

chaud E. (2013) From the *Flavobacterium* genus to the phylum Bacteroides: genomic analysis of dnd gene clusters. FEMS Microbiol Lett 348:26-35.

Yáñez AJ, Silva H, Valenzuela K, Pontigo JP, Godoy M, Troncoso J, Romero A, Figueroa J, Carcamo JG y Avendaño-Herrera R. (2013) Two novel blood-free solid media for the culture of the salmonid pathogen *Piscirickettsia salmonis*. J Fish Dis 36: 587-591.

Hedrerera MI, Galdanes JA, Jimenez-Reyes MF, Reyes AE, Avendaño-Herrera R, Romero J y Feijóo CG. (2013) Soybean meal induces intestinal inflammation in zebrafish larvae. PLoS One 8 (7): e69983.

Yáñez AJ, Godoy MG, Gallardo A y Avendaño-Herrera R. (2013) Identification of *Streptococcus phocae* strains associated with mortality of Atlantic salmon

(*Salmo salar*) cultured at low temperature in Chile. Bull Eur Assoc Fish Pathol 33: 58-63.

Poblete-Morales M, Irgang R, Henríquez-Núñez H, Toranzo AE, Kronvall G y Avendaño-Herrera R. (2013) *Vibrio ordalii* antimicrobial susceptibility testing – Modified culture conditions required and tentative epidemiological disk test cut-off values. Vet Microbiol 165: 434-442.

## Patología Microbiana y Diagnóstico en Acuicultura

José Agustín Guijarro



Universidad de Oviedo-Facultad de Medicina-Dpto. Biología Funcional-Microbiología. C/ Julián Clavería, 6, 33006 Oviedo



Foto de grupo.

Grupo de Patología y Diagnóstico en Acuicultura (de izquierda a derecha): Desirée Cascales, Ana Isabel García, José Agustín Guijarro y Jessica Méndez.

Tras una trayectoria inicial en la investigación de diversos aspectos relacionados con el ciclo de vida de especies del género *Streptomyces*, en el año 1997 José Agustín Guijarro Atienza materializó su interés en la acuicultura, y más concretamente en las infecciones bacterianas que ocasionan importantes pérdidas económicas en el sector, con la formación del grupo Patología Microbiana y Diagnóstico en Acuicultura adscrito al Departamento de Biología Fun-

cional de la Universidad de Oviedo. Así, en colaboración con el SERIDA, concretamente con el Laboratorio de Sanidad Animal de Jove, inició una línea de investigación sobre patología infecciosa de salmónidos cuyo eje ha sido el estudio de tres importantes bacterias patógenas: *Flavobacterium psychrophilum* causante de la Enfermedad del agua fría (CWD), *Yersinia ruckeri*, agente causal de Yersiniosis o ERM y *Lactococcus garvieae* responsable de la lactococosis.

En este ámbito los trabajos de investigación del grupo se han centrado en dos líneas principales. Por un lado el desarrollo pionero de sistemas de diagnóstico basados en ensayos Taq-man de gran utilidad para el diagnóstico de la CWD y de una PCR múltiple que permitió identificar en muestras naturales, además de *F. psychrophilum*, otros patógenos como *Y. ruckeri* y *Aeromonas salmonicida*. El desarrollo de esta metodología que ha sido implementada en laboratorios de diagnóstico

fue reconocida con la concesión del V Premio JACUMAR de Investigación en Acuicultura concedido por el entonces Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación en el año 2004 y el IV Premio ProAqua 2005, actualmente BioMar, para distinguir las aportaciones de sistemas útiles para la acuicultura.

Actualmente, el trabajo del grupo se centra en una segunda línea de investigación que tiene como objetivo el estudio de los mecanismos de virulencia de los tres patógenos anteriormente mencionados. En todos los casos el objetivo de partida fue la puesta a punto de sistemas de manipulación genética que permitiesen la selección, identificación y el estudio de los genes relacionados con la virulencia así como de aquellos mecanismos de regulación que controlan su expresión.

Así, en el caso de *F. psychrophilum* una bacteria calificada como «fastidiosa» por la dificultad que presenta su manipulación, el grupo ha conseguido desarrollar diferentes medios de cultivo y sistemas de manipulación genética como la mutagénesis insercional, mutación por delección o transposición, que han permitido obtener más de trescientos mutantes intragénicos, algunos de ellos defectuosos en importantes factores de virulencia, lo que resulta de gran importancia de cara a conocer la interacción bacteria-hospedador y para el desarrollo de vacunas, una de las líneas que actualmente está desarrollando el grupo.

