

NOTE

Extended method for discrimination of *Aeromonas* spp. by 16S rDNA RFLP analysis

M. J. Figueras,¹ L. Soler,¹ M. R. Chacón,¹ J. Guarro¹
and A. J. Martínez-Murcia²

Author for correspondence: M. J. Figueras. Tel: +34 9777 59321. Fax: +34 9777 59322.
e-mail: mjfs@fmc.s.uv.es

¹ Departamento de Ciencias Médicas Básicas, Facultad de Medicina y Ciencias de la Salud, Universidad Rovira y Virgili, San Lorenzo 21, 43201 Reus, Spain

² División de Microbiología, Universidad Miguel Hernández, Campus de Orihuela, Ctra de Beniel, Km 3.2, 03312 Orihuela, Alicante, Spain

A previously described molecular method, based on 16S rDNA RFLP analysis, for the identification of *Aeromonas* spp. was unable to separate the species *Aeromonas salmonicida*, *Aeromonas bestiarum* and the recently described *Aeromonas popoffii*. In this study, the method has been extended with endonucleases *AlwNI* and *PstI* for the identification of these species. A molecular frame for the identification of all known *Aeromonas* spp. is presented.

Keywords: *Aeromonas*, 16S rDNA RFLP, molecular taxonomy

The genus *Aeromonas* currently comprises 14 species (*Aeromonas hydrophila*, *Aeromonas bestiarum*, *Aeromonas salmonicida*, *Aeromonas caviae*, *Aeromonas media*, *Aeromonas eucrenophila*, *Aeromonas sobria*, *Aeromonas jandaei*, *Aeromonas veronii*, *Aeromonas schubertii*, *Aeromonas trota*, *Aeromonas allosaccharophila*, *Aeromonas encheleia* and *Aeromonas popoffii*), although the taxonomy of the group is not yet resolved. For example, even though *Aeromonas ichthiosmia* and *Aeromonas enteropelogenes* were previously synonymized with *A. veronii* and *A. trota*, respectively (Collins *et al.*, 1993), recently Bruckner *et al.* (1999) still considered *A. enteropelogenes* to be a valid species (Figueras *et al.*, 2000a). Other conflicting species are *Aeromonas punctata* and *A. encheleia*. In relation to the former, there is still discussion on the priority between this species and *A. caviae* (Carnahan & Altwegg, 1996). Huys *et al.* (1996, 1997b) suggest including DNA hybridization group 11 (HG11) within the species *A. encheleia*, and Graf (1999) also includes *Aeromonas* Group 501 (Hickman-Brenner *et al.*, 1988) within that species. However, a recent phylogenetic analysis of the genus *Aeromonas* considered the three to be separate taxa (Martínez-Murcia, 1999). Identification of *Aeromonas* spp. has long been controversial due to their phenotypic heterogeneity (Janda *et al.*, 1996; Abbott *et al.*, 1998). A number of approaches that have been applied to characterize the aeromonads have attempted a definitive species identification frame. Despite all these efforts, identification of some species is still a serious problem because the conventional biochemical tests are not always reliable and discrepancies remain between phenotypic and genetic groups (Janda *et al.*, 1996; Borrell *et al.*, 1997, 1998).

The 16S (or small subunit) ribosomal gene has proved to be a valuable tool in providing signature sequences for delineation and identification of most *Aeromonas* species (Martínez-Murcia *et al.*, 1992). Consequently, a number of species-specific DNA probes have been reported (Ash *et al.*, 1993a, b; Dorsch *et al.*, 1994; Oakey *et al.*, 1999; Khan *et al.*, 1999; Demarta *et al.*, 1999). A protocol was recently described based on the RFLP patterns of the complete PCR-amplified 16S rDNA gene that enabled identification of most (10 species) *Aeromonas* spp. by using two endonucleases (*AluI* and *MboI*) simultaneously (Borrell *et al.*, 1997). Two additional enzymes, *NarI* and *HaeIII*, were necessary to distinguish the species *A. salmonicida*, *A. encheleia* from *Aeromonas* HG11. The discrimination of *A. salmonicida* from the recently described species *A. bestiarum* (Ali *et al.*, 1996) was not included in that study. The method described by Borrell *et al.* (1997) does not allow the identification of the new species *A. popoffii* (Huys *et al.*, 1997a). The objective of this study, therefore, was to extend our previously proposed identification pathway to provide a protocol for all known species of *Aeromonas*, including the two newly mentioned species.

Seventy-two strains from diverse origins were analysed, including the type strains of the species which could not be distinguished by previously described protocols and six additional strains (Table 1) identified as *A. veronii* in a recent study (Graf, 1999). Genomic DNA extraction and PCR amplification of the 16S rDNA was performed as previously described (Martínez-Murcia *et al.*, 1992; Borrell *et al.*, 1997). Computer analysis [using DIGEST and RESTRY programs

Table 1. Strains of *Aeromonas* spp. used in this study

Species	Strain*	Source
<i>A. bestiarum</i>	ATCC 51108 ^T , CECT 5200, CECT 5201, CECT 5202, CECT 5203, CECT 5204, CECT 895, CECT 896, CECT 5179, CECT 4239 LMG 13662 CECT 5219 CECT 5222, CECT 5223 CECT 5224, CECT 5226, CECT 5228, CECT 5236 CECT 5248, CECT 5211 CECT 5213, CECT 5212 CECT 5214, CECT 5215, CECT 5239, CECT 5242, CECT 5205, CECT 5217, CECT 5247, CECT 5206	Fish Faeces Cake Shellfish Drinking water Seawater River Reservoirs
<i>A. salmonicida</i>	ATCC 33658 ^T , CECT 4237, CECT 4236 LMG 13448 LMG 18998 LMG 19037, CECT 5221, CECT 5218 CECT 5225, CECT 5227 CECT 5229, CECT 5232, CECT 5238, CECT 5230, LMG 19036 CECT 5209, CECT 5220, CECT 5234 CECT 5231 CECT 5249	Fish Faeces Wound exudate Cake Shellfish Drinking water Seawater Reservoir River
<i>A. popoffii</i>	LMG 17541 ^T , LMG 17542, LMG 17543, LMG 17544, LMG 17545, LMG 17546, LMG 17547 CECT 5235, CECT 5246, CECT 5245, CECT 5250 CECT 5251, CECT 5240, CECT 5243, CECT 5244 CECT 5210	Drinking water Reservoirs River Seawater
<i>A. encheleia</i>	CECT 4342 ^T , CECT 4340, CECT 4341, CECT 4343	Fish
<i>Aeromonas</i> Group 501	ATCC 43946	Leg wound
<i>Aeromonas</i> HG11	ATCC 35941	Ankle fracture
<i>A. veronii</i> biogroup <i>sobria</i>	LMG 13068, LMG 13071, LMG 13073, LMG 13074, LMG 13695 LMG 13694	Faeces Unknown

* Abbreviations: ATCC, American Type Culture Collection; LMG, Belgian Coordinated Collection of Micro-organisms; CECT, Colección Española de Cultivos Tipo.

of PC/GENE (IntelliGenetics) and OMIGA restriction sites (Oxford Molecular)] of the complete 16S rDNA sequences of the type strains of all *Aeromonas* spp. was performed to select the most suitable restriction endonucleases for species discrimination. Products of digestions with enzymes *AluI* and *MboI* or *HaeIII* were electrophoresed on 4% Metaphor agarose (FMC BioProducts). Digestions performed with enzymes *NarI*, *PstI* and *AlwNI* were separated on 1.2% Seakem LE agarose (FMC BioProducts). The same protocol was applied in the case of the six mentioned strains from the study of Graf (1999) to confirm their identity. A further computer simulation of restriction enzyme *AluI* was performed to recognize restriction fragments for all type strains within the part of the sequence (5'-end) amplified by Graf (1999), i.e. the first ca. 600 bp of the gene.

Fig. 1 shows a flowchart of the protocol for the identification of the 16 species of *Aeromonas*, including species HG11 and *Aeromonas* Group 501. Endonucleases *AluI* and *MboI* provided different RFLP patterns for 10 species of *Aeromonas* which have already been published (Borrell *et al.*, 1997) and for

Aeromonas Group 501. However, *A. salmonicida*, *A. encheleia*, *Aeromonas* HG11, *A. popoffii* and *A. bestiarum* exhibited the same RFLP pattern. A third enzyme, *NarI*, was needed to discriminate *A. bestiarum* and *A. salmonicida* from *A. encheleia*, *Aeromonas* HG11 and also from *A. popoffii*. The use of *HaeIII* allowed the distinction of *Aeromonas* HG11 from *A. encheleia* and *A. popoffii*, separation of which was then accomplished using *AlwNI*. It was possible to differentiate *A. bestiarum* from *A. salmonicida* using either endonuclease *PstI* or *SfaNI*, but *PstI* is recommended because of its price.

Different biochemical tests are routinely used for *Aeromonas* identification. These tests, although useful, are laborious, time-consuming and can give erroneous identification. Some of these conventional methods require the use of as many as 18 tests for species identification and six additional tests are necessary to differentiate the species included within the '*A. hydrophila*' complex, i.e. *A. hydrophila*, *A. bestiarum* and *A. salmonicida* (Janda *et al.*, 1996). When biochemical tests were applied, only 10 *A. bestiarum* and six *A. salmonicida* strains were unequivocally identified from

