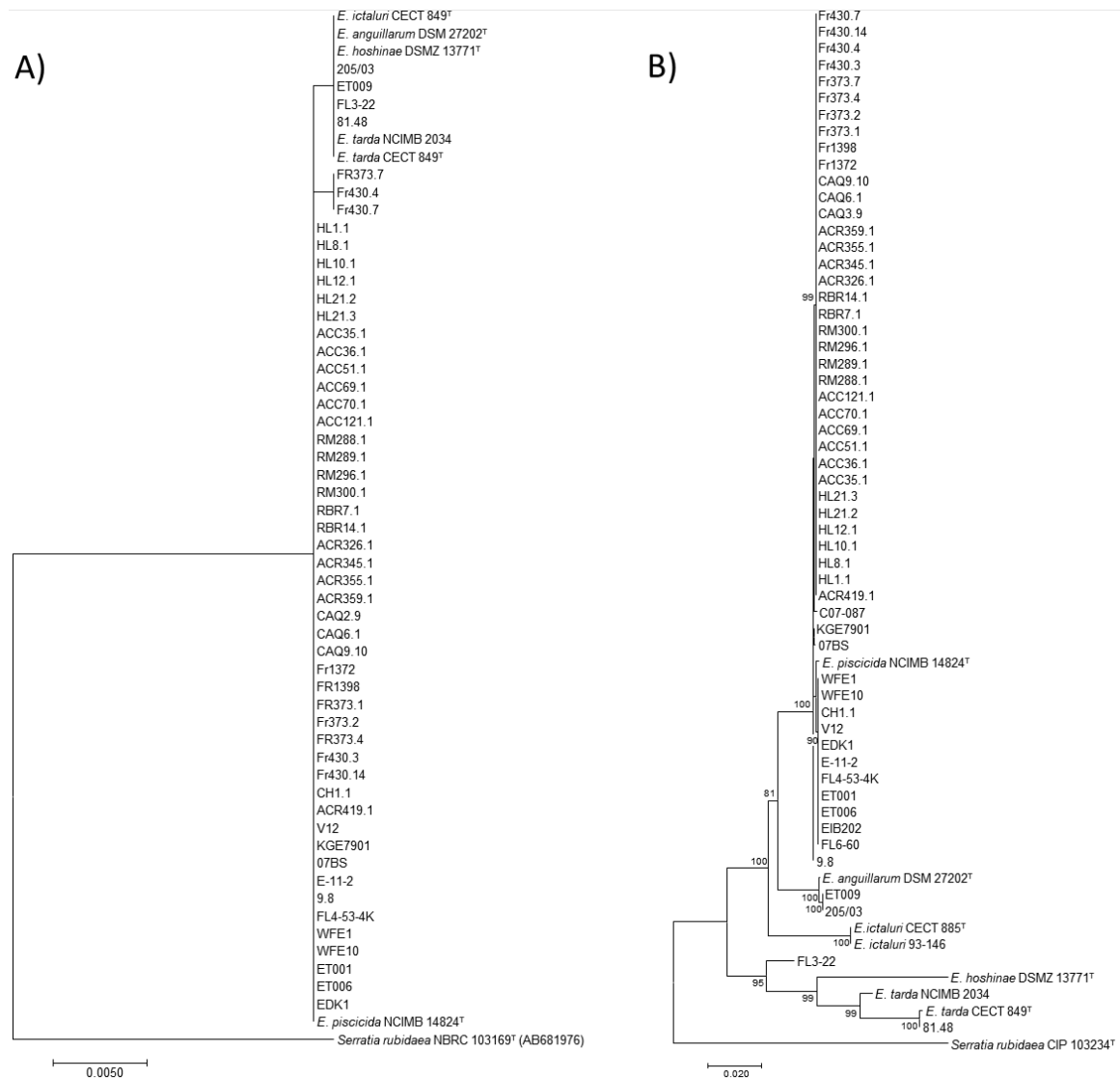
Para comprobar la utilidad del gen ARNr 16S como herramienta taxonómica, se comparó las secuencias obtenidas de este gen para todos los aislados incluidos en esta tesis, con las secuencias tipo depositadas en la base de datos pública EzBioCloud. En todos los casos, los porcentajes de similitud obtenidos con las secuencias tipo de las cinco especies del género *Edwardsiella* fueron superiores al 99% creando confusión a la hora de identificar los aislados. Además, estos aislados mostraron porcentajes de similitud entre 99,1% y 100% al compararlos entre sí. En la Tabla 16 se muestran los porcentajes de similitud entre las cinco cepas tipo del género. Estas secuencias se encuentran depositadas en la base de datos DDBJ/EMBL/GenBank con los siguientes números de acceso: MF034668 - MF034719, MF034724 - MF034726, MF034728 y MF034731.

**Tabla 16.** Porcentajes de similitud obtenidos para el gen ARNr 16S en base a las diferencias en el número total de nucleótidos entre las cepas tipo del género *Edwardsiella*.

	1	2	3	4	5
<i>E. tarda</i> CECT 849 <sup>T</sup>	1	0,6	0,2	0,4	0,6
<i>E. piscicida</i> NCIMB 14824 <sup>T</sup>	2	99,3	0,3	0,2	0,2
<i>E. anguillarum</i> DSM 27202 <sup>T</sup>	3	99,5	99,5	0,1	0,3
<i>E. ictaluri</i> CECT 885 <sup>T</sup>	4	99,4	99,7	99,7	0,2
<i>E. hoshinae</i> DSMZ 13771 <sup>T</sup>	5	99,3	99,8	99,5	99,7

Porcentaje de identidad

La reconstrucción del árbol filogenético mediante el método ML para este gen, mostró resultados menos resolutivos que los obtenidos mediante AFLP (Figura 10A). Por un lado, vemos como la mayoría de los aislados se agrupan en torno a la cepa *E. piscicida* NCIMB 14824<sup>T</sup>, mientras que el resto de cepas tipo y aislados se mezclan en otra rama diferente. El árbol obtenido por NJ da mejores resultados (Figura 10B), aunque el aislado FL3-22 está en una rama independiente como si se tratase de una especie diferente a las cinco descritas.



**Figura 10.** Árboles filogenéticos obtenidos mediante los métodos de NJ (A) y ML (B) basados en la secuencia parcial del gen ARNr 16S del género *Edwardsiella*. Barra, número de sustituciones nucleotídicas por sitio. En los nodos se muestran los valores de *bootstrap* iguales o mayores al 70% como porcentaje de 1000 pseudoréplicas. Figura modificada de Buján y col. 2018b, permiso cedido por la editorial Elsevier.

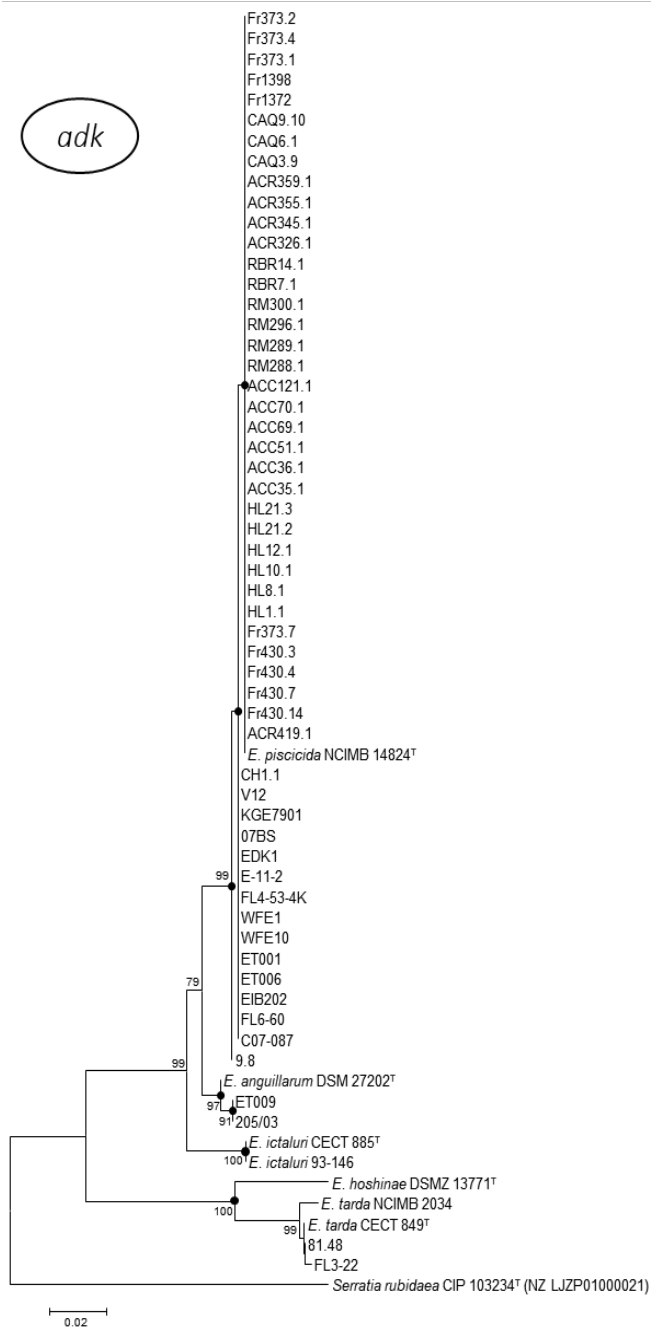
El análisis filogenético obtenido de las secuencias génicas del gen ARNr 16S en el género *Edwardsiella* mostró grandes diferencias entre el método utilizado para la construcción de los árboles filogenéticos.

### 3.2.2.2 Análisis de las Secuencias Multigénicas

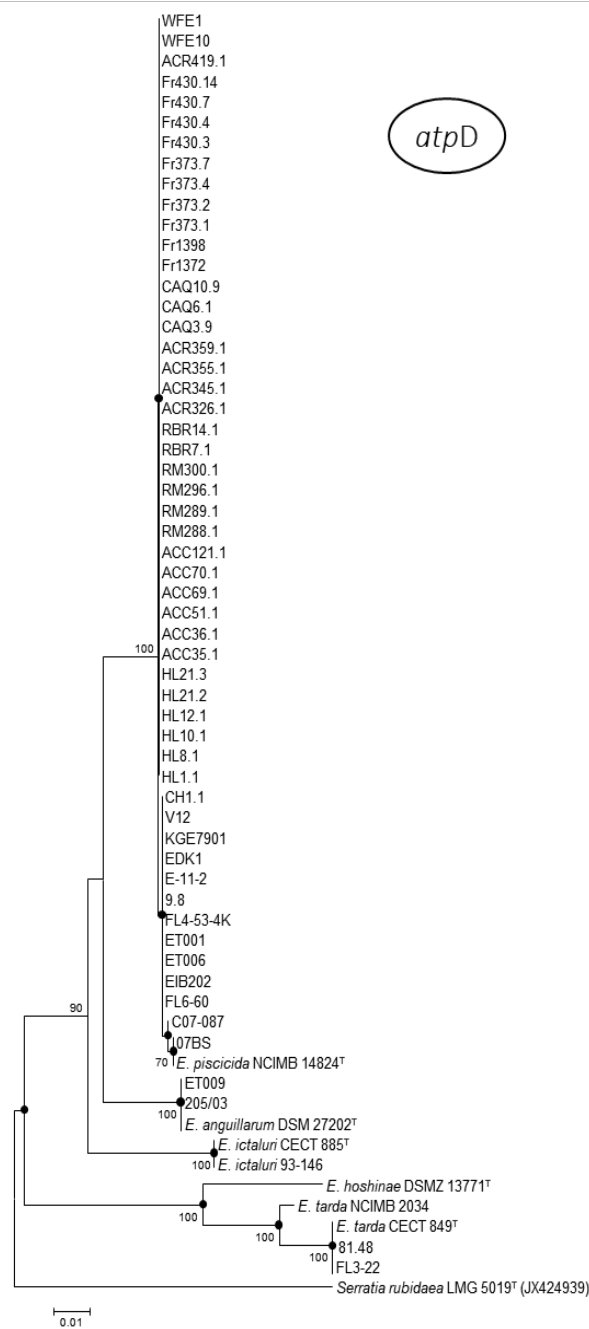
Los árboles filogenéticos reconstruidos con cada gen (Figura 11) así como con las secuencias concatenadas de los seis genes (Figura 12), mostraron cinco grandes grupos representado cada uno de ellos por las cepas tipo del género *Edwardsiella*. En todos los árboles de los genes esenciales podemos observar como solamente los aislados FL3-22 y 81.48 permanecen agrupados junto a las cepas de *E. tarda* CECT849<sup>T</sup> y NCIMB 2034. El resto de aislados previamente identificados como *E. tarda*, se agrupan con la cepa de *E. piscicida* NCIMB 14824<sup>T</sup>, a excepción de los aislados ET009 y 205/03 que forman un grupo con la cepa de *E. anguillarum* DSMZ 13771<sup>T</sup>. Además, los aislados reclasificados como *E. piscicida* formaron dos grupos claramente separados, uno compuesto por todos los aislados de obtenidos de rodaballo en Europa y el otro compuesto por aislados pertenecientes a diferentes países no europeos y a otros hospedadores.

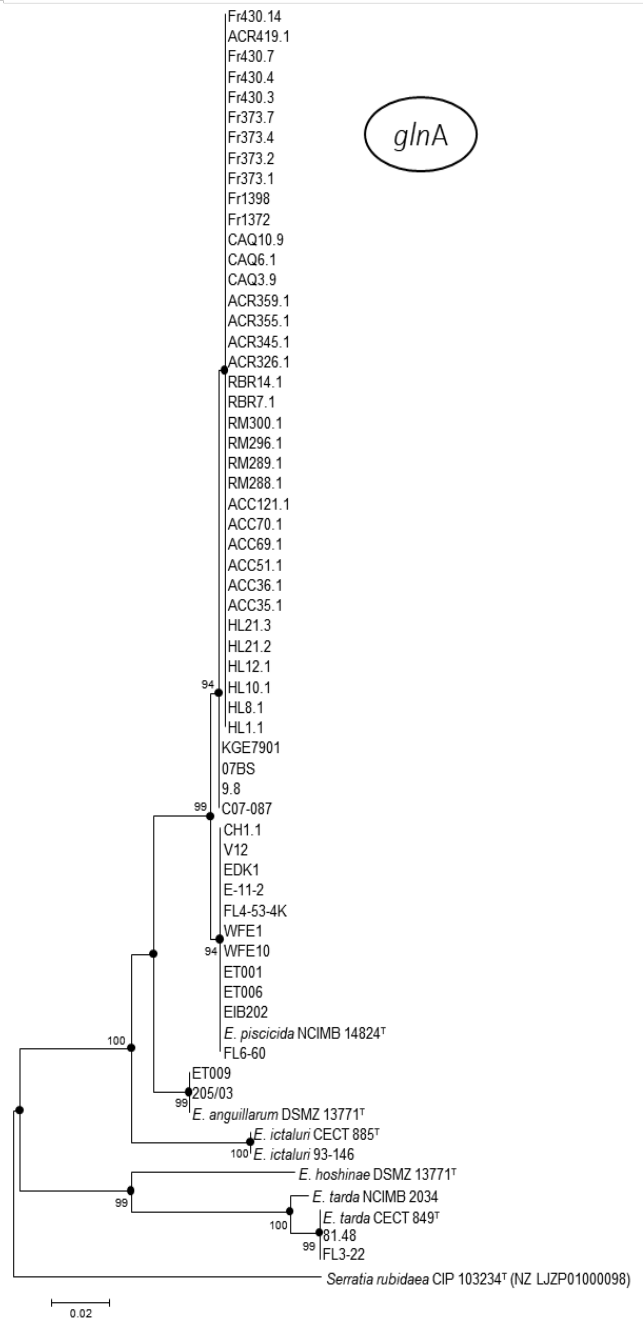
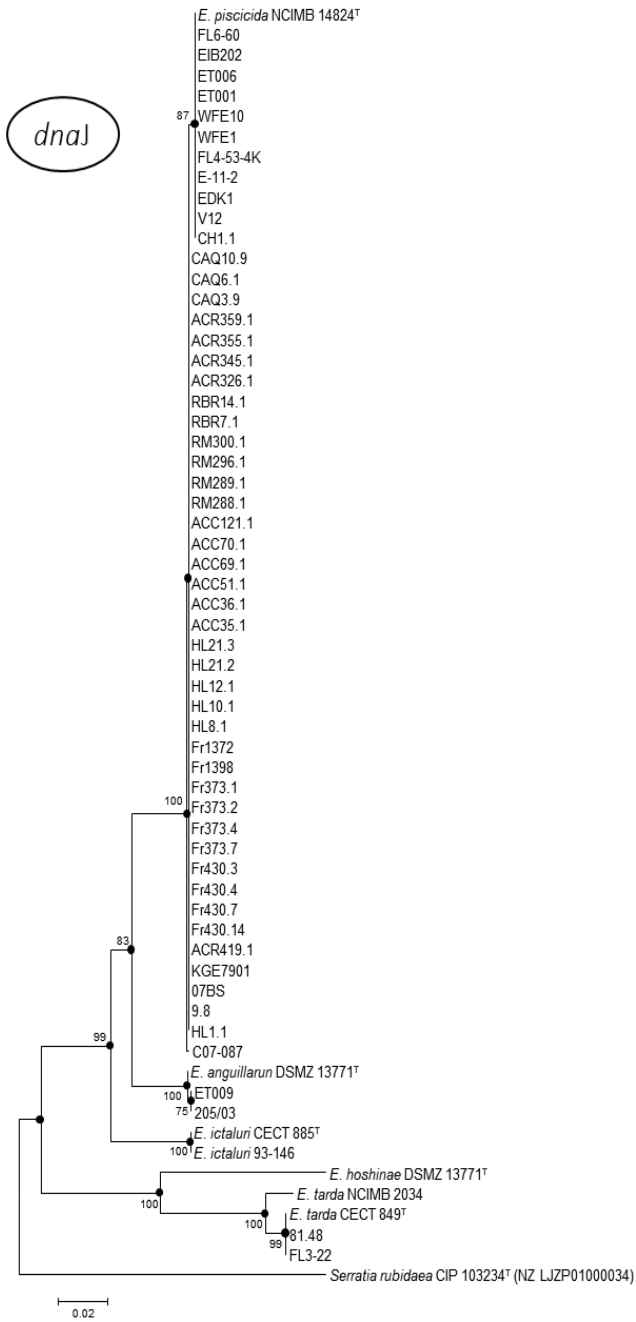


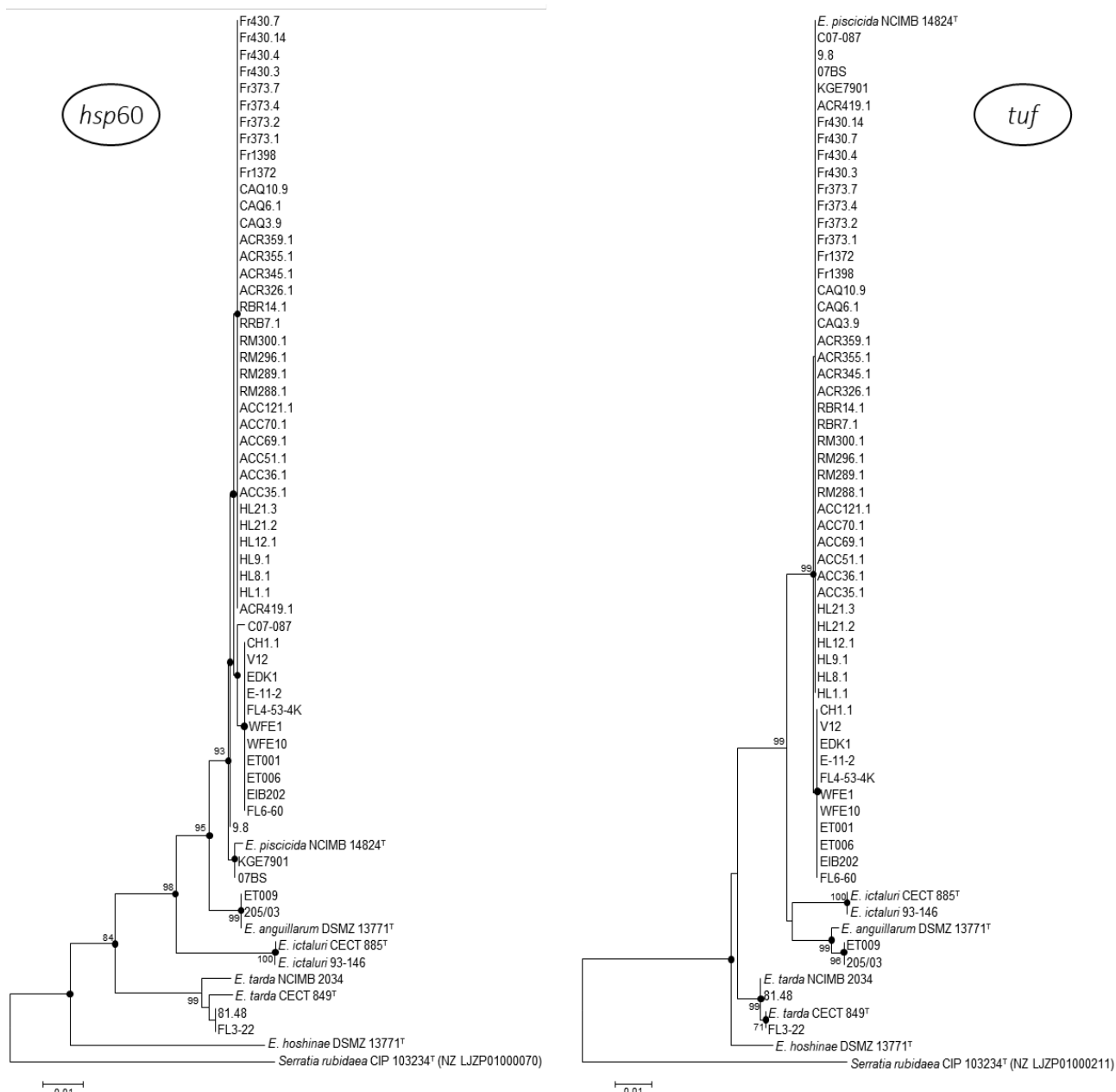
adk



atpD

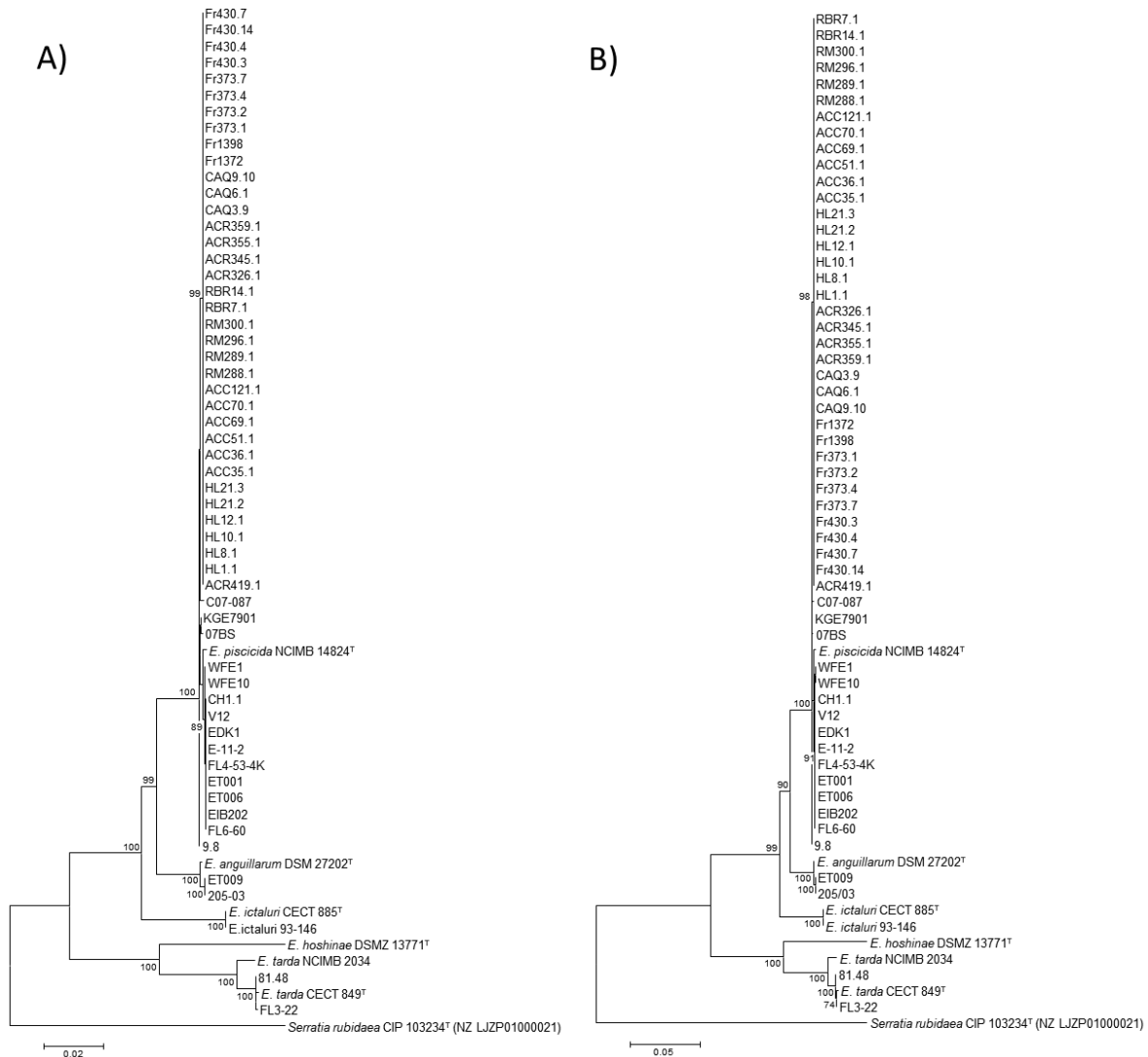






**Figura 11.** Árboles obtenidos mediante los métodos de NJ y ML basados en las secuencias parciales de los genes *adk*, *atpD*, *dnaJ*, *glnA*, *hsp60* y *tuf* del género *Edwardsiella*. Barra, número de sustituciones nucleotídicas por sitio. En los nodos se muestran los valores de *bootstrap* iguales o mayores al 70% como porcentaje de 1000 pseudoréplicas. Círculo negro, muestra coincidencia entre NJ y ML. Figura extraída de Buján y col. 2018b, permiso cedido por la editorial Elsevier.

Cabe destacar que la topología de los genes individuales varió mínimamente según el método utilizado, incluso fue idéntica en las secuencias concatenadas (Figura 12), apareciendo las especies más relacionadas con *E. tarda* mejor posicionadas en los árboles construidos mediante NJ.



**Figura 12.** Árboles obtenidos mediante los métodos de NJ (A) y ML (B) basados en la concatenación de las secuencias parciales de los genes *adk*, *atpD*, *dnaJ*, *glnA*, *hsp60* y *tuf* del género *Edwardsiella*. Barra, número de sustituciones nucleotídicas por sitio. En los nodos se muestran los valores de *bootstrap* iguales o mayores al 70% como porcentaje de 1000 pseudoréplicas. Figura modificada de Buján y col. 2018b, permiso cedido por la editorial Elsevier.

Tanto los árboles construidos con los genes individuales como el reconstruido con la concatenación de las secuencias muestran características comunes entre sí:

- Se corrobora la existencia de cinco especies claramente identificables.
- Todos los aislados de rodaballo europeo se sitúan en un subgrupo dentro del clúster de *E. piscicida* junto con el aislado de lenguado europeo ACR419.1.

- Los aislados ET009, obtenido de besugo japonés, y el 205/03, proveniente de dorada española comparten una rama independiente junto a la especie tipo de *E. anguillarum*.
- Los aislados americanos FL3-22 y 81.48 formaron, junto a las cepas de *E. tarda* NCIMB 2034 y CECT 849<sup>T</sup>, un grupo bien diferenciado.

### 3.2.2.3 Resolución de los genes analizados

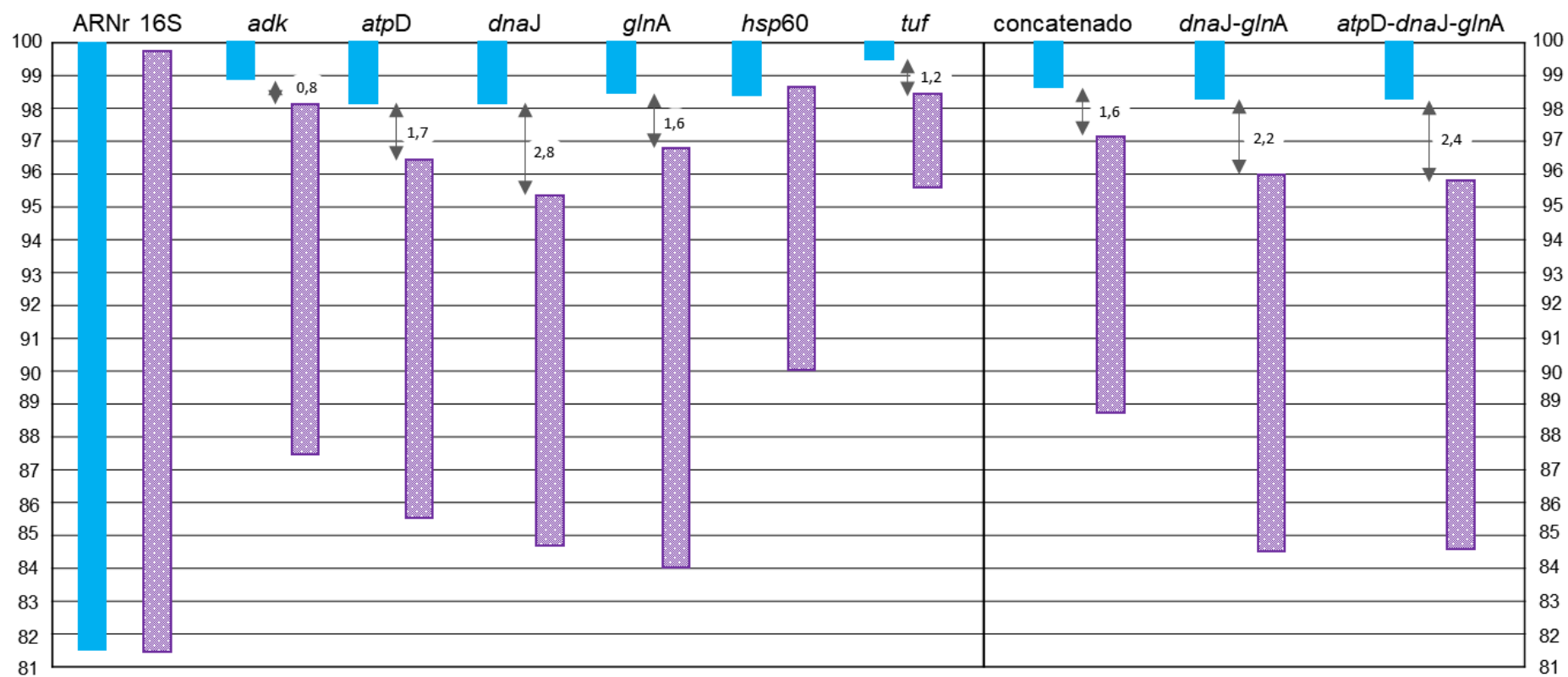
Las similitudes intraespecíficas obtenidas para cada una de las cinco especies del género *Edwardsiella*, a partir de la concatenación de los seis genes fueron aproximadamente de un 98 % para *E. tarda* (CECT 849<sup>T</sup>, NCIMB 2034, 81.48 y FL3-22), de un 99 % para *E. piscicida*, y de un 100 % para *E. anguillarum* (DSMZ 13771<sup>T</sup>, ET009 y 205/03) y para *E. ictaluri*. Todos los porcentajes de similitud inter e intraespecies obtenidos para el concatenado y para cada uno de los genes se muestran en la Tabla 17.

La gráfica construida para determinar la resolución taxonómica de cada gen, definida como el grado de solapamiento o hueco que se crea entre la distancia intraespecífica máxima y la distancia interespecífica mínima representada como porcentaje de las similitudes génicas se muestra en la Figura 13. La gráfica indica que todos los genes presentan un buen poder de resolución a excepción del gen *adk* (valor de resolución del 0,8), y los genes ARNr 16S y *hsp60* que mostraron diferentes grados de solapamiento entre las distancias intraespecífica máxima e interespecífica mínima. Por el contrario, el gen que mejor poder de resolución presentó fue el *dnaJ* seguido de los genes *atpD* y *glnA*. Además, la concatenación de los genes más resolutivos, *dnaJ-glnA* y *atpD-dnaJ-glnA*, presentaron mayor poder de resolución que el concatenado.

**Tabla 17.** Porcentajes de similitud obtenidos en base a las diferencias en el número total de nucleótidos de las secuencias concatenadas entre los grupos definidos del género *Edwardsiella*.

		<i>E. tarda</i> (n=3)	<i>E. piscicida</i> (n=52)	<i>E. anguillarum</i> (n=3)	<i>E. ictaluri</i> (n=2)	<i>E. hoshinae</i> (n=1)
<b>adk</b>	<i>E. tarda</i>	98,9-100	87,6-88,4	87,8-88,6	88,8-89,2	93,9-94,5
	<i>E. piscicida</i>		100	97,5-98,1	96-96,4	87,3-87,6
	<i>E. anguillarum</i>			99,6-100	96-96,4	87,3-87,8
	<i>E. ictaluri</i>				100	87,6
	<i>E. hoshinae</i>					100
<b>atpD</b>	<i>E. tarda</i>	98,1-100	88,6-89,7	85,5-85,6	88,9-89,6	93,5-94,4
	<i>E. piscicida</i>		99,5-100	96-96,4	94,5-94,9	88,9-89,1
	<i>E. anguillarum</i>			100	94,7	88
	<i>E. ictaluri</i>				100	88,8
	<i>E. hoshinae</i>					100
<b>dnaI</b>	<i>E. tarda</i>	98,1-100	85,6-85,9	86-86,3	87-87,2	89,3-89,9
	<i>E. piscicida</i>		99,6-100	95,2-95,3	93,7-94,1	84,3-84,6
	<i>E. anguillarum</i>			99,9-100	93,4-93,5	84,9-85
	<i>E. ictaluri</i>				100	84,8
	<i>E. hoshinae</i>					100
<b>glnA</b>	<i>E. tarda</i>	98,4-100	84,4-85	84-85	84-84,2	89,1
	<i>E. piscicida</i>		99,2-100	96,4-96,8	93,1-93,3	85-85,2
	<i>E. anguillarum</i>			100	95,1	85
	<i>E. ictaluri</i>				100	84
	<i>E. hoshinae</i>					100
<b>hsp60</b>	<i>E. tarda</i>	98,3-100	93,9-94,8	94,2-94,6	93,5-94,2	92-92,4
	<i>E. piscicida</i>		99,4-100	98,1-98,7	95,7-96,3	91,3-91,7
	<i>E. anguillarum</i>			100	96,1	90,9
	<i>E. ictaluri</i>				100	90
	<i>E. hoshinae</i>					100
<b>tuf</b>	<i>E. tarda</i>	99,9-100	97,1-97,2	96,4-96,8	96,3-96,4	98,1-98,3
	<i>E. piscicida</i>		99,9-100	96,7-97,9	96,6-96,7	96,5-96,7
	<i>E. anguillarum</i>			99,5-100	97,1-97,3	96-96,3
	<i>E. ictaluri</i>				100	95,6
	<i>E. hoshinae</i>					100
<b>MLSA</b>	<i>E. tarda</i>	98,7-99,9	90-90,2	89,9-90,1	90,2-90,3	92,9-93
	<i>E. piscicida</i>		99,7-100	96,8-97,1	95,3-95,5	89,2-89,4
	<i>E. anguillarum</i>			99,8-100	95,4-95,5	89-89,1
	<i>E. ictaluri</i>				100	88,8
	<i>E. hoshinae</i>					100

n, número de aislado englobados junto a la especie tipo



**Figura 13.** Resolución taxonómica en relación al rango de similitudes (%) intraespecíficas (blanco) e interespecíficas (punteado). Figura extraída de Buján y col. 2018b, permiso cedido por la editorial Elsevier.

### 3.2.3 Identificación de especies mediante análisis de genoma completo

Como ya hemos dicho anteriormente, para los estudios con genoma completo se emplearon diversos genomas pertenecientes al género *Edwardsiella* depositados en la base de datos pública DDBJ/EMBL/GenBank, así como dos de nuestros aislados y la cepa de referencia NCIMB 2034 identificados como *E. tarda*. En base al análisis de las secuencias de los genomas depositados mediante el algoritmo OrthoANI y la hibridación *in silico* (Figura 14 y Tabla 18), la mayoría de las cepas están correctamente identificadas. Solamente la cepa RSB1309 identificada como *E. piscicida* correspondería en realidad con la especie *E. anguillarum*. Además, también pertenecerían a esta especie los dos aislados nombrados como *Edwardsiella* sp. EA181011 y LADL05-105.

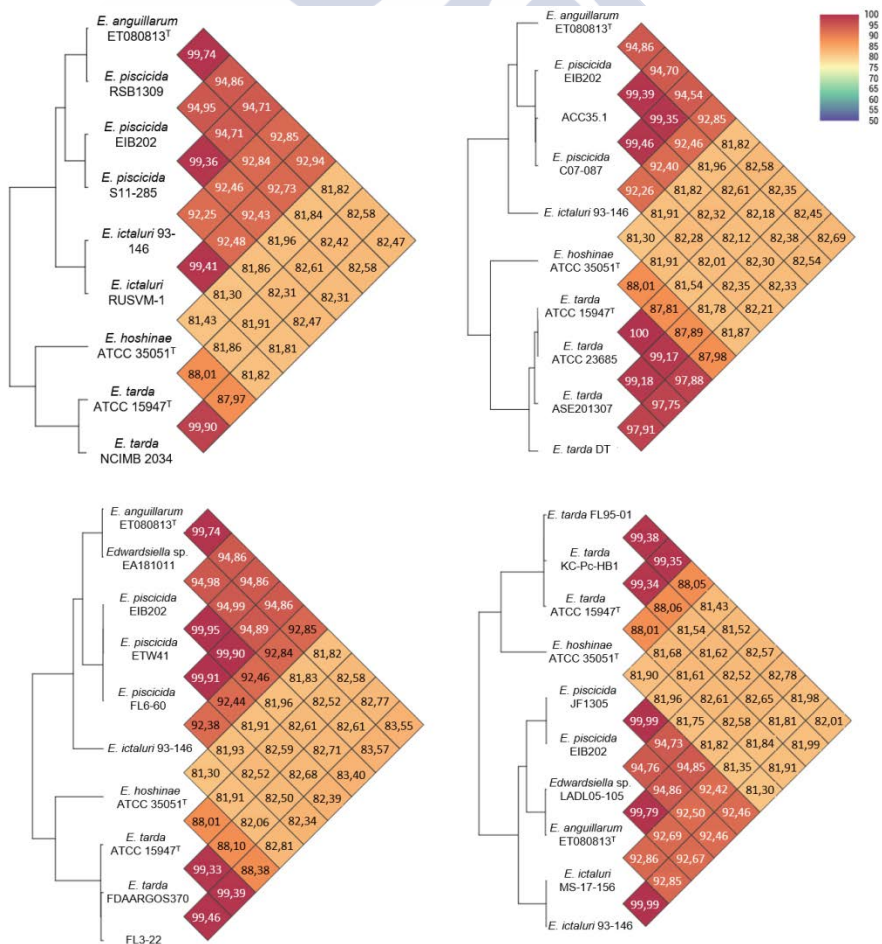


Figura 14. Resultados de OrthoANI calculados con los genomas disponibles del género *Edwardsiella*. Especies diferentes muestran valores inferiores al 95-96%. Figura original.

**Tabla 18.** Comparación de resultados del cálculo de ANI utilizando el algoritmo OrthoANI y DDH *in silico* entre los genomas disponibles del género *Edwardsiella*.

% OrthoANI

		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24			
GGDC	1		97,9	99,4	99,4	99,4	97,8	99,2	99,9	99,3	82,3	82,5	82,6	82,3	82,6	82,3	82,4	82,7	82,6	81,9	81,8	81,9	82,5	82,6	88	1	<i>E. tarda</i>	ATCC 15947 <sup>T</sup>
	2	81,7		97,8	98	97,8	98,4	97,6	97,6	97,9	82,3	82,4	82,3	82,4	82,4	82,9	82,3	82,5	82,4	81,8	81,2	81,8	82,5	82,6	88	2		NCIMB 2034
	3	96,5	85,4		99,5	99,4	98	99,1	99,3	99,5	83,2	83,3	83,4	83,1	83,4	65,4	83,5	83,4	83,5	82,8	82,8	65,6	83,6	65,3	88,4	3		FL3-22
	4	95,5	82,5	96,5		99,4	98	99,1	99,3	99,3	82,2	82,5	82,5	82,3	82,7	82,3	82,6	82,4	82,8	82	82	81,9	82,8	82,6	88	4		FL95-01
	5	95	81,9	96,5	96		97,4	99,2	99,2	99,3	82,3	82,6	82,7	82,3	79,1	82,4	82,7	82,5	82,6	82	81,9	81,8	82,6	83,5	88	5		KC-Pc-HB1
	6	82,9	90,1	86,3	83,2	82,9		97,7	97,7	98	82,3	82,3	82,5	82,2	82,5	82,5	82,6	82,5	82,7	81,9	81,8	81,7	82,5	82,6	87,9	6		DT
	7	94	81,1	95,5	94,3	94,3	82,3		99,1	99,2	82,3	82,4	82,4	82,4	82,5	82,5	82,6	82,5	82,5	81,8	81,8	81,9	82,5	82,4	87,9	7		ASE201307
	8	99,9	79,7	96,3	95,1	94,1	81	93		99,2	82,1	82,9	82,2	82	82,3	82,2	82,3	82,3	82,4	81,5	81,5	81,4	82,3	82,2	87,8	8		ATCC 23685
	9	95,4	81,8	96,6	95,7	95,5	82,8	94,4	94,3		82,4	82,5	82,7	82,5	82,7	99,1	82,4	82,5	82,8	82	82,1	81,4	82,6	82,2	88	9		FDAARGOS370
	10	25,1	25,1	31,6	25	25,1	25	25	25,6	25,2		99,4	99,4	99,5	99,4	99,6	94,7	99,4	94,7	92,4	92,4	92,3	94,6	94,7	81,8	10	<i>E. piscicida</i>	ACC35.1
	11	25,3	25,2	31,7	25,6	25,6	25,2	25,1	25,4	25,6	94,4		99,9	99,4	99,9	99,4	94,8	99,9	94,9	92,4	92,4	92,4	94,9	94,7	81,9	11		FL6-60
	12	25,4	25,3	31,8	25,6	25,7	25,2	25,1	25,6	25,7	95,9	99,6		99,3	99,9	99,4	95	99,9	94,9	92,5	92,5	92,4	95	94,7	82	12		EIB202
	13	25,2	25,3	31,5	25,5	25,6	25,2	25,1	25,4	25,5	96,4	95,1	95		99,3	99,4	94,7	99,4	94,5	92,3	92,2	92,4	94,6	94,3	81,9	13		CO7-087
	14	25,4	25,4	31,8	25,6	25,7	25,2	25,1	25,6	25,7	95	99,6	99,6	94,9		99,3	95	99,9	94,9	92,4	92,4	92,4	94,9	94,7	81,9	14		ETW1
	15	25,4	25,4	31,6	25,5	25,5	25,2	25,2	25,6	25,6	97,5	95,6	95	96,3	94,8		94,7	99,4	94,7	92,2	92,3	94,3	94,6	94,5	81,9	15		S11-285
	16	25,3	25,2	32,5	25,6	25,5	25,2	25,3	25,8	25,5	58,9	59,6	59,8	58,8	59,8	59,1		94,9	99,7	92,8	92,9	92,7	99,9	99,5	81,8	16		RSB1309
	17	25,3	25,2	31,9	25,3	25,4	25,2	25,1	25,6	25,4	94,9	99,6	98,5	95,3	99,6	94,9	59,7		94,8	92,5	92,4	92,4	94,9	94,7	81,9	17		JF1305
	18	25,6	25,5	32,6	25,9	25,8	25,5	25,4	26,3	25,9	58,7	60,1	59,9	59	60,1	59,4	97,9	59,6		92,9	92,8	92,9	99,7	99,8	81,8	18	<i>E. anguillarum</i> ET080813 <sup>T</sup>	
	19	24,6	24,6	31	24,8	24,9	24,5	24,3	24,8	24,9	47,9	48,4	48,5	48,4	48,4	48,2	49,3	48,2	49,7		99,9	99,4	92,8	92,7	81,3	19	<i>E. ictaluri</i>	93-146
	20	24,6	24,7	30,9	24,8	24,9	24,5	24,3	24,9	24,9	47,9	48,4	40,5	48,3	48,4	48,2	49,3	48,2	49,7	98,9		99,4	92,9	92,8	81,3	20		MS-17-156
	21	24,4	24,4	30,8	24,7	24,6	24,3	24,2	24,5	24,7	47,9	48,2	48,3	48,2	48,2	48,3	49,1	48	49,5	95,5	95,4		92,7	92,7	81,4	21		RUSVM-1
	22	25,2	25,4	32,4	25,9	25,9	25,4	25,3	25,8	25,8	58,9	60	60,1	59	60,2	59,4	95,6	59,9	97,7	48,7	49,7	49,4		99,5	81,2	22	<i>Edwardsiella</i> sp. EA181011	
	23	25,5	25,5	32,4	26	25,9	25,4	25,4	25,9	25,9	57,2	58,5	58,4	57,5	58,4	57,9	95,2	58,1	97,7	48,7	48,7	48,4	95		81,7	23	<i>Edwardsiella</i> sp. LADL05-105	
	24	34,7	34,8	38,2	35	34,9	34,6	34,4	34,1	34,9	24,6	24,9	24,9	24,4	24,9	25	24,5	24,6	24,8	24,2	24,2	24,2	24,8	24,9		24	<i>E. hoshinae</i> ATCC 35051 <sup>T</sup>	

### 3.3 DISCUSIÓN

Los análisis taxonómicos llevados a cabo con aislados de la especie *E. tarda* elucidaban la presencia de tres grupos genéticos dentro de la especie *E. tarda* (Yamada y Wakabayashi, 1999; Castro y col., 2011b; Yang y col., 2012 y 2013; Abayneh y col., 2012; Griffin y col., 2013). En los últimos años, la taxonomía del género *Edwardsiella* ha sido una fuente de controversia y confusión, tras la publicación de que estos tres grupos se correspondían con tres especies diferentes basándose sobre todo en estudios de genotipado y MLSA (Abayneh y col., 2013; Shao y col., 2015). La descripción de estas dos nuevas especies mostró evidencias de las limitaciones de los sistemas de pruebas bioquímicas (Grimont y col., 1980; Yang y col., 2012; Abayneh y col., 2012 y 2013) que se venían usando hasta el momento para identificar las especies *E. tarda*, *E. ictaluri* y *E. hoshinae* (Castro y col., 2006 y 2012; Abayneh y col., 2013; Griffin y col., 2014; Shao y col., 2015; Camus y col., 2016; Kebede y Habtamu, 2016), ya que muchos de los aislados clasificados como *E. tarda* mediante esta metodología son en realidad miembros de las especies *E. piscicida* y *E. anguillarum* (Griffin y col., 2014; Griffin, y col., 2017; Reichley y col., 2017).