No menos importantes han sido los avances en el desarrollo de técnicas de manipulación genética de *Lactococcus garvieae* (transformación, mutagénesis insercional o transposición). Destacar el aplicación de la técnica Signature tagged mutagenesis (STM) que ha permitido seleccionar y analizar mutantes con el crecimiento limitado *in vivo* y con ello la identificación de genes esenciales para la progresión del proceso infeccioso. Se

desarrolló un modelo infeccioso en ratones y además, ha sido esta bacteria la primera con la que el grupo ha incorporado la bioinformática a su campo de trabajo con la secuenciación y análisis del genoma de la cepa *L. garvieae* UNIOV74 aislada de trucha arcoíris.

En cuanto a *Y. ruckeri*, indicar que el grupo comenzó a trabajar con este microorganismo a finales de los noventa con la caracterización de la proteasa extracelular Yrp1 implicada en su virulencia y se continuó con una línea bien definida y fructífera que se mantiene hasta la actualidad. Resaltar en este aspecto la aplicación de la Tecnología IVET en este patógeno, la cual permitió identificar y posteriormente estudiar, numerosos factores de virulencia como los implicados en la captación de hierro, una hemolisina, un sistema de secreción de tipo IV y otro de captación de cisteína. Recientemente, el grupo siempre con la idea de buscar vías novedosas de abordaje al estudio de las relaciones bacteria-hospedador, ha desarrollado una serie de técnicas que permiten la identificación de genes cuya expresión se induce a 18 °C, temperatura a la que ocurren los brotes de la enfermedad, y/o en presencia de una atmósfera reductora, condiciones presentes en determinadas zonas del tracto intestinal. Una característica interesante de este método de selección es que al generar mutaciones en los genes identificados permite estudiar la implicación de éstos tanto en la fisiología como en la virulencia de la bacteria, además de poder analizar los factores o condiciones que influyen en su expresión. Actualmente, los integrantes del grupo (Ana I. García, Desirée Cascales, Jessica Méndez y José Agustín Guijarro) se plantean un reto adicional: mediante el desarrollo de una nueva estrategia fundamentada en un proceso de doble transposición, identificar nuevos sistemas de regulación de genes de virulencia, en particular los dependientes de temperatura y/o de una atmósfera reductora y al mismo tiempo, determinar qué

factores físico-químicos regulan la expresión de los propios genes reguladores.

## PUBLICACIONES RECIENTES

- Gómez E, Álvarez B, Duchaud E y Guijarro JA.** (2015). Development of a markerless deletion system for the bacterial fish pathogen *Flavobacterium psychrophilum*. Plos One 10, e0117969.
- Guijarro JA, Cascales D, García-Torrico AI, García-Domínguez M y Méndez J.** (2015). Temperature-dependent expression of virulence genes in fish-pathogenic bacteria. Front Microbiol 6: 700.
- Pérez-Pascual D, Gómez E, y Guijarro JA.** (2015). Lack of a type-2 glycosyltransferase in the fish pathogen *Flavobacterium psychrophilum* determines pleiotropic changes and loss of virulence. Vet Res 46:1-9.
- Gómez E, Méndez J, Cascales D y Guijarro JA.** (2014). *Flavobacterium psychrophilum* vaccines: a difficult task. Microb Biotechnol 7: 414-423.
- Navais R, Méndez J, Cascales D, Pérez-Pascual D y Guijarro JA.** (2014). Two tandem putative U32 peptidases encoding genes of *Yersinia ruckeri* induced under anaerobic conditions are involved in virulence. Virulence 5: 1-6.
- Navais R, Méndez J, Cascales D, Reimundo P y Guijarro JA.** (2014). The heat sensitive factor (HSF) of *Yersinia ruckeri* is produced by an alkyl sulphatase involved in sodium dodecyl sulphate (SDS) degradation but not in virulence. BMC Microbiol 14: 221-231.
- Méndez J y Guijarro JA.** (2013). In vivo monitoring of *Yersinia ruckeri* in fish tissue: progression and virulence gene expression. Environ Microbiol Rep 5: 179-185.
- Méndez J, Reimundo P, Pérez-Pascual D, Navais R, Gómez E y Guijarro JA.** (2011). A novel *cdsAB* operon is involved in the uptake of L-cysteine and participates in pathogenesis of *Yersinia ruckeri*. J Bacteriol 193: 944-951.
- Navais R, Méndez J, Reimundo P, Pérez-Pascual D, Gómez E y Guijarro JA.** (2011). The *yctCAB* operon of *Yersinia ruckeri* involved in in vivo citrate uptake is not necessary for virulence. App Environ Microbiol 77: 1107-1110.
- Pérez-Pascual D, Gómez E, Álvarez B, Méndez J, Reimundo P, Navais R, Duchaud E y Guijarro JA.** (2011). Comparative analysis and mutation effects of *fpp1-fpp2* tandem genes encoding proteolytic extracellular enzymes of *Flavobacterium psychrophilum*. Microbiology 157:1196-1204.