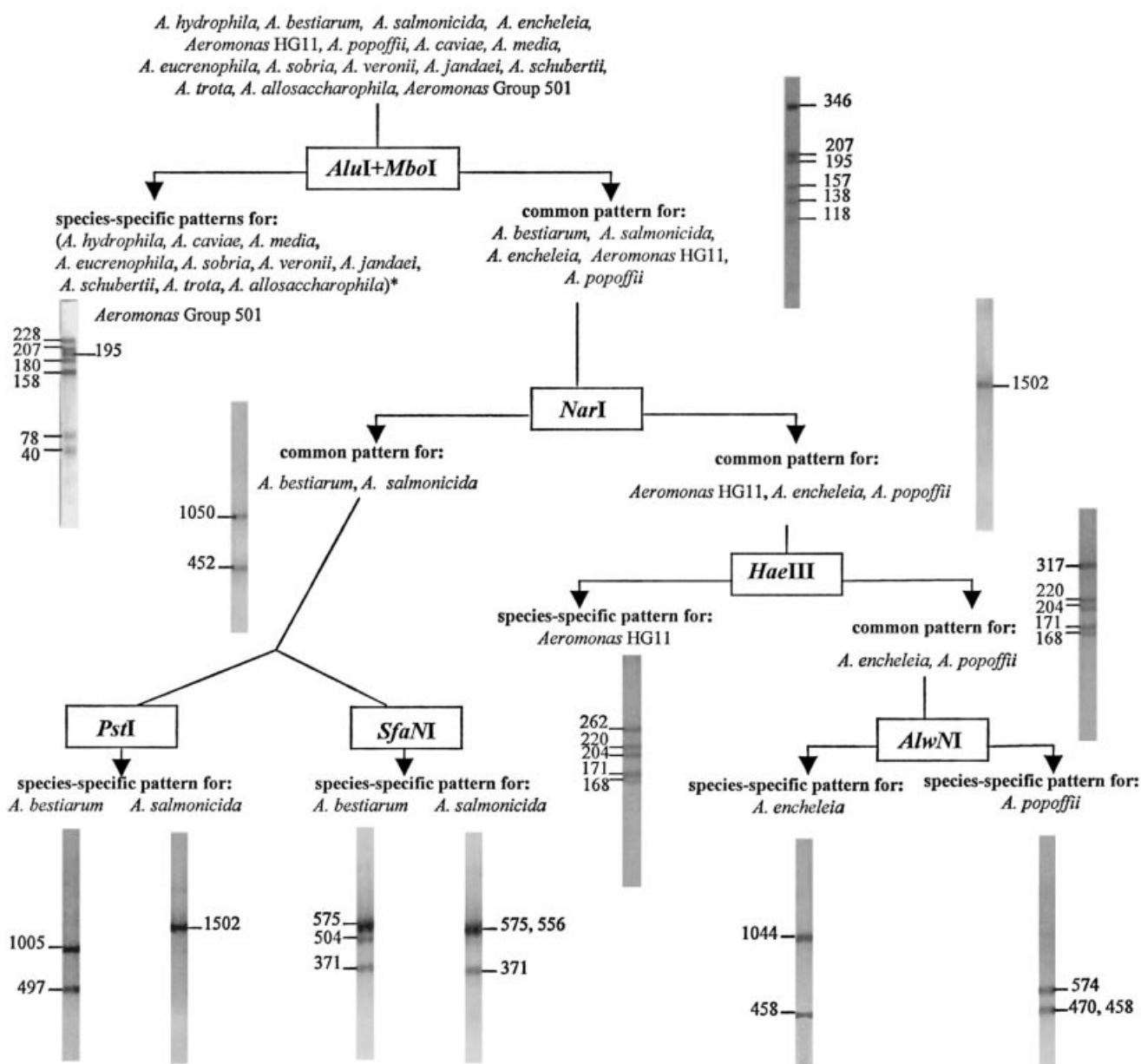


Fig. 1. Different steps for the identification of *Aeromonas* species by 16S rDNA RFLP analysis. Sizes are shown in bp. The species-specific patterns indicated by an asterisk, with the exception of *Aeromonas* Group 501, were illustrated by Borrell *et al.* (1997).

a total of 54 and 32 strains, respectively (Borrell *et al.*, 1998). This misidentification problem has now been overcome by the newly proposed molecular approach.

The recently described species *A. popoffii* has a very similar biochemical response to that of *A. bestiarum* and these species can only be separated by D-sucrose fermentation, lysine decarboxylase production and the use of DL-lactate as a sole energy and carbon source (Huys *et al.*, 1997a). A specific probe based on the 16S rDNA gene sequence has recently been designed for the identification of *A. popoffii* (Demarta *et al.*, 1999). The use of DNA probes to identify all *Aeromonas* spp.

is costly and time-consuming, because of the need for a number of probes, and reliability is critical when sequence targets differ in so few nucleotides, e.g. *A. salmonicida* and *A. bestiarum* only show two nucleotide differences (Martínez-Murcia *et al.*, 1992). Our proposed scheme, also based on 16S rDNA sequencing, provides reliable and fast species identification of a large collection of isolates and can be rapidly achieved by simply digesting the complete PCR-amplified gene.

Demarta *et al.* (1999) reported variations in two or three nucleotide positions after sequencing the 16S rDNA of 12 *A. popoffii* strains. Despite these varia-

tions, unique primary structures exist in the gene which allow the identification of members of this species. In fact, a common pattern was obtained for all the *A. popoffii* strains tested, including those used in the original species description (Huys *et al.*, 1997a). As already noted in a previous publication (Borrell *et al.*, 1997), 16S rDNA RFLP patterns different to those previously described may be expected if the digested sequence belongs to a new *Aeromonas* species or if the restriction sites in known species are affected by intra-species nucleotide diversity, i.e. differences between strains of the same species. A common pattern, which differs from those previously reported (Borrell *et al.*, 1997), was obtained for the nine new isolates of *A. popoffii* that were included in this study.

Recently, Graf (1999) described a different 16S rDNA RFLP method using only the first ca. 600 bp of the gene and endonucleases *AluI*, *CfoI* and *MnII* to evaluate, according to the author, the precision of our original method (Borrell *et al.*, 1997) with 62 *Aeromonas* reference strains. This author reported diverse RFLP patterns within *A. veronii* and possible misidentifications of *Aeromonas* species suggesting that this was due to differences in the 16S rDNA gene sequences (Graf, 1999). These contradictory results have been investigated in our laboratory and broadly discussed elsewhere (Figueras *et al.*, 2000b). The intra-species heterogeneity reported by Graf (1999) appears to be due to a misidentification of the strains used. For example, in this study, six strains (Table 1) of the 11 considered by Graf to be *A. veronii* using our RFLP protocol were analysed; only two of them (LMG 13068 and LMG 13694) showed the pattern of *A. veronii* whereas the rest had that of *A. sobria*. In the same study, *Aeromonas* Group 501 (ATCC 43946) was considered to be *A. encheleia* (Graf, 1999), whereas these strains are distinct species with 30 nucleotide differences in the 16S rDNA gene (Martínez-Murcia, 1999). Graf also indicated that the use of a single enzyme, *AluI*, can separate the species *A. veronii*, *A. caviae* and *A. hydrophila*. Further computer simulation on the 16S rDNA sequences of the type strains were carried out to confirm this statement; the endonuclease *AluI* produced species-specific patterns only for *A. sobria*, *A. jandaei*, *A. schubertii* and *A. veronii* (although the latter had a pattern identical to that of *Aeromonas* Group 501). *A. caviae* and *A. hydrophila*, however, had identical patterns to other species. In summary, it is concluded that the main problem of Graf's method was that the enzymes were selected arbitrarily and not on the basis of a previous computerized analysis of the 16S rDNA gene sequences of the type strains of all species as described in our studies.

The method provided in this work, apart from being a reliable identifier of all known *Aeromonas* spp., can be highly useful in future studies for determining the real incidence of the recently described species *A. popoffii* and *A. bestiarum* obtained from different habitats. Species determination may be carried out rapidly and at reasonable cost. The use of the proposed protocol

for research studies that need species identification is also encouraged.

Acknowledgements

This work has been supported by the grants: FIS 99/0944 and FIS 96/0579 from the Spanish Ministry of Health; from CIRIT (SGR 1999/00103); from Fundació Ciència i Salut; and GV8-5-21 from Generalitat Valenciana. We would like to thank Drs R. Bartolome (Hospital Valle Hebrón, Barcelona), J. Vila (Hospital Clinic, Barcelona), J. Reina (Hospital Son Dureta, Palma de Mallorca), F. Soriano (Fundación Jiménez Díaz, Madrid), and I. Pujol and F. Ballester (Hospital Universitari Sant Joan, Reus) for providing clinical strains and the Colección Española de Cultivos Tipo (CECT) and the Belgian Coordinated Collection of Microorganisms (LMG) for kindly providing isolates.

References

- Abbott, S., Seli, L. S., Catino, M., Hartley, M. A. & Janda, M. (1998). Misidentification of unusual *Aeromonas* species as members of the genus *Vibrio*: a continuing problem. *J Clin Microbiol* **36**, 1103–1104.
- Ali, A., Carnahan, A. M., Altwegg, M., Lüthy-Hottenstein, J. & Joseph, S. W. (1996). *Aeromonas bestiarum* sp. nov. (formerly genomospecies DNA group 2 *A. hydrophila*), a new species isolated from non-human sources. *Med Microbiol Lett* **5**, 156–165.
- Ash, C., Martínez-Murcia, A. J. & Collins, M. D. (1993a). Identification of *Aeromonas schubertii* and *Aeromonas jandaei* by using a polymerase chain reaction-probe test. *FEMS Microbiol Lett* **108**, 151–156.
- Ash, C., Martínez-Murcia, A. J. & Collins, M. D. (1993b). Molecular identification of *Aeromonas sobria* using a polymerase chain reaction-probe test. *Med Microbiol Lett* **2**, 80–86.
- Borrell, N., Acinas, S. G., Figueras, M. J. & Martínez-Murcia, A. (1997). Identification of *Aeromonas* clinical isolates by restriction fragment length polymorphism of PCR-amplified 16S rRNA genes. *J Clin Microbiol* **35**, 1671–1674.
- Borrell, N., Figueras, M. J. & Guarro, J. (1998). Phenotypic identification of *Aeromonas* genomospecies from clinical and environmental sources. *Can J Microbiol* **44**, 7–12.
- Bruckner, D. A., Colonna, P. & Bearson, B. L. (1999). Nomenclature for aerobic and facultative bacteria. *Clin Infect Dis* **29**, 713–723.
- Carnahan, A. M. & Altwegg, M. (1996). Taxonomy. In *The Genus Aeromonas*, pp. 23–24. Edited by B. Austin, M. Altwegg, P. J. Gosling & S. Joseph. Chichester: Wiley.
- Collins, M. D., Martínez-Murcia, A. J. & Cai, J. (1993). *Aeromonas enteropelogenes* and *Aeromonas ichthiosmia* are identical to *Aeromonas trota* and *Aeromonas veronii*, respectively, as revealed by small-subunit rRNA sequence analysis. *Int J Syst Bacteriol* **43**, 855–856.
- Demarta, A., Tonolla, M., Caminada, A.-P., Ruggeri, N. & Peduzzi, R. (1999). Signature region within the 16S rDNA sequences of *Aeromonas popoffii*. *FEMS Microbiol Lett* **172**, 239–246.
- Dorsch, M., Ashbolt, N. J., Cox, P. T. & Goddman, A. E. (1994). Rapid identification of *Aeromonas* species using 16S rDNA targeted oligonucleotide primers: a molecular approach based on screening of environmental isolates. *J Appl Bacteriol* **77**, 722–726.
- Figueras, M. J., Guarro, J. & Martínez-Murcia, A. (2000a). Clinically relevant *Aeromonas* spp. *Clin Infect Dis* **30**, 988–989.