La técnica AFLP se utilizó en numerosos trabajos para aclarar la relación genética o investigar la variabilidad genética intraespecífica en diversas especies como *Aeromonas* sp, *Vibrio cholerae*, *Flavobacterium columnare* o *E. ictaluri* (Janssen y col., 1996; Sakai y col., 2009d; Mishra y col., 2012, Mohammed y Arias, 2014). Los diferentes perfiles obtenidos mediante AFLP mostraron que la mayoría de los aislados identificados como *E. tarda* se agruparon con *E. piscicida* NCIMB 14824<sup>T</sup> sugiriendo su reclasificación; solamente los aislados 81.48 y FL3-22 estarían correctamente identificadas por lo que, una vez más, se muestra la ineficacia de los métodos fenotípicos y bioquímicos a la hora de clasificar aislados del género *Edwardsiella*. Aunque otros trabajos de AFLP llevados a cabo con otros patógenos demostraron la capacidad de esta técnica para genotipar aislados y conseguir agruparlos por origen geográfico o asociación del huésped (Sakai y col., 2009d; Mishra y col., 2012, Mohammed y Arias, 2014), nosotros no hemos podido encontrar ninguna relación entre los aislados pertenecientes al mismo lugar geográfico ni entre los obtenidos

del mismo hospedador en la especie *E. piscicida*. Esto puede ser debido a que la especie no muestra esta diferenciación o a que el límite establecido para la comparación intraespecífica es muy elevado ocultando una posible diferenciación intraespecífica entre los aislados (Soto y col., 2012).

El análisis del gen ARNr 16S es una de las herramientas universales para la identificación de las especies (Yarza y col., 2014), pero en algunos géneros como *Pseudomonas*, *Aeromonas* o *Vibrio* carece de utilidad para tales fines (Thompson y col., 2009; Janda y Abbott, 2010; Gomila y col., 2015). Los porcentajes de similitud obtenidos, así como la identificación a través de la herramienta en línea EzBioCloud, reveló una gran semejanza entre todas las especies dificultando su identificación mediante este gen. Además, su resolución taxonómica fue especialmente baja o prácticamente nula, lo que nos indica que lo correcto sería no utilizar este gen para discernir entre especies. La ineficacia del gen ARNr 16S para identificar especies del género *Edwardsiella* ha sido mencionada por otros autores (Shao y col., 2015; Reichley y col., 2017).

Aunque el método AFLP mostró resultados similares a los obtenidos por MLSA, y por tanto, ambos serían válidos para la discriminación de las especies de *Edwardsiella*, el análisis multigénico presenta la ventaja de que la información genómica es estable y no se ve afectada por las condiciones de manipulación o metodología, por lo que permite la comparación de resultados entre laboratorios utilizando bases de datos públicas de una manera más fiable que los datos obtenidos mediante el estudio de los perfiles que genera la técnica AFLP.

La dificultad de la realización de estudios de MLSA radica en la elección de los genes objeto de estudio, y es especialmente importante en el caso de los estudios de organismos muy cercanos filogenéticamente. Los genes empleados en esta tesis se eligieron en base a su uso previo en diferentes géneros de la familia *Enterobacteraceae* incluido el género objeto del estudio (Kotetishvili y col., 2005; Paradis y col., 2005; Pham y col., 2007; McQuiston y col., 2008; Abayneh y col., 2012; Griffin y col., 2013). La capacidad de discriminación de estos genes quedó demostrada a excepción del gen *hsp60* que hace que la resolución de las secuencias concatenadas sea inferior a la concatenación de los genes más resolutivos por lo que sería conveniente excluirlo en futuros análisis.

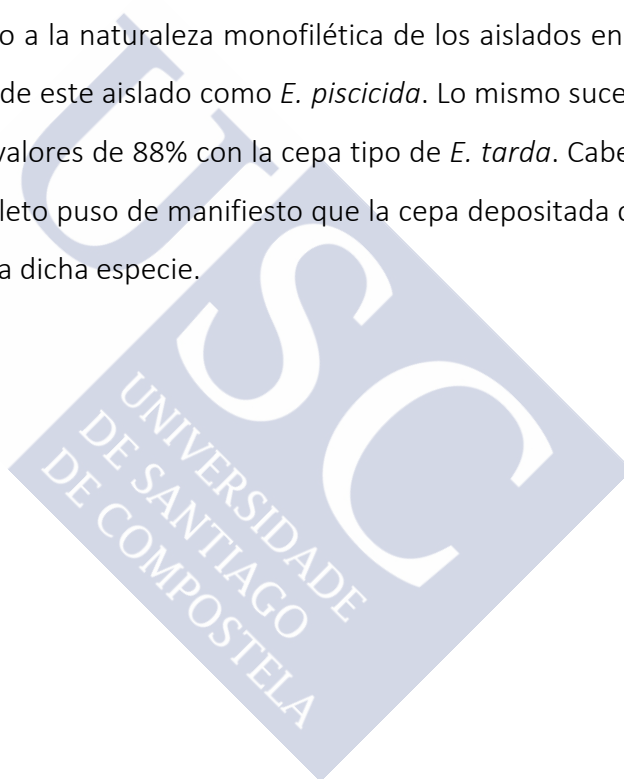
El análisis de los genes individuales y concatenados mostraron, al igual que la técnica AFLP, una reorganización en la identificación de los aislados que en su origen pertenecían a la especie *E. tarda*, siendo clasificados en su gran mayoría como *E. piscicida*. Como ya hemos mencionado esto pone de manifiesto el gran poder clasificatorio de los análisis genómicos frente a las pruebas fenotípicas clásicas. Cabe mencionar que los aislados ET009 y 205/03 identificados mediante MLSA como *E. anguillarum* fueron erróneamente clasificadas como *E. piscicida* por la herramienta AFLP. Esto puede ser debido a que dicha técnica no muestra la resolución esperada o que la ausencia de la cepa tipo de *E. anguillarum* (no se había descrito cuando se realizó el experimento) hace un sesgo en el análisis causando este error.

Todas las filogenias reconstruidas con los genes individuales evidenciaron la existencia de dos clústeres en la especie *E. piscicida*, pero mostraron variaciones en la agrupación de los aislados dentro de cada uno de ellos. La alta diversidad genética observada entre aislamientos asiáticos de *E. piscicida* (WFE1, WFE10, CH1.1, EDK1, E-11-2, ET001, ET006, KGE7901, 07BS) puede indicar una reestructuración genética en adaptación a diferentes nichos (Abayneh y col., 2012). Numerosos estudios de genotipado (Nucci y col., 2002; Acharya y col., 2007; Abayneh y col., 2012) mostraron cierto nivel de discriminación en aislados de las especies *E. tarda* y *E. piscicida* de acuerdo con el origen del huésped o del medio físico que habrían sido obtenidos. Sin embargo, con los resultados en esta tesis, no se ha podido establecer ninguna relación entre el año de aislamiento, el origen geográfico o/y del hospedador, al igual que sucedió con nuestros estudios de AFLP.

El gráfico de resolución taxonómica es una herramienta útil para determinar qué genes resultan más discriminativos. Aunque cabría esperar que la secuencia concatenada fuese más informativa que los genes individuales (Balboa, 2012), el lastre que realizan los genes *hsp60* y *adk*, provocan que genes como *atpD*, *glnA* y especialmente *dnaJ*, sean más resolutivos por separado. La resolución más elevada obtenida en el análisis de todos los genes, fue la que presentó el gen *dnaJ*. Este hecho junto a la correcta discriminación entre las especies del género *Edwardsiella* que muestra dicho gen, hacen que su empleo en la taxonomía de este género sea recomendable. La capacidad discriminatoria de este gen ya fue demostrada en el estudio de las diferentes especies de la familia *Enterobacteraceae*

realizado por Pham y col. (2007), en el cual *dnaJ* resultó ser capaz de hacer una correcta identificación a nivel de especie dentro de esta familia.

Con el avance de las técnicas genómicas la hibridación *in vitro* ha quedado prácticamente relevada por la hibridación *in silico* que emplea las secuencias de genomas completos. Los valores obtenidos para OrthoANI e *isDDH* entre *E. tarda* ATCC 15947<sup>T</sup> y la cepa de referencia NCIMB 2034 fueron similares a los resultados informados por Abayneh y col. (2012 y 2013). Los valores obtenidos para nuestro aislado ACC35.1 recién clasificado como *E. piscicida* y los demás genomas pertenecientes a esta especie fue del 95% aproximadamente, muy por encima del valor fijado para pertenecer a la misma especie >70%. Este resultado junto a la naturaleza monofilética de los aislados en el análisis MLSA confirma la identificación de este aislado como *E. piscicida*. Lo mismo sucede con las cepas NCIMB 2034 y FL-22 con valores de 88% con la cepa tipo de *E. tarda*. Cabe destacar que el análisis del genoma completo puso de manifiesto que la cepa depositada como *E. piscicida* RSB1309 no corresponde a dicha especie.







## Capítulo 4: ESTUDIO DE LA ESTRUCTURA Y EVOLUCIÓN DE LA POBLACIÓN DEL GÉNERO *Edwardsiella*

### Trabajo publicado:

Buján N y col. (2018) Population genetic and evolution analysis of controversial genus *Edwardsiella* by multilocus sequence typing. **Mol Phylogenet Evol**, 127: 513-521



## 4 ESTUDIO DE LA ESTRUCTURA Y EVOLUCIÓN DE LA POBLACIÓN DEL GÉNERO *Edwardsiella*

Para poder entender una infección bacteriana y su dispersión es necesario conocer ampliamente la biología y ecología del patógeno causante, así como comprender su epidemiología. Los estudios de genética de poblaciones contribuyen a este conocimiento, proporcionando información sobre la estructura poblacional y la naturaleza de la variación genética que existe en las poblaciones naturales. La cantidad de variación genética de una población es un parámetro imprescindible, ya que determina el potencial evolutivo de la misma. Los cortos tiempos de generación de la mayoría de las bacterias y el enorme tamaño de sus poblaciones, hacen que los cambios evolutivos sean muy rápidos. La dinámica de aparición y selección de mutantes o la importancia relativa de la mutación y de la recombinación en estas poblaciones, son variables esenciales para comprender los cambios epidemiológicos que se producen en ellas.

El tipado de secuencia multigénica (MLST, del inglés *Multilocus Sequence Typing*) es considerado un método altamente sensible y reproducible en estudios epidemiológicos de bacterias patógenas y es ampliamente utilizado como procedimiento de genotipado, tanto a nivel interespecífico como intraespecífico, mediante la utilización de genes esenciales (Maiden, 2006). Además, esta técnica contribuye al conocimiento de la diversidad y las relaciones evolutivas entre miembros de una misma población. A pesar de que ya se realizó un análisis de MLST en la especie *E. tarda* con aislados originarios de China (Yang y col., 2013), en esta tesis se estableció un nuevo esquema de MLST en el que los genes esenciales utilizados presentan ratios de evolución diferentes.

Tras los resultados del estudio de MLSA y debido al bajo número de aislados disponibles, se incorporaron cuatro genes esenciales (*gapA*, *phoR*, *pyrG* y *rpoA*) más con diferentes ratios evolutivos para obtener una mejor representación del genoma bacteriano del género *Edwardsiella*. La selección de estos genes se realizó en base a su uso extendido en diferentes estudios de MLST (Salerno y col., 2007; Raftis y col., 2011; Miyoshi-Akiyama y col., 2013; Balboa y col., 2014) y en base a su variabilidad genética.

## 4.1 MATERIALES Y MÉTODOS

Se utilizaron un total de 52 aislados pertenecientes al género *Edwardsiella* con diferente origen geográfico, hospedador y temporal, 6 cepas representando las 5 especies del género y, 4 genomas completos de *E. ictaluri* y *E. piscicida*. Estas cepas se corresponden con las empleadas para el análisis de MLSA (Tabla 14).

122

### 4.1.1 Amplificación y secuenciación de los genes

El estudio de poblaciones se llevó a cabo en base a la secuencia parcial de diez genes esenciales, incluyendo fragmentos de los seis empleados en el estudio de MLSA, *adk*, *atpD*, *dnaJ*, *glnA*, *Y-hsp60* y *tuf*. Los cuatro nuevos genes seleccionados fueron *gapA* (gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa), *phoR* (proteína sensor y reguladora de fosfato), *pyrG* (citidina trifosfato sintetasa) y *rpoA* (subunidad  $\alpha$  de la polimerasa ARN).

La extracción de ADN, la amplificación de los genes, la secuenciación y concatenación de los mismos y, el análisis de las secuencias se realizó siguiendo los protocolos descritos en el apartado 3.1.2.1. Los cebadores utilizados para la amplificación de cada uno de los genes se muestran en las Tablas 15 y 19. Para la amplificación de los nuevos genes esenciales las condiciones generales fueron: 95°C durante 5 min, seguido de 35 ciclos de amplificación, 45 s a 95°C, 45 s a 52°C, 1 min a 72°C, y una elongación final de 5 min a 72°C.

**Tabla 19.** Cebadores utilizados para la amplificación de los genes empleados en el análisis MLST.

Gen	Cebador	Secuencia del cebador (5'-3')	Longitud (pb)	Tamaño utilizado (pb)	Referencia
<i>gapA</i>	150F	AACTCACGGTCGTTTCAAC	750	719	Sawabe y col. (2007)
	899R	CGTTGTCGTACCAAGATAC			
<i>phoR</i>	<i>phoR</i> -F	GACGGAGTTCTGACTGT	659	600	Abayneh y col. (2012)
	<i>phoR</i> -R	ATGGCTGACGTTGGCAA			
<i>pyrG</i>	<i>pyrG</i> -F	TGAACTCCGTTGAGTTG	722	684	Abayneh y col. (2012)
	<i>pyrG</i> -R	TCGTGAACACACCATGT			
<i>rpoA</i>	1F	ATGCAGGGTTCTGTDACAG	884	801	Thompson y col. (2005)
	3R	GHGGCCARTTTTCHARRCGC			

## 4.1.2 Análisis de la estructura poblacional

Siguiendo las indicaciones para la realización de un análisis MLST (Maiden y col., 1998; Urwin y Maiden, 2003), en primer lugar se procedió a la asignación arbitraria de números que identifican cada alelo diferente (tipos alélicos o alelo tipo, AT) a cada una de las distintas secuencias, aunque se diferenciaban en un único nucleótido. Para cada cepa, se definió un perfil alélico o tipo de secuencia (ST del inglés, *sequence type*) compuesto por la combinación de los ATs obtenidos para todos los *loci* estudiados en el siguiente orden: *adk*, *atpD*, *dnaJ*, *glnA*, *gapA*, *Y-hsp60*, *phoR*, *pyrG*, *rpoA* y *tuf*.

Posteriormente se realizaron análisis estadísticos a partir de los fragmentos secuenciados que permitieron calcular los índices y parámetros necesarios para determinar la estructura genética de la población.

### 4.1.2.1 Cálculo de índices de variabilidad

✓ Índice de diversidad de Nei (Hd):

Es un índice de diversidad haplotípica equivalente a la heterocigosidad esperada para datos diploides. Se define como la probabilidad de que al elegir dos haplotipos al azar de una muestra o población éstos sean diferentes. El índice de diversidad haplotípica (H) así como su varianza se estimaron según Nei (1978) utilizando el programa online Linkage ANalysis v3.7 (Haubold y Hudson, 2000) disponible en el sitio web <http://guanine.evolbio.mpg.de>.

✓ Pi ( $\pi$ ) y Theta ( $\theta$ ):

Son medidas de la diversidad nucleotídica. Pi se define como el número de nucleótidos diferentes por sitio entre dos secuencias tomadas al azar (Nei y Li, 1979). Este parámetro se ve afectado por los alelos con mayor frecuencia y es independiente del tamaño muestral. Por otro lado, theta es el número total de sitios segregativos (lugares en los que difiere una secuencia) en una muestra de secuencia dada, y está afectado por la deriva génica viéndose afectado por el tamaño de la muestra.

El cálculo de  $\pi$  y  $\theta$  se realizó para cada uno de los genes individuales, así como para el concatenado utilizando el programa Dnasp5 (Librado y Rozas, 2009).

✓ Relación  $d_N/d_S$ :

Analiza el tipo de selección que opera en la población estudiada en base a las sustituciones no sinónimas ( $d_N$ ) y las sinónimas ( $d_S$ ). Si ambos valores son iguales, se cumpliría la hipótesis de neutralidad ( $d_N=d_S$ ). Si la relación es mayor que 1 indica selección positiva de las sustituciones; mientras que si el valor  $d_N/d_S$  es menor a 1, la población se encuentra bajo selección purificadora. Se calculó utilizando el programa START2 (del inglés, *Sequence Type Analysis and Recombination Tests*) siguiendo el método de Nei y Gojobori (1986), disponible en <http://pubmlst.org/software/analysis/start2/>.

124

#### 4.1.2.2 Análisis del equilibrio de ligamiento

✓ Índice de asociación ( $I_A$ ):

Este índice se define como la probabilidad de que dos cepas o haplotipos elegidos al azar en la población difieran en un *locus* determinado. Se estima el valor esperado ( $V_E$ ) para la varianza en la distribución de no coincidencias a partir de las frecuencias alélicas para un locus dado. Este valor se compara con el valor de la varianza observado para nuestras muestras ( $V_O$ ), obteniéndose una medida del grado de asociación entre alelos en los *loci* estudiados, que se expresa como el índice de asociación  $I_A$  (Brown y col., 1980; Maynard-Smith y col., 1993).

El índice  $I_A$  estima la existencia de desequilibrio de ligamiento en la muestra estudiada, valores que difieren significativamente de cero ( $V_O \neq V_E$ ) indican desequilibrio, es decir, que existe un cierto grado de asociación entre los alelos de los diferentes *loci* estudiados. Cuando esto sucede, los alelos no están distribuidos al azar, sino que existen combinaciones alélicas más frecuentes que otras. El grado de recombinación existente en la población no es suficiente para romper estas asociaciones alélicas, por lo que la población presenta una estructura clonal. Si, por otro lado, el valor de  $I_A$  no es significativamente diferente de cero ( $V_O=V_E$ ), los alelos se encuentran en equilibrio de ligamiento. En este caso, la población presenta una tasa tan elevada de recombinación que

es capaz de romper cualquier posible asociación entre alelos en los distintos *loci* analizados. Este índice se calculó utilizando el programa online Linkage ANalysis v3.7 (Haubold y Hudson, 2000) disponible en el sitio web <http://guanine.evolbio.mpg.de>.

✓ Índice de asociación estandarizado ( $I_A^S$ ):

Este índice es una modificación del  $I_A$  y se diferencia en que el valor no depende del número de *loci* analizados (Haubold y Hudson, 2000). La interpretación y el programa utilizado para su cálculo son iguales a los del índice  $I_A$ .

#### 4.1.2.3 Estudio de la estructura poblacional

✓ Esquema de eBURST:

Como ya hemos mencionado en el punto 4.1.2, se definieron los diferentes tipos alélicos (ATs) y sus combinaciones para cada cepa (STs). Las relaciones entre los diferentes STs, así como la búsqueda del ancestro común para nuestra población, se determinaron en base a las relaciones entre las variantes de los diferentes *loci* considerando los SLV (variaciones en un solo *locus*, del inglés, *single-locus variant*) y DLV (variaciones en dos *loci*, del inglés, *double-locus variants*) mediante la realización de 1000 bootstrap. Los complejos clonales (CC) están formados por al menos dos STs relacionados entre sí mediante SLVs (cada ST comparte al menos 9 de 10 *loci* con otro del complejo). Los STs que no pueden agruparse en ningún complejo clonal son denominados *singletones*. Estas relaciones se analizaron con el programa eBURST v3.0 (<http://eburst.mlst.net>).

✓ *Dot graph* (gráfico de puntos):

Las relaciones entre los STs se representaron también utilizando el programa ClonalFrame (Didelot y Falush, 2007) que es capaz de inferir las relaciones filogenéticas teniendo en cuenta los eventos de recombinación. La representación gráfica del esquema se generó con el programa Graphviz (AT&T Labs Research, [www.graphviz.org](http://www.graphviz.org)) implementado en el propio paquete informático ClonalFrame (Didelot y Falush, 2007).

✓ Red genealógica de haplotipos:

Para determinar las relaciones genealógicas de los haplotipos se construyó una red utilizando el método de Median-Joining (MJ) (Bandelt y col., 1999) incluido en el programa NETWORK 4.2.0.1 (<http://www.fluxus-engineering.com>). Esta red está representada por dos tipos de nodos: los que representan las secuencias analizadas y cuyo tamaño es proporcional al número de aislados que contienen, y los nodos que representan los vectores medios que son secuencias hipotéticas requeridas para conectar las secuencias reales existentes en la red a través de máxima parsimonia. Las conexiones entre ellos hacen referencia al número de mutaciones existentes entre los nodos (Farris, 1970).

126

✓ Estudio filogenético:

Las relaciones filogenéticas inferidas en base a la secuencia concatenada de las secuencias parciales de los 10 genes se determinaron mediante el método de NJ y ML siguiendo las condiciones descritas en el apartado 3.1.2.2 del capítulo anterior.

#### 4.1.2.4 Estudio de la recombinación y mutación

Los posibles eventos de recombinación se detectaron utilizando diferentes métodos. En primer lugar, se utilizó el paquete informático RDP4 (Martin y col., 2010). Este paquete contiene una serie de programas que permiten identificar secuencias recombinantes, las hipotéticas secuencias parentales, así como los puntos de recombinación. La significación estadística seleccionada fue de  $p \leq 0,01$ .

Además, se calculó el número mínimo de eventos de recombinación ( $R_{\min}$ ) (Hudson y Kaplan, 1985), con el fin de evaluar el número de eventos de recombinación en la historia de una muestra. Este índice se halló mediante el programa DnaSP5 (Librado y Rozas, 2009) utilizando el test de cuatro gametos mediante simulaciones por coalescencia.

Por otro lado, se realizó el test phi (del inglés, *pairwise homoplasy index*) (Hudson y Bryant, 2006) utilizando el programa SplitsTree v4.0 (Hudson y Bryant, 2006) que localiza las regiones de DNA con una mayor evidencia de mosaicismo. Estos resultados también se analizaron de una manera gráfica mediante la construcción de diagramas de descomposición de particiones (*Split decomposition analysis*) empleando el mismo

programa informático. Los diagramas consisten en la transformación de los datos en una serie de particiones compatibles y representados mediante un esquema no jerárquico en forma de red (*Split graph*) (Bandelt y Dress, 1992). En una serie de datos ideales en los que no existiera recombinación, el proceso evolutivo estaría representado por un proceso de ramificación jerárquico. Sin embargo, para datos más reales en los que se debe tener en cuenta la existencia de recombinación, este diagrama tiene forma de un árbol reticulado en el que los paralelogramos mostrados pueden ser considerados como indicador de diferentes filogenias dentro de la población analizada.

También se analizó la relación entre las tasas de recombinación y mutación mediante el uso de dos parámetros,  $r/m$  (recombinación/mutación) y  $\rho/\theta$  (rho/theta), empleando el programa ClonalFrame (Didelot y Falush, 2007). El parámetro  $\rho/\theta$  indica el ratio (medida de la frecuencia) en el que ocurren eventos de recombinación y mutación en una muestra dada. La relación entre  $r/m$  es el ratio de probabilidades de que un sitio determinado en una secuencia sea alterado por recombinación y mutación. Es por tanto una medida que pondera la importancia que tiene la recombinación en la diversificación de la población en relación a la mutación.

En último lugar, el programa STRUCTURE v2.3 (Falush y col., 2003, 2007; Hubisz y col., 2009; Pritchard y col., 2000) se empleó para identificar grupos con distintas frecuencias de alelos y para detectar cepas portadoras de ADN extraño entre aislados, es decir, para la identificación de distintas poblaciones genéticas, la asignación de individuos a las poblaciones y la identificación de los migrantes. Este programa analiza las diferencias en la distribución de variantes genéticas entre las poblaciones con un algoritmo reiterativo bayesiano colocando muestras en grupos cuyos miembros comparten frecuencias alélicas para cada *locus*. Este modelo asume que los marcadores no están en desequilibrio de ligamiento. Cuando diferentes subpoblaciones están genéticamente próximas, se pueden generar nuevos patrones genéticos mediante recombinación. Las diferentes líneas genéticas están representadas, en este tipo de análisis, mediante colores puros y, la creación de nuevos patrones genéticos mediante recombinación genera patrones en los que los colores puros se mezclan. La cantidad de subpoblaciones ( $K$ ) se estableció de tres a

siete y todas las ejecuciones se repitieron cinco veces. El mejor modelo de probabilidad se estimó utilizando 100.000 interacciones en un período de *burn-in* y una MCMC de 50.000.

#### 4.1.2.5 Genealogía clonal

La genealogía clonal se construyó utilizando el programa ClonalFrame (Didelot y Falush, 2007) que emplea métodos bayesianos para inferir filogenias utilizando el método de Montecarlo basado en cadenas de Markov (MCMC, Markov Chain Monte Carlo). Las inferencias se realizan aplicando diferentes modelos y escenarios evolutivos para determinar cuál de ellos ha dado lugar a los datos actuales. A diferencia del método bayesiano puro, el programa ClonalFrame (Didelot y Falush, 2007) tiene en cuenta el efecto de la recombinación. Así, además de reconstruir filogenias, permite estudiar si la divergencia en cada rama ocurrió por mutación o recombinación. El programa genera un árbol consenso de entre las distintas descomposiciones que encuentra para la población siguiendo la regla de la mayoría del 50%, y al considerar todos los eventos posibles puede calcular las tasas de recombinación y/o mutación que ocurren en cada nodo. Las principales ventajas que presenta este método es que la filogenia es mucho más precisa ya que la recombinación puede interferir en otros métodos y, además, genera información sobre los procesos de recombinación en sí mismos (Didelot, 2010; Didelot y Falush, 2007). Los análisis se realizaron con los parámetros incluidos por defecto en el programa con 100 000 iteraciones de MCMC.

#### 4.1.2.6 Flujo genético de la población

El flujo genético de una población es el conjunto de mecanismos que generan movimiento de genes de una población a otra. Este flujo es un componente fundamental en la estructura de las poblaciones ya que puede actuar como una fuerza que mantiene integrada a la especie, además de influir en procesos ecológicos (Balboa, 2012).

Los estimadores utilizados se basan en la observación de la distribución espacial de los alelos en las poblaciones, pudiendo así inferir los niveles y/o patrones de flujo génico en las poblaciones (Slatkin, 1985). El modelo más utilizado en las estimaciones de flujo génico se

basa en el modelo de islas infinitas descrito por Wright (1951) que considera que existen condiciones de equilibrio entre un número infinito de islas o subpoblaciones de igual tamaño que intercambian migrantes entre cualquiera de las islas con igual probabilidad y a una tasa constante. El modelo se basa en sólo dos parámetros: tamaño poblacional ( $N$ ) y tasa de migración ( $m$ ). La importancia de la deriva génica es proporcional a  $1/N$ , mientras que la importancia del flujo génico es proporcional a  $m$  (Slatkin, 1985).

- ✓ El índice de fijación ( $F_{ST}$ ) es la proporción de la varianza genética total contenida en una subpoblación relativa a la varianza genética total basado en el modelo de islas infinitas (Wright, 1951).  $F_{ST}$  se define como,  $F_{ST} = (H_T - H_S) / H_T$ , donde  $H_T$  es el promedio de la heterocigosis esperada en la población total y  $H_S$  es promedio de la heterocigosis esperada dentro de las subpoblaciones, ambos para todos los *loci*. Este índice mide la variación de las frecuencias alélicas entre poblaciones y por tanto, la diferenciación genética entre ellas. La tasa con la que un alelo se fija en una población es inversamente proporcional al tamaño efectivo de la población  $N$ . Esta tasa puede ser contrarrestada por el flujo génico que llega de otras poblaciones a una tasa  $m$ , por tanto, podemos relacionar este índice con la migración de la siguiente forma:  $F_{ST} \approx 1/(Nm+1)$  y  $Nm \approx 1/2/(1/F_{ST}-1)$ . Bajo este modelo, una tasa de migración mayor a 1 en cada generación es suficiente para contrarrestar la diferenciación genética debida a la deriva génica.
- ✓ El parámetro  $G_{ST}$  es una medida similar al índice  $F_{ST}$  pero asume un modelo de islas finitas (Crow y Aoki, 1984). Este modelo asume que las poblaciones están en equilibrio y que las islas intercambian migrantes entre sí con igual probabilidad y tasa constante al igual que el  $F_{ST}$ .  $G_{ST}$  se define como  $G_{ST} \approx 1/(4Nm\alpha + 1)$  donde  $\alpha = [n/(n-1)]^2$  y  $n$  es el número de las subpoblaciones.

Ambos parámetros se calcularon mediante el programa ARLEQUIN v3.5 (Excoffier y Lischer, 2010).

#### 4.1.2.7 Historia demográfica de la población

Podemos definir la evolución biológica como el conjunto de cambios en caracteres fenotípicos y genéticos de poblaciones biológicas a través de varias generaciones. Durante mucho tiempo se creyó que los procesos evolutivos eran, en exclusiva, los encargados de mantener la biodiversidad en cada nivel de la organización biológica (especie, población, organismos individuales, ...) de acuerdo a su adaptación relativa dentro de la población. El avance de las técnicas moleculares puso de manifiesto que esta teoría no era justificable únicamente por la selección natural. A raíz de estas ideas se desarrolló la teoría neutra de la evolución (Kimura, 1968; 1983) que dice que la mayor parte de la variación a nivel molecular no se mantiene por la selección tipo darwiniano (adaptativa), sino que es resultado de un balance entre la deriva génica y las mutaciones neutras o casi neutras (Kimura, 1983; Nei y Kumar, 2000; Ohta y Basten, 1992). Este hecho implica que las variaciones a nivel molecular ocurren de forma aleatoria y, por tanto, no tienen función adaptativa.

Para poder detectar la implicación de la selección en un genoma o región del mismo, es necesario saber si la hipótesis nula de que la selección no actúa en las secuencias mencionadas, sea aprobada o rechazada. Para ello se han desarrollado los postulados de Kimura (1968, 1983) que nos permiten establecer patrones esperados para la evolución de las secuencias si existiesen desviaciones del modelo neutro originadas por mutación y deriva génica sin la participación de la selección.

Los estudios de selección natural llevados a cabo en este trabajo han sido, todos ellos, basados en la distribución de polimorfismos. Este tipo de índices analizan la información proporcionada por los estimadores de diversidad genética  $\pi$  y  $\theta$ , y la relación que existe entre ellos permite determinar si las secuencias se encuentran bajo el modelo neutral o se desvían del mismo. Si ambos estimadores son iguales, se interpreta como que el polimorfismo es neutro y, por tanto, se encuentra distribuido aleatoriamente por la muestra. Si por otro lado, existen diferencias entre ellos quiere decir que la selección está afectando a alguno de los estimadores promoviendo su incremento o decremento. Si  $\pi$  es mayor que  $\theta$ , quiere decir que se incrementan las frecuencias alélicas por lo que existe selección positiva. Por el contrario, si  $\theta$  es mayor que  $\pi$ , se incrementan los alelos

deletéreos en la muestra (Watterson, 1975). Para determinar estas diferencias se han descrito varias pruebas:

✓ Prueba de Tajima (Tajima, 1989):

Se basa en la detección de las diferencias entre los estimadores  $\pi$  y  $\theta$  con la determinación del estadístico D y se define como

$$D = \frac{\pi - \theta}{\sqrt{V(\pi - \theta)}}$$

Si D es igual a 0 indica que la población se encuentra bajo equilibrio neutral. Si D es negativa ( $\pi > \theta$ ) indica la presencia de mutaciones deletéreas, y si D es positiva ( $\pi < \theta$ ) indica que algunos alelos se encuentran bajo selección positiva, incrementando sus frecuencias.

✓ Método de Fu y Li (Fu y Li, 1993):

La diferencia con el anterior índice es que considera la distribución de las mutaciones en una genealogía de muestras tomadas al azar a partir de una población dada. Supone que las mutaciones antiguas tendrán que ser detectadas con mayor probabilidad en las ramas más antiguas de la genealogía, mientras que las más recientemente se situarán en las ramas más externas. Con estos dos estadísticos ( $D^*$  y  $F^*$ ) las desviaciones de la neutralidad se identifican como las desviaciones del estimador  $\theta$  derivadas del número de mutaciones en las ramas externas de la filogenia y de número total de las mutaciones ( $D^*$ ) o de la media de la diversidad pareada (*pairwise diversity*) ( $F^*$ ). Valores positivos son causados por un déficit en las mutaciones en las ramas externas de la filogenia que indican la presencia de alelos inusualmente antiguos que probablemente han sido mantenidos por selección balanceadora.

✓  $F_s$  de Fu (Fu, 1996):

Está basado en la probabilidad de observar no menos de k haplotipos en una muestra de n secuencias dado un cierto valor de  $\theta$ , calculado a través de  $\pi$ . Se calcula como:

$$F_s = \ln\left(\frac{S'}{1 - S'}\right)$$

donde  $S'$  es la probabilidad de encontrar un número de alelos igual o menor que el observado en una muestra aleatoria asumiendo que la diversidad alélica y su distribución siguen el modelo neutral. Valores negativos de  $F_s$  evidencian un exceso de alelos, lo que se esperaría de una población con reciente expansión o *hitchhiking* genético y que no siguiese el modelo neutral, mientras que, valores positivos evidencian una deficiencia de alelos, y sería típico de una población que ha sufrido un evento de cuello de botella reciente. Hay que tener en cuenta que esta prueba asume que la recombinación es igual a cero, y por lo tanto una prueba significativa puede simplemente estar demostrando la presencia de un exceso de haplotipos por el efecto de la recombinación.

132

- ✓  $S'$  de Strobeck (Strobeck, 1987):  
Se define como la probabilidad de tener un número igual o menos haplotipos en una muestra que los observados en función de la distribución de frecuencia génica derivada de la tasa de mutación inferida  $\theta$ .  $S'$  es un buen indicador si existen muchas mutaciones recientes, aunque no es aconsejable tomarlo como estimador único debido a que habitualmente da valores muy cercanos a cero. En estos casos es aconsejable utilizar la información proporcionada por  $F_s$ .
- ✓  $R_2$  (Ramos-Onsins y Rozas, 2002):  
Este estimador mide la diferencia entre el número de mutaciones que presenta un solo individuo (mutación *singleton*) observadas en una población y el número medio de diferencias nucleotídicas en esa población. Valores bajos de este estadístico se debe a un incremento del número de mutaciones *singleton* que se interpreta como la existencia de un episodio de expansión poblacional.  $R_2$  está considerado como un buen índice para de poblaciones pequeñas en las que existe recombinación.

Los estudios que comparan la efectividad de diversos indicadores evolutivos en distintas simulaciones demuestran que la prueba de Tajima es la más poderosa cuando hablamos de hipótesis alternativa de barrido selectivo (*selective sweeps*) y cuello de botella (Simmons y col. 1995; Tajima, 1989). En cambio, el test de Fu es más adecuado para casos de expansión poblacional y *hitchhiking* genético ya que es capaz de detectar un exceso en los alelos raros (Fu, 1997; Ramos-Onsins y Rozas, 2002).

Para el cálculo de todos estos índices se utilizaron los programas DnaSP v5 (Librado y Rozas, 2009) y ARLEQUIN v3.5 (Excoffier y Lischer, 2010). La significación se evaluó mediante simulaciones de coalescencia (10000 réplicas) basadas en un proceso de Monte Carlo (Hudson, 1990) asumiendo la opción más conservativa, que es la ausencia de recombinación en los datos.

✓ Aislamiento por distancia:

Para estudiar la dependencia entre la correlación genética y las distancias geográficas se realizó un estudio de aislamiento por distancia con el programa web *Isolation by distance* (IBD) v3.1.6 (Jensen y col., 2005) utilizando el test no paramétrico de Mantel (Mantel, 1967). El test de Mantel analiza la asociación no aleatoria entre las matrices de distancias genéticas pareadas calculadas en base al parámetro  $F_{ST}$  y las matrices pareadas de distancias geográficas. Las distancias genéticas se calcularon en base al parámetro  $F_{ST}$  utilizando medida de similitud de Slatkin (Slatkin, 1993):  $M = ([1/ F_{ST}] - 2) / 4$ . El nivel de significación estadística se calculó mediante un test de permutaciones de  $n=1000$ . Los aislados se agruparon en función de su país de origen y las distancias geográficas se calcularon en base a las coordenadas geográficas del punto medio geográfico entre los aislados pertenecientes a cada país utilizando las herramientas web Google Earth (<http://earth.google.com/>).

✓ Autocorrelación espacial:

Este parámetro se calculó utilizando el índice de correlación  $I$  de Moran utilizando el software Gedis v1.74 (Peña y col., 2009). Este estadístico cuantifica si la distribución de una determinada característica en una especie se ve afectada o no por sus relaciones filogenéticas.

## 4.2 RESULTADOS

### 4.2.1 Descripción de la población y análisis de la diversidad

La concatenación de los 10 genes empleados para la realización de los análisis MLST resultó en una secuencia de 6629 pb. El contenido medio G+C% de toda la población fue del 58%. En la Tabla 20 se muestran los porcentajes de todos los genes analizados para el género *Edwardsiella*, así como, el valor obtenido para las secuencias concatenadas de cada especie.

134

Tabla 20. Contenido G+C % mol de los fragmentos génicos utilizados.

Gen	Población	<i>E. tarda</i>	<i>E. piscicida</i>	<i>E. anguillarum</i>	<i>E. ictaluri</i>	<i>E. hoshinae</i>
<i>adk</i>	59,28	58,75	59,5	59,8	57,59	58,02
<i>atpD</i>	58,32	56,57	58,57	58,51	57,47	55,54
<i>dnaI</i>	62	58,25	62,09	63,28	61,26	58,1
<i>gapA</i>	57,85	56,43	58,02	58,19	56,21	55,79
<i>glnA</i>	59,97	59,11	60	61,34	58,7	58,3
<i>hsp60</i>	56,25	56,5	56,22	56,59	56,96	54,55
<i>phoR</i>	62,29	59,5	62,64	62,31	61,01	57,59
<i>pyrG</i>	56,71	56,4	56,73	57,3	56,37	54,03
<i>rpoA</i>	52,47	52,85	52,43	52,43	52,43	53,21
<i>tuf</i>	55,25	55,01	55,18	56,13	55,38	54,98
Concatenado	58,04	57,06	58,14	58,6	57,34	56,01

El número de tipo alélicos observados para cada gen osciló entre 5 (*rpoA*) y 14 (*pyrG*), obteniendo un total de 97 alelos con 50 sitios sinapomórficos. El alelo más frecuente en todos los genes fue el alelo 3 con un porcentaje del 58% para los genes *glnA*, *hsp60*, *phoR* and *pyrG* y del 91,7% en el gen *rpoA*. El locus más polimórfico fue *dnaI* con 158 sitios polimórficos (131 bialélicos, 24 trialélicos y 3 tetralélicos), mientras que el que menos sitios polimórficos presentó fue el gen *rpoA* con 31 sitios (30 bialélicos y 1 trialélico). Toda esta información está recogida en la Tabla 21.

Tabla 21. Número de alelos y variaciones nucleotídicas.

Gen	Número de alelos	SPM	SPI
<i>adk</i>	10	81	68
<i>atpD</i>	9	121	88
<i>dnaI</i>	9	158	126
<i>gapA</i>	9	68	32
<i>glnA</i>	8	111	82
<i>hsp60</i>	12	74	34
<i>phoR</i>	13	154	111
<i>pyrG</i>	14	119	85
<i>rpoA</i>	5	31	16
<i>tuf</i>	8	48	30
<b>Concatenado</b>	97	965	788

SPM, número de sitios polimórficos; SPI, número de sitios parsimoniosos.

A pesar de la gran cantidad de sitios polimórficos, los índices de diversidad mostraron valores bajos. La diversidad nucleotídica ( $\pi$ ) de la secuencia concatenada fue de 0,048 y el número total de sitios segregativos ( $\theta$ ) fue de 0,047. Todos los *loci* tuvieron una diversidad haplotípica ( $H_d$ ) alta excepto el gen *rpoA* (Tabla 23).

La sustitución sinónima ( $d_s$ ) se produjo con más frecuencia que la sustitución no sinónima ( $d_N$ ), por lo que la relación  $d_N/d_s$  para la secuencia concatenada fue inferior a 1, lo que nos indica que la población se sometió a una selección purificadora (Tabla 22).

Tabla 22. Valores de diversidad nucleotídicas.

Gen	$\pi$	$\theta$	$H_d$	$d_N/d_s$
<i>adk</i>	0,075	0,067	0,8301	0,018
<i>atpD</i>	0,067	0,066	0,9085	0,006
<i>dnaI</i>	0,095	0,095	0,8824	0,007
<i>gapA</i>	0,036	0,040	0,8366	0,017
<i>glnA</i>	0,104	0,100	0,8824	0,011
<i>hsp60</i>	0,042	0,050	0,9477	0,029
<i>phoR</i>	0,100	0,088	0,9281	0,058
<i>pyrG</i>	0,067	0,060	0,9673	0,008
<i>rpoA</i>	0,018	0,017	0,5490	0,010
<i>tuf</i>	0,027	0,027	0,8627	0,017
<b>Concatenado</b>	0,048	0,047	ND	ND

$H_d$ , índice de diversidad de Nei;  $d_N/d_s$ , ratio entre sitios no sinónimos y sinónimos; ND, no determinado.

#### 4.2.2 Estudio del equilibrio de ligamiento

Como ya hemos descrito, el equilibrio de ligamiento se estimó mediante el índice de asociación  $I_A$  cuyo resultado fue de 6,298 ( $P=0,000$ ) y de 0,700 ( $P=0,000$ ) para el índice estandarizado ( $I_A^S$ ). Estos resultados fueron significativamente diferentes de cero lo que indican que no existe una distribución aleatoria de los alelos dentro de la población, sino que existe un cierto grado de ligamiento y que la recombinación no ocurre en la frecuencia necesaria para romper la asociación entre ellos.

136

#### 4.2.3 Estudio de la estructura de la población

La combinación de los 95 alelos de la secuencia concatenada resultó en la descripción de 18 tipo de secuencias o STs (Tabla 23), de los cuales 14 están representados por un solo aislado.