- Figueras, M. J., Guarro, J. & Martínez-Murcia, A. (2000b).** Use of Restriction Fragment Length Polymorphism of the PCR-amplified 16S rRNA gene for the identification of *Aeromonas* spp. *J Clin Microbiol* **38**, 2023–2025.
- Graf, J. (1999).** Diverse restriction fragment length polymorphism pattern of the PCR-amplified 16S rRNA genes in *Aeromonas veronii* strains and possible misidentification of *Aeromonas* species. *J Clin Microbiol* **37**, 3194–3197.
- Hickman-Brenner, F. W., Fanning, G. R., Arduino, M. J., Brenner, D. J. & Farmer, J. J. (1988).** *Aeromonas schubertii*, a new mannitol-negative species found in clinical specimens. *J Clin Microbiol* **26**, 1561–1564.
- Huys, G., Altwegg, M., Hänninen, M. L. & 7 other authors (1996).** Genotypic and chemotaxonomic description in the species *Aeromonas eucrenophila* and their affiliation to *A. encheleia* and *Aeromonas* DNA hybridization group 11. *Syst Appl Microbiol* **19**, 616–623.
- Huys, G., Kämpfer, P., Altwegg, M. & 7 other authors (1997a).** *Aeromonas popoffii* sp. nov., a mesophilic bacterium isolated from drinking water production plants and reservoirs. *Int J Syst Bacteriol* **47**, 1165–1171.
- Huys, G., Kämpfer, P., Altwegg, M., Coopman, R., Janssen, P., Gillis, M. & Kersters, K. (1997b).** Inclusion of *Aeromonas* DNA hybridization group 11 in *Aeromonas encheleia* and extended description of the species *Aeromonas eucrenophila* and *A. encheleia*. *Int J Syst Bacteriol* **47**, 1157–1164.
- Janda, J. M., Abbott, S. L., Khashe, S., Kellogg, G. H. & Shimada, T. (1996).** Further studies on biochemical characteristics and serologic properties of the genus *Aeromonas*. *J Clin Microbiol* **34**, 1930–1933.
- Khan, A. A., Nawaz, M. S., Khan, S. A. & Cerniglia, C. E. (1999).** Identification of *Aeromonas trota* (hybridization group 13) by amplification of the aerolysin gene using polymerase chain reaction. *Mol Cell Probes* **13**, 93–98.
- Martínez-Murcia, A. (1999).** Phylogenetic positions of *Aeromonas encheleia*, *Aeromonas popoffii*, *Aeromonas* DNA Hybridization Group 11 and *Aeromonas* Group 501. *Int J Syst Bacteriol* **49**, 1403–1408.
- Martínez-Murcia, A., Benlloch, S. & Collins, D. (1992).** Phylogenetic interrelationships of members of the genera *Aeromonas* and *Plesiomonas* as determined by 16S ribosomal DNA sequencing: lack of congruence with results of DNA-DNA hybridizations. *Int J Syst Bacteriol* **42**, 412–421.
- Oakey, H. J., Gibson, L. F. & George, A. M. (1999).** DNA probes specific for *Aeromonas hydrophila* (HG1). *J Appl Microbiol* **86**, 187–193.

**Dedicada a la memoria de mis
abuelos Juan y Juana**

AGRADECIMIENTOS

Desearía expresar mi agradecimiento a todas las personas que me han ayudado a la realización de este trabajo, especialmente:

A la Prof. María José Figueras y a la Dra. Matilde Rodríguez Chacón por la dirección de este trabajo.

Al Prof. Josep Guarro, Catedrático de Microbiología de la Facultad de Medicina y Ciencias de la Salud (Universitat Rovira y Virgili) por su minuciosa revisión y numerosas aportaciones a lo largo del desarrollo de esta tesis.

Al Dr. Antonio Martínez-Murcia, Profesor Ayudante de la Escuela Politécnica Superior de la Universidad Miguel Hernández de Alicante, por la colaboración y revisión de los estudios realizados.

A Adela Yáñez, quien aunque a distancia, ha compartido conmigo la realización de una tesis doctoral en *Aeromonas* y me ha facilitado los resultados referentes a la secuenciación del gen *gyrB*, así como por su colaboración en muchos otros trabajos.

Al Dr. Jordi Vila, adjunto del Hospital Clínico de Barcelona por su colaboración en los estudios realizados de sensibilidad a agentes antimicrobianos así como por su colaboración en el aislamiento de cepas procedentes de muestras clínicas.

Al Dr. Francisco Javier Pastor, Profesor Titular de la Facultad de Medicina y Ciencias de la Salud (Universitat Rovira y Virgili) por haber estado siempre dispuesto a ayudarme, aconsejarme y revisarme todo aquello en lo que he dudado.

A la Dra. Rosa Bartolomé, adjunto del Hospital Valle de Hebrón de Barcelona, por su colaboración en el aislamiento de cepas procedentes de muestras clínicas.

A la Dra. Isabel Pujol y a Frederic Ballester, adjuntos del Hospital Universitario San Juan de Reus, por haberme introducido en el campo de la microbiología médica, y por

su constante colaboración en el aislamiento de cepas procedentes de muestras clínicas.

A la Dra. Alicja Kozińska, del Department of Fish Disease (National Veterinary Research Institute en Putawy, Polonia) por su colaboración en los estudios realizados en pescado destinado al consumo humano.

A la Dra. Graciela Castro-Escarpulli, del Departamento de Microbiología de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas (Instituto Politécnico Nacional, México D.F.) por su colaboración en algunos de los trabajos incluidos y por todos los consejos y ayuda que de ella recibí durante su estancia en nuestro laboratorio.

Al Dr. Eduardo Groisman, del Howard Hughes Medical Institute (Washington University School of Medicine, Department of Molecular Microbiology. Saint Louis, M.O., Estados Unidos), por haberme acogido en su laboratorio y haberme permitido iniciar los estudios del Sistema de Secreción Tipo III en *Aeromonas*. Así mismo me gustaría agradecerle a Felix Solomon el soporte técnico que me prestó, así como a Maribel y Chakib por su amistad y los buenos ratos que pasamos.

A todos mis compañeros y amigos (investigadores, becarios, técnicos, auxiliares de laboratorio y secretarías) del laboratorio de la Unidad de Microbiología de la Facultad de Medicina (Universitat Rovira y Virgili) por su apoyo incondicional. En especial a Montse, Javi, Arantxa, Mabel, Lupita, Ester, Kendra, Dania, Félix, Carol y Antonio por los buenos ratos que hemos pasado, y a Mati (aunque me repita) por su amistad, apoyo y dedicación, y por la formación que me ha ofrecido.

A mis amigos Gloria, Jose, Manolo, Montse, Antonio y Jesús, y a mi hermana Eva por estar siempre dispuestos a escuchar.

A mis padres, Francisco y Merche, por haber estado siempre a mi lado y haberme ayudado a alcanzar todas las metas que me he propuesto.

Y finalmente, a Joaquín, por haber compartido conmigo todo el largo camino que me ha llevado hasta aquí, por su paciencia, cariño y comprensión.

Correspondence

In vitro* antimicrobial susceptibility of clinical isolates of *Aeromonas caviae*, *Aeromonas hydrophila* and *Aeromonas veronii* biotype *sobria

J Antimicrob Chemother 2002; **49**: 701–702

Jordi Vila^{a*}, Francesc Marco^a, Lara Soler^b,
Matilde Chacon^b and Maria José Figueras^b

^aLaboratorio de Microbiología, Institut d'Infeccions i Immunologia, Institut d'Investigació Biomèdica August Pi i Sunyer, Facultat de Medicina, Universitat de Barcelona, Villarroel 170, 08036 Barcelona;

^bDepartament de Ciències Mèdiques Bàsiques, Facultat de Medicina i Ciències de la Salut, Universitat Rovira i Virgili, Sant Llorenç 21, 43201 Reus, Spain

*Corresponding author. Tel: +34-93-227-55-22;
Fax: +34-93-227-93-72; E-mail: vila@medicina.ub.es

Sir,

The genus *Aeromonas* comprises 14 species, although its taxonomy has not yet been resolved.¹ The main species considered to be pathogenic in humans are *Aeromonas hydrophila*, *Aeromonas caviae* and *Aeromonas veronii* biotype *sobria*.¹ These species can cause both gastrointestinal and extraintestinal infectious diseases. *Aeromonas* gastroenteritis is generally self-limiting and, except in immunocompromised patients, antibiotic treatment is unnecessary. However, for extraintestinal infections the susceptibility patterns should be known in order to implement appropriate therapy.

The main objective of this study was to evaluate the activity of 24 antimicrobial agents against *A. caviae*, *A. hydrophila* and *A. veronii* biotype *sobria* clinical isolates.

Forty-three *Aeromonas* spp. clinical isolates were studied. Strains were distributed by species according to sample source as follows: 19 *A. caviae* strains (14 isolated from faeces, three from blood, one from an abscess, one from cellulitis), 14 *A. veronii* strains (12 from faeces, one from blood, one from an ulcer) and 10 *A. hydrophila* strains (seven isolated from faeces, two from joint fluids, one from a wound). All strains were identified to the species level by the 16S rDNA-RFLP method.²

Dade-microscan Combo Urine IS panels (Dade Behring, West Sacramento, CA, USA) were used for suscep-

tibility testing. The panels were inoculated according to the manufacturer's guidelines and incubated overnight in the Walk-away System. *Escherichia coli* ATCC 25922 and *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 were used as quality control strains.

The results of testing the 43 *Aeromonas* spp. strains against the 24 antimicrobial agents are shown in the Table. Regarding the β -lactam antibiotics, the *Aeromonas* spp. strains analysed were uniformly resistant to ampicillin, as expected. Piperacillin was more active than ticarcillin against all species. The percentage of piperacillin-susceptible strains was >93%, whereas the percentage of ticarcillin-susceptible strains ranged from 14% to 74%, *A. caviae* being more susceptible than *A. veronii* and *A. hydrophila*. The combination of clavulanic acid and amoxicillin enhanced antibacterial activity, whereas tazobactam did not enhance the effect of piperacillin. All the cephalosporins tested except cefazolin showed very good activity against the different *Aeromonas* spp. tested. Susceptibility to cefazolin was higher for *A. veronii* (79%) than for *A. caviae* (53%) and *A. hydrophila* (40%), in agreement with previously described data.^{1,4} As well as reporting a similar percentage of susceptibility to cefazolin for *A. veronii* (83%), Overman & Janda⁴ also found similar results with *Aeromonas trota* (80%). All strains tested were susceptible to aztreonam and imipenem. In a previous study analysing 12 clinical isolates of *A. veronii*, 67% were resistant to imipenem.⁴

Among the aminoglycosides, gentamicin and amikacin were more active than tobramycin. This tobramycin-resistant, gentamicin-susceptible duality has also been observed in strains isolated in Australia, Taiwan and the USA.^{1,4,5}

In previous studies,^{1,4,5} fluoroquinolones showed good activity against all species of *Aeromonas*. We obtained similar results in which all the strains analysed were susceptible to ofloxacin and ciprofloxacin. However, 26% and 20% of the strains of *A. caviae* and *A. hydrophila* were resistant to nalidixic acid and pipemidic acid, whereas the resistance was higher in *A. veronii* strains, with 88% ($P < 0.05$ for the resistance to nalidixic acid of *A. veronii* compared with the other species) of the strains being resistant to nalidixic acid and pipemidic acid. Resistance in environment-isolated *Aeromonas* was found in 59% of strains analysed.⁶

In summary, although fluoroquinolones have been reported as the first choice treatment for *Aeromonas* infections, microorganisms resistant to nalidixic acid and susceptible to ciprofloxacin are known to already have a

Correspondence

Table. Susceptibility of *Aeromonas* spp. to 24 antimicrobial agents

Antimicrobial agent	% susceptibility			Breakpoints ^a	
	<i>A. veronii</i> (n = 14)	<i>A. caviae</i> (n = 19)	<i>A. hydrophila</i> (n = 10)	S	R
Ampicillin	0	0	0	≤8	≥32
Co-amoxiclav	43	84	40	≤8/4	≥32/16
Piperacillin	93	99	100	≤16	≥128
Piperacillin + tazobactam	93	95	100	≤16/4	≥128/4
Ticarcillin	14	74	20	≤16	≥128
Cefazolin	79	53	40	≤8	≥32
Cefuroxime	100	100	100	≤8	≥32
Cefotaxime	100	100	100	≤8	≥32
Ceftazidime	100	100	100	≤8	≥32
Cefixime	100	100	100	≤8	≥32
Cefepime	100	100	100	≤8	≥32
Aztreonam	100	100	100	≤8	≥32
Imipenem	100	100	100	≤4	≥16
Gentamicin	93	100	100	≤4	≥16
Tobramycin	72	90	90	≤4	≥16
Amikacin	100	100	100	≤16	≥64
Nalidixic acid	22	74	80	≤16	≥32
Pipemidic acid	22	74	80	≤4	≥16
Ofloxacin	100	100	100	≤2	≥8
Ciprofloxacin	100	100	100	≤1	≥4
Fosfomycin	100	74	100	≤64	≥256
Nitrofurantoin	100	90	90	≤32	≥128
Trimethoprim/sulfamethoxazole	72	79	90	≤2/8	≥4/76

^aNCCLS (2001).³

mutation in the *gyrA* gene, and can easily develop a second mutation of resistance, generating a MIC of ciprofloxacin above the breakpoint.⁷ Therefore, fluoroquinolones should not be recommended for the treatment of infections produced by *Aeromonas* spp. resistant to nalidixic acid.

Acknowledgements

We would like to thank Drs R. Bartolome (Hospital Valle Hebrón, Barcelona) F. Soriano (Fundación Jiménez Díaz, Madrid), J. Reina (Hospital Son Dureta, Palma de Mallorca), and I. Pujol and F. Ballester (Hospital Universitari Sant Joan, Reus) for their collaboration. This work was supported by grants FIS 99/0944 and FIS 96/0579 from the Spanish Ministry of Health and from CIRIT (SGR 99/00103).

References

1. Janda, J. M., Abbott, S. L. & Morris, J. G., Jr (1995). *Aeromonas*, *Plesiomonas*, and *Edwardsiella*. In *Infections of the Gastrointestinal Tract*, (Blaser, M. J., Smith, P. D., Ravdin, J. I., Greenberg, H. B. & Guerrant, R. L., Eds), pp. 905–17. Raven Press, New York, NY.

2. Figueras, M. J., Soler, L., Chacón, M. R., Guarro, J. & Martínez-Murcia, A. J. (2000). Extended method for discrimination of *Aeromonas* spp. by 16S rDNA-RFLP analysis. *International Journal of Systematic Evolution and Microbiology* **50**, 2069–73.

3. National Committee for Clinical Laboratory Standards. (2001). *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. Eleventh Informational Supplement M100-S11*. NCCLS, Wayne, PA.

4. Overman, T. L. & Janda, J. M. (1999). Antimicrobial susceptibility patterns of *Aeromonas jandai*, *A. shubertii*, *A. trota*, and *A. veronii* biotype *veronii*. *Journal of Clinical Microbiology* **37**, 706–8.

5. Ko, W. C., Yu, K. W., Liu, C. Y., Huang, C. T., Leu, H. S. & Chuang, Y. C. (1996). Increasing antibiotic resistance in clinical isolates of *Aeromonas* strains in Taiwan. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **40**, 1260–2.

6. Goñi-Urriza, M., Pineau, L., Capdepuy, M., Roques, C., Caumette, P. & Quentin, C. (2000). Antimicrobial resistance of mesophilic *Aeromonas* spp. isolated from two European rivers. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **46**, 297–301.

7. Ruiz, J., Gómez, J., Navia, M. M., Ribera, A., Sierra, J. M., Marco, F. et al. (2002). High prevalence of nalidixic acid resistant, ciprofloxacin susceptible phenotype among clinical isolates of *Escherichia coli* and other Enterobacteriaceae. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, in press.

Potential virulence and antimicrobial susceptibility of *Aeromonas popoffii* recovered from freshwater and seawater

Lara Soler ^a, Maria José Figueras ^{a,*}, Matilde R. Chacón ^a, Jordi Vila ^b,
Francesc Marco ^b, Antonio J. Martínez-Murcia ^c, Josep Guarro ^a

^a Unitat de Microbiologia, Departament de Ciències Mèdiques Bàsiques, Facultat de Medicina i Ciències de la Salut, Universitat Rovira i Virgili, Sant Llorenç 21, 43201 Reus, Spain

^b Laboratori de Microbiologia, Institut d'Infeccions i Immunologia, Institut d'Investigació Biomèdica August Pi i Sunyer, Facultat de Medicina, Universitat de Barcelona, Villarroel 170, 08036 Barcelona, Spain

^c Servicio de Diagnóstico Molecular, Escuela Politécnica Superior, Universidad Miguel Hernández, Crta. Beniel Km. 3,2, 03312 Orihuela (Alicante), Spain

Received 24 November 2001; accepted 28 November 2001

First published online 14 January 2002

Abstract

Aeromonas popoffii is the most recent species within the genus *Aeromonas* described from freshwater. In our study this species was also recovered from this habitat and for the first time from seawater. Most of the virulence factors known in *Aeromonas* spp. (aerolysin/hemolysin, serine protease, lipases and DNases) were highly prevalent in this species. Third-generation cephalosporins and quinolones were the most active antimicrobial agents against *A. popoffii*. © 2002 Federation of European Microbiological Societies. Published by Elsevier Science B.V. All rights reserved.

Keywords: *Aeromonas popoffii*; Virulence factor; Water; Antimicrobial susceptibility

1. Introduction

Aeromonas spp. are autochthonous inhabitants of aquatic environments and are considered causative agents of human gastrointestinal and, to a lesser extent, extraintestinal infections [1]. Currently, the genus *Aeromonas* comprises 14 species, although its taxonomy remains confusing [2]. *Aeromonas popoffii* is one of the most recently described species, and only a few strains have been recovered up to now [3,4]. In an extensive study carried out in our laboratory, some strains showed an atypical biochemical behavior [5] and could only be identified as *A. popoffii* by using a 16S rDNA restriction fragment length polymorphism (RFLP) technique [6]. However, due to the limited number of strains isolated to date [3,4], there are no data on the incidence and potential virulence of this new species. Pathogenic species of *Aeromonas* have been found to possess several virulence factors that may be involved in

infection mechanisms [7]. Among them, aerolysin, a pore-forming cytotoxin, is the most studied [7]. The glycerophospholipid:cholesterol acyltransferase (GCAT) is an extracellular lipase only so far investigated in fish furunculosis caused by *Aeromonas salmonicida* [8,9]. Both aerolysin and GCAT are secreted as proenzymes, and the latter has been found to be activated by serine protease [10], which is also considered a virulence factor. Other virulence factors common in *Aeromonas* are extracellular lipases (*lip*, *lipH3*, *pla* and *plc*), which may alter the plasma membrane of the host, and DNases, although little is known about their role in *Aeromonas* pathogenesis [7]. The aim of this study was to investigate the incidence of *A. popoffii* in freshwater and seawater samples from Catalonia (north-east Spain). Since antimicrobial susceptibility patterns for this species have only been investigated in seven strains [3], we considered it important to elucidate this aspect in all available strains, i.e. in those previously reported, along with eight strains from Switzerland [4] and in those isolated by us in Catalonia, adding 10 new antimicrobial agents never before investigated in *A. popoffii*. In addition, the presence of the above-mentioned virulence genes and their associated phenotypic activity were evaluated in the above-mentioned strains.

* Corresponding author.

Tel.: +34 (977) 759321; Fax: +34 (977) 759322.

E-mail address: mjfs@fmc.s.uv.es (M.J. Figueras).

2. Materials and methods

A total of 113 water samples, including freshwater and seawater, were investigated for the presence of *Aeromonas* spp. using the methodology described in a previous paper [5]. Of three typical colonies selected from ampicillin dextrin agar, only one isolate representing a species was considered from each sample for incidence calculation. Strains were identified genetically to species level (Table 1) by the 16S rDNA RFLP technique [6,11].

Sequences from GenBank (GB) and European Molecular Biology Laboratory (EMBL) were used to design primers (Primer Designer 3 software, Scientific Educational Software, Durham, NC, USA) for each group of genes (Table 2) after alignment with a CLUSTAL W program [12]. The gene accession numbers for aerolysin/hemolysin were those of the 10 sequences used by Kingombe et al. [13], while the others were: serine protease, GB AF159142 [14] and EMBL X67043 [15]; GCAT, EMBL X70686 [16] and X07279 [17]; lipases, GB U63543 [18], S65123 [19], AF092033 [20] and U14011 [21]; DNase, GB AF004392 (unpublished), L78266 [22] and M99491 [23]. PCR amplifications were performed with 1.2–2 µg of DNA as previously described [11] and using conditions shown in Table 2. Selected primers were compared to all sequences deposited in GB and EMBL databases to ensure their specificity. PCR products were confirmed by sequencing with an ABI-Prism[®] 310.