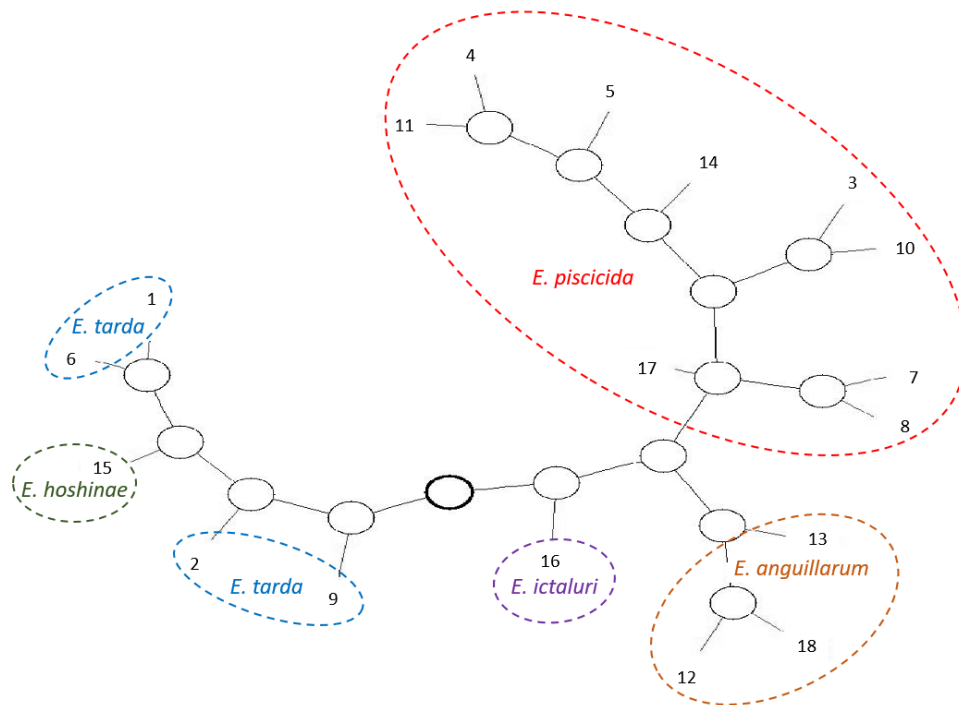
**Tabla 23.** Perfil alélico del esquema de MLST establecido para el género *Edwardsiella*.

ST	<i>adk</i>	<i>atpD</i>	<i>dnaI</i>	<i>gapA</i>	<i>glnA</i>	<i>hsp60</i>	<i>phcR</i>	<i>pyrG</i>	<i>rpoA</i>	<i>tuf</i>	n
1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	1
3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	36
4	4	4	4	3	4	4	4	4	3	4	8
5	4	4	4	3	4	4	5	5	3	4	1
6	1	1	1	4	1	5	6	6	1	2	1
7	4	4	3	5	5	6	4	7	3	3	1
8	4	5	3	5	5	6	4	7	3	3	1
9	5	1	3	6	1	5	7	8	1	1	1
10	6	4	3	3	5	7	8	9	3	3	1
11	4	3	4	3	4	4	4	4	3	4	2
12	7	6	5	7	6	8	9	10	3	5	1
13	7	6	5	7	6	8	10	10	3	5	1
14	3	5	4	3	4	9	4	4	3	3	1
15	8	7	6	8	7	10	11	11	4	6	1
16	9	8	7	9	8	11	12	12	5	7	2
17	4	9	8	3	5	12	8	13	3	3	1
18	10	6	9	7	6	8	13	14	3	8	1

n, número de aislados



El gráfico de puntos construido mediante el programa ClonalFrame utilizando la regla de mayoría por consenso del 50% mostró la existencia de intermediarios evolutivos, así como la fuerte relación entre las diferentes especies del género *Edwardsiella* que formaron un único complejo clonal putativo (Figura 16).

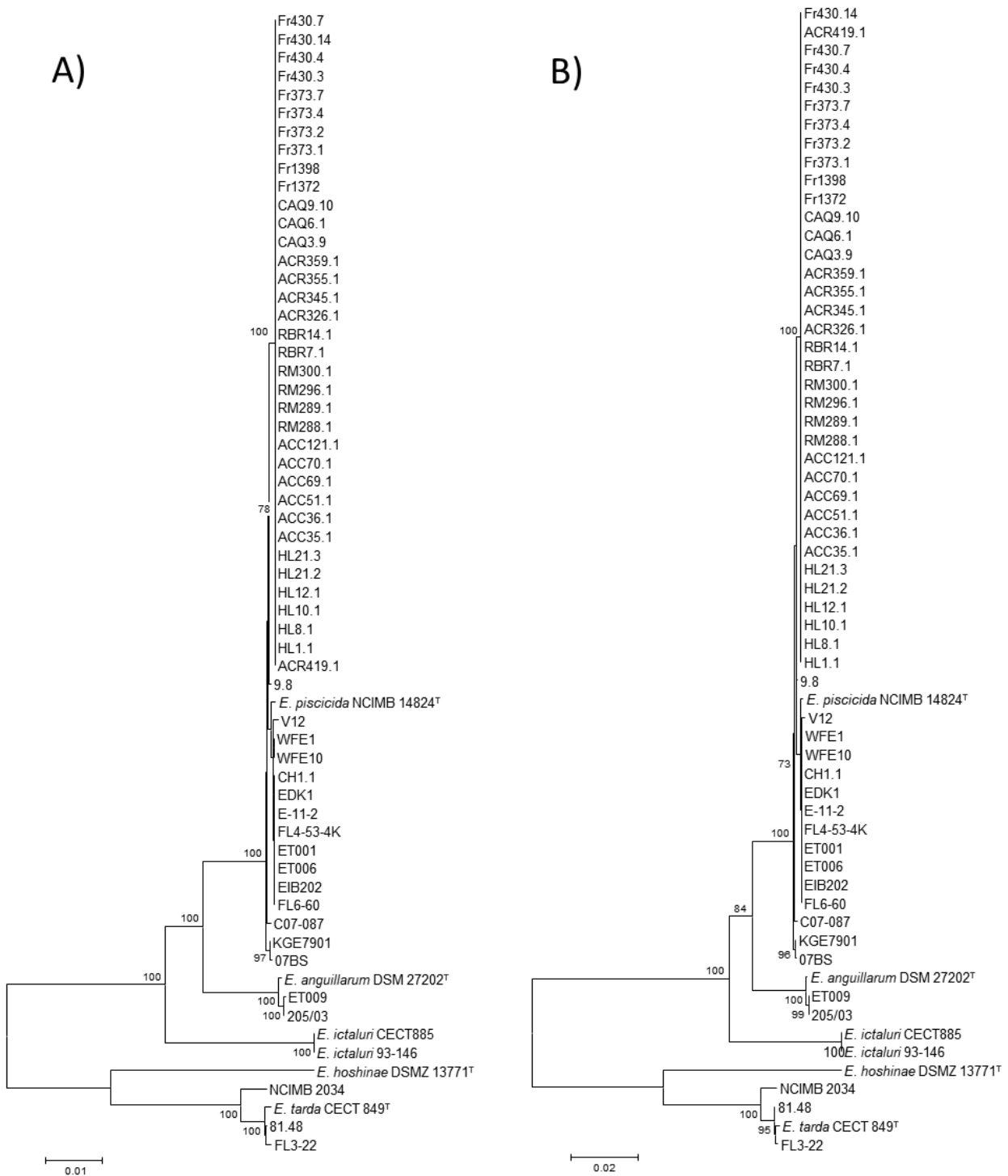


**Figura 16.** Dot graph basado en regla de mayoría por consenso del 50%. El nodo ancestral se muestra en negrita y cada uno de los STs se corresponde con cada línea. Los círculos vacíos representan nodos ancestrales putativos. Figura modificada de Buján y col. 2018a, permiso cedido por la editorial Elsevier.

Estos intermediarios son claramente visibles en la construcción de una red filogenética mediante el algoritmo de Median Joining (MJ) (Figura 17). Cabe mencionar que éste no es un método filogenético y que, por lo tanto, la longitud de las ramas no es proporcional a la distancia evolutiva. Además, el alto número de mutaciones entre las especies del género *Edwardsiella*, *E. hoshinae*, *E. ictaluri* y *E. tarda*, puede indicar que se separaron genéticamente mediante eventos mutacionales.

Para completar este apartado, se llevó a cabo la construcción de un árbol filogenético con las secuencias concatenadas mediante el método NJ y ML (Figura 18) con el fin de explorar las relaciones filogenéticas y poder compararlas con el análisis de MLSA realizado anteriormente. La topología de este árbol se corresponde con la descrita para los análisis de MLSA y ambos métodos generaron el mismo árbol.





**Figura 18.** Árboles filogenéticos obtenidos mediante los métodos de NJ (A) y ML (B) basados en la concatenación de las secuencias parciales de los genes *adk*, *atpD*, *dnaJ*, *gapA*, *glnA*, *hsp60*, *phoR*, *pyrG*, *rpoA* y *tuf* para del género *Edwardsiella*. Barra, número de sustituciones nucleotídicas por sitio. En los nodos se muestran los valores de *bootstrap* iguales o mayores al 70% como porcentaje de 1000 pseudoréplicas. Figura modificada de Buján y col. 2018a, permiso cedido por la editorial Elsevier.

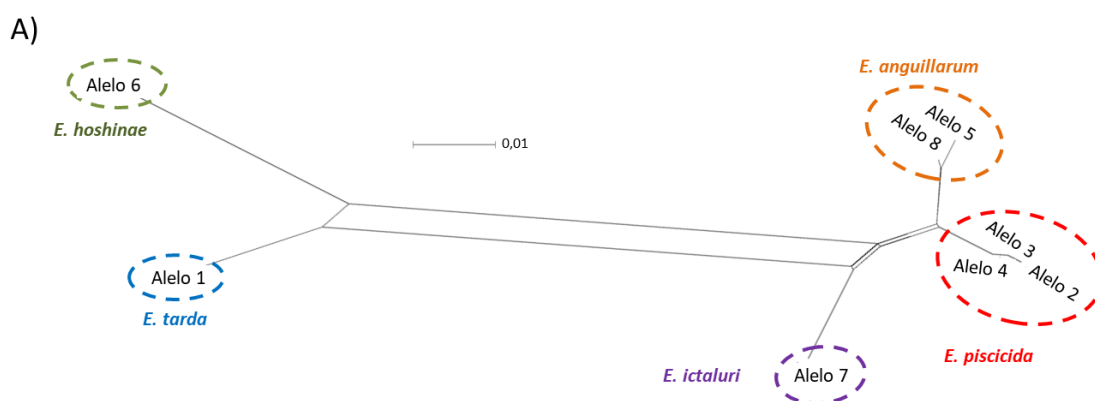
#### 4.2.4 Análisis de la recombinación y mutación

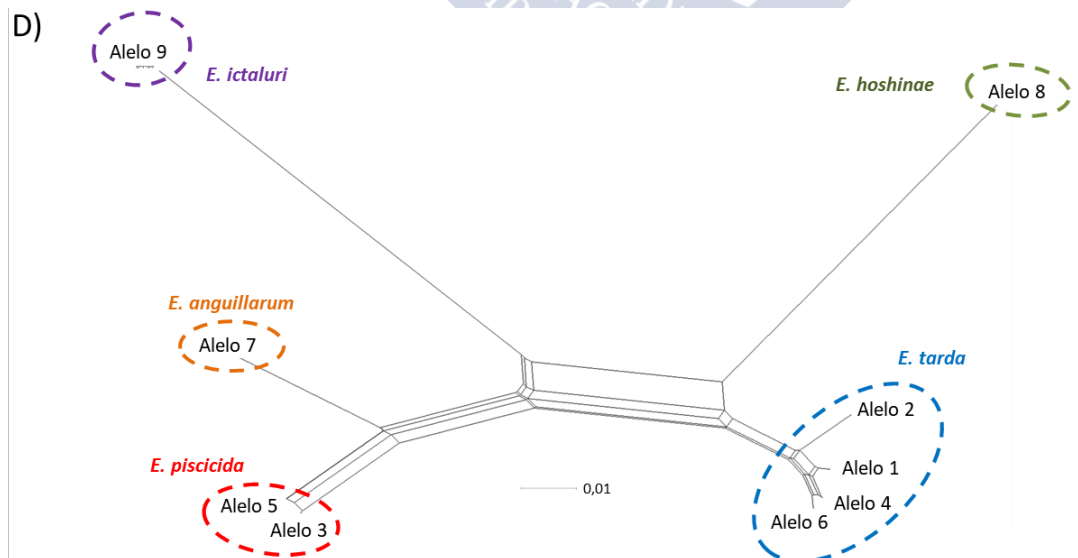
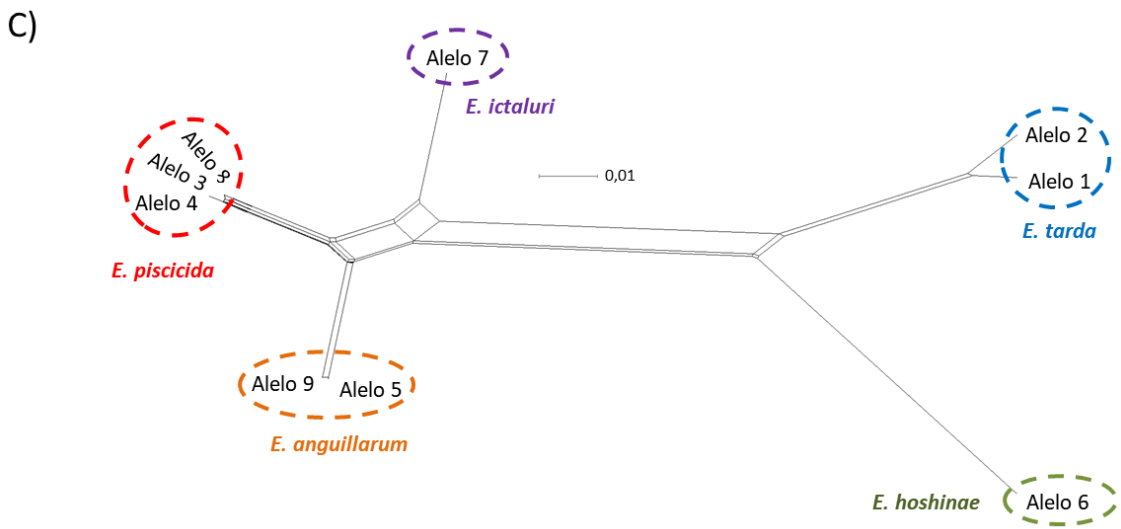
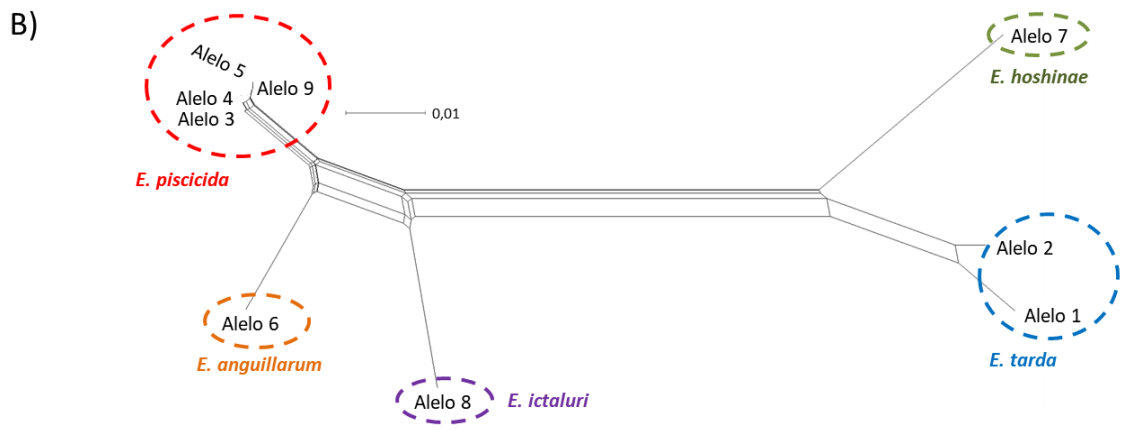
El análisis de los posibles eventos de recombinación mostró diferentes resultados según el método utilizado. Así, mediante el programa RDP4 y el phi test no se detectó ningún evento de recombinación mientras que mediante el test de  $R_{\min}$  se detectaron varios eventos de recombinación en todos los genes (Tabla 24).

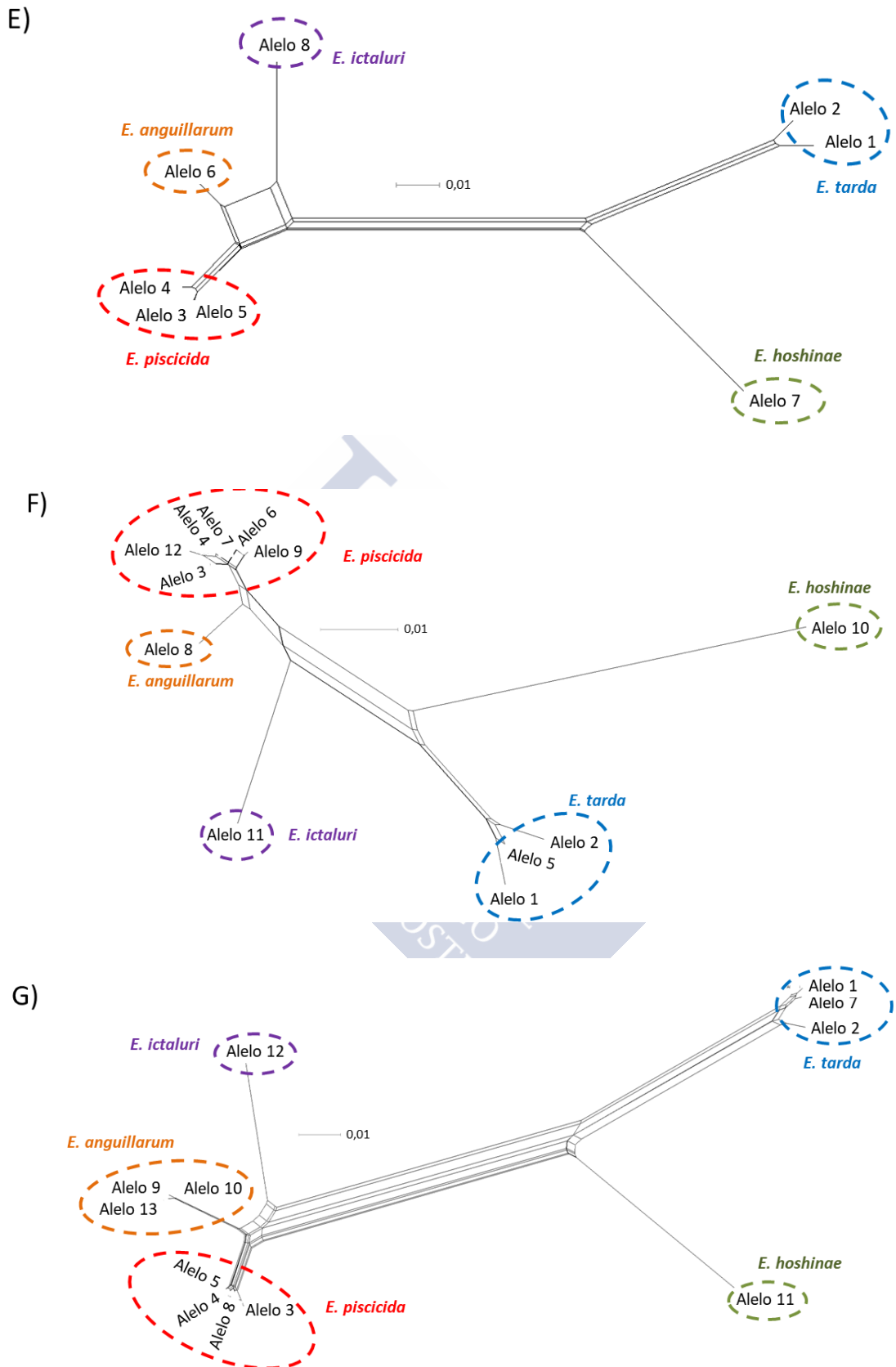
**Tabla 24.** Número de eventos de recombinación detectados mediante el programa DNASP5.

<i>adk</i>	<i>atpD</i>	<i>dnaJ</i>	<i>gapA</i>	<i>glnA</i>	<i>hsp60</i>	<i>phoR</i>	<i>pyrG</i>	<i>rpoA</i>	<i>tuf</i>	Concatenado
6	21	25	10	19	6	24	18	4	5	142

La construcción de los gráficos *split tree* permiten detectar la presencia de recombinación cuando aparecen paralelogramos y la estructura tiene apariencia de red, aunque estas estructuras también pueden ser generadas por incongruencias en la posición que ese aislado ocupa en el árbol. Sin embargo, cuando se obtiene un árbol robusto mediante los análisis filogenéticos, estas estructuras en forma de red pueden considerarse como eventos de recombinación, siendo este el caso del género *Edwardsiella*. Los *split trees* generados para cada gen (Figura 19), así como para el concatenado (Figura 20), muestran una gran formación de paralelogramos entre los diferentes alelos siendo los menos complejos los generados en los genes *adk*, *rpoA* y *tuf*.







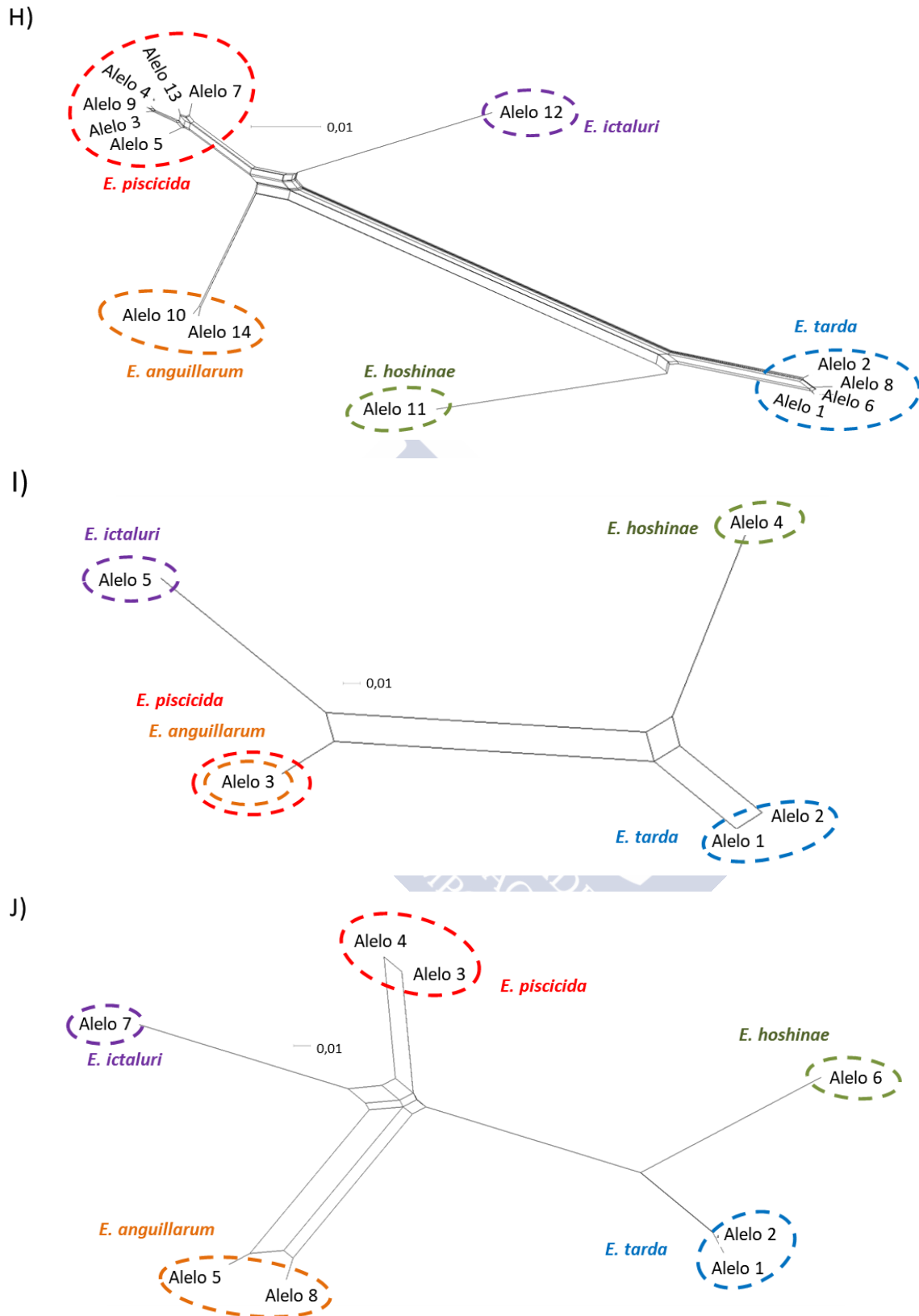
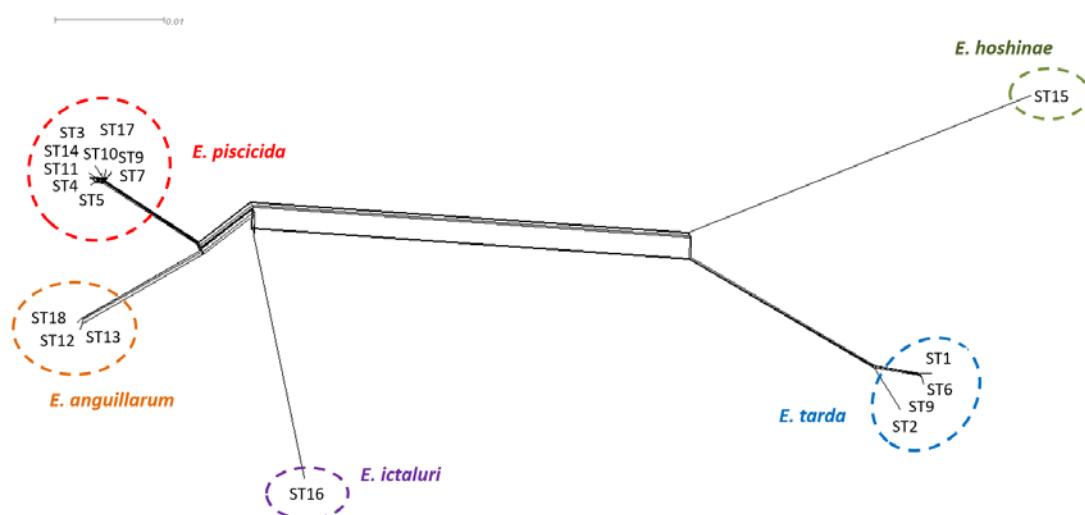


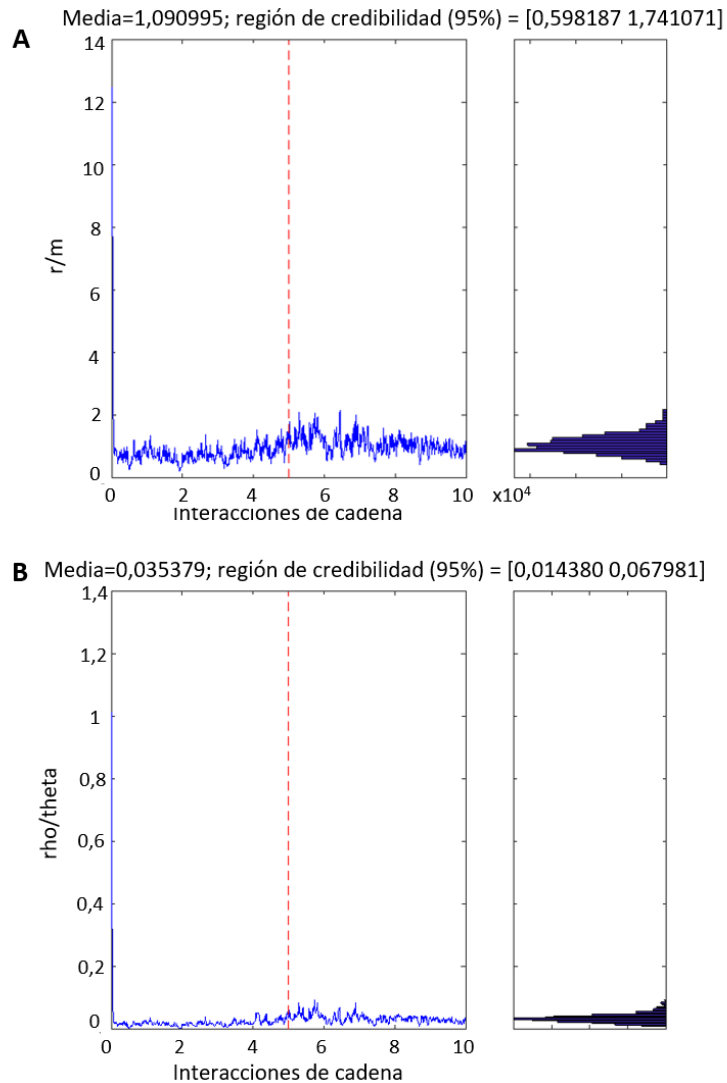
Figura 19. Splits generados para cada uno de los genes individuales A) *adk* B) *atpD* C) *dnaJ* D) *gapA* E) *glnA* F) *hsp60* G) *phoR* H) *pyrG* I) *rpoA* J) *tuf*. La barra representa distancia genética. Figura modificada de Buján y col. 2018a, permiso cedido por la editorial Elsevier.

Los resultados mostrados son concordantes con la red filogenética obtenida mediante MJ (Figura 18) y con los árboles filogenéticos NJ y ML, en los que se observa claramente como las cinco especies están separadas. Además, los paralelogramos indicativos de eventos de recombinación coinciden con los nodos representados por triángulos que forman los vectores medios (mv, del inglés *median vector*).



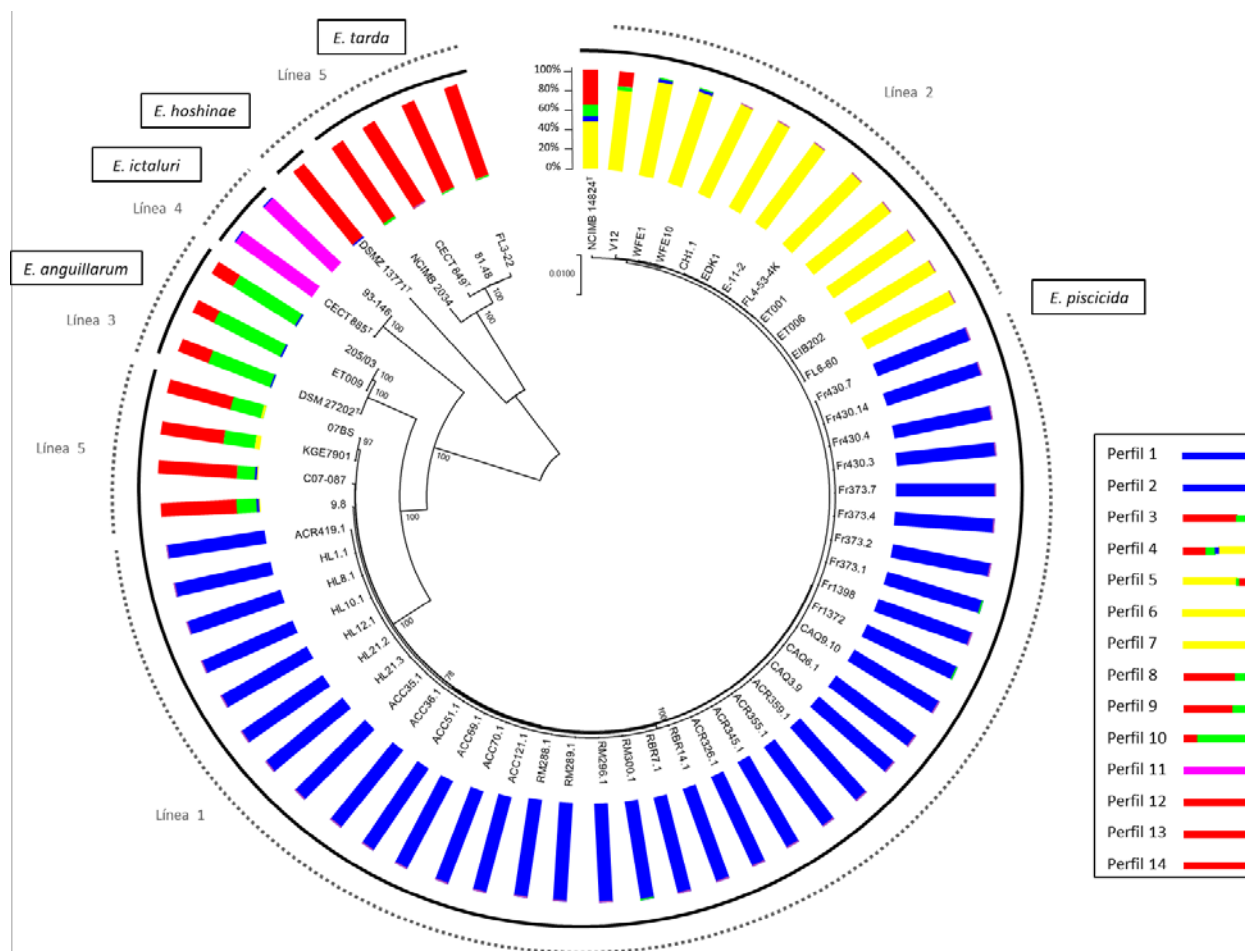
**Figura 20.** *Split* generado para la secuencia concatenada de cada uno de los STs. La barra representa distancia genética. Figura modificada de Buján y col. 2018a, permiso cedido por la editorial Elsevier.

La relación entre la mutación y la recombinación fue estudiada más profundamente con el software ClonalFrame. El ratio obtenido ( $\rho/\theta$ ) para nuestra población fue de 0,035 (CI 95% [0,014-0,068]) lo que nos indica que la tasa de mutación es considerablemente mayor que la de la recombinación. Sin embargo, la influencia de estos factores de evolución para la diversificación genética fue aproximadamente la misma ( $r/m=1,09$ ; CI 95% [0,598-1,741]). La representación gráfica de estos dos índices obtenida en el programa ClonalFrame se muestra en la Figura 21.



**Figura 21.** Gráfica de los parámetros  $r/m$  (A) y  $\rho/\theta$  (B) obtenidos mediante el programa ClonalFrame con un nivel de significación del 95% para el género *Edwardsiella*. Figura modificada de Buján y col. 2018a, permiso cedido por la editorial Elsevier.

Además de estos análisis, se trató de establecer el perfil genético de la población para observar si se produce recombinación entre los aislados y cuál es el grado de asociación que presentan las diferentes poblaciones genéticas con las especies u otro factor como el hospedador o el origen. Los resultados mostrados por el estudio realizado mediante el software Structure v2.3 determinaron la presencia de 5 líneas genéticas ancestrales. Aunque este número coincide con el número de especies del género *Edwardsiella*, cada aislado presenta una proporción variada de estas líneas generando los 62 aislados, 14 perfiles diferentes (Figura 22). Estos perfiles se han agrupado en base a cuál de las 5 líneas ancestrales presenta una contribución igual o superior al 65% en la variabilidad genética del aislado.



**Figura 22.** Árbol filogenético basado en la concatenación de las secuencias parciales de los genes *adk*, *atpD*, *gapA*, *dnaJ*, *glnA*, *hsp60*, *phoR*, *pyrG*, *rpoA*, y *tuf* del género *Edwardsiella* construido mediante los métodos de NJ y ML. Barra del árbol, número de sustituciones nucleotídicas por sitio. En los nodos se muestran los valores de *bootstrap* iguales o mayores al 70% como porcentaje de 1000 pseudoréplicas. Círculo negro, muestra coincidencia entre los métodos NJ y ML. Los cinco colores representan las cinco líneas ancestrales identificadas por el programa Structure. El tamaño de las barras y los colores que las conforman indican la proporción de cada una de las 5 líneas ancestrales. Figura modificada de Buján y col. 2018a, permiso cedido por la editorial Elsevier.

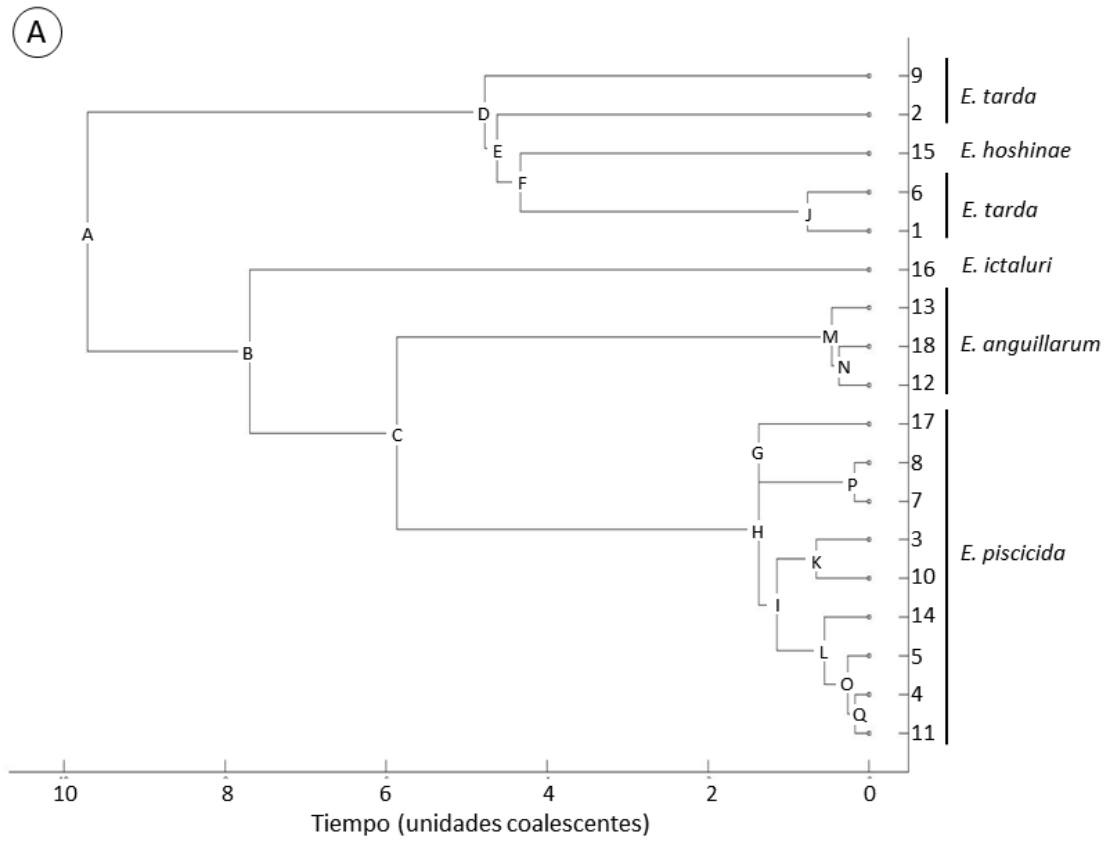
La especie *E. piscicida* fue el grupo más heterogéneo englobando tres líneas genéticas diferentes (1, 2 y 5), así como el aislado NCIMB 14824<sup>T</sup>, que presentó un alto grado de variabilidad no siendo posible asignarlo a ningún grupo, sino que se denominó línea mixta. Todos los aislados pertenecientes a rodaballo europeo y el único aislado de lenguado europeo formaron un grupo perfectamente diferenciable del resto que fue denominado como línea 1. La línea genética 2 engloba aislados de diferentes puntos geográficos y hospedadores. Cabe destacar que dos aislados americanos (C07-087 y 9.8) y dos japoneses (07BS y KGE7901) provenientes de diferentes hospedadores, fueron agrupados en la línea 5. Esta línea también incluye los cuatro aislados pertenecientes a la especie *E. tarda* y a la cepa de *E. hoshinae*. La línea 3 engloba los tres aislados de *E. anguillarum* mientras que la línea 4 está compuesta en exclusiva por miembros de la especie *E. ictaluri*.

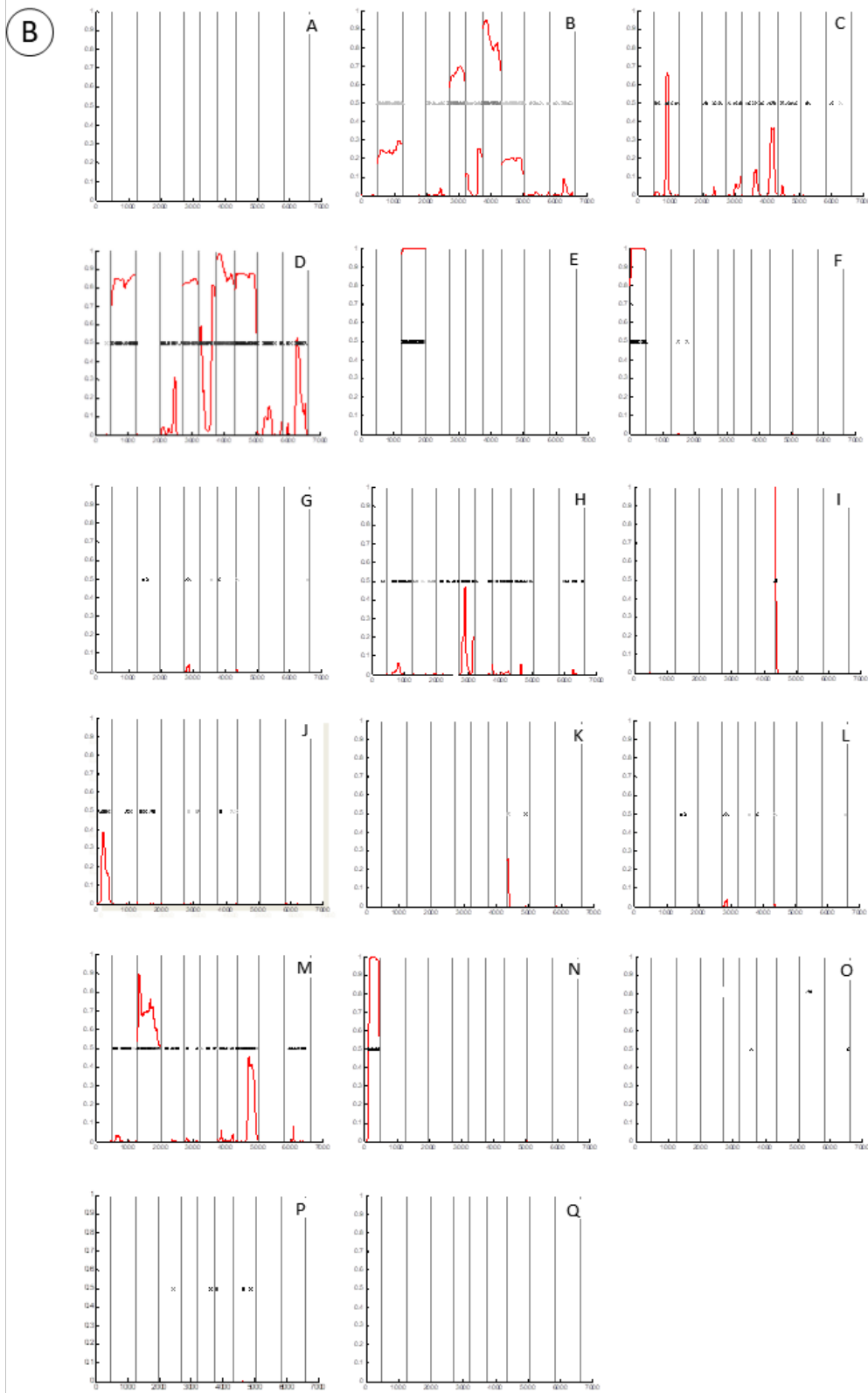
#### 4.2.5 Genealogía clonal

El árbol consenso obtenido para la genealogía clonal (Figura 23A) es muy similar a los demás generados en este capítulo. En la Figura 23 apartado A, los nodos de divergencia están representados por letras en la intersección de cada rama. Además, en el apartado B de la Figura 23 podemos ver en detalle los procesos de divergencia de cada nodo, donde las posibilidades de un evento de mutación están representadas por líneas horizontales rojas mientras que la probabilidad de recombinación es indicada por la verticalidad de esta misma línea. Las cruces indican las diferencias genéticas entre los genotipos arriba y debajo de la rama.