The associated phenotypic activities investigated were: β-hemolysis, assayed on TSA agar (Difco) containing 5% sheep or human blood agar, at 20 and 37°C; DNase activity, assessed at 37°C on DNase agar; lipase activity, tested at 37°C on TSA plates containing 0.5% tributyrin emulsified in the presence of 0.2% Triton X-100; and the serine protease activity, detected at 30°C by the azocasein method as previously described [24].

Antibacterial susceptibility testing was performed using Combo Urine 1S panels containing 26 antibiotics (Dade-MicroScan).

3. Results and discussion

A total of 102 (90.3%) water samples were positive for *Aeromonas* spp., 72 from freshwater (reservoirs and rivers) and 30 from seawater. The species *A. popoffii* was present

in 8.8% of the samples studied. From a total of 145 strains of *Aeromonas* recovered, 11 belonged to *A. popoffii* (eight from freshwater and three from seawater at bathing areas), representing 8% of strains isolated from freshwater and 6.8% from seawater (Table 1). In freshwater the most frequently recovered species were *A. veronii*, *A. hydrophila* and *A. caviae*, while in seawater *A. caviae* was the most abundant (Table 1). Although it has been argued that *A. popoffii* is unable to grow in the presence of NaCl [3], three of the isolates studied were from seawater with a high salinity rate. This is the first report of the species in this habitat.

Most of the known genes encoding virulence factors in *Aeromonas* were also present in the strains of *A. popoffii* tested (Table 3). All strains had the genes for DNases, GCAT and lipases and showed DNase and lipase activity. Although the role of DNases is unknown in *Aeromonas* pathogenicity, these genes are involved in *Streptococcus* infections [25], and are considered important for bacterial nutrition [7]. GCAT had only been previously investigated by PCR in isolates of *A. salmonicida* [9]. Practically all *A. popoffii* strains (96%) presented the serine protease genes, and 69% showed protease activity with the azocasein test. All strains isolated in Switzerland and Scotland–Belgium had the genes encoding aerolysin/hemolysin, while they were only present in 73% of the isolates from Spain. Aerolysin/hemolysin is commonly found in *A. hydrophila* strains that cause bacteremia [26]. Additionally, it has been observed that deletion mutants for the *aerA* gene (encoding aerolysin) are less virulent than parental strains [27]. Our study demonstrated that the occurrence of the aerolysin/hemolysin genes in *A. popoffii* (92%) is similar to that in common clinical species (e.g. *A. veronii* bt sobria), and also in the fish pathogen *A. salmonicida* [13]. In the original description, the isolates of *A. popoffii* were tested in sheep blood at 37°C and considered non-β-hemolytic [3]. However, in our study strains of *A. popoffii* were clearly β-hemolytic, although dependent on the temperature and the type of blood used (Table 3), which agrees with data on other *Aeromonas* spp. [28].

To date, the patterns of antibiotic susceptibility of *A. popoffii* have only been investigated in the seven strains used to describe the species [3,29]. In this study, we have tested all available strains against a total of 26 antibiotics, 10 of which have never been tested against this species (piperacillin–tazobactam, cefalotin, ceftibuten, meropenem).

Table 1
Distribution of *Aeromonas* species isolated from freshwater and seawater

	<i>A. hydrophila</i>	<i>A. bestiarum</i>	<i>A. salmonicida</i>	<i>A. caviae</i>	<i>A. media</i>	<i>A. sobria</i>	<i>A. veronii</i>	<i>A. jandaei</i>	<i>A. popoffii</i>	<i>A. schubertii</i>	Total
Freshwater	14 ^a (13.9) ^b	8 (7.9)	3 (2.9)	13 (12.9)	7 (6.9)	1 (1.0)	44 (43.6)	3 (2.9)	8 (8.0)	–	101 (100)
Seawater	2 (4.5)	6 (13.6)	5 (11.4)	21 (47.7)	4 (9.1)	–	1 (2.3)	1 (2.3)	3 (6.8)	1 (2.3)	44 (100)

^aNumber of strains.

^bPercentage (incidence).

Table 2

Primers designed and PCR conditions for the detection of virulence genes

Gene	Primers ^a	PCR conditions		Cycles
		°C	min	
Aerolysin/hemolysin	aer-f: 5'-CCTATGGCCTGAGCGAGAAG-3'	95	3	35
	aer-r: 5'-CCAGTTCAGTCCCACCACT-3'	94	1	
		56	1	
		72	1	
		72	5	
GCAT	GCAT-f: 5'-CTCCTGGAATCCCAAGTATCAG-3'	95	3	35
	GCAT-r: 5'-GGCAGGTTGAACAGCAGTATCT-3'	94	1	
		56	1	
		72	1	
		72	5	
Serine protease	Serine-f: 5'-CACCGAAGTATTGGGTCAGG-3'	95	3	35
	Serine-r: 5'-GGCTCATGCGTAACTCTGGT-3'	94	1	
		60	1	
		72	1	
		72	5	
DNase	Exu-f: 5'-(A/G) GACATGCACAACCTCTTCC-3'	95	3	35
	Exu-r: 5'-GATTGGTATTGCC (C/T) TGCAA (C/G) -3'	94	1	
		54	1	
		72	1	
		72	5	
Lipases	lip-f: 5'-CA (C/T) CTGGT (T/G) CCGCTCAAG-3'	95	3	35
	lip-r: 5'-GT (A/G) CCGAACCAGTCGGAGAA-3'	94	1	
		56	1	
		72	1	
		72	5	

^aThe selected primers produced an amplicon of 431 bp for aerolysin/hemolysin; 350 bp for serine protease; 237 bp for GCAT; 247 bp for lipases; and 323 bp for DNase.

nem, fosfomycin, pipemidic acid, colistin, ampicillin–sulbactam, amoxycillin–clavulanic acid and trimethoprim–sulfamethoxazole). As expected, all *A. popoffii* strains were resistant to ampicillin, a characteristic trait for most of the species of the genus [30]. By contrast, all the strains were susceptible to piperacillin, piperacillin–tazobactam, cefalotin, cefuroxime, ceftibuten, cefotaxime, ceftazidime, aztreonam, imipenem, meropenem, gentamicin, amikacin, tobramycin, fosfomycin, pipemidic acid, ciprofloxacin, norfloxacin, colistin and trimethoprim–sulfame-

thoxazole. 65% of the strains were resistant to ampicillin–sulbactam, 54% to cefazolin, 42% to ticarcillin, 27% to amoxycillin–clavulanic acid, 8% to cefoxitin, and 4% to tetracycline. The combination of penicillin and a β -lactamase inhibitor proved to be useful for reducing the *A. popoffii* resistance to ampicillin. The resistance to β -lactam antibiotics in the genus *Aeromonas* has been considered dependent on chromosome-mediated β -lactamases [31–33]. However, it is not clear if clavulanic acid shows intrinsic activity against *Aeromonas*, or if it inhibits the ac-

Table 3

Presence of virulence genes and associated phenotypic activity in 26 strains of *A. popoffii*

Origin	Number of strains	Extracellular lipases			Serine protease		Extracellular nucleases		Aerolysin/hemolysin						
		GCAT presence	<i>lip</i> , <i>plc1</i> , <i>lipH3</i> , <i>pla</i> presence	Tributyryl assay	Gene presence	Azocasein test	Gene presence	DNase assay	Gene presence	β-Hemolysis					
										Sheep blood		Human blood			
										20°C	37°C	20°C	37°C		
Scotland–Belgium	7	7 ^a (100) ^b	7 (100)	7 (100)	7 (100)	7 (100)	7 (100)	7 (100)	7 (100)	7 (100)	2 (28.6)	0 (0)	6 (85.7)	4 (57.1)	
Switzerland	8	8 (100)	8 (100)	8 (100)	8 (100)	3 (37.5)	8 (100)	8 (100)	8 (100)	8 (100)	0 (0)	0 (0)	7 (87.5)	4 (50)	
Spain	11	11 (100)	11 (100)	11 (100)	10 (90.9)	8 (72.7)	11 (100)	11 (100)	8 (73)	8 (73)	2 (18)	0 (0)	6 (55)	5 (45)	
Total	26	26 (100)	26 (100)	26 (100)	25 (96)	18 (69)	26 (100)	26 (100)	23 (88)	23 (88)	4 (15)	0 (0)	19 (73)	13 (50)	

^aNumber of strains positive for the test.

^bPercentage.

tivity of some of the chromosome-mediated β -lactamases. The resistance to cephalosporins shown in our study agrees with that reported for the species *A. jandaei*, *A. schubertii*, *A. trota* and *A. veronii* bt veronii [30] and also with that previously reported for *A. popoffii* [3,29]. Our results confirm that third-generation cephalosporins are the most active against *A. popoffii*, followed by second- and first-generation cephalosporins [29]. Resistance to quinolones has been described in clinical isolates of *Aeromonas* [34], however they were active against *A. popoffii*.

We can conclude that, although *A. popoffii* has never been reported from clinical samples, it has been found both in drinking water and in freshwater that is a source of production of drinking water. Since drinking water is considered a source of infection [35], some European countries, The Netherlands [36] and recently also the United States Environmental Protection Agency have added *Aeromonas* to the list of emerging pathogens of concern. The fact that *A. popoffii* possesses most of the virulence genes present in other *Aeromonas* pathogenic species indicates that its potential pathogenesis should not be underestimated. However, commercial identification systems are unable to identify this species, which may hamper establishing its true incidence.

Acknowledgements

This work has been supported by Grants FIS 99/0944 and FIS 96/0579 from the Spanish Ministry of Health, CIRIT (SGR 1999/00103), Generalitat Valenciana (GV98-21-05), Fundació Ciència i Salut and a fellowship from the Universitat Rovira i Virgili. We would like to thank the Colección Española de Cultivos Tipo (CECT), the Belgium Co-ordinated Collection of Micro-organisms (LMG) and Dr. Demarta for kindly providing isolates.