Si analizamos los nodos del árbol, vemos que la divergencia de la rama más antigua (nodo A) tuvo lugar exclusivamente mediante eventos de mutación (Figura 23B). Este resultado es corroborado por el alto número de mutaciones (509) mostradas entre los dos grupos de las especies *E. tarda-E. hoshinae* y *E. piscicida-E. anguillarum-E. ictaluri* por la red MJ (Figura 17). Los nodos intermediarios B, C y D son el punto en el que diversifican el grupo *E. tarda-E. hoshinae* y las restantes especies del género, *E. piscicida*, *E. anguillarum* y *E. ictaluri* y, como se observa en la Figura 22B los eventos que ocurren son mayoritariamente de recombinación. En los demás nodos intermediarios E y F, y las ramas más recientes o

jóvenes, la mayor parte de los cambios son generados en gran parte por eventos de mutación.



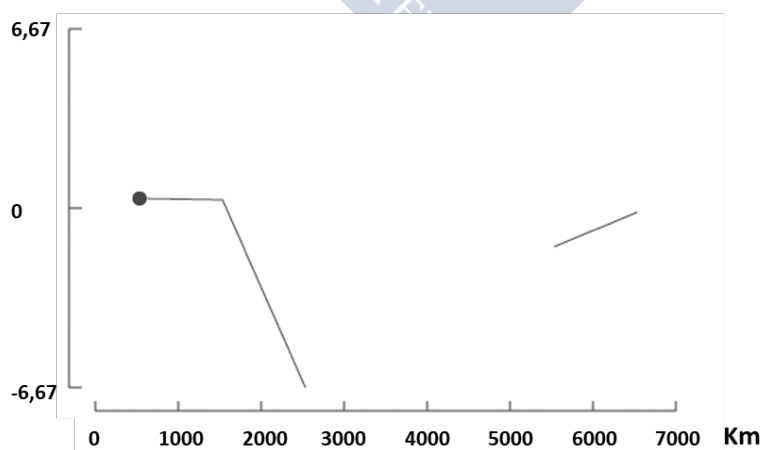


**Figura 23.** Genealogía clonal (A) y eventos evolutivos producidos en cada uno de los nodos (B) obtenidos mediante el programa ClonalFrame. Las líneas rojas indican la probabilidad de ocurrencia de los eventos de recombinación en una escala del 0 al 1. Las cruces indican las sustituciones nucleotídicas. Figura modificada de Buján y col. 2018a, permiso cedido por la editorial Elsevier.

#### 4.2.6 Flujo génico e historia demográfica de la población

El análisis de la diferenciación genética entre las especies (consideradas en este caso como subpoblaciones) en función de sus frecuencias alélicas resultó ser muy elevado  $F_{ST} = 0,94274$  ( $p = 0$ ), así como la proporción de diversidad genética distribuida entre las 5 subpoblaciones  $G_{ST} = 0,23144$  ( $p = 0$ ). El número de migrantes entre las subpoblaciones ( $N_M$ ) fue de 0,02 lo que nos indica que el intercambio genético es casi inexistente, de forma que la deriva genética actúa casi independientemente en la población.

El patrón de distribución alélica se estudió mediante el índice de Moran (I). El correlograma de dependencia espacial obtenido (Figura 24) muestra diferentes correlaciones entre los alelos. En base a este estudio se han podido establecer tres grupos de distancias geográficas, 500-1500 km, 1500-2500 km y 5000-7000 km. En el primer tramo (500-1500 km) se detectó una dependencia espacial de las frecuencias haplotípicas con valores significativos ( $P=0.030$ ) indicando que las frecuencias de los alelos son más diferentes a esta distancia geográfica, y sugiriendo aislamiento por distancia. En el segundo tramo (1500-2500 km), la correlación entre los aislado decrece con la distancia como era de esperar, sin embargo, en el tercer bloque (5000-7000 km) pasa lo contrario, la correlación aumenta con la distancia. Por otro lado, el test de Mantel no mostró diferencias significativas entre la similitud genética y la distancia geográfica que separa a los aislados ( $Z = 15344290.2316$ ,  $r = -0.0314$ ,  $p = 0.3320$ ). El valor negativo obtenido para  $r$ , puede ser indicativo de un aislamiento por distancia.



**Figura 24.** Correlograma para las frecuencias alélicas individuales obtenido mediante la representación gráfica de la dispersión del índice de Moran I. El punto negro indica valores significativos ( $p < 0,05$ ) de dependencia espacial. Figura modificada de Buján y col. 2018a, permiso cedido por la editorial Elsevier.

Todos los estadísticos empleados para el análisis de la historia demográfica indican una desviación de la teoría de la neutralidad. En la Tabla 25 se muestran los valores para los análisis de la población completa.

**Tabla 25.** Resumen de los estadísticos utilizados para el análisis demográfico de la población para el género *Edwardsiella*.

Gen	<i>D</i>	<i>D*</i>	<i>F*</i>	<i>F<sub>S</sub></i>	<i>S</i>	<i>R<sub>2</sub></i>
<i>adk</i>	-1,9915*	0,2117	-0,77	8,193	0,001	0,24193
<i>atpD</i>	-1,4896	0,5322	-0,31	17,76	0	0,10026
<i>dnaI</i>	-1,8399*	-0,4131	-1,17	20,03	0	0,10015
<i>gapA</i>	-1,8292*	-0,2706	-1,04	6,756	0,004	0,10075
<i>glnA</i>	-1,4181	0,2032	-0,52	18,76	0	0,10047
<i>hsp60</i>	-1,9449*	-2,0576	-2,41*	3,589	0,057	0,1009
<i>phoR</i>	-1,5395	0,0855	-0,67	13,66	0	0,10055
<i>pyrG</i>	-1,4244	0,2814	-0,46	9,374	0	0,10032
<i>rpoA</i>	-1,7082	-0,0203	-0,77	4,914	0,025	0,10068
<i>tuf</i>	-1,5648	0,4434	-0,38	5,71	0,01	0,10044
<b>Concatenado</b>	-1,6978	-0,0789	-0,88	49,14	0	0,1003

*D*, estadístico de Tajima; *D\** y *F\**, estadísticos Fu y Li; *F<sub>S</sub>*, estadístico de Fu; *S*, estadístico de Strobecks; *R<sub>2</sub>*, estadístico de Ramón-Onsis; \*valores significativos

El test de Tajima (*D*) y, Fu y Li (*F\** y *D\**) arrojaron valores negativos, pero no significativos para la secuencia concatenada. En el caso del análisis de los genes individuales, los valores también fueron negativos, aunque a diferencia del concatenado, algunos de ellos fueron significativos. Los valores negativos indican un exceso de polimorfismos raros en la población, resultado de la presión de selección positiva o de un incremento en el tamaño de la población. En el caso del estadístico *D\** los genes individuales *adk*, *atpD*, *glnA*, *phoR*, *pyrG* y *tuf* mostraron valores positivos, aunque no significativos lo que sugiere un exceso de alelos de frecuencias intermedias que puede deberse a procesos de selección balanceadora o de eventos de cuello de botella producidos en la población. La teoría principal de expansión poblacional es apoyada por los valores cercanos a cero obtenidos para el estadístico Ramos-Onsis *R<sub>2</sub>*. Por otro lado, Los valores de *F<sub>S</sub>* de Fu positivos y los valores cercanos o iguales a cero del test *S'* de Strobeck, indican una deficiencia de alelos,

lo que es esperable en una población que ha sufrido un cuello de botella o una selección superdominante.

### 4.3 DISCUSIÓN

La población del género *Edwardsiella* muestra una gran heterogeneidad, así como un alto grado de discontinuidad a nivel genético. La alta diversidad de secuencias y su discontinuidad se ve reflejada en los valores de diversidad nucleotídica *per site* ( $\pi$ ), en la media de las diferencias nucleotídicas *per site* ( $\theta$ ), en el elevado número de sitios polimórficos (963 de un total de 6629 pb), y en el gran número de singletones (14 de 18 ST) obtenidos mediante el algoritmo eBURST (Ramo y col., 2016). Cabe mencionar que los valores de diversidad se ven influenciados por la presencia de STs que engloben un número elevado de aislados de la población (Bastardo y col., 2012; Nicolas y col., 2008; Yan y col., 2011), por tanto, aunque los valores obtenidos fueron altos, probablemente estén mermados por la influencia del ST3, formado por más de la mitad de los aislados. La población presentó solo 107 cambios aminoacídicos no sinónimos de los 965 sitios polimórficos, lo que indica una fuerte selección contra los cambios de aminoácidos, una característica típica de los genes esenciales (Pérez-Losada y col., 2006).

Como hemos mencionado, el esquema de eBurst refleja discontinuidad en la población, sin embargo, la construcción del *dot graph* mostró una estrecha relación entre las diferentes especies del género *Edwardsiella*. Esta incongruencia puede deberse a que el análisis de eBURST no muestra posibles eslabones intermediarios entre las especies y a que el algoritmo utilizado para definir complejos clonales es muy estricto (Didelot y Falush, 2007). Por otro lado, Feil y col. (2004) demostraron que el algoritmo de eBURST es muy sensible en la identificación de la divergencia de clones en base a los perfiles alélicos de las poblaciones clonales, sin embargo, puede producir resultados incongruentes cuando se utiliza para estudiar poblaciones en las que existe un cierto grado de recombinación como es el caso del género *Edwardsiella*. El hecho de que el eBURST sea incapaz de detectar una divergencia genética sugiere que dicha divergencia se produjo muy lentamente y que no es reciente. Además, es importante enfatizar que debido a las últimas incorporaciones y

reestructuraciones del género, no todas las especies están representadas con el mismo número de aislados lo que puede afectar a la estructura poblacional (Balboa y col., 2014).

Los análisis filogénicos basados en la concatenación de todos los genes mostraron que los aislados de *E. piscicida* están divididos en dos grandes grupos, uno formado por los aislados europeos de rodaballo y el aislado de lenguado europeo y otra rama en la que se incluyen el resto de aislados con orígenes diversos. Este hecho hace pensar que los cambios genéticos que llevaron a estos aislados a separarse pueden estar influidos por la distancia geográfica. Si analizamos en detalle el árbol filogenético, se llega a la conclusión de que se puede establecer ninguna relación entre los grupos de aislados formados, es decir, no se agrupan ni por hospedador, ni por año ni por origen geográfico, a diferencia del análisis de MLSA llevado a cabo por Abayneh y col. (2012) en el que demuestran que los aislados de *E. tarda* (posteriormente *E. piscicida*) se asocian por hospedador u origen geográfico. Estas diferencias se deben seguramente a que los genes empleados en esta tesis no son los mismos.

El análisis de la genealogía clonal mostró que los eventos responsables de la divergencia evolutiva del género, pueden deberse a procesos de mutación y/o recombinación, aunque el índice  $\pi/\theta$  nos indica que la mutación es más frecuente. A pesar de este dato, el índice  $r/m$  obtenido para toda la población nos muestra lo que ya vimos en el árbol consenso, que la recombinación y la mutación tienen el mismo efecto en la evolución de la población de *Edwardsiella*. El alto número de mutaciones mostradas en la red de MJ se confronta con el alto número de paralelogramos (indicativos de recombinación) formados en el *split tree* lo que confirma que ambos factores están influyendo en la diferenciación genética en la población. Este resultado es coincidente con otros estudios de la familia de las enterobacterias donde se muestra una amplia diversidad genética influenciada por altos niveles de mutación y recombinación (Feil y col., 2001; Salerno y col., 2007).

El alto número de mutaciones detectadas junto con el bajo valor de  $I_A^S$  muestran que a pesar de que el impacto de la recombinación es tan importante como el de la mutación en la evolución del género, no es suficiente para producir una asociación aleatoria de los diferentes alelos (de las Rivas y col., 2006). Por otro lado, el hecho de que métodos como el phi test no sea capaz de detectar recombinación puede ser debido a que los genes

utilizados están sometidos a selección purificante, que elimina la variación nucleotídica necesaria para que las variaciones intragénicas puedan ser detectadas por la mayoría de los algoritmos (Feil y col., 2004).

El alto valor de  $I_A$  y la considerable mezcla genética entre especies indican que la estructura de población formada por las cinco especies es panmíctica (Maynard-Smith y col., 1993). A pesar de estos resultados, la presencia de clones dentro de la población o el desequilibrio entre los alelos de algunos genes nos indica que la población no es completamente panmíctica. La controversia los resultados no hace más que demostrar que la relación clonal y epidemiológica entre aislados de diferentes especies de un mismo género es un trabajo complejo, y el impacto real de la recombinación es más difícil de evaluar que en los estudios de una sola especie (Didelot y Maiden, 2010).

Mediante el programa Structure v2.3 examinamos la posible influencia de la recombinación entre las especies de nuestra población. Como hemos visto se determinaron cinco líneas ancestrales básicas que se entremezclan en mayor o menor medida indicándonos un posible esquema de interacción entre aislados y/o especies. En estudios similares como en el caso del género *Aeromonas*, los diferentes ancestros genéticos se asociaron casi exclusivamente con cada una de las especies analizadas (Martino y col., 2011). Por el contrario, nuestros resultados muestran que la especie *E. piscicida* abarca tres líneas diferentes y que la línea genética 5 es compartida por las especies *E. tarda*, *E. hoshinae* y *E. piscicida*. Esta falta de asociación puede explicarse por la gran cantidad de eventos de mutación responsables de la divergencia entre algunas de las especies o por aislamientos geográficos ya que los aislados de *E. piscicida* pertenecientes a la línea 5 provienen del mismo país (Estados Unidos) que las cepas de *E. tarda*. Por otro lado, los perfiles de los aislados identificados como *E. anguillarum* están generados por la mezcla de dos líneas ancestrales sugiriendo que la recombinación es la fuerza responsable de la divergencia de esta especie, estando esta teoría corroborada por los resultados mostrados en el árbol consenso obtenido mediante ClonalFrame.

Los valores cercanos a uno presentados por los índices  $F_{ST}$  y  $G_{ST}$ , y el escaso flujo genético mostrado por el índice  $N_m$ , nos indican que el aislamiento geográfico juega un papel importante en la evolución de la población y que probablemente existieron varios eventos

de cuello de botella. En estos casos, la mutación jugaría un papel mayor en la variabilidad genética que la recombinación, hecho que ha sido corroborado en múltiples ocasiones a lo largo de este capítulo. Este aislamiento está demostrado también mediante el correlograma obtenido con el índice de Moran, aunque el análisis no fue significativo en el cómputo global pero sí para las distancias más cercanas. La falta de significación puede ser debido al cambio de tendencia en los aislados más alejados ya que estos, al contrario de lo esperado, presentan mayor similitud genética. Debido a la gran distancia entre Estados Unidos y los países asiáticos, la explicación más lógica es atribuir estas similitudes genéticas al flujo de comercio y adquisición de alevines en diferentes países, como ocurrió con otros patógenos (Bastardo y col., 2015).

Los estadísticos de neutralidad reflejaron diferentes tendencias en la demografía del género *Edwardsiella*, hecho que ocurre también en otras especies (Bastardo y col., 2015; Balboa y col., 2014). Por un lado, tenemos los valores positivos de  $F_S$  y Strobeck's, que, siendo muy cercanos a cero, nos indican que la población sufrió un cuello de botella y por el otro; los estadísticos de neutralidad  $F^*$  y  $D^*$ , y  $D$  (Fu y Li, y Tajima respectivamente) así como el índice Ramos-Onsis, permitieron rechazar la teoría neutral en la población de *Edwardsiella* como resultado de una expansión poblacional relativamente reciente. Esta controversia en los índices, podría ser explicada en el caso de que alguno de los grupos o especies del género estuviese en expansión epidemiológica induciendo la diseminación de estos miembros (típico de aislados virulentos) mientras que otros grupos presentarían un embotellamiento genético. Además, el desequilibrio de ligamiento junto al alto número de mutaciones en las ramas más recientes de la genealogía clonal apoya esta hipótesis de una reciente expansión (Barton, 2000). Así mismo, los últimos brotes de *E. piscicida* en Europa (Castro y col., 2011a; Castro y col., 2012; Shafiei y col., 2016) respaldan tal hipótesis. Estos datos se reflejan en la evolución independiente de las diferentes líneas genéticas de *E. piscicida* mostradas por el análisis realizado con Structure. Otro factor determinante en la diferencia de los resultados puede deberse a que  $F_S$  es un indicador más sensible para la expansión de la población que  $D^*$ , aunque el estadístico  $R_2$  es particularmente adecuado para muestras de pequeño tamaño con recombinación (Balboa et al., 2014). Además de las diferencias a nivel de análisis del concatenado, algunos de los genes mostraron una

desviación de la tendencia general de la población lo que indica presiones selectivas únicas, diferentes historias demográficas, falsos resultados o, con mayor probabilidad, una mezcla de todos estos factores.

Cabe mencionar que los resultados de la historia demográfica, al igual que la estructura de la población del género *Edwardsiella*, pueden verse influenciados por el alto número de aislados de rodaballo europeo. El número de estos aislados fue seleccionado para representar la rápida propagación de la edwardsielosis en Europa (Mohanty y Sahoo, 2007) y procurar que nuestros datos empíricos fuesen reflejo de la situación real.







## Capítulo 5: BÚSQUEDA DE FACTORES DE VIRULENCIA MEDIANTE APLICACIONES PROTEÓMICAS

**Trabajo publicado:**

Buján N y col. (2015) Comparative proteomic study of *Edwardsiella tarda* strains with different degrees of virulence. *J Proteomics*, 127: 310-320



## 5 BÚSQUEDA DE FACTORES DE VIRULENCIA MEDIANTE APLICACIONES PROTEÓMICAS

La información genómica de un organismo es de fundamental importancia; sin embargo, los genomas completos son anotados mediante similitud de secuencias con genes ya conocidos. La identificación definitiva de estos genes se lograría realmente sólo cuando se expresan y las proteínas resultantes tiene efectivamente las actividades biológicas correspondientes. En la actualidad, la proteómica ha conseguido integrar un conjunto de metodologías con el objetivo de llevar a cabo el análisis de proteínas a gran escala. La proteómica podría así definirse como el uso de medidas cuantitativas de la expresión génica a nivel de proteínas con el fin de caracterizar procesos biológicos (como por ejemplo el desarrollo de una infección) y descifrar los mecanismos de control de la expresión genética (Anderson y Anderson, 1998).

Diferentes áreas, entre ellas, la microbiología se ha beneficiado del desarrollo de las diferentes técnicas proteómicas empleadas para la comparación de proteomas y subproteomas (secretoma, proteínas de superficie, etc.) de microorganismos con el objetivo de encontrar proteínas altamente inmunogénicas, factores de virulencia, proteínas responsables de la interacción hospedador patógeno u otras proteínas encargadas de la degradación de muchos compuestos como la celulosa.

Mediante la aplicación de la electroforesis bidimensional diferencial o 2D-DIGE (del inglés, *Difference In Gel Electrophoresis*) se han comparado, en esta tesis, los proteomas totales de dos aislados con diferente potencial patogénico descritas inicialmente como *E. tarda* (ACC35.1 y NCIMB 2034). Posteriormente al experimento, y como hemos visto en capítulos anteriores, los aislados pertenecen a las especies *E. tarda* (NCIMB 2034) y *E. piscicida* (ACC35.1) por lo que ciertas diferencias pueden ser debidas a este hecho. Gracias a esta comparación hemos podido evaluar la presencia/ausencia de diversas proteínas relacionadas con la virulencia en las dos especies.

Como ya hemos mencionado el hierro es un factor fundamental en la virulencia ya que regula diversos mecanismos bacterianos implicados en la infección. El marcaje peptídico mediante el uso de isótopos isobáricos estables, concretamente la tecnología TMT6plex, ha sido utilizada para comparar cuantitativamente las diferencias que existen a nivel de la expresión de proteínas de la cepa virulenta de *E. piscicida* ACC35.1 sometida a diferentes concentraciones de hierro.

## 5.1 MATERIALES Y MÉTODOS

### 5.1.1 Tecnología 2D-DIGE

#### 5.1.1.1 Aislados y condiciones de crecimiento

Para llevar a cabo la búsqueda de factores de virulencia mediante electroforesis bidimensional diferencial en gel se seleccionó el aislado de *E. piscicida* ACC35.1 obtenido de rodaballo y virulento para peces ( $LD_{50}$  de  $1,6 \times 10^1$  células/g), y la cepa de referencia no virulenta *E. tarda* NCIMB 2034 (Castro y col., 2011). Una colonia de cada aislado se inoculó en matraces con 50 ml de caldo tripticasa-soja (TSB, del inglés *Trypticase Soy Broth*) y se incubaron durante 24h en agitación a una temperatura de 30°C. Este cultivo se empleó para inocular 100 ml de TSB el cual se ajustó a una densidad óptica inicial de 0,2 a 600 nm y se dejó crecer a la misma temperatura y en agitación hasta una densidad de 0,8 (fase logarítmica de crecimiento). A continuación, los cultivos se centrifugaron a 4.000 rpm durante 20 min a 4°C, los sobrenadantes fueron descartados y los precipitados se utilizaron para la extracción de proteínas. Para obtener 4 réplicas biológicas se repitió este proceso tres veces más.

#### 5.1.1.2 Extracción de proteínas

A partir de los precipitados anteriores se realizó la extracción de proteínas siguiendo el protocolo TCA-acetona. Los precipitados se resuspendieron en tampón de lisis (urea 7M,

tiourea 2M, CHAPS 4% p/v) suplementado con 1 mM de fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF del inglés, *henylmethylsulfonyl fluoride*) en hielo. A continuación, las muestras se sonicaron en 3 pulsos de 30 s cada uno con intervalos de espera de 30 s. Seguidamente, se centrifugaron a 13.000 rpm durante 10 min a 4°C y el sobrenadante se recogió, se alicuotó y se conservó a -20°C para su posterior precipitado. Tras permanecer congeladas toda una noche (facilita la lisis celular), las muestras se precipitaron añadiendo ácido tricloroacético (TCA, del inglés *trichloroacetic acid*) al 10% e incubándolas durante 1 hora a 4°C con agitación aproximadamente cada 10 minutos. A continuación, las muestras se centrifugaron a 13.000 rpm durante 5 min a 4°C, se desechó el sobrenadante y se resuspendieron en acetona (almacenada a 4°C) incubándolas toda la noche a -20°C. Al día siguiente, las suspensiones se centrifugaron a 10.000 rpm durante 5 min a 4°C y los precipitados se resuspendieron con tampón de hidratación (urea 7M, tiourea 2M, CHAPS 4% p/v, tris 30 mM a pH 8.5).

Para determinar la concentración proteica de las muestras se utilizó el método Bradford (Bradford, 1976), empleando el reactivo comercial de *Bradford Protein Assay* (Bio Rad). Para realizar la recta patrón se utilizó una solución de seroalbúmina bovina (BSA) de concentración conocida y se midió la absorbancia a 595 nm en un espectrofotómetro Beckman DU 640.

Los extractos proteicos se almacenaron a -80°C para sus posteriores usos.

### 5.1.1.3 Diseño experimental, marcaje y electroforesis

Previamente al marcaje de las proteínas se realizó el diseño experimental en el que se distribuyeron las cuatro réplicas biológicas en los geles de forma aleatoria para poder obtener resultados comparativos estadísticamente significativos. Se emplearon cuatro geles, en cada uno de ellos se cargó una réplica del aislado ACC35.1, una réplica de la cepa NCIMB 2034 y una muestra control o estándar interno (mezcla de las dos muestras a comparar). Como ya se explicó en la introducción en el punto 1.6.1, solamente es posible correr en el gel tres muestras a la vez siendo obligatorio que una de ellas sea el estándar interno. En el diseño experimental que se muestra en la Tabla 26 y en la figura 6

incluida en el punto 1.6.1 de la introducción (página 75), podemos ver el flujo de trabajo que se realizó en los estudios 2D-DIGE.

**Tabla 26.** Diseño experimental para el ensayo de DIGE.

Gel	Cy5	Cy3	Cy2
1	ACC 1	NC 4	EI
2	ACC 2	NC 1	EI
3	NC 2	ACC 3	EI
4	NC 3	ACC 4	EI

ACC, aislado ACC35.1; NC, cepa NCIMB 2034; EI, estándar interno; Cy2, Cy3 y Cy5, fluorocromos (CyDye DIGE Fluor minimal dyes, GE Healthcare)

Para el marcaje de las muestras se siguieron las instrucciones del kit de marcaje *CyDye DIGE Fluor minimal dyes* (GE Healthcare) siguiendo las instrucciones del fabricante. Los fluorocromos se unen al 1-2% de las lisinas presentes en las proteínas. Se utilizaron 400 pmol de cada fluorocromo (Cy2, Cy3 y Cy5) para cada 50 µg de proteína y se incubaron 30 min en hielo y en oscuridad. Tras este tiempo, se añadió 1 µl de lisina 10 mM y se dejaron 15 min en las mismas condiciones que el marcaje para sobresaturar las muestras y detener el marcaje. Una vez finalizado este proceso se mezclaron las muestras (150 µg de proteína) para cada gel siguiendo el diseño experimental (Tabla 27), una marcada con Cy3, otra con Cy5, y el estándar interno marcado con Cy2, y se diluyeron en proporción 1:1 con tampón de carga (urea 7M, tiourea 2M, CHAPS 4% p/v, ditiotreitól (DTT) 200mM v/p y anfolitos al 4%).

Antes de la primera electroforesis, las tiras de gradiente de pH (24 cm, pH 3-11, *Immobiline DryStrip gels*, GE Healthcare) se rehidrataron sin la muestra con 350 µl de tampón de hidratación para 2D (urea 7 M, Tiourea 2 M, CHAPS 4% p/v, De Streak 1,2%, trazas de azul de bromofenol), durante aproximadamente 8 h. Las tiras permanecieron todo ese tiempo cubiertas con aceite mineral (*PlusOne™ DryStrip Cover Fluid*, GE Healthcare) para minimizar la evaporación en la bandeja de rehidratación (*Immobiline DryStrip Reswelling Tray*, GE Healthcare). Las muestras ya mezcladas con el tampón de carga se centrifugaron brevemente para evitar arrastrar restos de azul de bromofenol no diluido y se cargaron mediante pocillo en las tiras. Tras 10 min de espera para que el inicio de la tira se impregnara bien de la muestra, se aplicó el siguiente programa de isoelectroenfoco en un

dispositivo *IPGphor Isoelectric Focusing System* (GE Healthcare): 120 V durante 1 h; 500 V durante 2 h; de 500 V a 1000 V durante 2 h; de 1000 a 6000 V en gradiente, 6 h; y 6000 V durante 14 h. Tras el isoelectroenfoco de las tiras de gradiente de pH, se equilibraron dejándolas 12 min en agitación suave en solución de equilibrado reductora (urea 6M, dodecilsulfato sódico (SDS) 2%, glicerol 30% v/v, Tris-HCL 100mM pH 8.0) con DTT 2% p/v seguido de otros 5 min en esta solución con iodoacetamida al 2,5% y trazas de azul de bromofenol (solución de equilibrado alcalina).

Para la segunda dimensión, se prepararon geles de SDS-poliacrilamida al 12% en placas de cristal aptas para fluorescencia, sobre los que se depositaron las tiras de gradiente de pH, previamente inmovilizadas y equilibradas, y se sellaron con una solución de tampón de electroforesis 1x (Tris 25 mM, glicina 192 mM y SDS 0,1%) con 0,5% de agarosa fundida. La electroforesis se llevó a cabo en el dispositivo *Ettan DIGE System* (GE Healthcare) con tampón de electroforesis 1x en la cubeta inferior y tampón de electroforesis 2x (Tris 50 mM, glicina 384 mM, SDS 0,2%) en la cubeta superior. La electroforesis se realizó a 20°C a 1 W/gel durante 23 h.

#### 5.1.1.4 Adquisición de imágenes y análisis

Los geles 2D-DIGE se visualizaron en un escáner *Typhoon 9400TM* (GE Healthcare) con los filtros CyDye. Para visualizar las manchas proteicas marcadas con los fluorocromos Cy3, Cy5 y Cy2, se utilizaron las longitudes de onda de excitación/emisión 532 nm/580 nm, 633 nm/670 nm y 480 nm/520 nm, respectivamente, y un tamaño de píxel de 100  $\mu$ m. El análisis de las imágenes se llevó a cabo mediante los programas específicos ImageQuant v5.1 y DeCyder v6.5 (GE Healthcare).

El programa DeCyder v6.5 (GE Healthcare) se empleó para el análisis estadístico de los geles a través del análisis diferencial en gel (DIA del inglés, *Differential In gel Analysis*) y del análisis de la variación biológica (BVA del inglés, *Biological Variation Analysis*). Mediante el DIA las manchas proteicas son detectadas y cuantificadas en la serie de imágenes de un mismo gel bidimensional (imagen del estándar interno e imágenes de las muestras experimentales). Para ello se realiza la eliminación del fondo, la normalización de las señales correspondientes a la relación Cy3/Cy5 con la señal del estándar interno Cy2, y la

eliminación de cualquier artefacto presente en el gel. El BVA empareja las múltiples imágenes de los diferentes geles bidimensionales para proporcionar datos estadísticos de los niveles de abundancia proteica relativos. Las imágenes son emparejadas con una única imagen master (imagen con mayor número de manchas proteicas), identificando manchas proteicas comunes entre los geles.

Para reducir falsos positivos en el cálculo de la significación se aplicó la tasa de falsos descubrimientos (FDR del inglés, *false discovery rate*) (Karp y col., 2007). Además, se estableció que para denominar una proteína como diferencial, debía estar presente en el 75% de los geles procesados, que tuviera una variación de la abundancia de  $\pm 2$  y una significación de la prueba t de Student's menor de 0,05.

#### 5.1.1.5 Identificación de proteínas mediante MALDI-TOF/TOF

La identificación de manchas proteicas procedentes de los geles bidimensionales fue realizada por la Unidad de Proteómica del Parque Científico de Madrid en la Universidad Complutense de Madrid (PCM-UCM), miembro de la red científica ProteoRed (España). Para proceder a la extracción de las manchas proteicas primeramente se tiñó el gel con azul de Coomassie coloidal (Neuhoff y col., 1988) ya que a simple vista los fluorocromos no se ven. Las manchas se recortaron manualmente y se transfirieron a una placa multipocillo con 50  $\mu$ l de agua MilliQ para su posterior digestión mediante el protocolo descrito por Havlis y col. (2003). En resumen, las manchas se deshidrataron con acetonitrilo (ACN) al 75% y se secaron al vacío en un *Savant SpeedVac*. Las muestras se redujeron con 10 mM de DTT en 25 mM de bicarbonato de amonio durante 30 minutos a 56°C y posteriormente se alquilaron con yodoacetamida 55 mM en bicarbonato de amonio 25 mM durante 20 minutos en la oscuridad. Después, las muestras se digirieron con tripsina 12,5 ng/ml (Roche Molecular Biochemicals) en bicarbonato de amonio 25 mM (pH 8,5) durante una noche a 37°C. Tras la digestión, se recogieron los sobrenadantes y se depositó 1  $\mu$ l de estos en una placa específica para la ionización por desorción con láser asistido por matriz (MALDI) y se dejó secar al aire a temperatura ambiente. A continuación, se añadió a cada

pocillo 0,5 ml de matriz (3 mg/ml CHCA, Sigma-Aldrich) diluida en 3% de TCA-ACN/H<sub>2</sub>O en relación 1:1 v/v, y se dejó secar nuevamente al aire y a temperatura ambiente.

La identificación se realizó mediante huella peptídica o mediante fragmentación de péptidos utilizando un espectrómetro de masas MALDI-TOF/TOF (del inglés, MALDI *tandem time-of-flight mass spectrometer*) 4800 Proteomics Analyzer (Per-Septives Biosystems). El voltaje de aceleración empleado fue de 20.000 V y todos los espectros de masas se calibraron empleando péptidos de autodigestión de la tripsina. Se recurrió a la combinación de huella peptídica y fragmentación de péptidos en los casos en los que la huella peptídica no conducía a una identificación clara de la proteína.

Las identificaciones de proteínas se llevaron a cabo utilizando el motor de búsqueda MASCOT v1.9 (<http://www.matrixscience.com>). Los parámetros de búsqueda de las huellas peptídicas fueron: (1) especies: todas, (2) número permitido de divisiones perdidas: 1, (3) modificación fija: carbamidometil cisteína, (4) modificaciones variables: oxidación de metionina, (5) tolerancia al péptido:  $\pm 150$  ppm, (6) tolerancia de los iones fragmentados:  $\pm 0.3$  Da y (7) carga peptídica: +1. Solamente se consideraron las proteínas identificadas con un intervalo de confianza igual o mayor al 85% y cuya significancia fuese  $p < 0,05$ .

La base de datos de referencia utilizada para la identificación de proteína funcional fue UniProt (<http://www.uniprot.org>).

#### 5.1.1.6 Validación de las proteínas más relevantes

Tras la identificación proteica se ha procedido a la demostración fenotípica de la existencia de algunas de las proteínas diferenciales presentes en los proteomas. Para ello se evaluaron la respuesta al estrés, se comparó la motilidad y la susceptibilidad a la polimixina B de ambos aislados. Además, se secuenció el gen superóxido dismutasa (SOD) relacionado con la virulencia (Yamada y Wakabayashi, 1999).

✓ Respuesta al estrés:

Para poder determinar diferentes capacidades para sobrevivir a una situación de estrés de los dos aislados, se evaluó la resistencia al peróxido de hidrógeno

siguiendo el protocolo descrito por Dang y col. (2011) con algunas modificaciones. Se cultivaron las células en TSB durante 7 h a 25°C en agitación ( $OD_{600}$  de 0,5), a continuación se centrifugaron y se lavaron tres veces con tampón fosfato salino (PBS del inglés, *phosphate buffered saline*) y se resuspendieron en la misma solución hasta una densidad de  $10^8$  unidades formadoras de colonias (UFC) por ml. Diez microlitros de esta suspensión fueron inoculados en 1 ml de PBS como control y en 1 ml de PBS con  $H_2O_2$  4mM v/v; posteriormente se incubaron durante 1 h a 25°C. Tras esta incubación, 400  $\mu$ l de la suspensión se sembraron en placas de TSA, se incubaron a 25°C durante 32 h y se contabilizaron el número de UFCs.

✓ Motilidad:

A partir de un cultivo en medio sólido de los aislados ACC35.1 y NCIMB 2034, se inocularon mediante picadura tubos con el medio de movilidad descrito por He y col. (2012). A continuación, se incubaron a 30°C durante 24 h. Las diferencias se pueden observar mediante la turbidez del medio.

✓ Susceptibilidad a la polimixina B:

La concentración mínima inhibitoria (MIC del inglés, *minimun inhibitory concentration*) de los aislados ACC35.1 y NCIMB 2034 para la polimixina B se evaluó mediante microdilución en placas de 96 pocillos. Se ajustaron al tubo 0,5 de la escala McFarland los cultivos bacterianos crecidos en TSB tras 16 h a 25°C y se depositaron 200  $\mu$ l de estos en los pocillos de la placa. Las concentraciones de polimixina B que se emplearon fueron de 1,46 mg/ml a 0,0014 mg/ml; como control negativo se añadió PBS en uno de los pocillos. El crecimiento se evaluó mediante la densidad óptica a 600nm empleando el espectrofotómetro PerkinElmer Lambda 2 (Waltham).

✓ Secuenciación del gen SOD:

La extracción del ADN cromosómico se realizó a partir de cultivos puros de los dos aislados mediante la matriz InstaGeneMatrix (Bio-Rad) como ya hemos descrito en

el apartado 3.1.2.1. La amplificación se llevó a cabo con los cebadores SOD-F (5'-TCGCTGGAAGAGATCGTGAAGAG-3') y SOD-R (5'-TGAACGCGGCAAATGAGC-3') y siguiendo estas condiciones: 94°C durante 2 min, 35 ciclos de amplificación que consistieron en, 94°C (1 min), 56°C (1 min) and 72°C (1 min), y un último paso a 72°C durante 5 min. Las reacciones de secuenciación se realizaron en el servicio de secuenciación Stabvida DNA Lab (Portugal). Para el análisis de las secuencias se empleó el mismo software que el descrito en el apartado 3.1.2.2.

## 5.1.2 Tecnología TMT6plex™

### 5.1.2.1 Aislados y condiciones de crecimiento

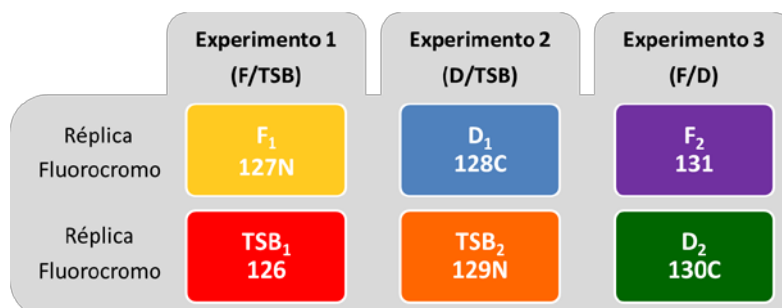
Para el análisis de los posibles factores de virulencia influenciados por la limitación de hierro en el medioambiente se seleccionó el aislado virulento de rodaballo *E. piscicida* ACC35.1. Se establecieron tres condiciones diferentes de cultivo: (1) en la condición control se utilizó el medio TSB, (2) en la condición de déficit de hierro se añadió el agente quelante 2,2'-dipiridil (Sigma) a una concentración final de 200 µM al medio TSB y (3) en la condición con exceso de hierro se añadió al medio TSB 20 µM de Fe<sub>3</sub>Cl. En todas las condiciones descritas, la cepa se incubó a 24°C con agitación hasta obtener una DO<sub>600</sub> de 0,8, momento en el que las células se sedimentaron por centrifugación a 4000 rpm durante 20 minutos a 4°C y los sedimentos celulares se congelaron a -80°C hasta la extracción de proteínas. Este proceso se repitió dos veces más para obtener tres réplicas biológicas independientes.

### 5.1.2.2 Extracción de proteínas, diseño experimental y marcaje

Las muestras se resuspendieron en tampón de lisis (urea 7M, tiourea 2M, CHAPS 4% v/p) suplementado con 1 mM de PMSF y al 1% p/v de una mezcla comercial de inhibidores de proteasas (*cOplete, Mini, EDTA-free Protease Inhibitor Cocktail Tablets* de Roche) en hielo. A continuación, las muestras se sonicaron, se centrifugaron y el sobrenadante se recogió como se describe en el apartado 5.1.1.2. A partir de este punto, los ensayos se

realizaron en la Unidad de Proteómica del Parque Científico de Madrid en la Universidad Complutense de Madrid (PCM-UCM) o en el Centro Nacional de Biotecnología (CNB-CSIC) ambos miembros de la red científica ProteoRed (España). La cantidad de proteínas se midió mediante el método colorimétrico *RC/DC protein assay* (BioRad). Cuarenta microgramos de proteína de cada condición se precipitaron mediante el método metanol/cloroformo a 4°C. Para ello se añadieron a las muestras 3 partes de metanol y una parte de cloroformo, se agitaron y se centrifugaron a 14.000 rpm durante 5 min. Se retiraron los sobrenadantes sin tocar la fase intermedia y se volvió a añadir 3 partes de metanol para que las proteínas de la interfase precipitasen, posteriormente se centrifugaron durante 10 min a 14.000 rpm y se retiraron los sobrenadantes dejando secar al aire el precipitado.

Los precipitados se resuspendieron y desnaturalizaron en una solución de 20 µl de hidrocloreuro de guanidina 6 M y HEPES 100 mM a pH 7,5 (SERVA *Electrophoresis*), se redujeron con 2 µl de tris (2-carboxietil) fosfina 50 mM (TCEP del inglés, *tris (2-carboxyethyl) phosphine*) (AB SCIEX) a pH 8,0 durante 60 minutos a 60°C. Seguidamente, se le añadieron 2 µl de metanosulfonato de metilo 200 mM (MMTS, del inglés *methyl methanethiosulfonate*) (Pierce) como reactivo bloqueante de la cisteína y se incubaron durante 10 minutos a temperatura ambiente. El volumen de las muestras se igualó a 120 µL para reducir la concentración de guanidina con TEAB 50 mM. Las digestiones se iniciaron agregando 3 µL (1 µg/µL) de tripsina (Sigma-Aldrich) a cada muestra en una proporción de 1:20 (p/p) y se incubaron a 37°C durante la noche en agitación. Las muestras digeridas se evaporaron en un concentrador de vacío. Antes del marcaje, se realizó un esquema del diseño experimental (Figura 25).

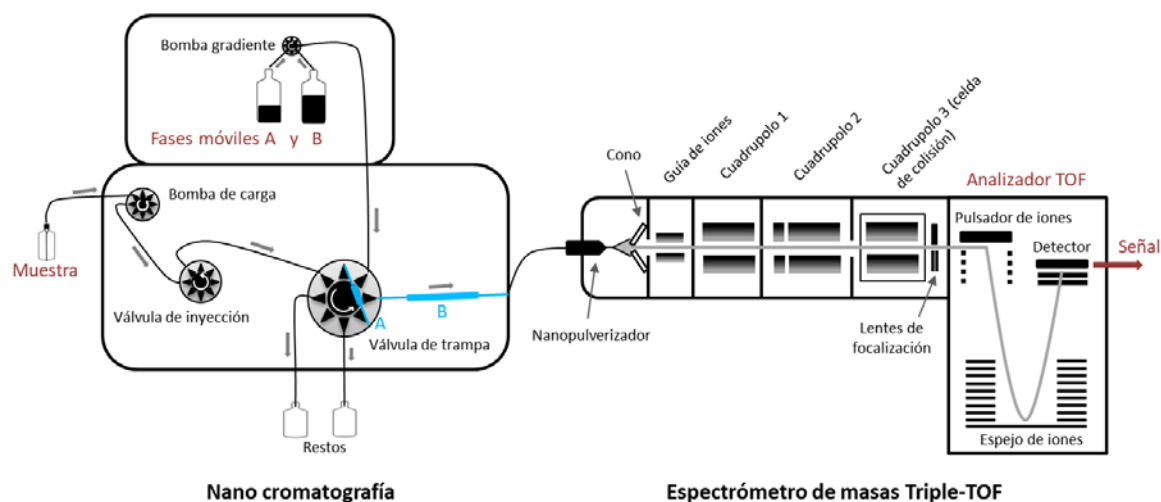


**Figura 25.** Diseño experimental para el análisis del proteoma mediante TMT6plex™. F, exceso de hierro; TSB, caldo tripticosa-soja; D, déficit de hierro. Figura original.

Inmediatamente antes del uso, los reactivos de TMT se equilibraron resuspendiéndolos en 42  $\mu\text{l}$  de acetonitrilo anhidro (ACN) y mezclándolos mediante agitación hasta su completa disolución. Posteriormente, se añadió 42  $\mu\text{l}$  de ACN por cada 100  $\mu\text{g}$  de muestra y se dejaron hidratar dos horas a temperatura ambiente. Después de la incubación, las reacciones se inactivaron incubándolas durante 15 min tras añadir 8  $\mu\text{l}$  de hidroxilamina al 5%. Finalmente, las muestras se mezclaron en cantidades iguales de péptido, se les incorporó 100  $\mu\text{l}$  de ACN al 50%, se evaporaron en un concentrador de vacío y se guardaron a  $-20^{\circ}\text{C}$  para su posterior uso.

### 5.1.2.3 Identificación de proteínas mediante cromatografía líquida y espectrofotómetro de masas (LC/MC)

Una alícuota de 1,5  $\mu\text{g}$  de cada fracción de péptido se sometió a análisis 2D-nano LC-ESI-MS/MS (del inglés, *Liquid Chromatography-ElectroSpray Ionization-tandem Mass Spectrometry*) usando un sistema de nano cromatografía (Eksigent Technologies nanoLC Ultra 1D plus, AB SCIEX) acoplado a un espectrómetro de masas Triple-TOF 5600 de alta velocidad con una fuente *Nanospray III* (AB SCIEX) (Figura 26). La columna analítica que se utilizó fue una columna de fase inversa basada en sílice C18 ChromXP 75  $\mu\text{m}$   $\times$  15 cm (*Eksigent Technologies*, AB SCIEX), cuyo tamaño de partícula y tamaño de poro es de 3  $\mu\text{m}$  y 120 Å respectivamente. Conectada en línea con la columna analítica, se empleó una columna de trampa C18 ChromXP (*Eksigent Technologies*, AB SCIEX), con el mismo diámetro de partícula y tamaño de poro. La bomba de carga suministró una solución de ácido fórmico al 0,1% diluido en agua a una velocidad de 2  $\mu\text{l}/\text{min}$ , mientras que, la nano bomba proporcionó un caudal de 300  $\text{nL}/\text{min}$  y funcionando en condiciones de elución en gradiente usando ácido fórmico al 0,1% diluido en agua como fase móvil A y ácido fórmico al 0,1% diluido en acetonitrilo como fase móvil B. Esta elución se realizó durante 120 min variando de 2 a 90% la fase móvil B.



**Figura 26.** Esquema de la estructura de un sistema de nanocromatografía conectado a un analizador triple-TOF. A) columna de trampa C18 ChromXP, B) columna analítica C18 ChromXP. Figura original.