References

- [1] Janda, J.M. and Abbott, S.L. (1998) Evolving concepts regarding the genus *Aeromonas*: An expanding panorama of species, disease presentations, and unanswered questions. *Clin. Infect. Dis.* 27, 332–344.
- [2] Figueras, M.J., Guarro, J. and Martínez-Murcia, A. (2000) Clinically relevant *Aeromonas* species. *Clin. Infect. Dis.* 30, 988–989.
- [3] Huys, G., Kämpfer, P., Altwegg, M., Kersters, I., Lamb, A., Coopman, R., Luthy-Hottenstein, J., Vancanneyt, M., Janssen, P. and Kersters, K. (1997) *Aeromonas popoffii* sp. nov., a mesophilic bacterium isolated from drinking water production plants and reservoirs. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 47, 1165–1171.
- [4] Demarta, A., Tonolla, M., Caminada, A.-P., Ruggeri, N. and Peduzzi, R. (1999) Signature region within the 16S rDNA sequences of *Aeromonas popoffii*. *FEMS Microbiol. Lett.* 172, 239–246.
- [5] Borrell, N., Figueras, M.J. and Guarro, J. (1998) Phenotypic identification of *Aeromonas* genomospecies from clinical and environmental sources. *Can. J. Microbiol.* 44, 7–12.
- [6] Figueras, M.J., Soler, L., Chacón, M.R., Guarro, J. and Martínez-Murcia, A.J. (2000) Extended method for discrimination of *Aeromonas* spp. by 16S rDNA-RFLP. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 50, 2069–2073.
- [7] Pemberton, J.M., Kidd, S.P. and Schmidt, R. (1997) Secreted enzymes of *Aeromonas*. *FEMS Microbiol. Lett.* 152, 1–10.
- [8] Lee, K.K. and Ellis, A.E. (1990) Glycerophospholipid:cholesterol acyltransferase complexed with lipopolysaccharide (LPS) is a major lethal exotoxin and cytotoxin of *Aeromonas salmonicida*: LPS stabilizes and enhances toxicity of the enzyme. *J. Bacteriol.* 172, 5382–5393.
- [9] Hoie, S., Dalsgaard, I., Aase, I.L., Heum, M., Thornton, J.M. and Powell, P. (1999) Polymerase chain reaction (PCR)-based typing analysis of atypical isolates of the fish pathogen *Aeromonas salmonicida*. *Syst. Appl. Microbiol.* 22, 403–411.
- [10] Howard, S.P., MacIntyre, S. and Buckley, J.T. (1996) Toxins. In: *The Genus Aeromonas* (Austin, B., Altwegg, M., Gosling, P.J. and Joseph, S., Eds.), pp. 267–286. John Wiley and Sons, Chichester.
- [11] Borrell, N., Acinas, S.G., Figueras, M.J. and Martínez-Murcia, A. (1997) Identification of *Aeromonas* clinical isolates by restriction fragment length polymorphism of PCR-amplified 16S rRNA genes. *J. Clin. Microbiol.* 35, 1671–1674.
- [12] Thompson, J.D., Higgins, D.G. and Gibson, T.J. (1994) Clustal W: Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, positions-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* 22, 4673–4680.
- [13] Kingombe, C.I.B., Huys, G., Tonolla, M., Albert, M.J., Swings, J., Peduzzi, R. and Jemmi, T. (1999) PCR detection, characterization, and distribution of virulence genes in *Aeromonas* spp. *Appl. Environ. Microbiol.* 65, 5293–5302.
- [14] Cascon, A., Fregeneda, J., Allen, M., Yugueros, J., Temprano, A., Hernanz, C., Sanchez, M., Rodriguez Aparicio, L. and Naharro, G. (2000) Cloning, characterization and insertional inactivation of a major extracellular serine protease gene with elastolytic activity for *Aeromonas hydrophila*. *J. Fish Dis.* 23, 49–59.
- [15] Whitby, P.W., Landon, M. and Coleman, G. (1992) The cloning and nucleotide sequence of the serine protease gene (*aspA*) of *Aeromonas salmonicida* ssp. *salmonicida*. *FEMS Microbiol. Lett.* 99, 65–72.
- [16] Nerland, A.H. (1996) The nucleotide sequence of the gene encoding GCAT from *Aeromonas salmonicida* ssp. *salmonicida*. *J. Fish Dis.* 19, 145–150.
- [17] Thornton, J., Howard, S.P. and Buckley, J.T. (1988) Molecular cloning of a phospholipid-cholesterol acyltransferase from *Aeromonas hydrophila*. Sequence homologies with lecithin-cholesterol acyltransferase and other lipases. *Biochim. Biophys. Acta* 959, 153–159.
- [18] Chuang, Y.C., Chiou, S.F., Su, J.H., Wu, M.I. and Chang, M.C. (1997) Molecular analysis and expression of the extracellular lipase of *Aeromonas hydrophila* MCC-2. *Microbiology* 143, 803–812.
- [19] Anguita, J., Rodriguez-Aparicio, L.B. and Navarro, G. (1993) Purification, gene cloning, amino acid sequence analysis, and expression of an extracellular lipase from an *Aeromonas hydrophila* human isolate. *Appl. Environ. Microbiol.* 59, 2411–2417.
- [20] Merino, S., Aguilar, A., Noguera, M.M., Regue, M., Swift, S. and Tomás, J.M. (1999) Cloning, sequencing, and role in virulence of two phospholipases (A1 and C) from mesophilic *Aeromonas* sp. serogroup O:34. *Infect. Immun.* 67, 4008–4013.
- [21] Ingham, A.B. and Pemberton, J.M. (1995) A lipase of *Aeromonas hydrophila* showing nonhemolytic phospholipase C activity. *Curr. Microbiol.* 31, 28–33.
- [22] Dodd, H. and Pemberton, J.M. (1999) The gene encoding periplasmic deoxyribonuclease for *Aeromonas hydrophila*. *FEMS Microbiol. Lett.* 173, 41–46.
- [23] Chang, M.C., Chang, S.Y., Chen, S.I. and Chuang, S.M. (1992) Cloning and expression in *Escherichia coli* of the gene encoding an extracellular deoxyribonuclease (DNase) from *Aeromonas hydrophila*. *Gene* 94, 175–180.
- [24] Swift, S., Lynch, M.J., Leigh, F., Kirke, D.F., Tomás, J.M., Stewart, G. and Williams, P. (1999) Quorum sensing-dependent regulation

- and blockade of exoprotease production in *Aeromonas hydrophila*. Infect. Immun. 67, 5192–5199.
- [25] Podbielski, A., Zarges, I., Flösdorff, A. and Weber-Heynemann, J. (1996) Molecular characterization of a major serotype M49 group A Streptococcal DNase gene (*sdaD*). Infect. Immun. 64, 5349–5356.
- [26] Vadivelu, J., Puthucherry, S.D., Phipps, M. and Chee, Y.W. (1995) Possible virulence factors involved in bacteraemia caused by *Aeromonas hydrophila*. J. Med. Microbiol. 42, 171–174.
- [27] Chakraborty, T., Huhle, B., Hof, H., Bergbauer, H. and Goebel, W. (1987) Marker-exchange mutagenesis of the aerolysin determinant in *Aeromonas hydrophila* demonstrates the role of aerolysin in *A. hydrophila*-associated systemic infections. Infect. Immun. 55, 2274–2280.
- [28] Santos, J.A., Gonzalez, C.J., Otero, A. and García-López, M.L. (1999) Hemolytic activity and siderophore production in different *Aeromonas* species isolated from fish. Appl. Environ. Microbiol. 65, 5612–5614.
- [29] Kämpfer, P., Christmann, C., Swings, J. and Huys, G. (1999) In vitro susceptibilities of *Aeromonas* genomic species to 69 antimicrobial agents. Syst. Appl. Microbiol. 22, 662–669.
- [30] Overman, T.L. and Janda, J.M. (1999) Antimicrobial susceptibility patterns of *Aeromonas jandaei*, *A. schubertii*, *A. trota*, and *A. veronii* biotype *veronii*. J. Clin. Microbiol. 37, 706–708.
- [31] Hayes, M.V., Thomson, C.J. and Amyes, S.G.B. (1994) Three β -lactamases isolated from *Aeromonas salmonicida*, including a carbapenemase not detectable by conventional methods. Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. 13, 805–811.
- [32] Alksne, L.E. and Rasmussen, B.A. (1997) Expression of the AsbA1, OXA-12, and AsbM1 beta-lactamases in *Aeromonas jandaei* AER 14 is coordinated by a two-component regulon. J. Bacteriol. 179, 2006–2013.
- [33] Walsh, T.R., Stunt, R.A., Nabi, J.A., MacGowan, A.P. and Bennett, P.M. (1997) Distribution and expression of β -lactamase genes among *Aeromonas* spp. J. Antimicrob. Chemother. 40, 171–178.
- [34] Vila, J., Marco, F., Soler, L., Chacón, M.R. and Figueras, M.J. (2001) In vitro antimicrobial susceptibility of clinical isolates of *Aeromonas caviae*, *Aeromonas hydrophila* and *Aeromonas veronii* biotype *sobria*. J. Antimicrob. Chemother. (submitted).
- [35] Gavriel, A.A., Landre, J.P.B. and Lamb, A.J. (1998) Incidence of mesophilic *Aeromonas* within a public drinking water supply in north-east Scotland. J. Appl. Microbiol. 84, 383–392.
- [36] Havelaar, A.H., Versteegh, J.F.M. and During, M. (1990) The presence of *Aeromonas* in drinking-water supplies in the Netherlands. Zbl. Hyg. 190, 236–256.

Evaluation of two miniaturized systems, MicroScan W/A and BBL Crystal E/NF, for the identification of clinical isolates of *Aeromonas* spp.

Soler, L.¹, F. Marco², J. Vila², M.R. Chacón¹, J. Guarro¹ and M.J. Figueras^{1*}.

¹Unitat de Microbiologia. Departament de Ciències Mèdiques Bàsiques, Facultat de Medicina i Ciències de la Salut, Universitat Rovira i Virgili, Sant Llorenç 21, 43201 Reus (Spain); ²Laboratorio de Microbiología, Institut d'Infeccions i Immunologia, Institut d'Investigació Biomèdica August Pi i Sunyer, Facultat de Medicina, Universitat de Barcelona, Villarroel 170, 08036, Barcelona (Spain).

Running title: Evaluation of MicroScan and BBL Crystal on *Aeromonas*.

*Author for correspondence:

Maria José Figueras

Departament de Ciències Mèdiques Bàsiques

Facultat de Medicina i Ciències de la Salut

Universitat Rovira i Virgili

Sant Llorenç 21

43201 Reus (Spain)

Phone: 34-977759321

Fax: 34-977759322

E-mail: mjfs@fmcs.urv.es

Evaluation of two miniaturized systems, MicroScan W/A and BBL Crystal E/NF, for the identification of clinical isolates of *Aeromonas* spp.

Fifty-two clinical strains and 22 type and reference strains of *Aeromonas* were identified in parallel with the MicroScan W/A and the BBL Crystal E/NF systems. Isolates had been previously genetically identified by 16S rDNA-RFLP. Discrimination to species level was very poor. MicroScan identified correctly only 19.3% of the isolates and BBL Crystal only 26.9%.