Tras este proceso, los péptidos se analizaron por un sistema TripleTOF 5600 (AB SCIEX) con las siguientes condiciones: voltaje de pulverización iónica flotante (ISVF) a 2800 V, cortina de gas (CUR) 20, temperatura del calentador de interfaz (IHT) 150, fuente de iones en gas 1 (GS1) 20 y potencial de desagregación (DP) 85 V. Los resultados obtenidos fueron procesados mediante el programa informático Analyst TF 1.5 (AB SCIEX) empleando el modo de adquisición independiente de la información (IDA del inglés, *information-dependent acquisition*). Para esta adquisición se eligieron los parámetros del ciclo: un paso inicial de escaneado de 0,25 s mediante *MS survey scan* en el rango de masa 350-1250 Da, seguido 30 escaneados de 150 ms mediante MS/MS de rango de masa de 100-1800 (tiempo total del ciclo: 4,04 s). Los criterios de conmutación (del inglés, *switching criteria*) que se establecieron para la selección de los iones fueron: un intervalo de 1350-250 para la relación  $m/z$  con un estado de carga de 2-5 y, un umbral de abundancia mayor a 90 eventos por segundo (cps).

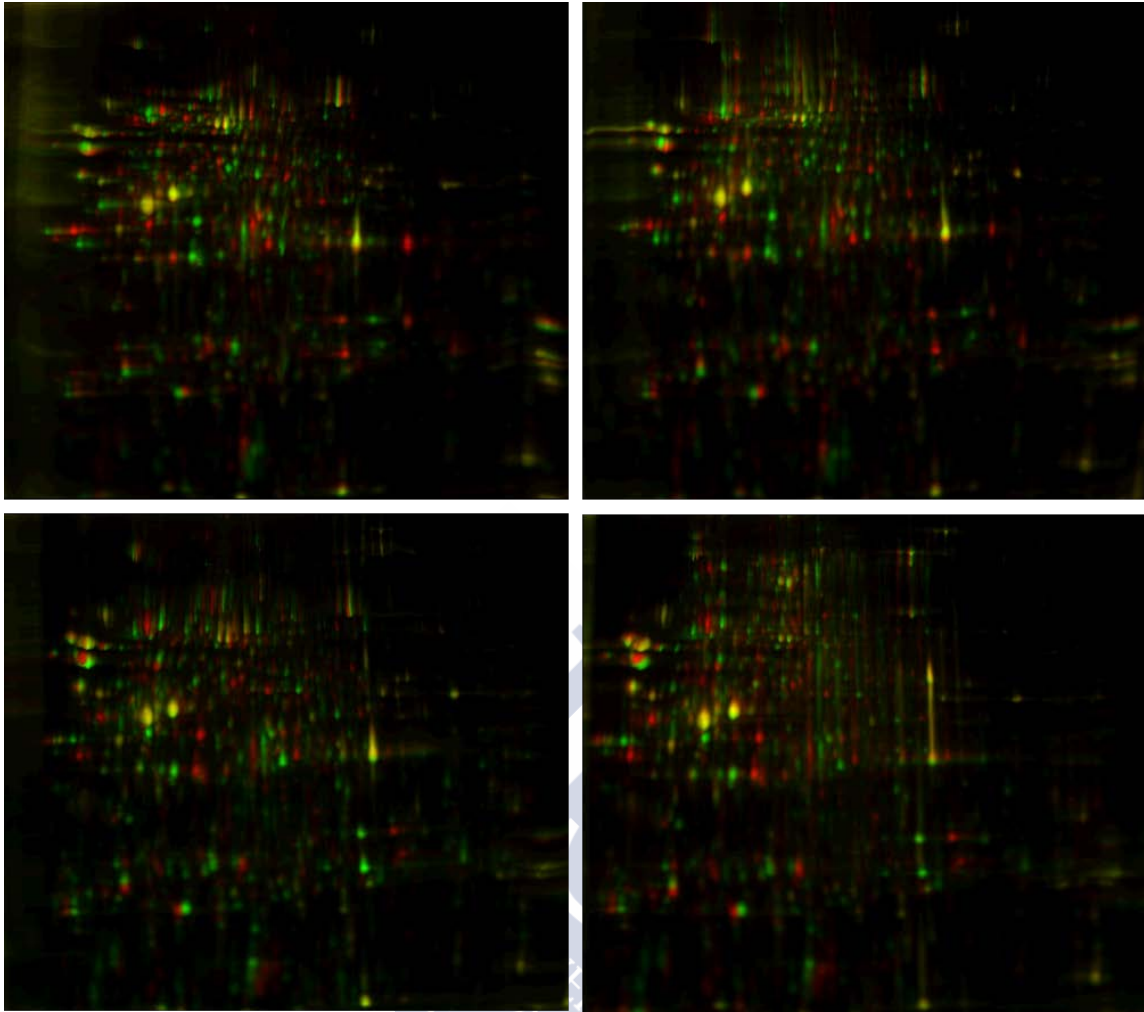
Los espectros MS/MS se exportaron al formato *mgf* usando el programa *Peak View* v1.2.0.3 y se buscaron coincidencias entre las 33175 secuencias de péptidos de *Edwardsiella piscicida* (actualizado a mayo de 2015) almacenadas en la base de datos NCBI nr, utilizando los programas OMSSA 2.1.9, X! TANDEM 2013.02.01.1, Myrimatch 2.2.140 y MS-GF+ (Beta v10072). Los motores de búsqueda se configuraron para que

coincidan con posibles candidatos peptídicos con tolerancia al error en la masa de 25 ppm y tolerancia iónica de fragmentos de 0,02 Da. Los modelos de distribución se usaron para calcular los valores de identificación significativos a nivel de péptido (Ramos-Fernández y col., 2008) y los espectros recuperados con una tasa de error (FDR) menor o igual a 0,01 se seleccionaron para el análisis cuantitativo. Aproximadamente el 5% de las señales de baja calidad se eliminaron antes de un análisis completo. La regulación diferencial se midió utilizando modelos lineales (López-Serra y col., 2014), y la significación estadística se midió utilizando valores  $q$  (FDR). Todos los análisis estadísticos se realizaron con el programa Proteobotics (Madrid, España).

## 5.2 RESULTADOS

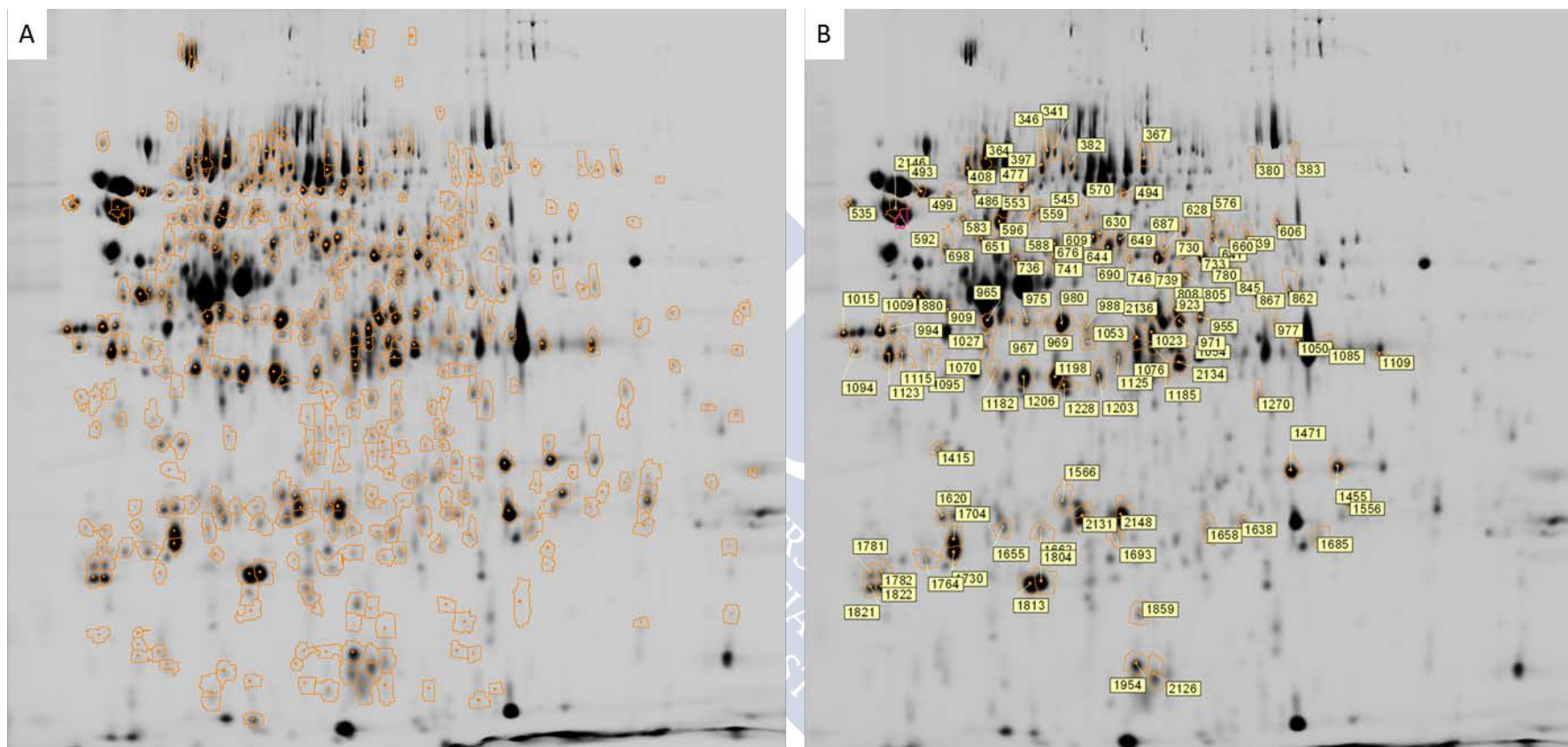
### 5.2.1 Tecnología 2D-DIGE

Tras realizar el emparejamiento de las manchas de forma automática con el programa DeCyder v6.5, se repasa y/o modifica aquellos emparejamientos que no se hayan realizado correctamente. Se obtuvieron una media de 1977 manchas proteicas por gel (Figura 27) y un total de 2148 en el gel de referencia empleado para los posteriores análisis.

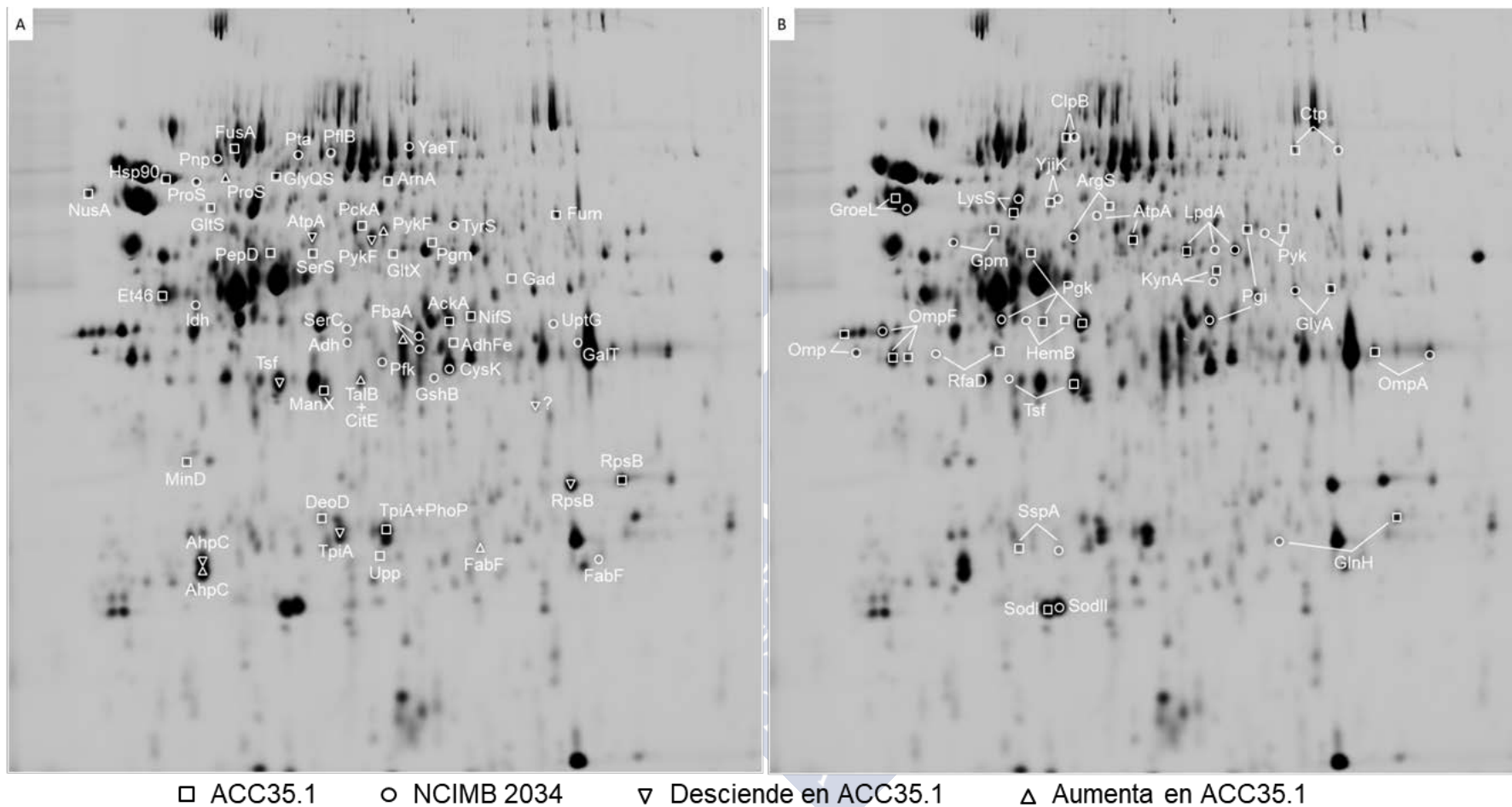


**Figura 27.** Imágenes obtenidas del programa DeCyder de la pareja de fluorocromos Cy3/Cy5 de los 4 geles DIGE. En verde y rojo aparecen los puntos proteicos diferenciales mientras que los puntos amarillos se corresponden con las manchas comunes entre el aislado ACC35.1 y la cepa NCIMB 2034. Figura original.

Aplicando los criterios mencionados en materiales y métodos a los 2148 puntos, se obtuvieron un total de 373 manchas cuya variación de su abundancia fue significativa (Figura 28A). Estos puntos fueron sometidos al análisis MALDI-TOF/TOF y solamente 103 puntos proteicos (Figura 28B) fueron correctamente identificados (Figura 29 y, Tablas 27 y 28).



**Figura 28.** Imagen representativa del gel de referencia 2D teñido con azul de coomasie. A) las formas naranjas delimitan los puntos proteicos de expresión diferencial significativa B) manchas proteicas identificadas por MALDI-TOF/TOF, las etiquetas muestran el número identificativo de los puntos. Figura modificada de Buján y col. 2015, permiso cedido por la editorial Elsevier.



**Figura 29.** Imagen representativa del gel de referencia 2D teñido con azul de coomasie. A) Proteínas diferenciales detectadas de forma individual en cada aislado y las proteínas comunes cuya abundancia pudo ser comparada b) Proteínas asignadas manualmente como comunes entre los aislados ACC35.1 y NCIMB 2034. Figura modificada de Buján y col. 2015, permiso cedido por la editorial Elsevier.

Tabla 27. Manchas proteicas con expresión diferencial entre el aislado ACC35.1 y la cepa NCIMB 2034 (ACC35.1 vs. NCIMB2034).

Nº <sup>a</sup>	Código UniProt <sup>b</sup>	Abrev. proteica	Nombre de la proteína	Ratio prom. <sup>c</sup>	t-test <sup>c</sup>	M <sub>r</sub> <sup>d</sup>	pI <sup>d</sup>	Punt. <sup>d</sup>	Nº de pept <sup>d</sup>	% Cov <sup>d</sup>
<b>Procesos metabólicos</b>										
<i>Metabolismo de aminoácidos</i>										
736*	D0ZDD2	PepD	<b>MIX</b> Aminoacil-histidina dipeptidasa K.GIHAERDAVGNILLR.K (41) R.FLAGHADELGAR.V (106) R.VTVDAAQSALLPLDAASQSR.F (107)	-2,63	0,0078	51,97	5,25	324	16/70	28
977	D4F689	CitE	Cistationina beta liasa	10,42	1,3E-05	38,52	6,35	179	19/65	66
955*	D0ZD86	NifS	Cisteína desulfurasa	-8,66	5,5E-05	45,03	5,99	206	27/65	59
2134	D4F3E7	CysK	Cisteína sintasa A	26,72	4,3E-05	34,10	5,94	326	32/65	91
780*	D0ZDS2	GadB2	Glutamato descarboxilasa	-10,15	5,5E-05	52,39	5,97	99	17/65	39
1185	MOQA14	GshB	Glutatió sintasa	7,01	0,00012	35,54	5,8	175	23/65	69
988	D4F722	SerC	Fosfoserina transaminasa	4,56	3,1E-05	40,47	5,44	145	18/65	44
<i>Metabolismo de carbohidratos</i>										
971*	D0ZAZ8	AckA	Acetato quinasa	-4,58	5,2E-05	43,45	5,78	154	21/65	57
1053	D4F0B2	Adh	Alcohol deshidrogenasa dependiente de NADP	3,31	6,7E-06	44,31	5,34	105	15/65	38
1054*	D0Z9Z7	AdhFe	Alcohol deshidrogenasa con hierro R.FAEGLLQTLIEEGPR.A (76) R.ALQEPENYGV.R.A (66) R.VWNIHSGSDEQR.I (65)	-2,18	0,0021	42,61	5,73	310	19/70	46
367	D4F726	PflB	Formato acetiltransferasa	7,59	0,00012	85,45	5,71	183	30/65	36
1023	D4F1S7	FbaA	Fructosa-bisfosfato aldolasa K.IFDVFKPGVISGDDVQK.V (57) K.LLPWLDGLLDAGEK.H (73)	25,19	4,8E-05	41,36	5,75	220	14/72	38
1076	F0LWK4	FbaA	Fructosa-bisfosfato aldolasa M.SKIFDFVKPGVISGDDVQK.V (112)	7,48	0,00035	38,80	4,92	138	6/68	15
2136▲	D0ZEE4	FbaA	Fructosa-bisfosfato aldolasa	-11,9	5,5E-05	39,40	5,65	141	16/65	53
397	MOQ6L6	Pta	Fosfato acetiltransferasa	9,1	9,9 E-05	78,36	5,36	287	65/269	68
687*	D0ZCA1	Pgm	Fosfoglucomutasa, α-D-glucosa-fosfato	-11,35	1,4E-05	59,27	5,88	202	26/65	43
630*	D0ZG10	PckA	Fosfoenol piruvato carboxiquinasa	-2,06	0,00094	59,37	5,55	110	15/65	29
1125	D4FAR3	PfkA	Fosfofructoquinasa	5,06	0,0016	35,17	5,6	144	21/65	50

Nº <sup>a</sup>	Código UniProt <sup>b</sup>	Abrev. proteica	Nombre de la proteína	Ratio prom. <sup>c</sup>	t-test <sup>c</sup>	M <sub>r</sub> <sup>d</sup>	pI <sup>d</sup>	Punt. <sup>d</sup>	Nº de pept <sup>d</sup>	% Cov <sup>d</sup>
1228*	D0Z711	ManX	Subunidad IIAB transportadora de manosa del sistema PTS	-10,84	3,9 E-05	35,03	5,4	118	23/152	66
644▼	D0Z8B8	PykF	Piruvato quinasa	6,03	0,0001	50,90	5,62	156	21/65	52
649▲	D0Z8B8	PykF	Piruvato quinasa	-11,05	0,00015	50,90	5,62	210	26/65	56
1203#	D0ZC16	TalB	<b>MIX</b> Transaldolasa	-6,92	3,3E-06	35,04	5,61	266	25/65	70
2131▼	D4FAR2	TpiA	Triosa-fosfato isomerasa	8,03	5,5E-05	26,10	5,36	112	13/65	52
2126*	D0ZGV9	TpiA	Triosa-fosfato isomerasa	-10,88	5,6E-05	26,75	5,62	120	12/44	46
2148*	D0ZGV9	TpiA	<b>MIX</b> Triosa-fosfato isomerasa	-13,17	6,7E-06	26,75	5,62	156	17/65	58
1050	D4F8D4	GalT	UTP-hexosa-1-fosfato uridiltransferasa	2,58	1,4E-05	39,86	6,49	123	19/65	52
<i>Metabolismo de lípidos</i>										
1658▲	D0Z9F8	FabG2	3-oxoacil-(proteína portadora del grupo acil) reductasa	-3,86	0,00032	25,73	6,63	90	13/65	51
1685	D4F6U3	FabG2	3-oxoacil-(proteína portadora del grupo acil) reductasa R.GITVNVVAPGFIETDMTR.A (150) R.SGILAEVPAGR.L (45)	19,75	4,8E-05	25,69	6,63	247	11/70	43
494*	D0ZG82	ArnA	Proteína de resistencia a la polimixina bifuncional ArnA	-10,99	0,00071	74,29	5,62	223	25/45	45
<i>Ciclos de los ácidos tricarbóxicos</i>										
1203#	D4F097	CitE	<b>MIX</b> Subunidad β de la citrato (pro-3S) liasa	-6,92	3,3E-06	31,15	5,14	96	11/65	48
606*	D0Z9H3	Fum	Subunidad hidro-liasa de la subfamilia de tartrato/fumarato de tipo Fe-S beta	-7,78	0,0026	60,09	6,44	232	26/65	54
909	D4F6P2	Icd	Isocitrato dehidrogenasa R.ENAEDIYAGIEWK.A (44)	16,71	4,8E-05	42,49	5,35	123	14/70	34
<i>Respuesta al estrés y procesamiento proteico</i>										
493*	D4F335	HtpG	Proteína 90 de choque térmico	-4,42	0,0016	71,26	4,96	267	30/65	50
408	D4F0T4	Pnp	Polirribonucleótido nucleotidiltransferasa	24,34	2,1E-05	77,27	5,25	159	25/65	34
<i>Síntesis de proteínas</i>										
1455*	D0ZCV1	RpsB	Proteína 30S ribosomal	-29,31	1E-05	26,28	6,61	174	21/65	80
1471▼	D4F2F9	RpsB	Proteína 30S ribosomal	9,96	0,00011	26,83	6,33	161	21/65	84
364*	D0ZFW5	FusA	Factor de elongación G	-37,36	5,5E-05	77,52	5,17	423	44/65	73
1206▼	D4F2G0	Tsf	Factor de elongación Ts	11,02	4,8E-05	30,78	5,35	203	26/65	65
746*	D0Z30	GltX	Glutamato-ARNt ligasa	-9,19	0,00062	53,86	5,64	289	31/65	57
477*	D0Z8K3	GlyS	Glicina- ARNt ligasa	-5,01	0,00052	76,28	5,39	256	29/65	46
486▲	D0ZBZ4	ProS	Prolina- ARNt ligasa	-7,52	5,5E-05	63,39	5,17	237	27/65	51

Nº <sup>a</sup>	Código UniProt <sup>b</sup>	Abrev. proteica	Nombre de la proteína	Ratio prom. <sup>c</sup>	t-test <sup>c</sup>	M <sub>r</sub> <sup>d</sup>	pI <sup>d</sup>	Punt. <sup>d</sup>	Nº de pept <sup>d</sup>	% Cov <sup>d</sup>
499	D4F1C3	ProS	Prolina- ARNt ligasa	13,28	5,5E-05	63,73	5,03	170	22/65	41
741*	D0ZA17	SerS	Serina- ARNt ligasa	-4,38	5,1E-05	48,96	5,4	182	25/65	51
535*	D0ZB73	NusA	Proteína de elongación de la transcripción NusA	-4,6	0,00051	54,85	4,57	133	19/65	34
628	D4F5Q0	TyrS	Tirosina- ARNt ligasa R.LVHGAEGLQAAQR.I (49) R.LVHGAEGLQAAQR.I (25)	7,84	6E-05	15,82	5,06	103	6/69	34
<i>Biogénesis de componentes celulares</i>										
1415*	D0ZH27	MinD	Proteína determinante del sitio del septo MinD K.KTVVIDFDIGLR.N (16) R.TENLFILPASQTR.D (77) R.AENGDDPIKEHLLLR.Y (44)	-10,9	3,3E-06	29,80	4,98	223	16/69	44
<i>Defensa celular y virulencia</i>										
880*	Q3V737	Et46	Proteína antigénica Et 46	-65,28	9,7E-06	43,77	5,2	142	17/65	49
1704▼	M0QAN3	AhpC	Antioxidante, familia AhpC/TSA	2,11	0,00035	22,41	5,12	160	18/65	81
1730▲	D0ZE70	AhpC	Antioxidante, familia AhpC/TSA	-15,19	4E-05	22,41	5,12	159	17/65	78
<i>Membrana celular y transporte</i>										
382	D4F2G9	YaeT	Proteína de membrana externa, complejo Bam (YaeT)	4,68	0,00022	88,19	5,69	255	30/65	41
676▼	D4FAY6	AtpA	Subunidad α de la ATP sintasa tipo FOF1	3,55	0,0035	55,36	5,43	142	21/65	38
<i>Transducción de señal</i>										
2148*	D0Z9B8	PhoP	<b>MIX</b> Regulador de transcripción dependiente del ADN, familia de hélice alado (WH)	-13,17	6,7E-06	25,55	5,62	155	17/65	74
<i>Metabolismo de purinas y pirimidinas</i>										
583*	D0ZHD1	GlnA	Glutamina sintasa K.GGYFPVPPVDSAQDIR.S (85)	-8,31	1,4E-05	51,87	5,15	135	16/70	30
1566*	D0ZBF8	DeoD	Purina nucleósido fosforilasa tipo DeoD K.HIAETFLQDVR.Q (91) R.FKDNDFAAIADFDMMVR.N (93)	-4,74	5,5E-05	26,39	5,4	252	14/67	48
1693*	D0ZEX8	Upp	Uracil fosforribosiltransferasa	-17,98	3,4E-05	22,69	5,65	127	15/65	64
<i>Otras</i>										
1270▼	D4F9M4	?	Proteína hipotética conservada	59,03	5,1E-05	34,99	8,43	112	17/65	43

<sup>a</sup>Número de mancha en el gel, <sup>b</sup>Código de Uniprot, <sup>c</sup>Ratio promedio y test t de Student, <sup>d</sup>Masa molecular experimental, punto isoelectrico, puntuación de identificación y porcentaje de cobertura. X\* proteína detectada en ACC35.1, X proteína detectada en NCIMB2034. X▲ proteínas detectadas en ambas cepas que aumenta en ACC35.1. X▼ proteínas detectadas en ambas cepas que disminuye en ACC35.1. X# mancha proteica detectada en ambas de la cual se han identificado dos proteínas diferentes. ? abreviatura proteica desconocida

Tabla 28. Manchas proteicas identificadas con expresión diferencial reasignadas a la categoría de comunes manualmente (ACC35.1 vs. NCIMB2034).

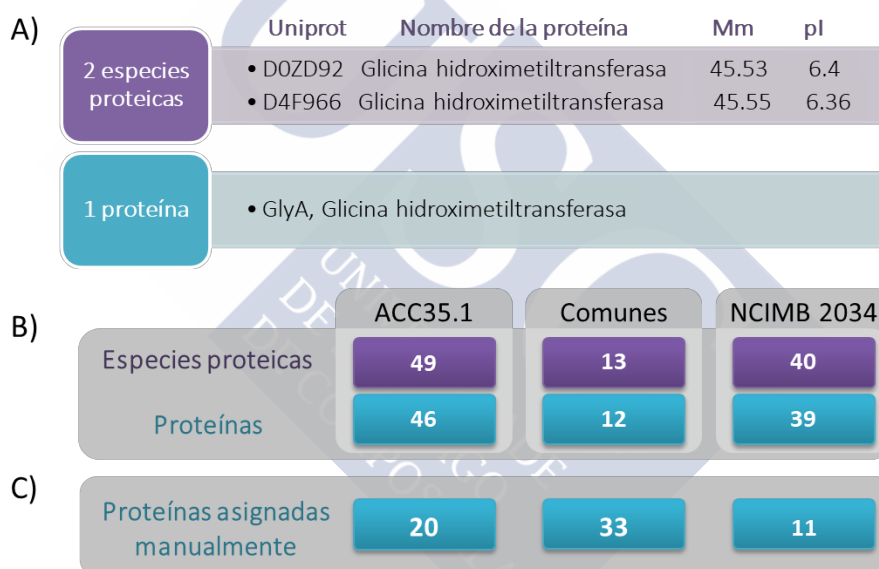
Nº <sup>a</sup>	Código UniProt <sup>b</sup>	Abrev. proteica	Nombre de la proteína	Ratio prom. <sup>c</sup>	t-test <sup>c</sup>	M <sub>r</sub> <sup>d</sup>	pI <sup>d</sup>	Punt. <sup>d</sup>	Nº de pept <sup>d</sup>	% Cov <sup>d</sup>
<b>Procesos metabólicos</b>										
<i>Metabolismo de aminoácidos</i>										
862*	D0ZD92	GlyA	Glicina hidroximetiltransferasa	-10,75	0,0009	45,53	6,4	125	19/65	42
867	D4F966	GlyA	Glicina hidroximetiltransferasa	20,82	5,9E-05	45,55	6,36	188	26/65	43
805*	D0ZDI3	TnaA	Triptofano 2,3-dioxygenasa	-5,08	0,00046	53,30	5,88	194	24/65	45
808	D4F902	TnaA	Triptofano 2,3-dioxygenasa	2,15	0,0031	53,28	5,84	90	13/65	28
<i>Metabolismo de carbohidratos</i>										
1070*	D0Z956	RfaD	ADP-gliceromano-heptosa-6-epimerasa	-5,66	0,00013	35,03	5,12	110	20/65	50
1095	D4F9R1	RfaD	ADP-gliceromano-heptosa-6-epimerasa	3,91	0,00068	35,15	4,92	143	16/65	38
730	D4F283	LpdA	Dihidrolipoil deshidrogenasa R.CADLGLTVIVER.Y (30) K.ALAEHGIVFGEPK.T (49)	5,59	0,00017	50,93	5,91	131	12/68	22
733	D4F283	LpdA	Dihidrolipoil deshidrogenasa	10,1	8,1E-05	50,93	5,91	274	30/65	64
739*	E0T9L0	LpdA	Dihidrolipoil deshidrogenasa	-18,73	7,6E-06	51,04	5,72	312	31/65	57
641*	D0Z9W1	Pgi	Glucose-6-fosfato isomerasa R.DWFLQAAGDER.H (60) R.ILPELEDAQPVR.S (57)	-7,87	0,00015	61,57	6,03	285	25/69	40
923	D4F076	Pgi	Glucose-6-fosfato isomerasa	2,25	5,3E-05	61,56	5,74	163	22/65	38
736*	C5BAU6	Pgk	<b>MIX</b> Fosfoglicerato quinasa R.LAKDYLDGVDVAQGLVLENVR.F (75) K.KLPAVVMLEER.A (5)	-2,63	0,0078	41,07	5,45	156	14/70	34
965	D4F1S8	Pgk	Fosfoglicerato quinasa K.DYLDGVDVAQGLVLENVR.F (16) K.KLLTTCPIPPTDVR.V (82) K.LLTTCPIPPTDVR.V (62) K.KLPAVVMLEER.A (90)	32,51	3,9E-05	41,70	5,27	502	20/70	42
975*	C5BAU6	Pgk	Fosfoglicerato quinasa	-6,39	0,0006	41,07	5,45	112	14/65	45
980*	D0ZEE5	Pgk	Fosfoglicerato quinasa	-87,09	3,9E-05	41,08	5,33	154	20/65	47
651*	D0ZH99	Gpm	Fosfoglicerato mutasa K.GEFHADNAIDGLQAAAYAR.G (58) R.GENDEFVKPTVIR.A (87) R.AFVNADFDGFAR.R (56)	-22,28	0,0001	56,29	5,2	274	16/71	25
698	D4FAS5	Gpm	Fosfoglicerato mutasa	10,23	3,3E-06	56,26	5,08	97	16/65	30

Nº <sup>a</sup>	Código UniProt <sup>b</sup>	Abrev. proteica	Nombre de la proteína	Ratio prom. <sup>c</sup>	t-test <sup>c</sup>	M <sub>r</sub> <sup>d</sup>	pI <sup>d</sup>	Punt. <sup>d</sup>	Nº de pept <sup>d</sup>	% Cov <sup>d</sup>
639*	D0ZH12	Pkm	Piruvato quinasa	-23,06	1,2E-05	51,85	6,3	107	18/37	37
660	D4F4C7	Pkm	Piruvato quinasa R.LNFSGSAEDHQLR.A (38) R.HVAILGDLQGP.K.I (92) R.CGEDLNYAR.R (33) R.GDLGVEIGDPELVGIQK.A (82)	3,85	0,00031	52,88	6,15	294	16/69	23
<i>Respuesta al estrés y procesamiento proteico</i>										
383	D4F5U5	Prc	Proteasa carboxi-terminal	13,97	5,6E-05	76,23	6,61	147	22/65	35
380*	D0Z7S7	Prc	Proteasa carboxi-terminal	-14,59	0,00014	71,24	6,72	212	28/65	43
592	D4F0J3	GroL	Chaperonina 60 kDa	4,59	5,6E-05	57,45	4,84	250	28/65	52
2146*	D0ZAK2	GroL	Chaperonina 60 kDa	-5,75	4,8E-05	57,51	4,82	316	32/65	67
341	D4F1D3	ClpB	Proteína de choque térmico de la familia	4,53	9,5E-06	95,48	5,46	266	34/65	41
346*	D0ZDN3	ClpB	Proteína de choque térmico de la familia	-4,07	0,0017	95,50	5,44	303	37/65	44
1655*	D0ZBF8	DeoD	Proteína de condiciones de restricción A	-13,5	0,0003	24,52	5,34	166	21/65	65
1662	MOQCE8	DeoD	Proteína de condiciones de restricción A	14,61	3,1E-05	24,52	5,34	170	19/65	68
<i>Síntesis de proteínas</i>										
1182	C5BHB7	Tsf	Factor de elongación Ts	2,53	0,00012	30,69	5,44	87	14/65	32
1198*	D0ZCV2	Tsf	Factor de elongación Ts	-31,54	3,3E-06	30,69	5,44	198	24/65	70
570*	D0ZGZ1	ArgS	Arginina-ARNt ligasa	-9,85	5,5E-05	63,54	5,49	190	26/65	36
588	D4F498	ArgS	Arginina-ARNt ligasa	3,95	0,0017	63,80	5,37	152	21/65	34
553	D4F1N9	LysS	Lisina- ARNt ligasa	5,2	0,00069	48,20	5,14	186	22/65	50
596*	D0ZDX8	LysS	Lisina- ARNt ligasa	-7,23	4E-05	57,97	5,22	279	31/65	62
<i>Defensa celular y virulencia</i>										
1804	QOPD83	SodBII	Superoxido dismutasa ligada al hierro M.SFELPALPYAK.N (95) K.GSEFEGKSLEIHK.T (29)	6,86	0,00023	17,93	5,38	152	6/69	35
1813*	QOPD76	SodBI	Superoxido dismutasa ligada al hierro R.GALADAINAAGSFAAFKDALTK.S (63) K.SAVGNFGSGWTWLVK.K (117)	-7,91	4E-05	17,90	5,55	260	10/71	77
<i>Cell membrane and transport</i>										
545	D4F1B5	YjJK	Transportador ABC, proteína de unión al ATP YjJK	2,48	0,00038	61,45	5,34	160	21/65	40
559*	D0ZBY7	YjJK	Transportador ABC, proteína de unión al ATP YjJK	-2,82	4,4E-05	62,13	5,32	267	29/65	49

Nº <sup>a</sup>	Código UniProt <sup>b</sup>	Abrev. proteica	Nombre de la proteína	Ratio prom. <sup>c</sup>	t-test <sup>c</sup>	M <sub>r</sub> <sup>d</sup>	pI <sup>d</sup>	Punt. <sup>d</sup>	Nº de pept <sup>d</sup>	% Cov <sup>d</sup>
1556*	D0Z7G2	GlnH	Proteína de unión al sustrato del transportador ABC de aminoácidos	-27,95	3,2E-05	27,56	8,94	183	18/65	69
1638	D4F4P8	GlnH	Proteína de unión al sustrato del transportador ABC de aminoácidos	36,06	5,6E-05	27,68	8,94	179	17/65	63
609	D4FAY6	AtpA	Subunidad $\alpha$ de la ATP sintasa tipo F0F1	8,5	0,00045	55,30	5,59	117	19/65	29
690*	D0ZHG9	AtpA	Subunidad $\alpha$ de la ATP sintasa tipo F0F1	-43,72	5,3E-05	55,30	5,59	312	33/65	59
1015*	Q8GF10	Omp	Proteína de membrana externa	-12,43	0,00033	47,28	5,27	88	12/65	29
1094	D4F5B2	Omp	Proteína de membrana externa K.FGNYGSIDYGR.N (90)	35,57	0,00034	41,42	4,65	96	3/71	4
1085*	D0ZFS8	OmpA	Proteína de membrana externa A	-5,11	0,00045	38,03	7,66	168	20/65	50
1109	D4FAY6	OmpA	Proteína de membrana externa A	61,65	0,0004	38,74	8,9	180	21/65	43
1009	M4TKJ8	OmpF2	Porina de membrana externa F K.FADYGSIDYGR.N (59)	42,85	0,0001	39,92	5,03	72	4/68	11
1115*	D0ZFQ0	OmpF2	Porina de membrana externa F K.FTSDKSDDGDHTYAR.F (55) K.FADYGSIDYGR.N (87)	-33,69	7,6E-06	40,05	5,03	197	11/69	22
1123*	D0ZFQ1	OmpF2	Porina de membrana externa F	-98,54	9,7E-06	40,05	5,03	125	14/65	47
<i>Others</i>										
967	D4F9Y9	HemB	Porfobilinógeno sintasa K.SLYAEEAYNADGLVQR.A (74) R.VAQWLHDAEMNR.- (39)	4,15	6,7E-05	32,54	4,85	193	17/69	40
969*	D0Z9R1	HemB	Porfobilinógeno sintasa M.SYAFPGAFPGR.R (75) K.SLYAEEAYSSDGLVQR.A (129) K.YASCYYPFR.D (20) R.VAQWLHDAEMTR.- (40) R.VAQWLHDAEMTR.- (23)	-8,04	3,8E-05	37,60	5,37	372	21/71	51

<sup>a</sup>Número de mancha en el gel, <sup>b</sup>Código de Uniprot, <sup>c</sup>Ratio promedio y test *t* de Student, <sup>d</sup>Masa molecular experimental, punto isoeléctrico, puntuación de identificación y porcentaje de cobertura. X\* proteína detectada en ACC35.1, X proteína detectada en NCIMB2034.

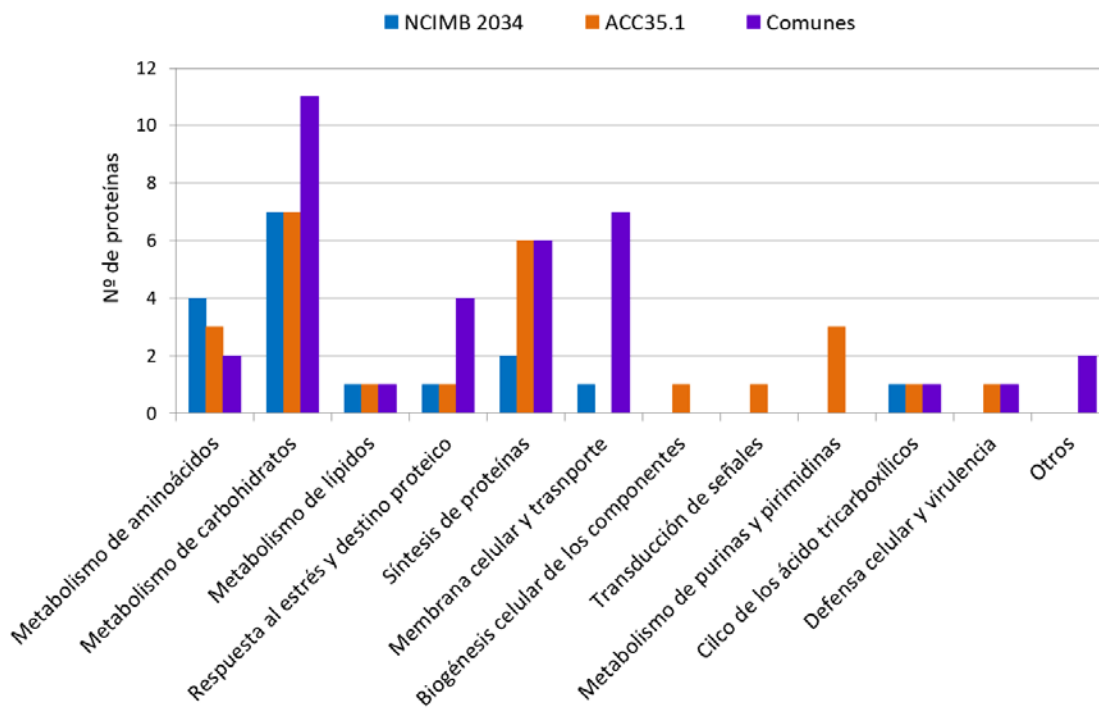
Mediante la base de datos UniProt se analizaron estos 103 puntos que se correspondieron con 102 especies proteicas (mismo nombre de la proteína, pero diferente número identificativo en UniProt, masa molecular y/o punto isoeléctrico) o 97 proteínas (mismo nombre de la proteína, ejemplo en Figura 30A). Si pormenorizamos en los números, se detectaron 49 especies proteicas en exclusiva en el aislado ACC35.1, 40 solamente en la cepa NCIMB 2034 y 13 fueron detectadas en ambas (Figura 30B). Tras el análisis manual de la identificación proteica, observamos que proteínas detectadas exclusivamente por el programa informático en el aislado ACC35.1, aparecen también en la cepa NCIMB 2034 y viceversa. Debido a este hecho, el número de proteínas exclusivas de cada aislado disminuyó mientras que el número de proteínas comunes aumentó (Figura 30C).



**Figura 30.** Figura resumen de los resultados obtenidos por 2D-DIGE. A) ejemplo de la definición de especies proteicas y proteína B) número de especies proteicas y su equivalente en proteínas de cada aislado y comunes C) número de proteínas reasignadas manualmente. Mm, masa molecular experimental; pI, punto isoeléctrico. Figura original.

En términos generales, las proteínas diferenciales se clasificaron en 12 categorías funcionales de acuerdo con los procesos biológicos: metabolismo de aminoácidos, metabolismo de carbohidratos, metabolismo de lípidos, ciclo de los ácidos tricarboxílico, respuesta al estrés y destino proteico, síntesis de proteínas, biogénesis de componentes celulares, defensa celular y virulencia, membrana celular y transporte, transducción de

señales, metabolismo de purinas y pirimidinas y, otros. La mayoría de las proteínas de la cepa no virulenta NCIMB 2034 están involucradas en procesos metabólicos (metabolismo de aminoácidos y carbohidratos) mientras que en el aislado de rodaballo virulento ACC35.1 las proteínas detectadas están implicadas en la síntesis de proteínas y su mecanismo de transporte (Figura 31).



**Figura 31.** Clasificación funcional de las proteínas de expresión diferencial identificadas. Figura original.

### 5.2.1.1 Validación de las proteínas más relevantes

Para comprobar la funcionalidad *in vivo* de las proteínas detectadas se realizaron diversos experimentos de validación. Para ello se escogieron proteínas de relevancia y que fuese fácilmente evaluable su actividad. A continuación, mostramos las proteínas seleccionadas, así como los resultados obtenidos:

#### ✓ Respuesta al estrés:

La proteína Hsp90 o HptG relacionada con la respuesta al estrés oxidativo en el interior de macrófagos (Dang y col., 2011) se detectó exclusivamente en el aislado ACC35.1. Esta proteína está presente en todos los organismos por lo que para

justificar que no pudo ser detectada en la cepa NCIMB 2034, posiblemente por su baja abundancia, se realizó el ensayo de resistencia al peróxido de hidrógeno. Los resultados mostraron como la cepa virulenta presenta un crecimiento de dos logaritmos superior (280 UFCs) al de la cepa NCIMB 2034 (9 UFCs).

✓ Motilidad:

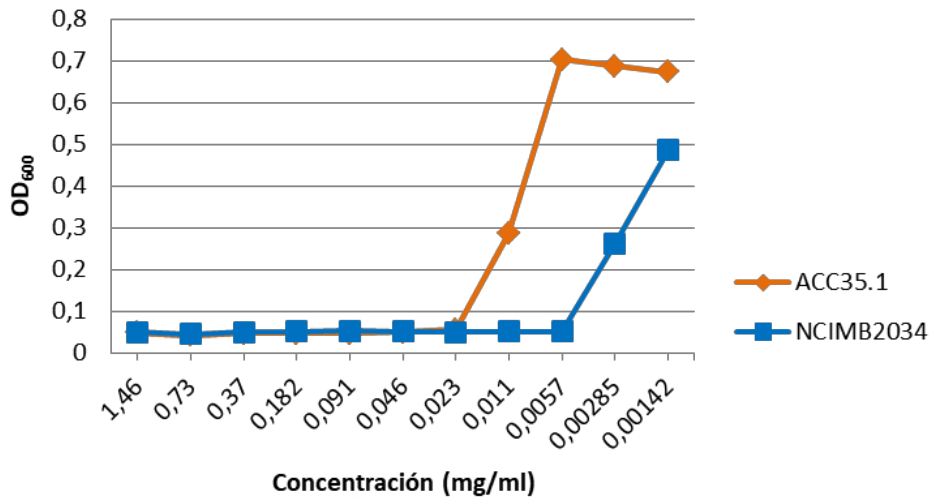
Al igual que en el punto anterior, la proteína relacionada con la motilidad FliC o Et46 en el caso de *E. tarda* (He y col., 2012), fue detectada solamente en el aislado ACC35.1. El ensayo de motilidad mostró diferencias entre las dos cepas (Figura 32) mostrando más turbidez el aislado ACC35.1 que el NCIMB 2034.



**Figura 32.** Crecimiento de los aislados ACC35.1 y NCIMB 2034 en medio de motilidad. Se observa alta motilidad en el aislado ACC35.1 en comparación con la cepa NCIMB 2034. Figura modificada de Buján y col. 2015, permiso cedido por la editorial Elsevier.

✓ Susceptibilidad a la polimixina B:

Otra de las proteínas detectadas solamente en el aislado de rodaballo fue la proteína ArnA, que está envuelta en procesos de resistencia a la polimixina B y en la modificación del lípido A (Breazeale y col., 2005). Los ensayos de microtitulación mostraron que el aislado más virulento presentaba mayor resistencia a este antibiótico (Figura 33). La MIC que se obtuvo para el aislado ACC35.1 fue de 0,011 mg/ml, mientras que para la cepa de *E. tarda* NCIMB 2034 fue de  $2,85 \times 10^{-3}$  mg/ml.



**Figura 33.** Perfiles de crecimiento de los aislados ACC35.1 y NCIMB 2034 a diferentes concentraciones de polimixina B. Figura modificada de Buján y col. 2015, permiso cedido por la editorial Elsevier.

✓ Secuenciación del gen SOD:

Varios autores relacionan los tipos de SOD con la virulencia (Yamada y Wakabayashi, 1999; Cheng y col., 2010) en *E. tarda*, lo que concuerda con lo obtenido en las identificaciones proteicas (Tabla 28). Además, en la Figura 28B se observa como estas proteínas están muy próximas unas de las otras. Para demostrar que las diferencias entre estos puntos proteicos son debidas a alteraciones en la secuencia se amplificó una parte de dicho gen. Los resultados obtenidos de esta secuenciación, mostraron que las secuencias del gen SOD eran diferentes, y que parte de estos cambios fueron no sinónimos produciendo alteraciones en la secuencia aminoacídica (Figura 34).

```

ACC35.1      : MSFELPALPYAMNALEPHISAETLEYHYGKHHNAYVVNLNLIKGTEFEGKSLEEIVKSASGGIFNNA
NCIMB2034   : MSFELPALPYAKNALEPHISAETLEYHYGKHHNTYVVNLNLIKGSEFEGKSLEEIIKTSSGGIFNNA

ACC35.1      : AQVWNHTFYWHCLSPNGGGEPRRGALADAINAAFGSFAAFKDALTKSAVGNFGSGWTWLVKKADG
NCIMB2034   : AQVWNHTFYWHCLSPNGGGEPTTGALADAINAAFGSFAAFQEALTKSAVANFGSGWTWLVKKADG

ACC35.1      : TLLAIVNTSNAATPLTGDDDKPLLTVDVWEHAYYIDYRNARPVYLENFWALVN
NCIMB2034   : SLLAIVNTSNAATPLTGDDDKPLLTVDVWEHAYYIDYRNARPKYLENFWALVN
    
```

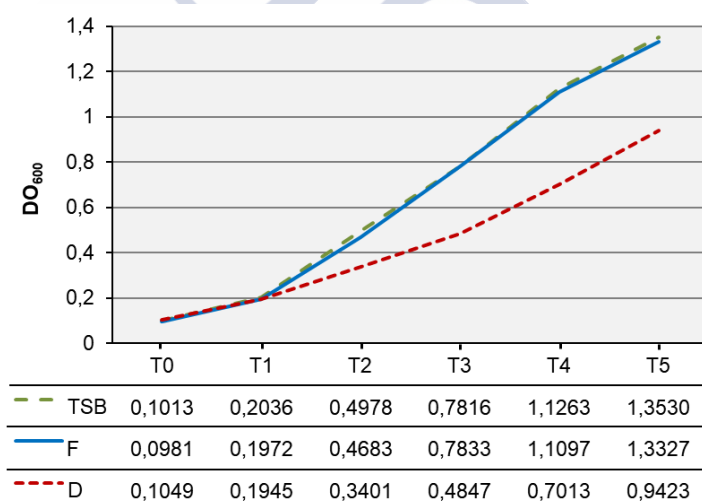
**Figura 34.** Alineamiento de las secuencias de aminoácidos del gen *sod* de los aislados ACC35.1 correspondiente a *sodI* y NCIMB 2034 a *sodII*. El sombreado de color gris indica diferencias entre pares de bases. La alineación de secuencia se realizó con MEGA7 (<http://www.megasoftware.net/>). Figura tomada de Buján y col. 2015, permiso cedido por la editorial Elsevier.

## 5.2.2 Tecnología TMT6plex™

### 5.2.2.1 Efecto del hierro en el crecimiento y proteoma de *E. piscicida*

Como hemos mencionado, el hierro es uno de los elementos esenciales más importantes en la vida de cualquier microorganismo, así como en su virulencia, es por ello que cualquier limitación en su concentración tendrá unos efectos negativos. Para ver estos efectos hemos comparado el proteoma del aislado ACC35.1 *E. piscicida* bajo diferentes concentraciones de hierro y hemos medido la densidad óptica de los cultivos a diferentes tiempos para ver cómo afecta a su crecimiento.

Como era de esperar, el efecto del crecimiento bacteriano se vio afectado por la ausencia de hierro durante el cultivo celular a partir casi del momento cero tal y como se muestra en la Figura 35.



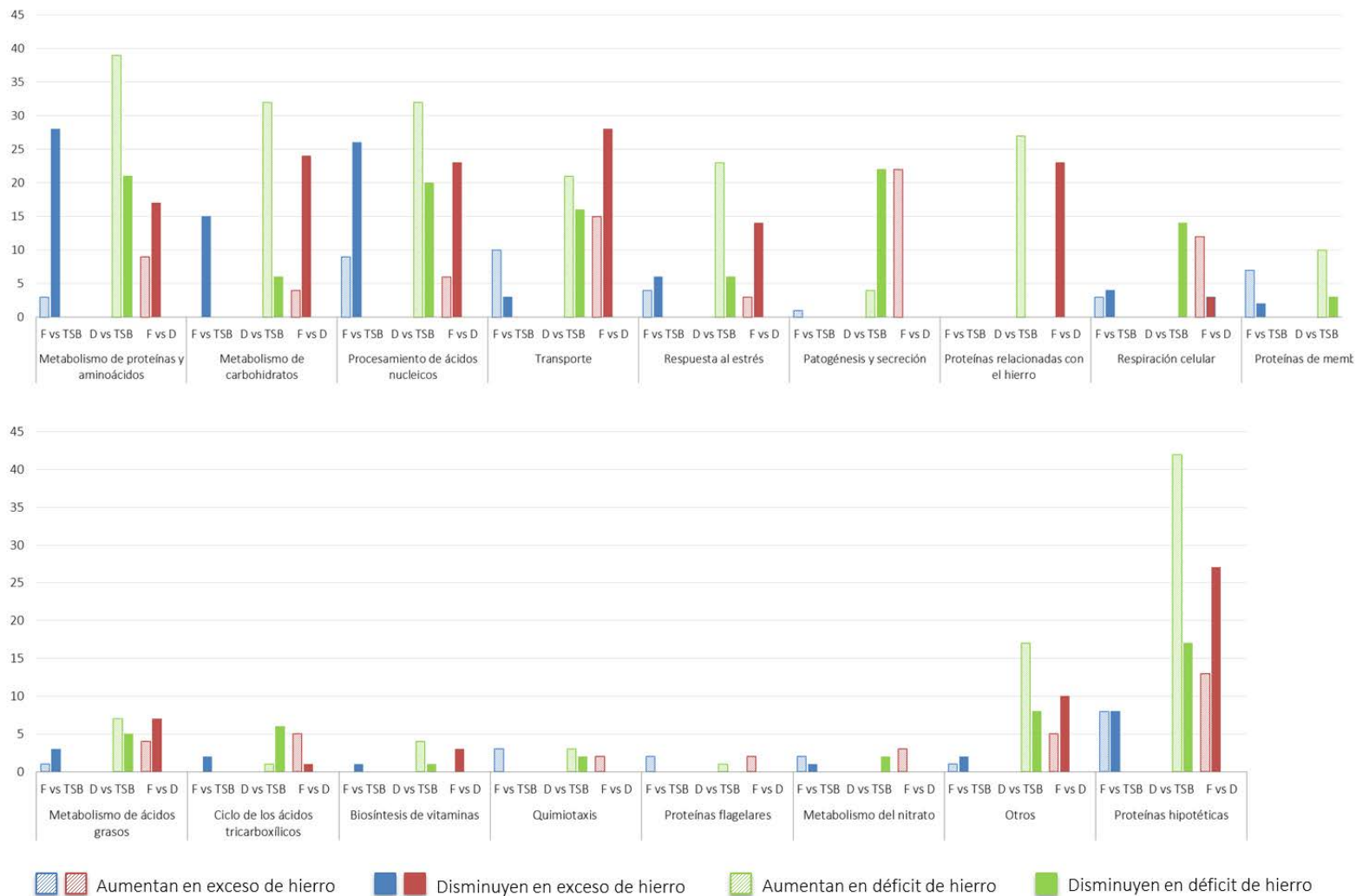
**Figura 35.** Efectos de la disponibilidad de hierro sobre el crecimiento del aislado ACC35.1 *E. piscicida*. Tn, número de horas después de comenzar el cultivo; TSB, medio caldo tripticasa-soja; F, TSB suplementado con hierro; D, TSB suplementado con el quelante de hierro. Los valores obtenidos para cada tiempo se muestran en la tabla añadida. Figura original.

El análisis realizado mediante la espectrometría de masas en tándem (TMT) permitió la identificación y la cuantificación de 2228 proteínas entre los tres experimentos. En el experimento 1 (F/TSB) se identificaron un total de 155 proteínas de expresión diferencial, 54 fueron más abundantes en presencia de hierro y 101 disminuyeron su expresión. En el experimento 2 (D/TSB) donde comparamos el proteoma en déficit de hierro con el control

188 para poder simular la limitación de hierro que se produce dentro del pez hospedador, el número de proteínas con expresión diferencial (412) se dispara; 263 proteínas aumentaron su expresión en ausencia de hierro mientras que 149 la disminuyeron. En el experimento 3 se comparó ambos extremos (F/D) resultando que 289 proteínas fueron de expresión diferencial, 108 aumentaron su expresión en superávit de hierro mientras que 181 disminuyeron. Cabe destacar que 122 proteínas que presentaron una reducción en su abundancia en el medio con exceso de hierro en el experimento 3 (F/D) aumentaron en déficit de este elemento en el experimento 2 (D/TSB). Estas proteínas fueron clasificadas, en términos generales, en 17 categorías funcionales (Figura 36): metabolismo de proteínas y aminoácidos, metabolismo de carbohidratos, procesamiento de los ácidos nucleicos, transporte, respuesta al estrés, patogénesis y secreción, proteínas relacionadas con el hierro, respiración celular, proteínas de membrana, metabolismo de ácidos grasos, ciclo de los ácidos tricarboxílicos, biosíntesis de vitaminas, quimiotaxis, proteínas flagelares, metabolismo del nitrato, proteínas hipotéticas y otros. La identificación de todas las proteínas se puede consultar en el CD adjunto a la tesis.

El exceso de hierro en el medio en comparación con el medio control, se tradujo en un pequeño aumento de las proteínas de transporte, de las de procesamiento de ácidos nucleicos y de las de membrana, seguidas por las proteínas de respuesta al estrés. El cambio que realmente llama la atención en este experimento es la gran disminución de las proteínas implicadas en el metabolismo de aminoácidos y proteínas, en el procesamiento de los ácidos nucleicos y en el metabolismo de carbohidratos.

El efecto de la quelación de este elemento en el medio se traduce en un alto número de proteínas que presentan un cambio en su abundancia. Si nos centramos en las proteínas que muestran un aumento en su expresión en condiciones de restricción de hierro, los procesos biológicos más representados son el metabolismo de proteínas y aminoácidos, el metabolismo de carbohidratos, el procesamiento de ácidos nucleicos, proteínas relacionadas con el hierro y la respuesta al estrés. En cambio, las categorías con mayor número de proteínas que disminuyen su expresión son las implicadas en la patogénesis y secreción, en el metabolismo de aminoácidos y proteínas, en el procesamiento de los ácidos nucleicos, en el transporte y en la respiración celular.



**Figura 36.** Clasificación de las proteínas identificadas en el experimento TMT6plex según las tres comparaciones. F vs TSB, experimento 1; D vs TSB, experimento 2; F vs D, experimento 3; F, hierro; D, dipiridil. Figura original.

En el experimento 3, las diferencias entre las proteínas que aumentan y disminuyen fueron menores que en los otros casos en los cuales las proteínas que disminuyen están cercanas a duplicar las que aumentan. En un exceso de hierro, las categorías de las proteínas que aumentan son bastante diferentes ya que la lista está encabezada por las proteínas involucradas en la patogénesis y secreción, proteínas de transporte, implicadas en la respiración celular y en el metabolismo de proteínas y aminoácidos. Si nos centramos en las proteínas que disminuyen nos volvemos a encontrar con las proteínas relacionadas con el transporte y el metabolismo de proteínas y aminoácidos, aunque el número de proteínas que desciende es casi el doble de las que aumentan. Disminuyen notablemente también aquellas proteínas asociadas al metabolismo de carbohidratos, a la captación y movilización de hierro, al procesamiento de ácidos nucleicos y con la respuesta al estrés. Cabe mencionar que las proteínas que más cambios sufren en su expresión en cualquiera de los experimentos, son las relacionadas con el procesamiento de ácidos nucleicos y el metabolismo de proteínas y aminoácidos.

#### 5.2.2.2 Proteínas relacionadas con el hierro

Para observar con más detenimiento como la concentración de hierro modula su captación y posibles mecanismos de virulencia fuertemente enlazados con este elemento, analizamos con más detalles las proteínas relacionadas con el metabolismo del hierro. En los experimentos donde el hierro es inutilizado por el agente quelante (experimentos 2 y 3), estas proteínas disminuyen en exceso de hierro y aumentan en su déficit (Tabla 29), tal y como era de esperar. En el experimento 1, un exceso de hierro se comparó con un medio rico en nutrientes por lo que las proteínas de captación férricas o similares no mostraron cambios en su expresión.

**Tabla 29.** Proteínas de expresión diferencial relacionadas con el hierro en el aislado *E. piscicida* ACC35.1 bajo diferentes condiciones de disponibilidad de este elemento.

↑ D (DvsT)	↓ F (FvsD)	Gen <sup>a</sup>	Código UniProt <sup>b</sup>	Descripción de la proteína	Organismo
✓	X	sn	D0ZC60	Sistema de transporte de sideróforos de tipo ABC cobalamina/Fe <sup>+3</sup> , componente de la ATPasa	<i>E. tarda</i> EIB202
✓	X	sn	D0ZC61	Sistema de transporte de hidroxamatos de tipo ABC Fe <sup>+3</sup> , componente periplásmico	<i>E. tarda</i> EIB202
✓	X	<i>afuC</i>	A0A076LP15	Transportador de la familia ABC (FeT) para la captación de ión férrico, proteína de unión ATP	<i>E. anguillarum</i> ET080813
X	✓	<i>fdx2</i>	D0ZD81	[2Fe-2S] ferredoxina, proteína transportadora de electrones	<i>E. tarda</i> EIB202
✓	X	<i>fur</i>	A2TEZ4	Regulador de captación de ión férrico	<i>E. tarda</i>
✓	✓	sn	D0Z8R2	Receptor de vibrioferrina férrica	<i>E. tarda</i> EIB202
✓	✓	sn	D0ZH85	proteína de la familia ferritina Dps	<i>E. tarda</i> EIB202
✓	✓	sn	A0A076LMK7	Proteína A transportadora de ión ferroso	<i>E. anguillarum</i> ET080813
✓	✓	<i>feoB</i>	D0ZG17	Proteína B transportadora de ión ferroso	<i>E. tarda</i> EIB202
✓	✓	<i>hemR</i>	D0Z865	Receptor de hemina	<i>E. tarda</i> EIB202
✓	✓	<i>hemS</i>	D0Z866	Proteína transportadora de hemina	<i>E. tarda</i> EIB202
✓	✓	<i>hmu</i> V	D0Z869	Sistema de unión al ATP transportadora de hemina	<i>E. tarda</i> EIB202
✓	✓	<i>hemP</i>	D0Z864	Proteína captadora de hemina HemP	<i>E. tarda</i> EIB202
✓	✓	<i>hmuT</i>	D0Z867	Proteína periplásmica de unión a la hemina	<i>E. tarda</i> EIB202
✓	✓	<i>iscA</i>	D0ZD84	Proteína de unión al hierro IscA	<i>E. tarda</i> EIB202
✓	✓	<i>iscU</i>	D0ZD85	Proteína de ensamblaje del grupo hierro-sulfuro IscU	<i>E. tarda</i> EIB202
✓	✓	sn	D0ZAF2	Probable transportador del ión ferrosol (Fe <sup>+2</sup> )	<i>E. tarda</i> EIB202
✓	✓	sn	D0Z862	Proteína putativa de utilización del grupo hemo	<i>E. tarda</i> EIB202
✓	✓	sn	D0Z8R1	Transportador de hierro putativo	<i>E. tarda</i> EIB202
✓	✓	sn	D0Z8Q7	Componente putativo de sideróforo sintetasa	<i>E. tarda</i> EIB202
✓	✓	sn	A0A1D7V8Y6	Proteína de biosíntesis de sideróforos	<i>E. tarda</i>
✓	✓	sn	A0A076LQJ5	Hemina TonB-dependiente, receptor ferricromo	<i>E. anguillarum</i> ET080813
✓	X	sn	A0A2A7U3V8	Receptor de la familia de la hemoglobina / lactoferrina / transferrina dependiente de TonB	<i>E. tarda</i>
✓	✓	sn	D4F4H3	Proteína de la familia del receptor de la hemoglobina / transferrina / lactoferrina dependiente de TonB	<i>E. tarda</i> ATCC 23685
✓	✓	sn	D0ZC63	Receptor dependiente de TonB	<i>E. tarda</i> EIB202
✓	✓	sn	A0A0H3DSE3	Precursor de la proteína A de unión a la transferrina	<i>E. tarda</i> FL6-60
✓	✓	<i>pvsB</i>	A0A076LVF5	Proteína de formación del enlace amida de la vibrioferrina PvsB	<i>E. anguillarum</i> ET080813
✓	✓	<i>pvsA</i>	A0A076LUT9	Preoteína ligasa / carboxilasa de la vibrioferrina PvsA	<i>E. anguillarum</i> ET080813

<sup>a</sup>Nombre del gen que aparece en la base de datos UniProt. <sup>b</sup>Código de identificación en la base de datos UniProt. ↑D(DvsT), la proteína aumenta en presencia de dipiridil en el experimento 2; ↓F(FvsD), la proteína disminuye en exceso de hierro en el experimento 3; ✓ proteína hallada en esa condición; X, proteína no hallada en esa condición; sn, sin nombre identificativo.

Las proteínas identificadas en ambos casos, son prácticamente las mismas a excepción de algunas transportadoras de hierro y sideróforos y, la proteína Fur que aumentan en presencia del agente quelante. El gen *fur* es muy conocido entre los estudios de virulencia de cualquier enterobacteria ya que es de vital importancia en la regulación de los sistemas de secreción III y VI.

### 5.3 DISCUSIÓN

192

Previamente a la discusión de este capítulo, es necesario mencionar que el aislado virulento ACC35.1 inicialmente identificado como *E. tarda* fue reclasificado como *E. piscicida* posteriormente a la realización del estudio de proteómica diferencial mediante electroforesis bidimensional.

Los resultados de este trabajo muestran que la tecnología 2D-DIGE es una herramienta importante para identificar proteínas involucradas en la patogénesis. La comparación entre los proteomas del aislado virulento de *E. piscicida* (ACC35.1) y de la cepa de *E. tarda* no patógena (NCIMB 2034) señala como posibles factores de virulencia las proteínas FliC, FeSODI, ArnA y Hsp90 halladas solamente en *E. piscicida*.

Análisis realizados en *E. tarda* sobre la enzima SodB unida a hierro (FeSod) mediante electroforesis isoenzimática (Yamada y Wakabayashi, 1999), mostraron diferencias en estas enzimas entre aislados virulentos y no virulentos. Estos autores clasificaron estas proteínas en dos grupos, FeSod tipo 1 (SodBI) halladas en las cepas virulentas y FeSod tipo 2 (SodBII), las encontradas en las cepas no virulentas. El análisis realizado mediante la tecnología 2D-DIGE corrobora la presencia de la proteína SodBI en el caso de *E. piscicida* (cepa virulenta) y, SodBII en *E. tarda* (cepa no virulenta), así como que dichas diferencias se deben a cambios en su secuencia nucleotídicas (cambios no sinónimos en su gran mayoría) como describieron anteriormente Yamada y Wakabayashi (1999). Además, otros trabajos han establecido un papel claro de la enzima SodBI como factor de virulencia en *E. piscicida* ya que, inhibe la activación de macrófagos y la respuesta inflamatoria (Cheng y col., 2010).

Varios autores (Nyström, 1994; Cohen y col., 2006; Zhu y col., 2007) describieron que a medida que el crecimiento exponencial se acerca a la fase estacionaria, los recursos de carbono disponibles en el medio se van agotando, lo que produce en las células una disminución de enzimas del ciclo de los ácidos tricarbóxicos y un aumento de enzimas de la glucólisis. Coincidiendo con estos resultados, tanto en *E. piscicida* como *E. tarda* la categoría de enzimas más representada fue la correspondiente al metabolismo de los carbohidratos. Este aumento en las proteínas de la glucólisis ha sido relacionado también con el grado de virulencia de diferentes microorganismos (Stead y col., 2005; Tonietto y col., 2012). En el presente trabajo se encontró que las proteínas relacionadas con la ruta de la glucólisis fueron más abundantes en el aislado virulento de *E. piscicida* ACC35.1 (como la triosa fosfato isomerasa y fosfoglicerato quinasa) lo que apoya la hipótesis de que cepas más virulentas tienen este proceso acelerado; además, este hecho podría explicar el porqué del crecimiento ligeramente más rápido del aislado ACC35.1 frente al de la cepa NCIMB 2034 (datos no mostrados).

El ciclo del glioxilato es utilizado por los microorganismos en condiciones de deficiencia de nutrientes y desempeña un papel importante en su persistencia a largo plazo y en la infección en los huéspedes (Lorenz y col., 2001; Schnappinger y col., 2003; Dunn y col., 2009). Las proteínas pertenecientes al ciclo del glioxilato no fueron detectadas en ninguna de las dos especies evaluadas, lo que concuerda con el estudio de genoma completo de *E. piscicida* realizado por Wang y col. (2009a). La ausencia de este ciclo sugiere que, al igual que otros microorganismos como *Brucella suis* (Köhler y col., 2002), *E. tarda* y *E. piscicida* no utilizan los ácidos grasos como fuente de energía principal para la supervivencia intracelular en macrófagos.

La pared celular de las bacterias Gram negativas está formada entre otros elementos, por proteínas de membrana interna y proteínas de membrana externa (OMP, del inglés *Outer Membrane Proteins*) las cuales incluyen dos grupos importantes: las lipoproteínas presentes en el periplasma, pero ancladas por un resto lipídico a la membrana y, las proteínas del barril  $\beta$  que son proteínas de membrana transportadoras. Al realizar el análisis entre las cepas de las dos especies estudiadas, solamente se detectaron proteínas del complejo Bam en la cepa de *E. tarda* NCIMB 2034, las cuales presentan un papel

194 importante en el transporte de lipopolisacáridos y fosfolípidos a la membrana externa (Voulhoux y col., 2004). Una mayor presencia de proteínas OMP y proteínas pertenecientes al metabolismo lipídico, como sucede en la cepa NCIMB 2034, ha sido fuertemente relacionada con una mayor formación de biopelículas (Otto y col., 2001), hecho que confirma el estudio realizado previamente con dicha cepa por He y col. (2001). Aunque la capacidad formadora de estos tapetes está generalmente identificada como un mecanismo de virulencia (O'Toole y col., 2000), su presencia no siempre está involucrada en ella, como se muestra en esta tesis y en la literatura (Nucci y col., 2002). Por otro lado, las proteínas del barril  $\beta$  (porinas) fueron más abundantes en el aislado ACC35.1 de *E. piscicida*. Un gran número de porinas en la membrana exterior disminuye la permeabilidad a grandes moléculas como los antibióticos, y por tanto, aumenta la resistencia celular a diversas sustancias tóxicas (Wang y col., 2003). Esto sugiere que el aislado ACC35.1 presenta un mecanismo de transporte más eficiente y desarrollado que puede colaborar en la virulencia y la resistencia a los antibióticos.

Entre las proteínas relacionadas con la virulencia ha sido detectada en exclusividad en el aislado de *E. piscicida* la proteína ArnA. Esta proteína es una proteína bifuncional implicada en la resistencia a la polimixina (y otros péptidos antimicrobianos catiónicos) y en la modificación del lípido A (Breazeale y col., 2005). La validación de la resistencia a la polimixina mostró que el aislado de *E. piscicida* ACC35.1 tiene una mayor resistencia a este compuesto lo cual puede estar influenciado por esta proteína y por la permeabilidad de la membrana regulada por las porinas mencionadas anteriormente. Siguiendo con las funciones de esta proteína, el lípido A es parte de una endotoxina típica de las enterobacterias y se considera un factor de virulencia (Wang y col., 2010a) lo que sugiere que esta proteína podría ser un factor importante en el proceso de virulencia de *E. piscicida* y un buen candidato para ensayos de mutantes.

Otra proteína importante para la patogénesis hallada solamente en el aislado de *E. piscicida* ACC35.1 fue la proteína de choque térmico 90 (Hsp90) o proteína de choque térmico G (HtpG), una chaperonina activada principalmente por estrés térmico (Thomas y Baneyx, 1998). Los resultados obtenidos en el ensayo de estrés oxidativo mostraron que el aislado de *E. piscicida* ACC35.1 es más resistente a este tipo de estrés que la cepa de *E.*

*tarda*. La implicación de esta proteína en respuestas al estrés oxidativo fue demostrada por Dang y col. (2011) en *E. piscicida* mediante la mutación del gen *htpG* lo que se tradujo en una ralentización del crecimiento, una reducción en la tasa de mortalidad y de la supervivencia a altas temperaturas y, una menor capacidad de sobrevivir y replicarse en los macrófagos donde el estrés oxidativo generado por el sistema ROS (del inglés *reactive oxygen species*) es muy elevado. Toda esta información sugiere que la proteína HtpG es esencial para una infección bacteriana eficiente.

Las especies del género *Edwardsiella* han sido descritas como motiles con algunas excepciones. En este caso, el estudio realizado a 30°C demostró que la motilidad es mayor en el aislado de *E. piscicida* ACC35.1 que en la cepa de *E. tarda* NCIMB 2034 (no móvil a <25°C). Entre las proteínas de movimiento celular encontradas mediante el análisis de la expresión diferencial se halló la proteína FliC solamente en el aislado de *E. piscicida*. Esta proteína es parte de la estructura de filamento flagelar y está asociada a cepas virulentas (Matsuyama y col., 2005). La ausencia del gen *fliC* produce una disminución en la capacidad de movilidad, en la formación de biopelículas y defectos en la formación de flagelos (He y col., 2012). Además, los sistemas de secreción tipo III (T3SS) y tipo VI (T6SS) empleados por *E. piscicida* para excretar factores de virulencia en células del hospedador (Srinivasa Rao y col., 2004) también se han visto influenciados por la expresión inadecuada de la proteína FliC (He y col., 2012; Xie y col. 2014). Las razones de que esta proteína no se pudiera hallar en la cepa de *E. tarda* NCIMB 2034 pueden ser que la proteína se produzca en bajas concentraciones o que la estructura secundaria sea diferente (Okuda y col., 2007). Se sabe que el hierro es un micronutriente vital que actúa como cofactor en enzimas involucradas en el transporte de electrones y procesos oxidativos que colaboran en la resistencia al sistema de defensa del hospedador, por lo tanto, este elemento es esencial para que las bacterias patógenas puedan establecer una infección. El objetivo del presente estudio fue identificar la abundancia diferencial de las proteínas de la cepa virulenta *E. piscicida* ACC35.1 bajo condiciones de crecimiento en las que la disponibilidad de hierro es diferente e, investigar su posible papel en la patogenia.

Analizando los datos obtenidos en los diferentes experimentos planteados en esta tesis, hemos encontrado que los cambios de expresión proteica entre el medio con exceso de

hierro y el medio sin modificar son casi imperceptibles y de escasa relevancia. Lo único resaltable es que las proteínas reparadoras del ADN, proteínas de función estructural en membrana como la mureína y diferentes proteínas de respuesta al estrés relacionadas con un superávit de hierro aumentan, lo que podría indicar que las células están sometidas a un ligero estrés posiblemente debido al alto potencial oxidativo de este elemento (Kehrer, 2000). Cabe mencionar que ni la curva de crecimiento, ni las proteínas relacionadas con el sistema ROS se han visto afectados en altas concentraciones de este elemento (Symeonidis y Marangos, 2012); además, los resultados obtenidos en los experimentos apoyan que el exceso de hierro empleado no influye en gran medida en el proteoma de *E. piscicida*.

Como ya hemos mencionado, además de colaborar en la supervivencia bacteriana en el interior del hospedador, bajos niveles de hierro inducen la expresión de varios factores de virulencia ya que estos genes suelen estar controlados por los mismos que controlan la expresión de los sistemas de adquisición de hierro (Payne, 1993). Los factores de virulencia regulados de esta forma incluyen una gran variedad de toxinas, proteínas de superficie celular, hemolisinas y otras enzimas secretadas. El alto número de proteínas de *E. piscicida* que modifican su expresión en bajas concentraciones de hierro pone de manifiesto la vital importancia de este elemento en el proceso de infección. Las proteínas que más aumentan tras las proteínas hipotéticas, son aquellas relacionadas con el metabolismo de proteínas y de carbohidratos, lo que puede deberse a que las bacterias en condiciones de estrés por baja concentración de hierro, alteran su actividad metabólica aumentando su capacidad para metabolizar diferentes fuentes de carbono (Antiabong y col., 2015). La reestructuración celular ante el déficit de hierro y la posible entrada en fase de letargo de la célula, no solamente se refleja por los cambios en estos metabolismos, sino que las proteínas involucradas en el transporte de sustancias, en el metabolismo de ácidos grasos, en la conformación de la membrana y en el metabolismo de ácidos nucleicos y procesos relacionados, se ven fuertemente alterados. La disminución de la abundancia de múltiples proteínas del ciclo de los ácidos tricarbóxicos ha sido detectada en especies como *Staphylococcus aureus*, en la cual la presencia de sideróforos regula negativamente enzimas de este ciclo como la citrato sintasa (Sheldon y col., 2014). En nuestro caso, el aumento de componentes de la sideróforo sintasa o proteínas implicadas en la biosíntesis

de sideróforos junto a la disminución de proteínas del ciclo de los ácido tricarbóxicos, nos hace pensar que en *E. piscicida* podría existir el mismo mecanismo de regulación que en *S. aureus*.

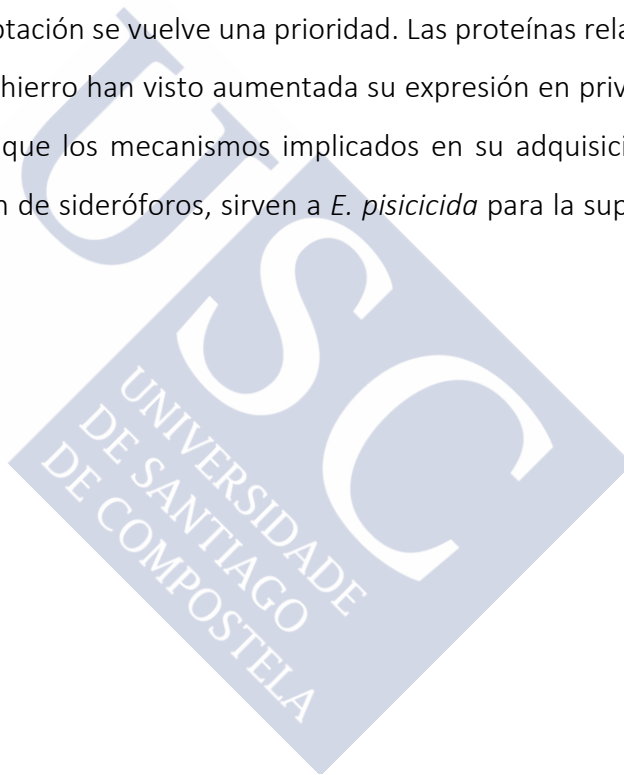
La absorción de hierro y la secreción de múltiples factores de virulencia está controlada estrechamente por el gen regulador de la captación férrica (*fur*) (Griffiths, 1991; Andrews y col., 2003), y se ha demostrado que en los miembros más antiguos del género *Edwardsiella*, este gen presenta una función similar a la de los demás microorganismos (Hirono y col., 1997; Sun y col., 2009; Chakraborty y col., 2011; Santander y col., 2012; Hu y Sun; 2016). Uno de los sistemas regulados positivamente por este gen es el sistema de transducción de energía TonB y los transportadores dependientes de TonB (Braun, 2001; Schauer y col., 2008; Lim, 2010). En condiciones privativas de hierro estas proteínas están fuertemente expresadas en *E. piscicida*, lo que nos indica que posiblemente en este microorganismo el complejo TonB es similar al de otras bacterias (Schauer y col., 2008). Este sistema es de vital importancia ya que facilita la incorporación de hierro a la célula durante el proceso de infección y su inactivación produce una atenuación en la virulencia de *Vibrio alginolyticus* (Wang y col., 2008) y *E. ictaluri* (Abdelhamed y col., 2017). De forma similar, la expresión del factor de virulencia superóxido dismutasa (SodB-Fe<sup>+2</sup>) está regulado positivamente por el complejo Fur-Fe<sup>+</sup> en muchas especies bacterianas (Jung y Kwon, 2008; Vasil, 2007), por lo que la disminución de esta proteína en condiciones restrictivas de hierro en *E. piscicida* sugiere que la expresión de SodB-Fe<sup>+2</sup> está regulada por el mismo complejo.

Otros de los sistemas que están regulados positivamente por la concentración de hierro y pueden estar mediados por el gen *fur* son los sistemas de secreción T3SS y T6SS (Chakraborty y col., 2011), por lo que no es de extrañar que las proteínas secretadas (EvpA, EvpL, EvpP, ...) por estos sistemas, disminuyan en gran medida en el medio con déficit de hierro. El sistema T6SS ha sido descrito en cepas de *E. piscicida* descritas como *E. tarda* como el responsable de la secreción de los efectores EvpC, EvpL y EvpP (Zheng y Leung, 2007) que desempeñan un papel clave en la patogénesis de esta especie (Srinivasa Rao y col., 2004). Se ha sugerido que el homólogo de EvpL en *Vibrio cholerae*, VgrG, participa en la formación del complejo trimérico necesario para construir una estructura de aguja que

conecta la membrana externa a la membrana de la célula hospedadora actuando, así como un dispositivo de entrada para otras proteínas del sistema T6SS (Kostakioti y col., 2005). El análisis genético del gen *evpP* indicó que la caja Fur se solapaba con la región promotora de este gen, y los ensayos FURTA *in vitro* verificaron que la transcripción de *evpP* está regulada positivamente por la disponibilidad de hierro (Wang y col., 2009b). Estos autores (Wang y col., 2009b) también demostraron que la proteína secretada EvpP juega un papel clave en la patogénesis de *E. piscicida* al controlar la secreción de otros factores de virulencia y el proceso de internalización en la invasión de las células de peces.

198

Como hemos visto hasta ahora, la disponibilidad de hierro regula muchos de los procesos infecciosos, por lo que su captación se vuelve una prioridad. Las proteínas relacionadas con el transporte y captación de hierro han visto aumentada su expresión en privación de este elemento dejando entrever que los mecanismos implicados en su adquisición, como los grupos hemo o la producción de sideróforos, sirven a *E. piscicida* para la supervivencia en el interior celular.





Capítulo 6:  
DISCUSIÓN GENERAL



## 6 DISCUSIÓN GENERAL

Como ya hemos visto a lo largo de esta tesis, la reasignación de aislados de la especie *E. tarda* a las nuevas especies *E. piscicida* y *E. anguillarum*, ha causado una gran desorganización en la taxonomía del género *Edwardsiella* siendo necesario revisar toda la información disponible en la literatura. Para no cometer errores es indispensable contar con buenas herramientas que permitan identificar inequívocamente las cinco especies del género. La metodología clásica de tubo y placa, así como el medio ET (Lindquist, 1991) quedan totalmente invalidados para este fin. La mayoría de las diferentes metodologías de PCR establecidas hasta el momento para la identificación específica de *E. tarda*, como la amplificación de genes relacionados con las fimbrias (Sakai y col., 2007) o con la subunidad  $\beta$  de la girasa (Lan y col., 2008), necesitan volver a ser evaluados para comprobar su eficacia en la identificación de esta especie.

En esta Tesis Doctoral, se ha llevado a cabo la caracterización genética y el estudio filogenético del género *Edwardsiella*. Para ello, se han utilizado diferentes técnicas basadas en el análisis de fragmentos de restricción de ADN, en la amplificación de genes esenciales o más recientemente, en el empleo del genoma bacteriano completo entre otras. El análisis de los resultados obtenidos tras la digestión con enzimas de restricción y subsecuente amplificación de los fragmentos generados mediante la herramienta de tipado AFLP, mostró ser útil en la identificación de las especies *E. tarda*, *E. ictaluri*, *E. hoshinae* y *E. piscicida*, pero la falta de más aislados de la especie *E. anguillarum*, así como de la cepa tipo en dicho análisis hace que estos resultados pierdan robustez. La amplificación de los siete genes esenciales empleados en esta tesis para los análisis de MLSA, revelaron una gran variabilidad entre los aislados de *E. piscicida*. En todas las reconstrucciones filogenéticas, independientemente del gen o de la combinación de estos empleada, los grupos formados fueron muy robustos y bien diferenciados demostrando el alto poder resolutivo del esquema de MLSA para la identificación de los cinco integrantes del género *Edwardsiella*. Por otro lado, el estudio de los genomas completos disponibles

de las especies de *Edwardsiella* mediante las diferentes comparaciones empleadas, mostró que tanto la hibridación *in silico* realizada mediante la herramienta GGDC2.1 como con la aplicación OrthoANI son útiles para diferenciar las especies del género *Edwardsiella*. Además, la similitud entre los genomas completos empleados mostró la necesidad de reasignar alguna de las cepas a la especie *E. anguillarum*. No cabe duda que la secuenciación del genoma completo es la mejor opción a la hora de identificar un aislado pero su elevado costo hace que no sea una herramienta disponible para todos los laboratorios. Por ello, sugerimos que la secuenciación del gen *dnaJ* es la técnica más recomendable para una correcta identificación de cualquiera de las especies del género *Edwardsiella*.

En el segundo capítulo de esta tesis, se realizó el estudio epidemiológico del género *Edwardsiella* con el fin de esclarecer relaciones filogenéticas entre las diferentes especies de este género y poder profundizar en sus mecanismos de evolución y especiación. Para ello, se emplearon métodos de tipificación basados en la secuenciación del ADN, como el MLST, el cual se utiliza para estudios epidemiológicos globales o para analizar la estructura poblacional de los microorganismos (Aanensen y Spratt). El análisis realizado con los algoritmos eBurst y Median Joining mostró que la población del género *Edwardsiella* presenta un alto grado de discontinuidad genética. La divergencia entre las especies parece haberse producido por eventos diferentes, mientras que la separación de los grupos *E. tarda*-*E. hoshinae* y *E. piscicida*-*E. anguillarum*-*E. ictaluri* está marcada por un elevado número de mutaciones. La tasa de mutación-recombinación muestra que ambos eventos son igual de importantes en la diversificación del género *Edwardsiella*, aunque la mutación ocurra en mayor medida. La población parece haberse diversificado mediante períodos de expansión espacial separados por un período de contracción demográfica, como un proceso de cuello de botella, lo que hace que los índices indicativos de estos sucesos sean contradictorios. El alto valor de  $I_A$  y la considerable mezcla genética mostrada en el análisis de líneas genéticas ancestrales, indican que la estructura de población formada por las cinco especies es panmíctica con cierto grado de expansión epidémica (Maynard-Smith y col., 1993).

En los últimos años, las técnicas proteómicas han sido de utilidad en la investigación microbiana para poder estudiar los posibles factores de virulencia. En esta tesis, mediante el empleo de la técnica proteómica 2D-DIGE se ha demostrado la presencia de las proteínas ArnA HtpG y FliC en *E. piscicida*, proteínas descritas por otros autores como factores de virulencia. Cabe resaltar que es la primera vez que la proteína ArnA se describe en *E. piscicida*.

Por otro lado, la comparativa realizada con el aislado virulento de *E. piscicida* ACC35.1 bajo condiciones de diferentes concentraciones de hierro mediante la tecnología TMT-6plex, ha sido de gran utilidad para identificar las proteínas más relevantes relacionadas con el hierro y con los mecanismos de virulencia que regula. Como era de esperar, las proteínas implicadas en el mecanismo de captación de hierro, proteínas relacionadas con el grupo hemo o con la producción de sideróforos, se vieron sobreexpresadas en condiciones limitantes de hierro. Además, en esta condición se han hallado proteínas importantes para la virulencia de *E. piscicida* como Fur y diferentes tipos de Evp (*Edwardsiella virulence protein*) lo que apoya que la expresión de estas proteínas está regulada por las concentraciones de hierro en el medio tal y como describen otros autores (Hirono y col., 2007; Sun y col., 2009; Chakraborty y col., 2011; Hu y Sun; 2016).

En resumen, con la reasignación de aislados de *E. tarda* a *E. piscicida*, toda la información relacionada con la edwardsielosis se ha vuelto confusa. Tanto los caracteres fenotípicos, serológicos, genéticos, así como los supuestos mecanismos de virulencia de ambas especies se entremezclan. En esta tesis se recopila información relacionada con la virulencia e identificación de la especie *E. piscicida* poniendo de manifiesto que un gran número de trabajos realizados por otros autores en *E. tarda*, se corresponden con *E. piscicida*. Por ello, en el anexo 2 se presenta una tabla con todas las cepas identificadas originalmente como *E. tarda* y que posteriormente han sido reclasificadas como *E. piscicida* tanto en la presente tesis como en la literatura. Así mismo se presenta una actualización de las características bioquímicas de *E. piscicida*.





**Capítulo 7:  
CONCLUSIONES**

**Chapter 7:  
CONCLUSIONS**



## 7 CONCLUSIONES

En base a los resultados obtenidos en los diferentes capítulos de esta memoria, se pueden enumerar las siguientes conclusiones:

1. La caracterización genética y el estudio filogenético del género *Edwardsiella* permitieron aclarar la controversia taxonómica entre las especies *E. tarda* y *E. piscicida*. Además, se propone la secuenciación del gen *dnaJ* como una herramienta clave para la correcta identificación de las especies del género *Edwardsiella*.
2. Los estudios MLST realizados con el fin de analizar la estructura de la población del género *Edwardsiella* revelaron la existencia de un alto grado de discontinuidad genética. Los eventos de mutación y recombinación mostraron la misma importancia en la evolución de este género, aunque la recombinación contribuyó mayormente en la diferenciación de las especies *E. anguillarum*, *E. piscicida* y *E. ictaluri*.
3. La búsqueda de factores de virulencia mediante aplicaciones proteómicas mostró que *E. piscicida* presenta mecanismos de resistencia a los antibióticos y al estrés más efectivos que *E. tarda*. La presencia de la proteína bifuncional ArnA fue detectada por primera vez en *E. piscicida*. La implicación de esta proteína en la resistencia a los antibióticos y en la síntesis del lípido A sugiere que puede constituir un nuevo factor de virulencia para esta especie.
4. El análisis de proteínas de *E. piscicida* empleando la técnica TMT6plex, permitió la identificación de proteínas reguladas por la concentración de hierro en el medio, como la proteína Fur, proteínas involucradas en la síntesis y transporte de sideróforos y proteínas Evp secretadas. Por lo tanto, esta técnica puede ser útil en la búsqueda de factores de virulencia.