Thirteen species of a total of 15 included in the genus *Aeromonas* have been reported from human infections (7). They include gastroenteritis, bacteremia, cellulitis, meningitis, peritonitis, soft-tissue and broncho-pulmonary infections (10; 11). However, the prevalence of the different species in clinical samples is not well known because the techniques used for species identification are unreliable (9). They are usually based on biochemical characters giving a false predominance of *A. hydrophila* (9). When clinical strains are identified by molecular methods, the species *A. caviae* and *A. veronii* bt sobria are more common than *A. hydrophila* (7; 11). Even though biochemical tests have proved to be less than absolutely accurate for *Aeromonas* identification (1; 6; 16), they are still broadly used. Some of the commonest used methods at clinical laboratories are the miniaturized BBL Crystal Enteric/Nonfermenter (E/NF) (Crystal; Becton Dickinson Microbiological Systems, Cockeysville, Md) and the MicroScan Walk/Away (W/A) (Dade MicroScan Inc., West Sacramento, Calif.). We have evaluated the accuracy of these two methods to identify clinical isolates of *Aeromonas*, previously identified genetically by 16S rDNA-RFLP (3; 8).

Fifty-two clinical isolates and 22 type and reference strains of *Aeromonas* (Table 1 and 2) were included in the study. The isolates were growth on Trypticase Soy Agar (Difco; Barcelona, Spain) at 30°C for 24 h. Pure 24 h cultures were used to inoculate the BBL Crystal E/NF and the MicroScan W/A Combo Negative 1S type panels. As recommended by the manufacturers, oxidase was performed as complementary test for both systems while indole test was used to complement the BBL Crystal. In the case of BBL Crystal, the reading of the panel gave a 10-digit number that was compared to the corresponding database. A confidence rating of 0.6000 to 1.0000 was considered a positive identification (17). When this confidence

rating was <0.6000, but all the given options were species of *Aeromonas*, the one with a higher confidence rating was given as valid identification. The chi-square test was used to compare the results obtained with both methods, using the Statistical Package for Social Sciences (SPSS 9.0 Inc., Chicago, USA). When $p < 0.05$, they were considered statistically significant.

From the 22 type and reference strains of *Aeromonas* tested, only the type strain of *A. hydrophila* was correctly identified at species level by BBL Crystal and MicroScan (Table 1). The former method identified correctly at genus level 50 (96%) and the latter 44 (84.6%) of the 52 clinical strains tested. This difference was statistically significant ($p = 0.008$). All results of *Aeromonas* identification appeared as 'A. hydrophila group' with the latter method. With BBL Crystal, 100% of the *Aeromonas* isolates were correctly identified to the genus level, contrasting with the 52% obtained with the commonly used system APE-20E (4). BBL Crystal and MicroScan only identified correctly at species level 14 (26.9%) and 10 (19.3%) of the isolates, respectively (Table 2). The BBL Crystal, identified correctly 100% (10/10) of the *A. hydrophila* with a confidence rating (CR) of 0.8631-0.9993, 21.4% (3/14) of the *A. veronii* with a coincident CR of 0.3604 and 5.2% (1/19) of the *A. caviae* clinical isolates with a CR of 0.7663. However the MicroScan only identified correctly the *A. hydrophila* ('A. hydrophila' group) isolates (Table 2).

The incorrect identification of 16 *A. caviae* clinical isolates as *A. hydrophila* by the BBL Crystal was due to a positive response for the lysine test, which is expected to be negative (2), nevertheless, 14 of such isolates were identified in second option as *A. caviae*, with a very low confidence rating (0.0035-0.3962). The misidentification of 6 *A. veronii* isolates as *A. hydrophila* was due to their positive responses to aesculin hydrolysis test, which is expected to be negative (2). In the case of MicroScan, the most confusing biochemical test was Voges-Proskauer.

BBL Crystal and MicroScan wrongly identified 71.4% and 85.7%, respectively, of the isolates as *A. hydrophila*. If these results were correct, this would agree with Vivas et al. (18) who after identifying the isolates with MicroScan stated that this is the most common clinical species. However, when identifying clinical isolates with molecular methods, *A. hydrophila* is not the most prevalent species (9; 11). Using the 16S rDNA RFLP method we found that *A. hydrophila* only represented a 8.1% of the total ($n = 490$) of isolates tested (unpublished data). This tendency of most commercial systems to identify clinical strains as *A. hydrophila* has lead to an overestimation of the

clinical relevance of this species and has masked the true incidence of other *Aeromonas* spp. (13; 14; 15; 16).

The poor accuracy of MicroScan in identifying *Aeromonas* at species level in our study contrasted with the results of Vivas et al. (18). We tested isolates of all the species of *Aeromonas* and only 19.3% of them were correctly identified, while Vivas et al. (18) tested isolates from 8 species, and found that 78.8% of them were correctly identified. An explanation for this discrepancy could be the fact that these authors confirmed identification using biochemical procedures which has been repeatedly demonstrated that they are not reliable for this purpose (3; 5; 8; 12).

From the total of 74 isolates here tested (type and reference strains plus clinical isolates), BBL Crystal and MicroScan identified 8.1% and 21.6% of them, respectively, as not belonging to this genus (Table 1 and 2). The tendency of biochemical identification miniaturized systems to confuse *Aeromonas* with *Vibrio* noticed in our study was already known (1). In our case MicroScan misidentified 8 isolates (10.8%) as *Vibrio fluvialis*, similar results than those reported by Vivas et al. (18) which was of 8%. It is worth of mentioning that BBL Crystal misidentified two isolates as *Vibrio cholerae*, which is of special relevance due to the pathogenic meaning of this microorganism. Modern methods based on colony blot hybridization have been proposed to avoid the misidentification of *Aeromonas* as *Vibrio* (6).

The drawbacks of commercial biochemical miniaturized systems for the identification of *Aeromonas* spp. lie mainly in their inappropriate and incomplete databases. For instance, the database of BBL Crystal includes the species *A. hydrophila*, *A. caviae*, *A. veronii* and *A. sobria*, although none of these species were correctly identified. Why the latter species is added in the database is unclear since is known that *A. sobria* has an environmental origin and it is very rarely isolated from clinical samples (7; 11). Maybe an explanation lies in the fact that *A. sobria* is the name classically used by clinical microbiology laboratories to refer to *A. veronii* bt *sobria* (7). To increase this confusion the BBL Crystal identified the type strain of *A. sobria* as *A. veronii*, while a reference strain of *A. veronii* bt *sobria* was identified as *A. sobria* (Table 1).

In summary, BBL Crystal and MicroScan are not useful systems for the identification clinical isolates of *Aeromonas*, and therefore our results highlight the need to develop more reliable systems.

This work has been supported by the grants: FIS 99/0944 from the Spanish Ministry of Health, Fundació Ciència i Salut and a fellowship from the Universitat Rovira i Virgili for L. Soler and M.R. Chacón. We would like to thank the Colección Española de Cultivos Tipo (CECT) and the Belgium Co-ordinated Collection of Micro-organisms (LMG) for kindly providing isolates.

REFERENCES

- Abbott, S.L., L.S. Seli, M. Catino, M.A. Hartley, and J.M. Janda.** 1998. Misidentification of unusual *Aeromonas* species as members of the genus *Vibrio*: a continuing problem. J. Clin. Microbiol. **36**:1103-1104.
2. **Altwegg, M.** 1999. *Aeromonas* and *Plesiomonas*. p. 507-516. In P.R. Murray, E. J. Baron, M.A. Pfaller, F.C. Tenover and R.H. Tenover (ed.), Manual of Clinical Microbiology. ASM Press, Washington.
3. **Borrell, N., S.G. Acinas, M.J. Figueras and A. Martínez-Murcia.** 1997. Identification of *Aeromonas* clinical isolated by restriction fragment length polymorphism of PCR-amplified 16S rRNA genes. J. Clin. Microbiol. **35**:1671-1674.
4. **Carnahan, A., S. Lee, D. Watsky, G. Thomas.** 1994. Evaluation of BBL^R CrystalTM enteric/non-fermenter identification system for *Aeromonas*, *Vibrio* and *Plesiomonas* isolates. C-245, p. 533. Abstracts of Annual Meeting of the American Society for Microbiology.
5. **Castro-Escarpulli, G., M.J. Figueras, G. Aguilera-Arreola, L. Soler, E. Fernández-Rendón, G.O. Aparicio, J. Guarro and M.R. Chacón.** 2002. Characterisation of *Aeromonas* spp. isolated from frozen fish intended for human consumption in Mexico. Int. J. Food Microbiol. **2612**: (in press).
6. **Chacón, M.R., G. Castro-Escarpulli, L. Soler, J. Guarro and M.J. Figueras.** 2002. A DNA probe specific for *Aeromonas* colonies. Diagn. Microbiol. Infect. Dis.**44**:221-225.
7. **Figueras, M.J., J. Guarro, and A.J. Martínez-Murcia.** 2000. Clinical relevant *Aeromonas* species. Clin. Infect. Dis. **30**:988-989.
8. **Figueras, M.J., L. Soler, M.R. Chacón, J. Guarro, and A.J. Martínez-Murcia.** 2000. Extended method for discrimination of *Aeromonas* spp. by 16S rDNA RFLP analysis. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. **50**:2069-2073.

9. **Janda, J.M.** 2001. *Aeromonas* and *Plesiomonas*. In *Molecular Medical Microbiology* ed. Sussman, M. pp. 1237-1270. San Diego, USA: Academic Press.
10. **Janda, J.M., and S.L. Abbott.** 1996. Human pathogens, p. 151-174. In B. Austin, M. Altwegg, P.J. Gosling and S. Joseph (ed.), *The genus Aeromonas*. John Wiley and Sons, New York.
11. **Janda, J.M., and S.L. Abbott.** 1998. Evolving concepts regarding the genus *Aeromonas*: An expanding panorama of species, diseases presentation, and unanswered questions. *Clin. Infect. Dis.* **27**:453-461.
12. **Kozińska, A., M.J. Figueras, M.R. Chacón and L. Soler.** 2002. Phenotypic characteristics and pathogenicity of *Aeromonas* genomospecies isolated from common carp (*Cyprinus carpio* L.). *Journal of Applied Microbiology*, **93**:1034-1041.
13. **Kuijper, E.J., A.G. Steigerwalt, B.C.I.M. Schoenmakers, M.F. Peeters, H.C. Zanen, and D.J. Brenner.** 1989. Phenotypic characterization and DNA relatedness in human fecal isolates of *Aeromonas* spp. *J. Clin. Microbiol.* **27**:132-138.
14. **Kuijper, E.J., and M.F. Peeters.** 1991. Bacteriological and clinical aspects of *Aeromonas*-associated diarrhea in The Netherlands. *Experientia* **47**: 432-434.
15. **Overman, T.L., and J.K. Overley.** 1986. Feasibility of same-day identification of members of the family *Vibrionaceae* by the API 20E system. *J. Clin. Microbiol.* **23**:715-717.
16. **Overman, T.L., J.F. Kessler, and J.P. Seabolt.** 1985. Comparison of API 20E, API Rapid E, and API Rapid NFT for identification of members of the family *Vibrionaceae*. *J. Clin. Microbiol.* **22**:778-781.
17. **Peele, D., J. Bradfield, W. Pryor, and S. Vore.** 1997. Comparison of identifications of human and animal source gram-negative bacteria by API 20E and Crystal E/NF systems. *J. Clin. Microbiol.* **35**:213-216.
18. **Vivas, J., A.I. Saa, A. Tinajas, L. Barbeyto, and L.A. Rodríguez.** 2000. Identification of motile *Aeromonas* strains with the Microscan walkaway system in conjunction with the combo negative type 1S panels. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**:1764-1766.