## 7 CONCLUSIONS

Based on the results obtained in the different chapters of this report, can be listed the following conclusions:

1. The genetic characterization and the phylogenetic study of the genus *Edwardsiella* allowed to clarify the taxonomic controversy between *E. tarda* and *E. piscicida* species. In addition, the sequencing of the *dnaJ* gene is proposed as a key tool for the correct identification of the species of the genus *Edwardsiella*.
2. The MLST studies carried out to analyze the population structure of the *Edwardsiella* genus revealed the existence of a high degree of genetic discontinuity. The events of mutation and recombination showed the same importance in the evolution of this genus, although recombination contributed mainly in the differentiation of the species *E. anguillarum*, *E. piscicida* and *E. ictaluri*.
3. The search of virulence factors by proteomic applications showed that *E. piscicida* presents mechanisms of resistance to antibiotics and stress more effective than *E. tarda*. The presence of the bifunctional protein ArnA was detected for the first time in *E. piscicida*. The implication of this protein in antibiotic resistance and in the synthesis of lipid A suggests that it may constitute a new virulence factor for this species.
4. The protein analysis of *E. piscicida* employing TMT6plex technique, allowed the identification of proteins regulated by the iron concentration in the medium such as Fur protein, proteins involved in the synthesis and transport of siderophores and secreted Evp proteins. Therefore, this technique can be useful in the search for virulence factors.



**Capítulo 8:**  
**BIBLIOGRAFÍA**



## 8 BIBLIOGRAFÍA

- Aanensen DM y Spratt BG (2005) The multilocus sequence typing network: mlst.net. *Nucleic Acids Res*, 33: 728-733
- Abayneh T, Colquhoun DJ, Austin D, Sørnum H (2014) Multilocus variable number tandem repeat analysis of *Edwardsiella piscicida* isolates pathogenic to fish. *J Fish Dis*, 37: 941-948
- Abayneh T, Colquhoun DJ, Sørnum H (2012) Multi-locus Sequence Analysis (MLSA) of *Edwardsiella tarda* isolates from fish. *Vet Microbiol*, 15: 367-375
- Abayneh T, Colquhoun DJ, Sørnum H (2013) *Edwardsiella piscicida* sp. nov., a novel species pathogenic to fish. *J Appl Microbiol*, 114: 644-654
- Abbott SL, Janda JM (2006) The Genus *Edwardsiella*. *Prokaryotes*, 6: 72-89
- Abdelhamed H, Lawrence ML, Karsi A (2017) The role of TonB gene in *Edwardsiella ictaluri* virulence. *Front Physiol*, doi: 10.3389/fphys.2017.01066
- Abdelhamed H, Lu J, Shaheen A, Abbass A, Lawrence ML, Karsi A (2013) Construction and evaluation of an *Edwardsiella ictaluri* *fhuC* mutant. *Vet Microbiol* 162: 858-865
- Abraham TJ, Mallick PK, Adikesavalu H, Banerjee S (2015) Pathology of *Edwardsiella tarda* infection in African catfish, *Clarias gariepinus* (Burchell 1822), fingerlings. *Arch Pol Fisheries*, 23: 141-148
- Acharya M, Maiti NK, Mohanty S, Mishra P, Samanta M (2007) Genotyping of *Edwardsiella tarda* isolated from freshwater fish culture system *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*, 30: 33-40
- Aebersold R y Mann M (2003) Mass spectrometry-based proteomics. *Nature*, 422: 198-207
- Akinbowale OL, Peng H, Barton MD (2006) Antimicrobial resistance in bacteria isolated from aquaculture sources in Australia. *J Appl Microbiol*, 100: 1103-1113
- Alcaide E, Herraiz S, Esteve C (2006) Occurrence of *Edwardsiella tarda* in wild European eels *Anguilla anguilla* from Mediterranean Spain. *Dis Aquat Org* 73: 77-81

- Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ (1990) Basic local alignment search tool. *J Mol Biol*, 215: 403-410
- Amandi A, Hiu S F, Rohovec JS, Fryer JL (1982) Isolation and characterization of *Edwardsiella tarda* from fall Chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*). *Appl Environ Microbiol*, 43: 1380-1384
- Anderson NL y Anderson NG (1998) Proteome and proteomics: New technologies, new concepts, and new words. *Electrophoresis*, 19: 1853-1861
- 212 Andrews SC, Robinson AK, Rodríguez-Quiñones F (2003) Bacterial iron homeostasis. *FEMS Microbiol Rev*, 27:215-237
- Antibong JF, Ball AS, Brown MH (2015) The effects of iron limitation and cell density on prokaryotic metabolism and gene expression: Excerpts from *Fusobacterium necrophorum* strain 774 (sheep isolate). *Gene*, 563: 94-102
- Aoki T, Kitao T (1981) Drug resistance and transferable R plasmids in *Edwardsiella tarda* from fish culture ponds. *Fish Pathol*, 15: 277-281
- Auch AF, Klenk H-P, Göker M (2010a) Standard operating procedure for calculating genome-to-genome distances based on high-scoring segment pairs. *Stand Genomic Sci*, 2: 142-148
- Auch AF, von Jan M, Klenk H-P, Göker M (2010b) Digital DNA-DNA hybridization for microbial species delineation by means of genome-to-genome sequence comparison. *Stand Genomic Sci*, 2: 117-134
- Aziz RK, Bartels D, Best AA, DeJongh M, Disz T, Edwards RA y col. (2008) The RAST Server: rapid annotations using subsystems technology. *BMC Genomics*, 9: 75
- Bader JA, Shoemaker CA, Klesius PH, Connolly MA, Barbaree JM (1998) Genomic subtyping of *Edwardsiella ictaluri* Isolated from diseased channel catfish by arbitrarily primed polymerase chain reaction. *J Aquat Anim Health*, 10: 22-27
- Balboa S (2012) Estudio de la variabilidad intraespecífica del patógeno de almejas *Vibrio tapetis*. M.Sc. Thesis, Departamento de Microbiología e Parasitología, Universidade de Santiago de Compostela, Santiago de Compostela, Spain.
- Balboa S, Bastardo A, Romalde JL (2014) Disentangling the population structure and evolution of the clam pathogen *Vibrio tapetis*. *Microb Ecol*, 67: 145-154

- Bandelt HJ y Dress AWM (1992) Split Decomposition: a new and useful approach to phylogenetic analysis of distance data. *Mol Phylogen Evol*, 1: 242-252
- Bandelt HJ, Foster P, Rhöl A (1999) Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Mol Biol Evol*, 16: 37-48
- Barton NH (2000) Genetic hitchhiking. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 355: 1553-1562
- Bastardo A, Ravelo C, Romalde JL (2012) Multilocus sequence typing reveals high genetic diversity and epidemic population structure for the fish pathogen *Yersinia ruckeri*. *Environ Microbiol*, 14: 1888-1897
- Bastardo A, Ravelo C, Romalde JL (2015) Phylogeography of *Yersinia ruckeri* reveals effects of past evolutionary events on the current strain distribution and explains variations in the global transmission of enteric redmouth (ERM) disease. *Front Microbiol*, doi: 10.3389/fmicb.2015.01198
- Baya AM, Romalde JL, Green DE, Navarro RB, Evans J, May EB y col. (1997) Edwardsiellosis in wild striped bass from the Chesapeake Bay. *J Wildl Dis*, 33: 517-525
- Blackstock WP y Weir MP (1999) Proteomics: quantitative and physical mapping of cellular proteins. *Trends Biotechnol*, 17: 121-127
- Blanch AR, Pinto RM, Jofre JT (1990) Isolation and characterization of an *Edwardsiella* sp. strain, causative agent of mortalities in sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Aquaculture* 88: 213-222
- Bockemühl J, Pan-Urai R, Burkhardt F (1971) *Edwardsiella tarda* associated with human disease. *Pathol Microbiol (Basel)*, 37: 393-401
- Bolger AM, Lohese M, Usadel B (2014) Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics*, 30: 2114-2120
- Bordbar A, Monk JM, King ZA and Palsson BO (2014) Constraint- based models predict metabolic and associated cellular functions. *Nat Rev Genet*, 15: 107-120
- Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, 72: 248-254
- Brady C, Cleenwerck I, Venter SN, Vancanneyt M, Swings J, Coutinho T (2008) Phylogeny and identification of *Pantoea* species associated with plants, humans and the

natural environment based on multilocus sequence analysis (MLSA). *Syst Appl Microbiol*, 31: 447-460

Bragg RR (1988) First isolation of *Edwardsiella tarda* from fish in South Africa. *Bull Eur Assoc Fish Pathol*, 8: 84-88

Braun V (2001) Iron uptake mechanisms and their regulation in pathogenic bacteria. *Int J Med Microbiol*, 291: 67-79

Breazeale SD, Ribeiro AA, McClerren AL, Raetz CRH (2005) A formyltransferase required for polymyxin resistance in *Escherichia coli* and the modification of lipid A with 4-amino-4-deoxy-L-arabinose. *J Biol Chem*, 280: 14154-14167

Brenner DJ (1977) Characterization and clinical identification of *Enterobacteriaceae* by DNA hybridation. *Prog Clin Pathol*, 7: 71-117

Brenner DJ, Fanning GR, Steigerwalt AG (1974) Polynucleotide Sequence Relatedness in *Edwardsiella tarda*. *Int J Syst Evol Microbiol*, 24: 186-190

Brenner DJ (1984) Family *Enterobacteriaceae*. En: *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Krieg NR, Holt JC (eds), Baltimore. The Williams and Wilkins Co, 1: 408-516

Brown AD, Feldman MW, Nevo E (1980) Multilocus structure of natural populations of *Hordeum spontaneum*. *Genetics*, 96: 523-536

Buján N, Balboa S, Romalde JL, Toranzo AE, Magariños B (2018a) Population genetic and evolution analysis of controversial genus *Edwardsiella* by multilocus sequence typing. *Mol Phylogenet Evol*, 127: 513-521

Buján N, Hernández-Haro C, Monteoliva L, Gil C, Magariños B (2015) Comparative proteomic study of *Edwardsiella tarda* strains with different degrees of virulence. *J Proteomics*, 127: 310-320

Buján N, Mohamed H, Balboa S, Romalde JL, Toranzo AE, Arias CR y col.(2018b) Genetic studies to re-affiliate *Edwardsiella tarda* fish isolates to *Edwardsiella piscicida* and *Edwardsiella anguillarum* species. *Syst Appl Microbiol*, 41: 30-37

Camacho C, Coulouris G, Avagyan V, Ma N, Papadopoulos J, Bealer K y col. (2009). BLAST+: architecture and applications. *BMC Bioinformatics*, 10: 421

- Camus A, Dill J, McDermott A, Hatcher N, Griffin M (2016) *Edwardsiella piscicida* associated septicaemia in a blotched fantail stingray *Taeniura meyeni* (Mueller & Henle). *J Fish Dis*, 39: 1125-1131
- Carius A, Dabelko GD, Wolf AT (2004) Water, conflict, and cooperation. Environmental Change and Security Program (ECSP) report, Washington DC, 10: 60-66
- Castro N (2011) *Edwardsiella tarda*: patógeno emergente en el cultivo del rodaballo. Tesis Doctoral. Universidade de Santiago de Compostela, Santiago de Compostela, España.
- Castro N, Magariños B, Núñez S, Barja JL, Toranzo AE (2011) Pathogenic potential of *Edwardsiella tarda* strains isolated from turbot. *Fish Pathol*, 47: 27-30
- Castro N, Osorio CR, Buján N, Fuentes JC, Rodríguez J, Romero M y col.(2016) Insights into the virulence-related genes of *Edwardsiella tarda* isolated from turbot in Europe: genetic homogeneity and evidence for vibrioferrin production. *J Fish Dis*, 39:565-576
- Castro N, Toranzo AE, Barja JL, Núñez S, Magariños B (2006) Characterization of *Edwardsiella tarda* strains isolated from turbot, *Psetta maxima* (L.). *J Fish Dis*, 29: 541-547
- Castro N, Toranzo AE, Devesa S, González A, Nuñez S, Magariños B (2012) First description of *Edwardsiella tarda* in Senegalese sole, *Solea senegalensis* (Kaup). *J Fish Dis*, 35: 78-79
- Castro N, Toranzo AE, Núñez S, Magariños B (2008) Development of an effective *Edwardsiella tarda* vaccine for cultured turbot (*Scophthalmus maximus*). *Fish Shellfish Immunol*, 25: 208-212
- Chakraborty S, Sivaraman J, Leung KY, Mok YK (2011) Two-component PhoB-PhoR regulatory system and ferric uptake regulator sense phosphate and iron to control virulence genes in type III and VI secretion systems of *Edwardsiella tarda*. *J Biol Chem*, 286:39417-39430
- Chang TW, Lin YM, Wang CF, Liao YD (2012) Outer membrane lipoprotein Lpp is Gram-negative bacterial cell surface receptor for cationic antimicrobial peptides. *J Biol Chem*, 287:418-428

Cheng S, Zhang M, Sun L (2010) The iron-cofactored superoxide dismutase of *Edwardsiella tarda* inhibits macrophage-mediated innate immune response. *Fish Shellfish Immun*, 29: 972-978

Christophy R, Osman M, Mallat H, Achkar M, Ziedeh A, Moukaddem W, Dabboussi F y col. (2017) Prevalence, antibiotic susceptibility and characterization of antibiotic resistant genes among carbapenem-resistant Gram-negative *Bacilli* and yeast in intestinal flora of cancer patients in North Lebanon. *J Infect Public Health*, doi: 10.1016/j.jiph.2016.10.009

Clavijo A M, Conray G, Santander J, Aponte F (2002) First report of *E. tarda* from tilapias in Venezuela. *Bull Eur Assoc Fish Pathol*, 22: 280-282

Cohen DPA, Renes J, Bouwman FG, Zoetendal EG, Mariman E, de Vos WM y col. (2006) Proteomic analysis of log to stationary growth phase *Lactobacillus plantarum* cells and a 2-DE database. *Proteomics*, 6: 6485-6493

Cools P, Haelters J, Lopes dos Santos Santiago G, Claeys G, Boelens J, Leroux-Roels I, y col. (2013) *Edwardsiella tarda* sepsis in a live-stranded sperm whale (*Physeter macrocephalus*) *Vet Microbiol*, 166: 311-315

Crow J y Aoki K (1984) Group selection for a polygenic behavioral trait estimating the degree of population subdivision. *Proc Natl Acad Sci USA*, 81: 6073-6077

Crumlish M, Dung TT, Turnbull JF, Ngoc NTN, Ferguson HW (2002) Identification of *Edwardsiella ictaluri* from diseased freshwater catfish, *Pangasius hypophthalmus* (Sauvage), cultured in the Mekong Delta, Vietnam. *J Fish Dis*, 25: 733-736

Cunha BA (2009) Antibiotic resistance. *Med Clin North Am*, 84: 1407-1429

Dang W, Hu YH, Sun L (2011) HtpG is involved in the pathogenesis of *Edwardsiella tarda*. *Vet Microbiol*, 152:394-400

De las Rivas B, Marcobal A, Muñoz R (2006) Development of a multilocus sequence typing method for analysis of *Lactobacillus plantarum* strains. *Microbiology*, 152: 85-93

Didelot X (2010) Sequence based analysis of bacterial populations. En *Bacterial population genetics in infectious diseases*. Eds DA Robinson, D Falusch, EJFeil. John Wiley & Sons, pp 37-60

- Didelot X y Falush D (2007) Inference of bacterial microevolution using multilocus sequence data. *Genetics*, 175: 1251-1266
- Didelot X y Maiden MC (2010) Impact of recombination on bacterial evolution. *Trends Microbiol*, 18: 315-322
- Du M, Chen J, Zhang X, Li A, Li Y, Wang Y (2007) Retention of virulence in a viable but nonculturable *Edwardsiella tarda* isolate. *Appl Environ Microbiol*, 73: 1349-1354
- Dunn MF, Ramírez-Trujillo JA, Hernández-Lucas I (2009) Major roles of isocitrate lyase and malate synthase in bacterial and fungal pathogenesis. *Microbiology*, 155: 3166-3175
- Eaves LE, Ketterer PJ, Anderson IG, Beumer JP (1990) The isolation and identification of *Edwardsiella tarda* from a diseased native Australian eel *Anguilla reinhardtii*. *Aust Vet J*, 67: 336-337
- Edwards U, Rogall T, Blocker H, Emde M, Bottger EC (1989) Isolation and direct complete nucleotide determination of entire genes. Characterization of a gene coding for 16S ribosomal RNA. *Nucleic Acids Res*, 17: 7843-7853
- Esteve C, Herraiz S, Alcaide E (2006) Occurrence of *Edwardsiella tarda* in wild European eels *Anguilla anguilla* from Mediterranean Spain. *Dis Aquat Org*, 73: 77-81
- Ewing WH, Mcwhorter AC, Escobar MR, Lubin A (1965) *Edwardsiella*, a new genus of *Enterobacteriaceae* based on a new species, *E. tarda*. *Int B Bact Nomencl T*, 15: 33-38
- Excoffier L y Lischer HEL (2010) Arlequin suite ver 3.5: a new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Mol Ecol Resour*, 10: 564-567
- Falush D, Stephens M, Pritchard JK (2003) Inference of population structure using Multilocus genotype data: linked loci and correlated allele frequencies. *Genetics*, 164: 1567-1587
- Falush D, Stephens M, Pritchard JK (2007) Inference of population structure using Multilocus genotype data, dominant markers and null alleles. *Mol Ecol Notes*, 7: 574-578

- FAO (2016). El estado mundial de la pesca y la acuicultura 2016. Contribución a la seguridad alimentaria y la nutrición para todos. Roma
- Farmer JJ, Brenner DONJ, Clark WA (1976) Proposal to conserve the specific epithet *tarda* over the specific epithet *anguillimortiferum* in the name of the organism presently known as *Edwardsiella tarda*: request for an opinion. *Int J Syst Evol Microbiol*, 26: 293-294
- Farmer JJIII (1999) *Enterobacteriaceae*: Introduction and Identification. En: Manual of clinical microbiology 7<sup>th</sup>. Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Tenove FC, Tenover FC (eds), Washington DC. ASM Press, pp 438-449
- Farris JS (1970) Methods for computing Wagner trees. *Syst Zool*, 19: 83-92
- Feil EJ, Holmes EC, Bessen DE, Chan MS, Day NP, Enright MC, y col. (2001) Recombination within natural populations of pathogenic bacteria, short-term empirical estimates and long-term phylogenetic consequences. *Proc Natl Acad Sci USA*, 98: 182-187
- Feil EJ, Li BC, Aanensen DM, Hanage WP, Spratt BG (2004) eBURST: inferring patterns of evolutionary descent among clusters of related bacterial genotypes from multilocus sequence typing data. *J Bacteriol*, 186: 1518-1530
- Fleischmann RD, Adams MD, White O, Clayton RA, Kirkness EF, Kerlavage AR y col. (1995) Whole-genome random sequencing and assembly of *Haemophilus influenzae* Rd. *Science*, 269: 496-512
- Fogelson SB, Petty BD, Reichley SR, Ware C, Bowser PR, Crim MJ y col. (2016) Histologic and molecular characterization of *Edwardsiella piscicida* infection in large-mouth bass (*Micropterus salmoides*). *J Vet Diagn Invest*, 28: 338-344
- Francke C, Siezen RJ, Teusink B (2005) Reconstructing the metabolic network of a bacterium from its genome. *Trends Microbiol*, 13: 550-558
- Fu YX (1996) New statistical tests of neutrality for DNA samples from a population. *Genetics*, 143: 557-570
- Fu YX (1997) Statistical tests of neutrality of mutations against population growth, hitchhiking and background selection. *Genetics*, 147: 915-925
- Fu YX y Li WH (1993) Statistical tests of neutrality of mutations. *Genetics*, 133: 693-709

- Gao D, Li Y, Zheng E, Liu N, Shao Z, Lu C (2016) Eha, a regulator of *Edwardsiella tarda*, required for resistance to oxidative stress in macrophages. FEMS Microbiol Lett, 363 pii: fnw192
- GOLD (2016) Genomes OnLine Database. <https://gold.jgi-psf.org/>
- Gomila M, Peña A, Mulet M, Lalucat J, García-Valdés E (2015) Phylogenomics and systematics in *Pseudomonas*. Front Microbiol, doi:10.3389/fmicb.2015.00214
- González-Fuentes M, Latif F, Fernández F, Villanueva MP, Ulloa J, Fernández H (2010) Especies de la familia *Enterobacteriaceae* en heces de lobo marino común, *Otaria flavescens* establecido en el río Valdivia. Rev Biol Mar Oceanogr, 45: 331-334
- Goris J, Konstantinidis KT, Klappenbach JA, Coenye T, Vandamme P, Tiedje JM. (2007) DNA-DNA hybridization values and their relationship to whole-genome sequence similarities. Int J Syst Evol Microbiol, 57: 81-91
- Griffin MJ, Greenway TE, Wise DJ (2017) *Edwardsiella* spp. En: Fish viruses and bacteria: pathobiology and protection. Woo PTK y Cipriano RC (eds), Boston. CAB International, pp 190-210
- Griffin MJ, Quiniou SM, Cody T, Tabuchi M, Ware C, Cipriano RC y col. (2013) Comparative analysis of *Edwardsiella* isolates from fish in the eastern United States identifies two distinct genetic taxa amongst organisms phenotypically classified as *E. tarda*. Vet Microbiol, 165: 358-372
- Griffin MJ, Reichley SR, Greenway TE, Quiniou SM, Ware C, Gao DX y col. (2016) Comparison of *Edwardsiella ictaluri* isolates from different hosts and geographic origins. J Fish Dis, 39: 947-969
- Griffin MJ, Ware C, Quiniou SM, Steadman JM, Gaunt PS, Khoo LH y col. (2014) *Edwardsiella piscicida* identified in the Southeastern USA by *gyrB* sequence, species-specific and repetitive sequence-mediated PCR. Dis Aquat Organ, 108: 23-35
- Griffiths E (1991) Iron and bacterial virulence - a brief overview. Biol Met 4: 7-13
- Grimont PAD, Grimont F, Richard C, Sakazaki R (1980) *Edwardsiella hoshinae*, a new species of *Enterobacteriaceae*. Curr Microbiol, 4: 347-351

- Gurevich A, Saveliev V, Vyahhi N, Tesler G (2013) QUASt: quality assessment tool for genome assemblies. *Bioinformatics*, 29: 1072-1075
- Gygi SP, Aebersold R (2000) Mass spectrometry and proteomics. *Curr Op Chem Biol*, 4: 489-494
- Han HJ, Kim DH, Lee DC, Kim SM, Park SI (2006) Pathogenicity of *Edwardsiella tarda* to olive flounder, *Paralichthys olivaceus* (Temminck & Schlegel). *J Fish Dis*, 29:601-609
- Haubold B y Hudson RR (2000) LIAN 3.0: detecting linkage disequilibrium in multilocus data. *Bioinformatics*, 16: 847-848
- Havlis J, Thomas H, Sebela M, Shevchenko A (2003) Fast-response proteomics by accelerated in-gel digestion of proteins. *Anal Chem*, 75: 1300-1306
- Hawke JP y Khoo LH (2004) Infectious diseases. En: *Biology and culture of the channel catfish*. Tucker CS y Hargreaves JA (eds), Amsterdam. Elsevier BV, pp 387-443
- Hawke JP, Kent M, Rogge M, Baumgartner W, Wiles J, Shelley J y col. (2013) Edwardsiellosis caused by *Edwardsiella ictaluri* in laboratory populations of zebrafish *Danio rerio*. *J Aquat Anim Health* 25, 171-183
- Hawke JP, McWhorther AC, Steigerwalt AG, Brenner DJ (1981) *Edwardsiella ictaluri* sp. nov., the causative agent of enteric septicemia of catfish. In *J Syst Bacteriol*, 31: 396-440
- He Y, Xu T, Fossheim LE, Zhang XH (2012) FliC, a flagellin, is a essential for the growth and virulence of fish pathogen *Edwardsiella tarda*. *PLoS ONE*, doi:10.1371/journal.pone.0045070.
- Henry CS, DeJongh M, Best AA, Frybarger PM, Lindsay B, Stevens RL (2010) High-throughput generation, optimization and analysis of genome-scale metabolic models. *Nat Biotechnol*, 28: 977-982
- Henz SR, Huson DH, Auch AF, Nieselt-Struwe K, Schuster SC (2005) Whole-genome prokaryotic phylogeny. *Bioinformatics*, 21: 2329-2335
- Herman RL y Bullock GL (1986) Pathology caused by the bacterium *Edwardsiella tarda* in striped bass. *T Am Fish Soc* 115: 232-235
- Hilton L y Wilson J (1980) Terramycin-resistant *Edwardsiella tarda* in channel catfish. 42: 159

- Hirono I, Tange N, Aoki T (1997) Iron-regulated haemolysin gene from *Edwardsiella tarda*. Mol Microbiol, 24: 851-856
- Horenstein S, Smolowitz R, Uhlinger K, Roberts S (2004) Diagnosis of *Edwardsiella tarda* infection in oyster toadfish (*Opsanus tau*) held at the Marine Resources Center. Biol Bull, 207: 171
- Hoshina T (1962) On a new bacterium, *Paracolobactrum anguillimortiferum* n. sp. Bull Jpn Soc Sci Fish, 28: 162-164
- Hu YH, Sun L (2016) The global regulatory effect of *Edwardsiella tarda* Fur on iron acquisition, stress resistance, and host infection: A proteomics-based interpretation. J Proteomics, 140: 100-110
- Hubisz M, Falush D, Stephens M, Pritchard JK (2009) Inferring weak population structure with the assistance of sample group information. Mol Ecol Resour, 9: 1322-1332
- Hudson RR (1990) Gene genealogies and the coalescent process. Oxf Surv Evol Biol, 7: 1-44
- Hudson RR y Kaplan NL (1985) Statistical properties of the number of recombination events in the history of a sample of DNA sequences. Genetics, 111: 147-164
- Humphrey JD, Lancaster C, Gudkovs N, McDonald W (1986) Exotic bacterial pathogens *Edwardsiella tarda* and *Edwardsiella ictaluri* from imported ornamental fish *Betta splendens* and *Puntius conchonus*, respectively: isolation and quarantine significance. Aust Vet J, 63: 369-371
- Huson DH y Bryant D (2006) Application of phylogenetic networks in evolutionary studies. Mol Biol Evol, 23: 254-267
- Igarashi A, Iida T, Crosa JH (2002) Iron-acquisition ability of *Edwardsiella tarda* with involvement in its virulence. Fish Pathol, 37:53-57
- Iwanowicz LR, Griffin AR, Cartwright DD, Blazer VS (2006) Mortality and pathology in brown bullheads *Amieurus nebulosus* associated with a spontaneous *Edwardsiella ictaluri* outbreak under tank culture conditions. Dis Aquat Organ, 70: 219-225
- Janda JM y Abbott SL (1993) Infections associated with the genus *Edwardsiella*: the role of *Edwardsiella tarda* in human disease. Clin Infect Dis, 17: 742-748
- Janda JM y Abbott SL (2010) The Genus *Aeromonas*: Taxonomy, Pathogenicity, and Infection. Clin Microbiol Rev, 23: 35-73

- Janda JM, Abbott SL, Kroske-Bystrom S, Cheung WKW, Powers K, Kokka RP y col. (1991) Pathogenic properties of *Edwardsiella* species. J Clin Microbiol, 29: 1997-2001
- Janssen P, Coopman R, Huys G, Swings J, Bleeker M, Vos P y col. (1996) Evaluation of the DNA fingerprinting method AFLP as a new tool in bacterial taxonomy. Microbiology, 142: 1881-1893
- Jensen JL, Bohonak AJ, Kelley ST (2005) Isolation by distance, web service. BMC Genet, doi: 10.1186/1471-2156-6-13
- Jiao XD, Zhang M, Hu YH, Sun L (2009) Construction and evaluation of DNA vaccines encoding *Edwardsiella tarda* antigens. Vaccine, 27: 5195-5202
- Jobichen C, Chakraborty S, Li M, Zheng J, Joseph L, Mok YK y col. (2010) Structural basis for the secretion of EvpC: a key type VI secretion system protein from *Edwardsiella tarda*. PLoS ONE, doi:10.1371/journal.pone.0012910
- Joh SJ, Kim MJ, Kwon HM, Ahn EH, Jang H, Kwon JH (2011) Characterization of *Edwardsiella tarda* isolated from farm-cultured eels, *Anguilla japonica*, in the Republic of Korea. J Vet Med Sci, 73: 7-11
- Jolley KA y Maiden MCJ (2010) BIGSdb: scalable analysis of bacterial genome variation at the population level. BMC Bioinformatics, 11: 595
- Jung YS y Kwon YM (2008) Small RNA ArrF regulates the expression of *sodB* and *feSII* genes in *Azotobacter vinelandii*. Curr Microbiol, 57: 593-597
- Kämpfer P y Glaeser SP (2012) Prokaryote taxonomy in the sequencing era the polyphasic approach revisited. Environ Microbiol, 14: 291-317
- Karp NA, McCormick PS, Russell MR, Lilley KS (2007) Experimental and statistical considerations to avoid false conclusions in proteomics studies using differential in-gel electrophoresis. Mol Cell Proteomics, 6: 1354-1364
- Kasornchandra J, Rogers WA, Plumb JA (1987) *Edwardsiella ictaluri* from walking catfish, *Clarias batrachus* L., in Thailand. J Fish Dis, 10: 137-138
- Katharios P, Kokkari C, Dourala N, Smyrli M (2015) First report of Edwardsiellosis in cage-cultured sharpsnout sea bream, *Diplodus puntazzo* from the Mediterranean. BMC Vet Res, 11: 155

- Kebede B y Habtamu T (2016) Isolation and Identification of *Edwardsiella tarda* from Lake Zeway and Langano, Southern Oromia, Ethiopia. *Fish Aquac J*, doi:10.4172/2150-3508.1000184
- Kehrer JP (2000) The Haber-Weiss reaction and mechanisms of toxicity. *Toxicology*, 149: 43-50
- Kent ML y Lyons JM (1982) *Edwardsiella ictaluri* in the green knife fish, *Eigemannia virescens*. *Fish Health News*, 1: 1-2
- Keskin O, Seçer S, İzgür M, Türkyilmaz S, Mkakosya RS (2004) *Edwardsiella ictaluri* infection in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Turk J Vet Anim Sci*, 28: 649-653
- Kim KI, Kang JY, Park JY, Joh SJ, Lee HS, Kwon YK (2014) Phenotypic traits, virulence-associated gene profile and genetic relatedness of *Edwardsiella tarda* isolates from Japanese eel *Anguilla japonica* in Korea. *Lett Appl Microbiol*, 58: 168-176
- Kimura M (1968) Evolutionary rate at the molecular level. *Nature*, 217: 624-626
- Kimura M (1980) A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *J Mo Evol*, 16: 111-120
- Kimura M (1983) The neutral theory of molecular evolution. Cambridge University Press, Cambridge.
- King MB y Adler DL (1964) A previously undescribed group of *Enterobacteriaceae*. *Am J Clin Path*, 41: 230
- Klesius P, Lovy J, Washuta E, Arias C (2003) Isolation of *Edwardsiella ictaluri* from tadpole madtom in a southwestern New Jersey river. *J Aquat Anim Health*, 15: 295-301
- Klesius PH (1994) Transmission of *Edwardsiella ictaluri* from infected, dead to noninfected channel catfish. *J Aquat Anim Health*, 6: 180-182
- Klesius PH y Shoemaker CA (1999) Development and use of modified live *Edwardsiella ictaluri* vaccine against enteric septicemia of catfish. *Adv Vet Med*, 41: 523-537
- Kobayashi M y Brummett R (2014) Disease management in aquaculture. En: Forum for Agricultural Risk Management in Development. <http://www.agriskmanagementforum.org/content/disease-management-aquaculture>

- Köhler S, Foulongne V, Ouahrani-Bettache S, Bourg G, Teyssier J, Ramuz M y col. (2002) The analysis of the intramacrophagic virulome of *Brucella suis* deciphers the environment encountered by the pathogen inside the macrophage host cell. PNAS, 99: 157911-157916
- Kokubo T, Iida T, Wakabayashi H (1990) Production of siderophore by *Edwardsiella tarda*. Fish Pathol, 4:237-241
- Konstantinidis K, Tiedje JM. (2005) Genomic insights that advance the species definition for prokaryotes. Proc Natl Acad Sci USA, 102: 2567-2592
- Kostakioti M, Newman CL, Thanassi DG, Stathopoulos C (2005) Mechanisms of protein export across the bacterial outer membrane. J Bacteriol, 187: 4306-4314
- Kotetishvili M, Kreger A, Wauters G, Morris JG Jr, Sulakvelidze A, Stine OC (2005) Multilocus Sequence typing for studying genetic relationships among *Yersinia species*. J Clin Microbiol, 43: 2674-2684
- Kottmann R, Gray T, Murphy S, Kagan L, Kravitz S, Lombardot T y col. (2008) A standard MIGS/MIMS compliant XML schema: toward the development of the Genomic Contextual Data Markup Language (GCDML). Omics, 12: 115-121
- Kumar G, Sharma P, Rathore G, Bisht D, Sengupta U (2010) Proteomic analysis of outer membrane proteins of *Edwardsiella tarda*. J Appl Microbiol, 108:2214-2221
- Kumar S, Stecher G, Tamura K (2016) MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets. Mol Biol Evol, 33: 1870-1874
- Kurtz S, Phillippy A, Delcher AL, Smoot M, Shumway M, Antonescu C y col. (2004). Versatile and open software for comparing large genomes. Genome Biol, 5: R12
- Kusuda R, Toyoshima T, Iwamura Y, Sako H (1976) *Edwardsiella tarda* from an epizootic of mullets (*Mugil cephalus*) in Okitsu bay. Bull Japan Soc Sci Fish 42: 271-275
- Kwon SR, Nam YK, Kim SK, Kim KH (2006) Protection of tilapia (*Oreochromis mosambicus*) from edwardsiellosis by vaccination with *Edwardsiella tarda* ghosts. Fish Shellfish Immunol, 20: 621-626
- Kwon SR, Nam YK, Kim SK, Kim KH (2007) Efficacy of oral immunization with *Edwardsiella tarda* ghosts against edwardsiellosis in olive flounder (*Paralichthys olivaceus*). Aquaculture, 269: 84-88

- Lan J, Zhang XH, Wang Y, Chen J, Han Y (2008) Isolation of an unusual strain of *Edwardsiella tarda* from turbot and establish a PCR detection technique with the *gyrB* gene. J Appl Microbiol, 105: 644-651
- Land M, Hauser L, Jun SR, Nookaew I, Leuze MR, Ahn TH y col. (2015) Insights from 20 years of bacterial genome sequencing. Funct Integr Genomics, 15(2): 141-161
- Larsen RA, Myers PS, Skare JT, Seachord CL, Darveau RP, Postle K (1996) Identification of TonB homologs in the family *Enterobacteriaceae* and evidence for conservation of TonB-dependent energy transduction complexes. J Bacteriol, 178:1363-1373
- Lee I, Kim YW, Park SC, Chun J (2015) OrthoANI: an improved algorithm and software for calculating average nucleotide identity. Int J Syst Evol Microbiol, 66: 1100-1103
- Leotta GA, Piñeyro P, Serena S, Vigo GB (2009) Prevalence of *Edwardsiella tarda* in Antarctic wildlife. Polar biology, 32: 809-812
- Leung KY, Siame BA, Tenkink BJ, Noort RJ, Mok YK (2012) *Edwardsiella tarda* - virulence mechanisms of an emerging gastroenteritis pathogen. Microbes Infect, 14:26-34
- Li MF, Hu YH, Zheng WJ, Sun BG, Wang CL, Sun L (2012) Inv1: an *Edwardsiella tarda* invasin and a protective immunogen that is required for host infection. Fish Shellfish Immunol, 32:586-592
- Librado P y Rozas J (2009) DnaSP v5, a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. Bioinformatics, 25: 1451-1452
- Lim BL (2010) TonB-dependent receptors in nitrogen-fixing nodulating bacteria. Microbes Environ, 25:67-74
- Lindstedt BA, Torpdahl M, Vergnaud G, Le Hello S, Weill FX, Tietze E y col. (2013) Use of multilocus variable-number tandem repeat analysis (MLVA) in eight European countries, 2012. EuroSurveillance, 18: pii=20385.
- Lindquist JA (1991) Medium and procedure for the direct, selective isolation of *Edwardsiella tarda* from environmental water samples. Abstracts of the annual meeting of the American Society for Microbiology, C-303 p. 302.
- Liu F, Tang X, Sheng X, Xing J, Zhan W (2017a) Construction and evaluation of an *Edwardsiella tarda* DNA vaccine encoding outer membrane protein C. Microb Pathog, 104: 238-247

- Liu X, Zhang H, Jiao C, Liu Q, Zhang Y, Xiao J (2017b) Flagellin enhances the immunoprotection of formalin-inactivated *Edwardsiella tarda* vaccine in turbot. *Vaccine*. 35:369-374
- Liu XJ, Kang LQ, Liu YJ, Li H, Peng X (2013) Characterization of the *Edwardsiella tarda* proteome in response to different environmental stresses. *J Proteomics*, 80:320-333
- Liu Y, Zhang H, Liu Y, Li H, Peng X (2012) Determination of the heterogeneous interactome between *Edwardsiella tarda* and fish gills. *J Proteomics*, 75:1119-1128
- Lo DY, Lee YJ, Wang JH, Kuo HC (2014) Antimicrobial susceptibility and genetic characterisation of oxytetracycline-resistant *Edwardsiella tarda* isolated from diseased eels. *Vet Rec*, 175: 203
- Loch PT, Hawke JP, Reichley SR, Faisal M, Del Piero F, Griffin MJ (2017) Outbreaks of edwardsiellosis caused by *Edwardsiella piscicida* and *Edwardsiella tarda* in farmed barramundi (*Lates calcarifer*). *Aquaculture*, 481: 202-210
- Lopez-Serra P, Marcilla M, Villanueva A, Ramos-Fernandez A, Palau A, Leal L y col. (2014) A DERL3-associated defect in the degradation of SLC2A1 mediates the Warburg effect. *Nat Commun*, doi: 10.1038/ncomms4608
- Lorenz MC y Fink GR (2001) The glyoxylate cycle is required for fungal virulence. *Nature*, 412: 83-86
- Lv Y, Zheng J, Yang M, Wang Q, Zhang Y (2012) An *Edwardsiella tarda* mutant lacking UDP-glucose dehydrogenase shows pleiotropic phenotypes, attenuated virulence, and potential as a vaccine candidate. *Vet Microbiol* 160: 506-512
- Maiden MC (2006) Multilocus sequence typing of bacteria. *Annu Rev Microbiol*, 60: 561-588
- Maiden MCJ, Bygraves JA, Feil E, Morelli G, Russell JE, Urwin E y col. (1998) Multilocus sequence typing: a portable approach to the identification of clones within populations of pathogenic microorganisms. *Proc Natl Acad Sci USA*, 95: 3140-3145
- Mäkelä PH y Mayer H (1976) Enterobacterial common antigen. *Bacteriol Rev*, 40: 591-632
- Mantel N (1967) The detection of disease clustering and a generalized regression approach. *Cancer Res*, 27: 209-220

- Martin DP, Lemey P, Lott M, Moulton V, Posada D, Lefevre P (2010) RDP3: a flexible and fast computer program for analyzing recombination. *Bioinformatics*, 26: 2462-2463
- Martin JD (1984) Atlantic salmon and alewife passage through a pool and weir fishway of the Magaguadavic River, New Brunswick, Canada during 1983. Abstract. *Can Manuscri Rep Fish Aqua Sci*, 1938
- Martino ME, Fasolato L, Montemurro F, Rosteghin M, Manfrin A, Patarnello T (2011) Determination of microbial diversity of *Aeromonas* strains on the basis of multilocus sequence typing, phenotype, and presence of putative virulence genes. *Appl Environ Microbiol*, 77: 4986-5000
- Mathew JA, Tan YP, Srinivasa Rao PS, Lim TM, Leung KY (2001) *Edwardsiella tarda* mutants defective in siderophore production, motility, serum resistance and catalase activity. *Microbiology*, 147:449-457
- Matsuyama T, Kamaishi T, Ooseko N, Kurohara K, Iida T (2005) Pathogenicity of motile and non-motile *Edwardsiella tarda* to some marine fish. *Fish Pathol*, 40: 133-136
- Maynard-Smith J, Smith NH, O'Rourke M, Spratt BG (1993) How clonal are bacteria? *Proc Natl Acad Sci USA*, 90: 4384-4388
- McQuiston JR, Herrera-Leon S, Wertheim BC, Doyle J, Fields PI, Tauxe RV y col. (2008) Molecular phylogeny of the *Salmonellae*: relationships among *Salmonella* species and subspecies determined from four housekeeping genes and evidence of lateral gene transfer events. *J Bacteriol*, 190: 7060-7067
- Meier-Kolthoff JP, Auch AF, Klenk H-P, Göker M (2013) Genome sequence-based species delimitation with confidence intervals and improved distance functions. *BMC Bioinformatics*, 14: 60
- Meyer EP y Bullock GL (1973) *Edwardsiella tarda*, a new pathogen of channel catfish (*Ictalurus punctatus*). *Appl Microbiol*, 25: 155-156
- Miller JR, Koren S, Sutton G (2010) Assembly algorithms for next-generation sequencing data. *Genomics*, 95: 315-27
- Mishra A, Taneja N, Sharma M (2012) Environmental and epidemiological surveillance of *Vibrio cholerae* in a cholera-endemic region in India with freshwater environs. *J Appl Microbiol*, 112: 225-237

- Miyoshi-Akiyama T, Hayakawa K, Ohmagari N, Shimojima M, Kirikae T (2013) Multilocus sequence typing (MLST) for characterization of *Enterobacter cloacae*. PLoS One, doi: 10.1371/journal.pone.0066358
- Mohammed HH y Arias CR (2014) Epidemiology of columnaris disease affecting fishes within the same watershed. Dis Aquat Organ, 109: 201-211
- Mohanty BR y Sahoo PK (2007) Edwardsiellosis in fish: a brief review. J Biosci, 32: 1331-1344
- 228 Monk J y Palsson BO (2014) Genetics. Predicting microbial growth. Science, 344: 1448-1449
- Monteoliva L y Albar JP (2004) Differential proteomics: an overview of gel and non-gel based approaches. Brief Funct Genomic Proteomic, 3: 220-239
- Nadirah M, Najiah M, Teng SY (2012) Characterization of *Edwardsiella tarda* isolated from Asian Seabass, *Lates calcarifer*. Int Food Res J, 19: 1247-1252
- Nagai T, Iwamoto E, Sakai T, Arima T, Tensha K, Iida Y y col. (2008) Characterization of *Edwardsiella ictaluri* isolated from wild ayu *Plecoglossus altivelis* in Japan. Fish Pathol, 43: 158-163
- Najiah M, Lee SW, Lee KL (2006) Phenotypic characterization and numerical analysis of *Edwardsiella tarda* in wild asian swamp eel, *Monopterus albus* in Terengganu. J Sustainability Sci Manage, 1: 85-91
- Nakatsugawa T (1983) *Edwardsiella tarda* isolated from cultured young flounder. Fish Pathol, 18: 99-101
- Nakhro K, Devi TB, Kamilya D (2013) In vitro immunopathogenesis of *Edwardsiella tarda* in catla *Catla catla* (Hamilton). Fish Shellfish Immunol, 35: 175-179
- Nei M (1978) Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. Genetics, 89: 583-590
- Nei M y Gojobori T (1986) Simple methods for estimating the numbers of synonymous and non synonymous nucleotide substitutions. Mol Biol Evol, 3: 418-426
- Nei M y Kumar S (2000) Molecular Evolution and Phylogenetics. Oxford University Press, New York. pp 333

- Nei M y Li WH (1979) Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. *Proc Natl Acad Sci USA*, 76: 5269- 5273
- Neuhoff V, Arold N, Taube D, Ehrhardt W (1988) Improved staining of proteins in polyacrylamide gels including isoelectric focusing gels with clear background at nanogram sensitivity using Coomassie Brilliant Blue G-250 and R-250. *Electrophoresis*, 9: 255-262
- Nicolas P, Mondot S, Achaz G, Bouchenot C, Bernardet JF, Duchaud E (2008) Population structure of the fish-pathogenic bacterium *Flavobacterium psychrophilum*. *Appl Environ Microbiol*, 74: 3702-3709
- Nougayrede P, Vuillaume A, Vigneulle M, Faivre B, Luengo S, Delprat J (1994) First isolation of *Edwardsiella tarda* from diseased turbot (*Scophthalmus maximus*) reared in a sea farm in the Bay of Biscay. *Bull Eur Assoc Fish Pathol*, 14: 128-129
- Nucci C, da Silveira WD, da Silva Corrêa S, Nakazato G, Bando SY, Ribeiro MA y col. (2002) Microbiological comparative study of isolates of *Edwardsiella tarda* isolated in different countries from fish and humans. *Vet Microbiol*, 89: 29-39
- Nurk S, Bankevich A, Antipov D, Gurevich A, Korobeynikov A, Lapidus A, Prjibelsky A, y col. (2013) Assembling genomes and mini-metagenomes from highly chimeric reads. *Lect N Bioinformat*, 7821: 158-170
- Nyström T (1994) The glucose-starvation stimulon of *Escherichia coli*: induced and repressed synthesis of enzymes of central metabolic pathways and role of acetyl phosphate in gene expression and starvation survival. *Mol Microbiol*, 12: 833-843
- O'Toole G, Kaplan HB, Kolter R (2000) Biofilm formation as microbial development. *Annu Re Microbiol*, 54: 49-79
- Oguro K, Tamura K, Yamane J, Shimizu M, Yamamoto T, Ikawa T y col. (2014) Draft genome sequences of two genetic variant strains of *Edwardsiella piscicida*, JF1305 and RSB1309, isolated from olive flounder (*Paralichthys olivaceus*) and Red Sea Bream (*Pagrus major*) cultured in Japan, respectively. *Genome Announc*, 2: pii: e00546-14
- Ohta T y Basten CJ (1992) Gene conversion generates hypervariability at the variable regions of kallikerins and their inhibitors. *Mol Phylogenet Evol*, 1: 87-90

- Okuda J, Murayama F, Yamanoi E, Iwamoto E, Matsuoka S, Nishibuchi M y col. (2007) Base changes in the *fliC* gene of *Edwardsiella tarda*: possible effects on flagellation and motility. *Dis Aquat Org*, 76: 113-121
- Ong SE, Blagoev B, Kratchmarova I, Kristensen DB, Steen H, Pandey A y col. (2002) Stable isotope labeling by amino acids in cell culture, SILAC, as a simple and accurate approach to expression proteomics. *Mol Cell Proteomics*, 1: 376-386
- Otto K, Norbeck J, Larsson T, Karlsson KA, Hermansson M (2001) Adhesion of type 1-fimbriated *Escherichia coli* to abiotic surfaces leads to altered composition of outer membrane proteins. *J Bacteriol*, 183: 2445-2453
- Paradis S, Boissinot M, Paquette N, Bélanger SD, Martel EA, Boudreau DK y col. (2005) Phylogeny of the *Enterobacteriaceae* based on genes encoding elongation factor Tu and F-ATPase beta-subunit. *Int J Syst Evol Microbiol* 55: 2013-2025
- Park SB, Jang HB, Nho SW, Cha IS, Hikima JI, Ohtani M y col. (2011) Outer membrane vesicles as a candidate vaccine against edwardsiellosis. *PLoS ONE*, doi: 10.1371/journal.pone.0017629
- Patterson SD y Aebersold R (1995) Mass spectrometric approaches for the identification of gel-separated proteins. *Electrophoresis*, 16: 1791-1814
- Payne SM (1993) Iron acquisition in microbial pathogenesis. *Trends Microbiol* 1: 66-69
- Peña JA, Alfonso-Sánchez MA, Pérez-Miranda AM, García-Obregón S, Gómez-Pérez L (2009) GeDis: Un programa para análisis de datos en Antropogenética. *Antropo*, 20: 49-56
- Pérez-Losada M, Browne EB, Madsen A, Wirth T, Viscidi RP, Crandall KA (2006) Population genetics of microbial pathogens estimated from multilocus sequence typing (MLST) data. *Infect Genet Evol*, 6: 97-112
- Pham HN, Ohkusu K, Mishima N, Noda M, Monir Shah M, Sun X y col. (2007) Phylogeny and species identification of the family *Enterobacteriaceae* based on *dnaJ* sequences. *Diagn Microbiol Infect Dis*, 58: 153-161
- Plumb JA y Quinlan EE (1986) Survival of *Edwardsiella ictaluri* in pond water and bottom mud. *Prog Fish-Culturist*, 48: 212-221

- Plumb JA y Shoemaker C (1995) Effects of temperature and salt concentration on latent *Edwardsiella ictaluri* infections in channel catfish, *Dis Aquat Org*, 21: 171-175
- Plumb JA y Vinitnantharat S (1989) Biochemical, biophysical, and serological homogeneity of *Edwardsiella ictaluri*. *J Aquat Anim Health*, 1: 51-56
- Pridgeon JW y Klesius PH (2012) Major bacterial diseases in aquaculture and their vaccine development. *CAB Reviews*, 7 (048)
- Pritchard JK, Stephens M, Donnelly P (2000) Inference of Population Structure Using Multilocus Genotype Data. *Genetics*, 155: 945-995
- Raftis EJ, Salvetti E, Torriani S, Felis GE, O'Toole PW (2011) Genomic diversity of *Lactobacillus salivarius*. *Appl Environ Microbiol*, 77: 954-965
- Ramo A, Monteagudo LV, Del Cacho E, Sánchez-Acedo C, Quílez J (2016) Intra-Species genetic diversity and clonal structure of *Cryptosporidium parvum* in sheep farms in a confined geographical area in Northeastern Spain. *PLoS One*. doi: 10.1371/journal.pone.0155336
- Ramos-Fernández A, Paradela A, Navajas R, Albar JP (2008) Generalized method for probability-based peptide and protein identification from tandem mass spectrometry data and sequence database searching. *Mol Cell Proteomics*, 7: 1748-1754
- Ramos-Onsis SE y Rozas J (2002) Statistical properties of new neutrality tests against population growth. *Mol Biol Evol*, 19: 2092-2100
- Reales-Calderón (2013) Estudio de la respuesta de macrófagos murinos y humanos frente a *Candida albicans* utilizando diversas técnicas proteómicas. Tesis doctoral. Universidad Complutense de Madrid, Madrid, España.
- Reddacliff GL, Hornitzk M, Whittington RJ (1996) *Edwardsiella tarda* septicaemia in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aust Vet J*, 73: 30
- Reichley SR, Ware C, Greenway TE, Wise DJ, Griffin MJ (2015) Real-time polymerase chain reaction assays for the detection and quantification of *Edwardsiella tarda*, *Edwardsiella piscicida*, and *Edwardsiella piscicida*-like species in catfish tissues and pond water. *J Vet Diagn Invest*, 27: 130-139

- Reichley SR, Ware C, Steadman J, Gaunt PS, García JC, La Frenz BR y col (2017) Comparative phenotypic and genotypic analysis of *Edwardsiella* spp. isolates from different hosts and geographic origins, with an emphasis on isolates formerly classified as *E. tarda* and an evaluation of diagnostic methods. J Clin Microbiol doi:10.1128/JCM.00970-17
- Richter M y Rosselló Mora R (2009) Shifting the genomic gold standard for the prokaryotic species definition. Proc Natl Acad Sci USA, 106: 19126-19131
- 232 Rogge ML, Dubytska L, Jung TS, Wiles J, Elkamel AA, Rennhoff A y col. (2013) Comparison of Vietnamese and US isolates of *Edwardsiella ictaluri*. Dis Aquat Organ, 106: 17-29
- Ross PL, Huang YN, Marchese JN, Williamson B, Parker K, Hattan S y col. (2004) Multiplexed protein quantitation in *Saccharomyces cerevisiae* using amine-reactive isobaric tagging reagents. Mol Cell Proteomics, 3: 1154-1169
- Rosselló-Mora R y Amann R (2001) The species concept for prokaryotes. FEMS Microbiol Rev, 25: 39-67
- Sae-Oui D, Muroga K, Nakai T (1984) A case of *Edwardsiella tarda* infection in cultured colored *Cyprinus carpio*. Fish Pathol, 19: 197-199
- Sahoo PK, Mukherjee SC, Sahoo SK (1998) *Aeromonas hydrophila* versus *Edwardsiella tarda*: A pathoanatomical study in *Clarias batrachus*. J Aquacult, 6: 57-66
- Sahoo PK, Swain P, Sahoo SK, Mukherjee SC, Sahu AK (2000) Pathology caused by the bacterium *Edwardsiella tarda* in *Anabas testudineus* (Bloch). Asian Fish Sci, 13: 357-362
- Sakai T, Iida T, Osatomi K, Kanai K (2007) Detection of type 1 fimbrial genes in fish pathogenic and non-pathogenic *Edwardsiella tarda* strains by PCR. Fish Pathol, 42: 152-157
- Sakai T, Matsuyama T, Nishioka T, Nakayasu C, Kamaishi T, Yamaguchi K y col. (2009a) Identification of major antigenic proteins of *Edwardsiella tarda* recognized by Japanese flounder antibody. J Vet Invest, 21: 504-509
- Sakai T, Matsuyama T, Sano M, Iida T (2009b) Identification of novel putative virulence factors, adhesin AIDA and type VI secretion system, in atypical strains of fish

- pathogenic *Edwardsiella tarda* by genomic subtractive hybridization. *Microbiol Immunol*, 53:131-139
- Sakai T, Yuasa K, Ozaki A, Sano M, Okuda R, Nakai T y col. (2009c) Identification of *Edwardsiella ictaluri* and *E. tarda* by species-specific PCR targeted to upstream region of fimbrial gene. *J Aquat Anim Health*, 21: 124-132
- Sakai T, Yuasa K, Ozaki A, Sano M, Okuda R, Nakai T y col. (2009d) Genotyping of *Edwardsiella ictaluri* isolates in Japan using amplified-fragment length polymorphism analysis. *Lett Appl Microbiol*, doi:10.1111/j.1472-765X.2009.02686.x
- Sakazaki R y Murata Y (1962) The new group of the *Enterobacteriaceae*, the Asakusa group. *Jap J Bact*, 17: 616
- Sakazaki R y Tamura K (1975) Priority of the specific epithet *anguillimortiferum* over the specific epithet *tarda* in the name of the organism presently known as *Edwardsiella tarda*. *Int J Syst Evol Microbiol*, 25: 219-220
- Salerno A, Delétoile A, Lefevre M, Ciznar I, Krovacek K, Grimont P (2007) Recombining population structure of *Plesiomonas shigelloides* (*Enterobacteriaceae*) revealed by Multilocus Sequence Typing. *J Bacteriol*, 189: 7808-7818
- Sánchez-Busó L, Coscollà M, Palero F, Camaró ML, Gimeno A, Moreno P y col. (2015) Geographical and Temporal Structures of *Legionella pneumophila* Sequence Types in Comunitat Valenciana (Spain), 1998 to 2013. *Appl Environ Microbiol*, 20: 7106-7113
- Sánchez-Busó L, Guiral S, Crespi S, Moya V, Camaró ML, Olmos MP y col. (2016) Genomic Investigation of a Legionellosis Outbreak in a Persistently Colonized Hotel. *Front Microbiol*, 21 (6): 1556
- Santander J, Golden G, Wanda SY, Curtiss R 3rd (2012) Fur-regulated iron uptake system of *Edwardsiella ictaluri* and its influence on pathogenesis and immunogenicity in the catfish host. *Infect Immun*, 80: 2689-2703
- Sawabe T, Kita-Tsukamoto K, Thompson FL (2007) Inferring the evolutionary history of vibrios by means of Multilocus Sequence Analysis. *J Bacteriol*, 21: 7932-7936
- Schauer K, Rodionov DA, de Reuse H (2008) New substrates for TonB-dependent transport: do we only see the 'tip of the iceberg'? *Trends Biochem Sci*, 33: 330-338

- Schnappinger D, Erhrt S, Voskuil MI, Liu Y, Mangan JA, Monahan IM y col. (2003) Transcriptional adaptation of *Mycobacterium tuberculosis* within macrophages: insights into the phagosomal environment. *J Exp Med*, 198: 693-704
- Schwarz G (1978) Estimating the dimension of a model. *Ann Statist*, 6: 461-464
- Shafiei S, Viljamaa-Dirks S, Sundell K, Heinikainen S, Abayneh T, Wiklund T (2016) Recovery of *Edwardsiella piscicida* from farmed white-fish, *Coregonus lavaretus* (L.), in Finland. *Aquaculture*, 454: 19-26
- 234 Shao S, Lai Q, Liu Q, Wu H, Xiao J, Shao Z y col. (2015) Phylogenomics characterization of a highly virulent *Edwardsiella* strain ET080813(T) encoding two distinct T3SS and three T6SS gene clusters, propose a novel species as *Edwardsiella anguillarum* sp. nov. *Syst Appl Microbiol*, 38: 36-47
- Sheldon JR, Marolda CL, Heinrichs DE (2014) TCA cycle activity in *Staphylococcus aureus* is essential for iron-regulated synthesis of staphyloferrin A, but not staphyloferrin B: the benefit of a second citrate synthase. *Mol Microbiol*, 92: 824-839
- Shetty M, Maiti B, Venugopal MN, Karunasagar I (2014) First isolation and characterization of *Edwardsiella tarda* from diseased striped catfish, *Pangasianodon hypophthalmus* (Sauvage). *J Fish Dis*, 37: 265-271
- Shoemaker C, Klesius P, Evans J (2002) In ovo methods for utilizing the modified live *Edwardsiella ictaluri* vaccine against enteric septicemia in channel catfish. *Aquaculture*, 203: 221-227
- Simmons KL, Churchill GA, Aquadro GF (1995) Properties of statistical tests of neutrality for ADN polymorphism data. *Genetics*, 141: 413-429
- Singh M, Singh S, Mills-Robertson F, McMurphy MA, Applegate RD, Crupp SS (2004) Antibiotic susceptibility of *Edwardsiella hoshinae* isolated from northern bobwhite quail (*Colinus virginianus*). *Vet Rec*, 155: 29
- Skerman VBD, McGowan V, Sneath PHA (1980) Approved Lists of Bacterial Names. *Inter J Syst Bacteriol*, 30: 225-420
- Slatkin M (1985) Gene flow in natural populations. *Ann Rev Ecol Syst*, 16: 393-430
- Slatkin M (1993) Isolation by distance in equilibrium and non equilibrium populations. *Evolution*, 47: 264-279

- Soto E, Griffin M, Arauz M, Riofrio A, Martinez A, Cabrejos ME (2012) *Edwardsiella ictaluri* as the causative agent of mortality in cultured Nile tilapia. *J Aquat Anim Health*, 24: 81-90
- Srinivasa Rao PS, Lim TM, Leung KY (2003) Functional genomics approach to the identification of virulence genes involved in *Edwardsiella tarda* pathogenesis. *Infect Immun*, 71:1343-1351
- Srinivasa Rao PS, Yamada Y, Peng Tan Y, Leung KY (2004) Use proteomics to identify novel virulence determinants that are required for *Edwardsiella tarda* pathogenesis. *Mol Microbiol*, 53:573-586
- Stackebrandt E y Goebel BM (1994) Taxonomic Note: A Place for DNA-DNA Reassociation and 16s rRNA Sequence Analysis in the Present Species Definition in Bacteriology.
- Stackebrandt E, Frederiksen W, Garrity GM, Grimont PAD, Kämpfer P, Maiden MCJ y col. (2002) Report of the ad hoc committee for the re-evaluation of the species definition in bacteriology. *Int J Syst Evol Microbiol*, 52: 1043-1047
- Stead D, Findon H, Yin Z, Walker J, Selway L, Cash P y col. (2005) Proteomic changes associated with inactivation of the *Candida glabrata* ACE2 virulence-moderating gene. *Proteomics*, 5: 1838-1848
- Strobeck C (1987) Average number of nucleotide differences in a sample from a single subpopulation, a test for population subdivision. *Genetics*, 117: 149-153
- Sun K, Cheng S, Wang F, Sun L (2009) Domain analysis of the *Edwardsiella tarda* ferric uptake regulator. *J Gen Appl Microbiol*, 55: 351-358
- Sun Y, Liu CS, Sun L (2010) Identification of an *Edwardsiella tarda* surface antigen and analysis of its immunoprotective potential as a purified recombinant subunit vaccine and a surface. *Vaccine*, 28: 6603-6608
- Sun Y, Liu CS, Sun L (2011) Comparative study of the immune effect of an *Edwardsiella tarda* antigen in two forms: subunit vaccine vs DNA vaccine. *Vaccine*, 29: 2051-2057
- Supamataya M (1988) The study of diseases in sand goby (*Oxyleotris mamoratus* Bleeker) in cage culture and some environmental factors related to infection. Abstract. Kasetsart University, Bangkok, Thailand

- Symeonidis A y Marangos M (2012) Iron and Microbial Growth. En: Insight and Control of Infectious Disease in Global Scenario. Priti R (ed), Londres. InTech, pp 289-330
- Tajima F (1989) Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. *Genetics*, 123: 585-595
- Takano T, Matsuyama T, Sakai T, Nakayasu C (2011) Protective efficacy of a formalin-killed vaccine against atypical *Edwardsiella tarda* infection in red sea bream *Pagrus major*. *Fish Pathol*, 4: 120-122
- 236 Tan YP, Zheng J, Tung SL, Rosenshine I, Leung KY (2005) Role of type III secretion in *Edwardsiella tarda* virulence. *Microbiology*, 151:2301-2313
- Taylor PW (1992) Fish-eating birds as potential vectors of *Edwardsiella ictaluri*. *J Aquat Anim Health*, 4: 240-243
- Tekedar HC, Karsi A, Williams ML, Vamenta S, Banes MM, Duke M y col. (2013) Complete genome sequence of channel catfish gastrointestinal septicemia isolate *Edwardsiella tarda* C07-087. *Genome Announc*, doi: 10.1128/genomeA.00959-13
- Thiele I y Palsson BO (2010) A protocol for generating a high-quality genome-scale metabolic reconstruction. *Nat Protoc*, 5: 93-121
- Thomas JG y Baneyx F (1998) Roles of the *Escherichia coli* small heat shock proteins IbpA and IbpB in thermal stress management: comparison with ClpA, ClpB, and HtpG *in vivo*. *J Bacteriol*, 180: 5165-5172
- Thompson A, Schäfer J, Kuhn K, Kienle S, Schwarz J, Schmidt G y col. (2003) Tandem mass tags: a novel quantification strategy for comparative analysis of complex protein mixtures by MS/MS. *Anal Chem*, 75: 1895-1904
- Thompson CC, Vicente AC, Souza RC, Vasconcelos AT, Vesth T, Alves N Jr y col. (2009) Genomic taxonomy of *Vibrios*. *BMC Evol Biol*, doi: 10.1186/1471-2148-9-258
- Thompson FL, Gevers D, Thompson CC, Dawyndt P, Naser S, Hoste B (2005) Phylogeny and molecular identification of vibrios on the basis of multilocus sequence analysis. *Appl. Environ. Microbiol.* 71, 5107-5115.
- Thune RL, Hawke JP, Johnson M (1994) Studies on vaccination of channel catfish, *Ictalurus punctatus*, against *Edwardsiella ictaluri*. *J Appl Aquaculture*, 3: 11-24

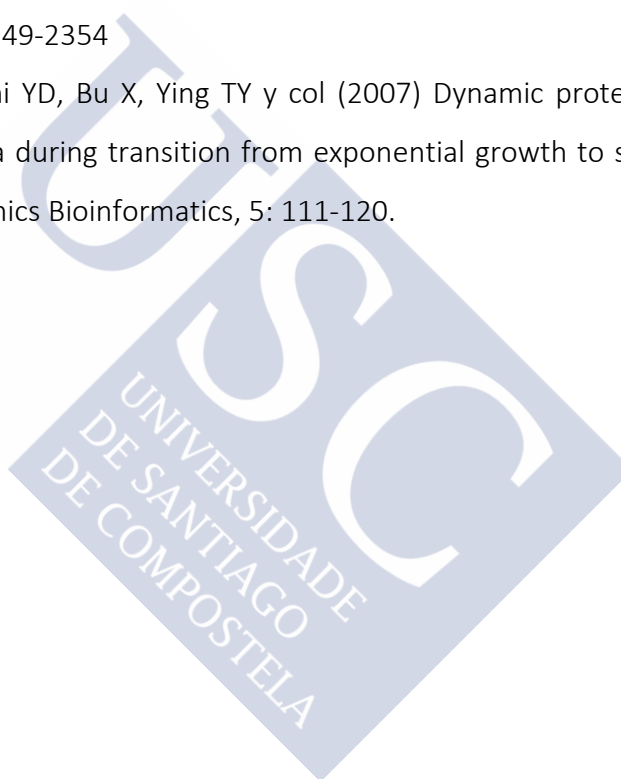
- Tonge R, Shaw J, Middleton B, Rowlinson R, Rayner S, Young J y col. (2001) Validation and development of fluorescence two-dimensional differential gel electrophoresis proteomics technology. *Proteomics*, 1: 377-396
- Tonietto A, Petriz BA, Araújo CW, Metha A, Magalhães, Franco LO (2012) Comparative proteomics between natural *Microcystis* isolates with a focus on microcystin synthesis. *Proteome Sci*, 10: 38
- Toranzo AE, Magariños B, Romalde JL (2005) A review of the main bacterial fish diseases in mariculture systems. *Aquaculture*, 246: 37-61
- Ucko M, Colorni A, Dubytska L, Thune RL (2016) *Edwardsiella piscicida*-like pathogen in cultured grouper. *Dis Aquat Organ*, 121: 141-148
- Uhland FC, Hélie P, Higgins R (2000) Infections of *Edwardsiella tarda* among Brook Trout in Quebec. *J Aquat Anim Health*, 12: 74-77
- Urwin R y Maiden MC (2003) Multilocus sequence typing: a tool for global epidemiology. *Trends Microbiol*, 11: 479-487
- Van Damme LR y Vandepitte J (1980) Frequent isolation of *Edwardsiella tarda* and *Plesiomonas shigelloides* from healthy Zaires fresh water fish: a possible source of sporadic diarrhea in the tropic. *Appl Environ Microbiol* 39: 457-479
- van Soest JJ, Stockhammer OW, Ordas A, Bloembergen GV, Spaik HP, Meijer AH (2011) Comparison of static immersion and intravenous injection systems for exposure of zebrafish embryos to the natural pathogen *Edwardsiella tarda*. *BMC Immunol*, doi: 10.1186/1471-2172-12-58
- Vasil ML (2007) How we learnt about iron acquisition in *Pseudomonas aeruginosa*: a series of very fortunate events. *Biometals*, 20: 587-601
- Vladik P, Prouza A, Vítovec J (1983) Finding of the bacterial species *Edwardsiella tarda* in the aquarium fish *Betta splendens*. *Vet Med (Praha)*, 28: 249-254
- Vos P, Hogers R, Bleeker M, Reijans M, van de Lee T, Hornes M y col. (1995) AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Res*, 23: 4407-4414
- Voulhoux R y Tommassen J (2004) Omp85, an evolutionarily conserved bacterial protein involved in outer-membrane-protein assembly. *Res Microbiol*, 155: 129-135

- Waltman WD, Shotts EB, Blazer VS (1985) Recovery of *Edwardsiella ictaluri* from danio (*Danio devario*). *Aquaculture*, 46: 63-66
- Waltman WD, Shotts EB, Hsu TC (1986) Biochemical characteristics of *Edwardsiella ictaluri*. *Appl Environ Microbiol*, 51: 101-104
- Wandersman C y Delepelaire P (2004) Bacterial iron sources: from siderophores to hemophores. *Annu Rev Microbiol*, 58:611-647
- Wang Q, Liu Q, Cao X, Yang M, Zhang Y (2008) Characterization of two TonB systems in marine fish pathogen *Vibrio alginolyticus*: their roles in iron utilization and virulence. *Arch Microbiol*, 190: 595-603
- Wang Q, Yang M, Xiao J, Wu H, Wang X, Lv Y y col. (2009a) Genome sequence of the versatile fish pathogen *Edwardsiella tarda* provides insights into its adaptation to broad host ranges and intracellular niches. *PLoS ONE*, doi: 10.1371/journal.pone.0007646
- Wang W, Zhang XH, Austin B (2010a) Comparative analysis of the phenotypic characteristics of high- and low-virulent strains of *Edwardsiella tarda*. *J Fish Dis*, 33: 985-994
- Wang X, Wang Q, Xiao J, Haizhen QL, Xu WL, Zhang Y (2009b) *Edwardsiella tarda* T6SS component *evpP* is regulated by *esrB* and iron, and plays essential roles in the invasion of fish. *Fish Shellfish Immunol*, 27: 469-477
- Wang X, Wang Q, Xiao J, Liu Q, Wu H, Zhang Y (2010b) Hemolysin EthA in *Edwardsiella tarda* is essential for fish invasion *in vivo* and *in vitro* and regulated by two-component system EsrA-EsrB and nucleoid protein Hha<sub>Et</sub>. *Fish Shellfish Immunol*, 29:1082-1091
- Wang X, Yan M, Wang Q, Ding L, Li F (2012) Identification of *Edwardsiella tarda* isolated from duck and virulence genes detection. *Afr J Microbiol Res*, 6: 4970-4975
- Wang YM, Wang QY, Xiao JF, Liu Q, Wu HZ, Zhang YX (2011) Genetic relationships of *Edwardsiella* strains isolated in China aquaculture revealed by rep-PCR genomic fingerprinting and investigation of *Edwardsiella* virulence genes. *J Appl Microbiol*, 111: 1337-1348

- Watterson GA (1975) On the number of segregating sites in genetical models without recombination. *Theor Popul Biol*, 7: 256-276
- Weinberg ED (1995) Acquisition of iron and other nutrients in vivo. En: Virulence mechanisms of bacterial pathogens. Roth JA, Bolin CA, Brogden KA, Minion FC, Wannemuehler M (eds), Washington, DC. American Society for Microbiology, pp 81-95
- White FH, Simpson CF, Williams LE JR (1973) Isolation of *Edwardsiella tarda* from aquatic animal species and surface waters in Florida. *J Wildlife Dis*, 9: 204-208
- Wilkins AS (1995) Variation in the human genome. 12-15 June, 1995. CIBA Foundation symposium 197, London, UK. *Bioessays*, 17: 905-906
- Wise DJ, Camus AC, Schwedler TE, Terhune JS (2004) Health management. En: Biology and Culture of Channel Catfish. Tucker CS y Hargreaves JA (eds), Amsterdam. Elsevier, pp 444-502
- Wise DJ, Greenway T, Li MH, Camus AC, Robinson EH (2008) Effects of variable periods of food deprivation on the development of enteric septicemia in channel catfish. *J Aquat Anim Health*, 20: 39-44
- Wright S (1951) The genetical structure of populations. *Ann Eugen*, 15: 323-354
- Xiao J, Chen T, Wang Q, Zhang Y (2012) Comparative analysis of the roles of catalases KatB and KatG in the physiological fitness and pathogenesis of fish pathogen *Edwardsiella tarda*. *Lett Appl Microbiol*, 54:425-432
- Xiao J, Wang Q, Liu Q, Xu L, Wang X, Wu H y col. (2009) Characterization of *Edwardsiella tarda* rpoS: effect on serum resistance, chondroitinase activity, biofilm formation, and autoinducer synthetases expression. *Appl Microbiol Biotechnol*, 83:151-160
- Xiao JF, Wang QY, Liu Q, Wang X, Liu H, Zhang YX (2008) Isolation and identification of fish pathogen *Edwardsiella tarda* from mariculture in China. *Aquac Res*, 40: 13-17
- Xie HX, Lu JF, Rolhion N, Holden DW, Nie P, Zhou Y y col. (2014) *Edwardsiella tarda*-Induced cytotoxicity depends on its type III secretion system and flagellin. *Infect Immun*, 82: 3436-3445
- Xu T y Zhang XH (2014) *Edwardsiella tarda*: an intriguing problem in aquaculture. *Aquaculture*, 431: 129-135

- Yamada Y y Wakabayashi H (1998) Enzyme electrophoresis, catalase test and PCR-RFLP analysis for the typing of *Edwardsiella tarda*. *Fish Pathol*, 33: 1-5
- Yamada Y y Wakabayashi H (1999) Identification of fish pathogenic strains belonging to genus *Edwardsiella* by sequence analysis of *sodB*. *Fish Pathol*, 34: 145-150
- Yamamoto S, Okujo N, Yoshida T, Matsuura S, Shinoda S (1994) Structure and iron transport activity of vibrioferrin, a new siderophore of *Vibrio parahaemolyticus*. *J Biochem*, 115:868-874
- 240 Yan Y, Cui Y, Han H, Xiao X, Won HC, Tan Y y col. (2011) Extended MLST-based population genetics and phylogeny of *Vibrio parahaemolyticus* with high levels of recombination. *Int J Food Microbiol*, 145: 106-112
- Yang M, Lv Y, Xiao J, Wu H, Zheng H, Liu Q y col. (2012) *Edwardsiella* comparative phylogenomics reveal the new intra/inter-species taxonomic relationships, virulence evolution and niche adaptation mechanisms. *PLoS One*, 7:e36987. doi: 10.1371/journal.pone.0036987
- Yang M, Shao S, Xiao J, Wang Q, Zhang Y (2013) Phylogenetic investigation of *Edwardsiella tarda* with multilocus sequence typing (MLST) and pulsed field gel electrophoresis (PFGE) typing methods. *Aquaculture* 410: 79-85.
- Yang W, Wang L, Zhang L, Qu J, Wang Q, Zhang Y (2015) An invasive and low virulent *Edwardsiella tarda* *esrB* mutant promising as live attenuated vaccine in aquaculture. *App Microbiol Biotech* 99: 1765-1777.
- Yarza P, Yilmaz P, Pruesse E, Glöckner FO, Ludwig W, Schleife K-Hr y col. (2014) Uniting the classification of cultured and uncultured bacteria and archaea using 16S rRNA gene sequences. *Nat Rev Microbiol*, 12: 635-645
- Yasunaga N, Ogawa S, Hatai K (1982) Characteristics of the fish pathogen *Edwardsiella* isolated from several species of cultured marine fishes. *B Nagasaki Prefectural I Fish*, 8: 57-65
- Ye S, Li H, Qiao G, Li Z (2009) First case of *Edwardsiella ictaluri* infection in China farmed yellow catfish *Pelteobagrus fulvidraco*. *Aquaculture*, 292: 6-10
- Ye X, Lin X, Wang Y (2010) Identification and detection of virulence gene of the pathogenic bacteria *Edwardsiella tarda* in cultured *Scortum barcoo*. *Freshwater Fish*, 40: 50-54

- Yoon SH, Ha SM, Kwon S, Lim J, Kim Y, Seo H y col. (2017) Introducing EzBioCloud: A taxonomically united database of 16S rRNA and whole genome assemblies. *Int J Syst Evol Microbiol*, 67: 1613-1617
- Yu JH, Han JJ, Park KS, Park KH, Park SW (2009) *Edwardsiella tarda* infection in Korean catfish, *Silurus asotus*, in a Korean fish farm. *Aquaculture Research*, 41: 19-26
- Zheng J y Leung KY (2007) Dissection of a type VI secretion system in *Edwardsiella tarda*. *Mol Microbiol*, 66: 1192-1206
- Zhou Y, Geng Y, Wang K-Y, Huang X-L, Chen D-F, Peng X y col. (2016) *Edwardsiella tarda* infection in cultured Ya-fish, *Schizothorax prenanti*, in China. *Aquaculture Research*, 47: 2349-2354
- Zhu L, Liu XK, Zhao G, Zhi YD, Bu X, Ying TY y col (2007) Dynamic proteome changes of *Shigella flexneri* 2a during transition from exponential growth to stationary phase. *Genomics Proteomics Bioinformatics*, 5: 111-120.



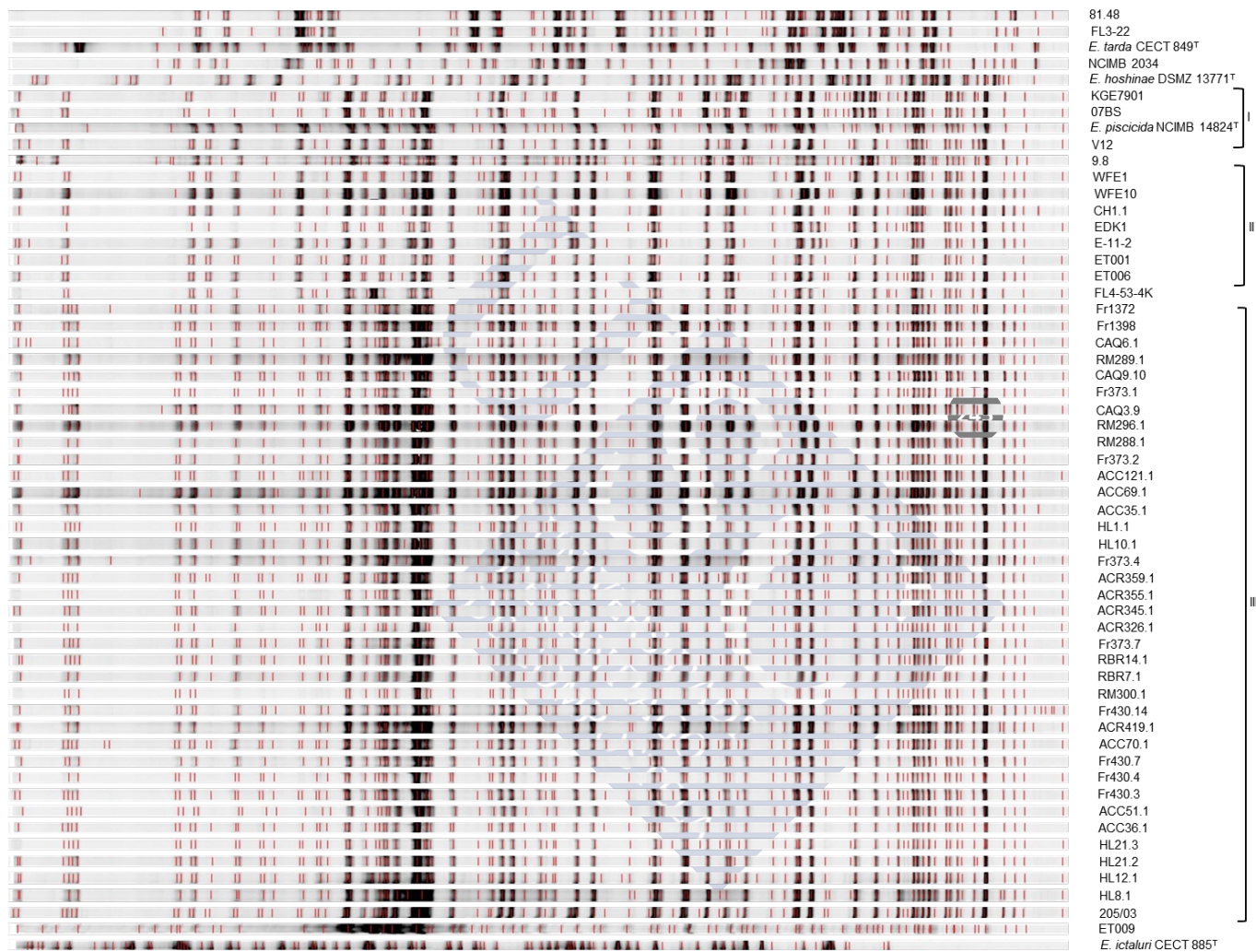


## 9 ANEXOS

### 9.1 Anexo 1







Perfiles genéticos de todos los aislados y cepas utilizados en el estudio de AFLP. Las líneas rojas se corresponden con la banda empleada por el programa informático BioNumerics v. 7.0 para analizar las similitudes. Figura modificada de Buján y col. 2018b, permiso cedido por la editorial Elsevier.



## 9.2 Anexo 2





Aislados de *E. tarda* reclasificados como *E. piscicida*.

Aislado	Artículo original	Aislados	Artículo original
080805	Yang y col. (2013)	ETB2	Abayneh y col. (2012)
07BS	Castro y col. (2006)	ETB3	Abayneh y col. (2012)
5-329-2	Yamada y Wakabayashi (1999)	ETG	Yu y col. (2009)
9.8	Castro y col. (2011)	ETK01	Abayneh y col. (2012)
ACC35.1	Castro y col. (2011)	ETK02	Abayneh y col. (2012)
ACC36.1	Castro y col. (2011)	ET-Mo	Wang y col. (2011)
ACC51.1	Castro y col. (2011)	ET-Wang	Yang y col. (2013)
ACC69.1	Castro y col. (2011)	FL6-60	Van-Soest y col. (2011)
ACC70.1	Castro y col. (2011)	FL4-53-4K	Castro y col. (2011)
ACC121.1	Castro y col. (2011)	Fr1372	Buján y col. (2018b)
ACR326.1	Castro y col. (2011)	Fr1398	Buján y col. (2018b)
ACR345.1	Buján y col. (2017)	Fr373.1	Buján y col. (2018b)
ACR355.1	Buján y col. (2018b)	Fr373.2	Buján y col. (2018b)
ACR359.1	Buján y col. (2018b)	Fr373.4	Buján y col. (2018b)
ACR419.1	Castro y col. (2012)	Fr373.7	Buján y col. (2018b)
BYK00679	Wang y col. (2011)	Fr430.3	Buján y col. (2018b)
BYK00680	Yang y col. (2013)	Fr430.4	Buján y col. (2018b)
C07-067	Tekedar y col. (2013)	Fr430.7	Buján y col. (2018b)
CAQ3.9	Buján y col. (2018b)	Fr430.14	Buján y col. (2018b)
CAQ6.1	Buján y col. (2018b)	FSW910310	Han y col. (2006)
CAQ9.10	Buján y col. (2018b)	HE95-12	Yamada y Wakabayashi (1999)
CGH9	Nakhro y col. (2013)	HL1.1	Castro y col. (2011)
CGK1	Nakhro y col. (2013)	HL8.1	Castro y col. (2011)
CH1.1	Buján y col. (2018b)	HL10.1	Castro y col. (2011)
CW7	Du y col. (2007)	HL12.1	Castro y col. (2011)
E-11-2	Castro y col. (2011)	HL21.2	Castro y col. (2011)
EDK1	Castro y col. (2011)	HL21.3	Castro y col. (2011)
E22	Yamada y Wakabayashi (1999)	JF1305	Oguro y col. (2014)
E381	Yamada y Wakabayashi (1999)	KE-1	Han y col. (2006)
EIB02	Yang y col. (2012)	KE-2	Han y col. (2006)
EIB11	Yang y col. (2012)	KE-3	Han y col. (2006)

Aislado	Artículo original	Aislados	Artículo original
EIB12	Yang y col. (2012)	KE-4	Han y col. (2006)
EIB15	Yang y col. (2013)	KE-5	Han y col. (2006)
EIB17	Yang y col. (2012)	KE-6	Han y col. (2006)
EIB18	Yang y col. (2012)	KGE7901	Castro y col. (2011c)
EIB103	Yang y col. (2012)	LADL 97-168	Griffin y col. (2013)
EIB107	Yang y col. (2012)	LADL 99-462	Griffin y col. (2013)
EIB100714	Yang y col. (2013)	LN031012-8	Zhu y col. (2006)
EIB202 (EH-202)	Xiao y col. (2009b)	LTB4	Lan y col. (2008)
EIB203	Yang y col. (2012)	L-49231	Wang y col. (2006)
EIB306	Yang y col. (2012)	MA97-004	Griffin y col. (2013)
EIB307	Yang y col. (2012)	MZ8901	Yamada & Wakabayashi (1999)
EIB05-1	Wang y col. (2011)	NE8003	Yamada & Wakabayashi (1999)
ET001	Castro y col. (2011c)	NR8001	Yamada & Wakabayashi (1999)
ET006	Castro y col. (2011a)	NuF84	Yamada & Wakabayashi (1999)
ET007	Kim y col. (2014)	NuF177	Yamada & Wakabayashi (1999)
ET013	Kim y col. (2014)	NUF806	Takano y col. (2010)
ET032	Kim y col. (2014)	PB46	Nakhro y col. (2013)
ET040	Kim y col. (2014)	PPD130/91	Ling y col. (2000)
ET057	Kim y col. (2014)	RBR7.1	Castro y col. (2011c)
ET060	Kim y col. (2014)	RBR14.1	Castro y col. (2006)
ET064	Kim y col. (2014)	RM288.1	Castro y col. (2011c)
ET073	Kim y col. (2014)	RM296.1	Castro y col. (2006)
ET077	Kim y col. (2014)	RM289.1	Castro y col. (2011c)
ET080	Kim y col. (2014)	RM300.1	Castro y col. (2006)
ET093	Kim y col. (2014)	S11-285	Griffin y col. (2013)
ET104	Kim y col. (2014)	S07-336	Griffin y col. (2013)
ET132	Kim y col. (2014)	S07-262	Griffin y col. (2013)
ET139	Kim y col. (2014)	S07-533	Griffin y col. (2013)
ET142	Kim y col. (2014)	S07-275	Griffin y col. (2013)
ET159	Kim y col. (2014)	S07-1019	Griffin y col. (2013)
ET180	Kim y col. (2014)	S07-338	Griffin y col. (2013)
ET191	Kim y col. (2014)	Su35	Yamada & Wakabayashi (1999)

Aislado	Artículo original	Aislados	Artículo original
ET196	Kim y col. (2014)	Su33	Yamada & Wakabayashi (1999)
ET205	Kim y col. (2014)	Su53	Yamada & Wakabayashi (1999)
ET211	Kim y col. (2014)	Su121	Yamada & Wakabayashi (1999)
ET215	Kim y col. (2014)	Su206	Yamada & Wakabayashi (1999)
ET216	Kim y col. (2014)	Su226	Yamada & Wakabayashi (1999)
ET222	Kim y col. (2014)	TC166	Deposítada en el GeneBank
ET883	Abayneh y col. (2012)	TC155	Deposítada en el GeneBank
ET2355	Abayneh y col. (2012)	TJ090818	Wang y col. (2011)
ET2493	Abayneh y col. (2012)	TX-1	Wang y col. (2011)
ET2639	Abayneh y col. (2012)	TX42	Yang y col. (2013)
ET2640	Abayneh y col. (2012)	V12	Castro y col. (2006)
ET3381	Abayneh y col. (2012)	WFE1	Castro y col. (2011c)
ET3612	Abayneh y col. (2012)	WFE10	Castro y col. (2011c)
ETA1	Abayneh y col. (2012)	WY18	Abayneh y col. (2012)
ETA2	Abayneh y col. (2012)	WY28	Bai y col. (2009)
ETA3	Abayneh y col. (2012)	WY37	Lan y col. (2008)
ETB1	Abayneh y col. (2012)		

Actualización de las características bioquímicas de *E. piscicida* (Abayneh y col., 2013; Castro y col., 2006; Griffin y col., 2013; Shao y col., 2014).

PRUEBAS			
Movilidad	v	D-sorbitol	-
Citocromo oxidasa	-	Sacarosa	-
Catalasa	+	Trehalosa	-
Arginina descarboxilasa	-	<b>Utilización de:</b>	
Lisina descarboxilasa	+	D-manitol	-
Ornitina descarboxilasa	+	L-arabinosa	-
Rojo de metilo	+	L-ramnosa	-
Voges-Proskauer	-	Maltosa	v
Citrato de Simmons	v	D-manosa	+
Reducción de nitratos	+	D-galactosa	+
Producción de:		$\beta$ -metilo-D-glucósido	-
Indol	+	Tween 80	v
H <sub>2</sub> S	+	L-fucosa	v
Gas a partir de glucosa	+	Ácido acético	-
Degradación de:		Ácido cítrico	v
Gelatina	-	Ácido fórmico	-
Esculina	-	D-ácido glucosamina	v
Amilasa	-	Ácido $\alpha$ -cetobutírico	-
Tween 80	-	Ácido $\alpha$ -cetobutírico	-
Ureasa	-	Ácido quínico	v
Crecimiento a:		Ácido bromosuccínico	v
4°C	-	Glucuronamida	v
37°C	+	L-asparraguina	+
42°C	v		
0% de NaCl	+	Ácido L-aspártico	v
3% de NaCl	+	Ácido L-glutámico	v
6% de NaCl	-	Ácido glicil-L-aspártico	v
Ácido a partir de:		Ácido glicil-L-glutámico	v
D-glucosa	+	L-prolina	-
D-manitol	-	L-serina	v
L-arabinosa	-	Uridina	v
Lactosa	-	Glicerol	v
L-ramnosa	-	D, L- $\alpha$ -glicerol	v

+ 90-100% de los aislados positivos; - 0-10% de los aislados positivos; v 11-89% de los aislados positivos