TABLE 1. Comparison of the BBL Crystal and MicroScan systems for the identification of 22 *Aeromonas* type and reference strains identified by 16S rDNA-RFLP.

16S rDNA-RFLP	BBL Crystal	MicroScan
<i>A. hydrophila</i> CECT 839 ^{Ta}	<i>A. hydrophila</i>	'A. hydrophila' group
<i>A. bestiarum</i> CECT 4227 ^T	<i>A. hydrophila</i>	'A. hydrophila' group
<i>A. salmonicida</i> LMG13451	<i>A. hydrophila</i>	<i>V. fluvialis</i>
<i>A. salmonicida</i> subsp <i>salmonicida</i> CECT 894 ^T	<i>Vibrio fluvialis</i>	N.Gb
<i>A. salmonicida</i> subsp <i>masoucida</i> CECT 896	<i>A. hydrophila</i>	'A. hydrophila' group
<i>A. salmonicida</i> subsp <i>achromogenes</i> CECT 895	<i>A. hydrophila</i>	<i>Pasteurella multocida</i>
<i>A. salmonicida</i> subsp <i>smithia</i> NCIMB 13210	Misclassified Gram negative bacilli	<i>P. multocida</i>
<i>A. caviae</i> CECT 838 ^T	<i>A. hydrophila</i>	'A. hydrophila' group
<i>A. media</i> CECT 4232 ^T	<i>A. hydrophila</i>	'A. hydrophila' group
<i>A. eucrenophila</i> CECT 4224 ^T	<i>A. hydrophila</i>	<i>V. fluvialis</i>
<i>A. sobria</i> CECT 4245 ^T	<i>A. veronii</i>	<i>P. multocida</i>
<i>A. veronii</i> bt <i>sobria</i> CECT 4246	<i>A. sobria</i>	'A. hydrophila' group
<i>A. jandaei</i> CECT 4228 ^T	<i>A. hydrophila</i>	'A. hydrophila' group
<i>A. veronii</i> bt <i>veronii</i> CECT 4257 ^T	<i>A. hydrophila</i>	'A. hydrophila' group
<i>Aeromonas</i> sp (GH11) CECT 4253	<i>V. cholerae</i>	<i>Ps. fluorescens/putida</i>
<i>Aeromonas</i> Group 501 CECT 5178	<i>A. hydrophila</i>	'A. hydrophila' group
<i>Aeromonas</i> Group 501 CECT 4254	<i>Chromobacterium violaceum</i>	<i>V. damsela</i>
<i>A. schubertii</i> CECT 4240 ^T	<i>A. hydrophila</i>	'A. hydrophila' group
<i>A. trota</i> CECT 4255 ^T	<i>A. hydrophila</i>	'A. hydrophila' group
<i>A. popoffii</i> LMG 17541 ^T	<i>A. hydrophila</i>	<i>V. damsela</i>
<i>A. allosaccharophila</i> CECT 4199 ^T	<i>A. hydrophila</i>	'A. hydrophila' group
<i>A. encheleia</i> CECT 4342 ^T	<i>A. hydrophila</i>	<i>V. parahaemolyticus</i>

^aType strain; ^bN.G. Numerous genera; CECT Colección Española de Cultivos Tipo, Universidad de Valencia, Valencia, Spain; LMG, Culture Collection of the Laboratorium voor Microbiologie Gent, Universiteit Gent, Ghent, Belgium.

TABLE 2. Comparison of the BBL Crystal and MicroScan systems for the identification of 52 clinical *Aeromonas* isolates identified by 16S rDNA-RFLP.

16S rDNA-RFLP	N° of tested strains	BBL Crystal		MicroScan	
<i>A. hydrophila</i>	10	10	<i>A. hydrophila</i>	10	'A. hydrophila' group
<i>A. caviae</i>	19	16	<i>A. hydrophila</i>	17	'A. hydrophila' group
		1	<i>A. sobria</i>	2	<i>Vibrio fluvialis</i>
		1	<i>A. veronii</i>		
		1	<i>A. caviae</i>		
<i>A. veronii</i>	14	3	<i>A. veronii</i>	1	<i>V. fluvialis</i>
		6	<i>A. hydrophila</i>	13	'A. hydrophila' group
		4	<i>A. sobria</i>		
		1	<i>Burkholderia cepacia</i>		
<i>A. media</i>	4	4	<i>A. hydrophila</i>	3	'A. hydrophila' group
				1	<i>V. fluvialis</i>
<i>A. jandaei</i>	2	1	<i>A. hydrophila</i>	1	<i>V. fluvialis</i>
		1	<i>Vibrio cholerae</i>	1	'A. hydrophila' group
<i>A. bestiarum</i>	1	1	<i>A. hydrophila</i>	1	'A. hydrophila' group
<i>A. salmonicida</i>	2	2	<i>A. hydrophila</i>	1	<i>V. fluvialis</i>
				1	'A. hydrophila' group

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
FACULTAT DE MEDICINA I CIÈNCIES DE LA SALUT
Departament de Ciències Mèdiques Bàsiques
Unitat de Biologia i Microbiologia

IMPORTANCIA BIOSANITARIA DE *Aeromonas*:
TAXONOMÍA Y EPIDEMIOLOGÍA

Lara Soler Falgàs
Tesis Doctoral
2003

VI. CONCLUSIONES

1. Se ha elaborado un protocolo basado en los patrones de restricción del gen 16S rRNA que ha permitido identificar todas las especies aceptadas de *Aeromonas*.
2. Se ha comprobado que los sistemas de identificación para enterobacterias MicroScan W/A y BBL Crystal E/NF, frecuentemente utilizados en clínica, no son útiles para la identificación de *Aeromonas* spp.
3. Se ha diseñado una sonda a partir de un fragmento de 237 pb del gen que codifica para la glicerofosfolípido-colesterol aciltransferasa, que demostró ser capaz de identificar las colonias de *Aeromonas*.
4. Se ha comprobado que las especies *A. bestiarum* y *A. salmonicida* no pueden identificarse mediante pruebas bioquímicas ni por métodos genéticos. Un 60% de las cepas estudiadas, que habían sido identificadas bioquímicamente como pertenecientes a *A. bestiarum* o *A. salmonicida*, presentaron una mezcla de operones ribosómicos de ambas especies, lo que impidió su separación utilizando los RFLP del gen 16S rRNA. El análisis filogenético de estas especies basado en las secuencias del gen *rpoD* y el análisis conjunto con el gen *gyrB* parecen indicar, no obstante, una divergencia entre estas especies.
5. Las cepas de origen clínico de las especies *A. hydrophila*, *A. caviae* y *A. veronii* han resultado ser sensibles a las cefalosporinas, con excepción de la cefazolina. Los aminoglucósidos más efectivos frente a dichas especies fueron la gentamicina y la amikacina, y las quinolonas más efectivas fueron el ofloxacino y ciprofloxacino.
6. Se ha evidenciado que *Aeromonas* es el causante del 2% de las diarreas del viajero, y las especies más frecuentemente involucradas fueron *A. veronii* bt sobria y *A. caviae*. Según los datos aportados en la presente tesis, las quinolonas o las cefalosporinas de tercera generación deberían considerarse el tratamiento de elección para este tipo de infecciones.

7. La técnica de ERIC-PCR fue más discriminativa que la de REP-PCR y que los RFLP del espaciador intergénico 16S-23S para el tipado de cepas de *Aeromonas*. Sin embargo, la combinación simultánea de dos de éstas técnicas mejoró los resultados, alcanzándose el mayor poder discriminativo con la utilización simultánea de todas ellas. Se demostró que las cepas tendían a agruparse en función de su origen geográfico.
8. La actividad β -hemolítica y los genes que codifican para los factores de virulencia aerolisina/hemolisina y DNasas, han sido más frecuentes en las cepas clínicas que en las ambientales. Los genes para la serina proteasa, glicerofosfolípido-colesterol aciltransferasa y lipasas extracelulares (*lip*, *plc*, *pla*, *lipH3*), así como la actividad fenotípica que los caracteriza, han sido detectados en todas las especies estudiadas, no encontrándose diferencias entre las cepas de origen clínico y ambiental.
9. Se ha demostrado una asociación estadísticamente significativa entre la presencia de genes que codifican para los factores de virulencia aerolisina/hemolisina y serina proteasa y la actividad β -hemolítica, lo que sugiere, tal como han indicado otros autores, que la serina proteasa podría actuar como activador de la aerolisina/hemolisina.
10. La especie *A. popoffii* representó un 8% de las cepas aisladas en aguas superficiales y un 6.8% en las de agua de mar, siendo la primera vez que dicha especie se aisló en este último hábitat. La presencia, en la citada especie, de los factores de virulencia aerolisina/hemolisina, serina proteasa, glicerofosfolípido-colesterol aciltransferasa y lipasas extracelulares (*lip*, *plc*, *pla*, *lipH3*), así como la actividad fenotípica que los caracteriza, fue comparable a la de las especies de interés clínico.

11. En *A. jandaei*, el factor de virulencia más prevalente ha sido el gen del flagelo lateral (gen *lafA*), seguido de la aerolisina/hemolisina, la enterotoxina citotónica termolábil (*alt*) y la enterotoxina citotónica termoestable (*ast*). Estos genes se encontraron con más frecuencia en cepas clínicas que en cepas ambientales, aunque sólo una cepa de origen intestinal presentó los genes *alt* y *ast* simultáneamente.
12. Las especies más frecuentemente aisladas en muestras de pescado destinado al consumo humano (tilapia y carpa) fueron *A. salmonicida*, *A. bestiarum*, *A. veronii*, *A. sobria*, *A. encheleia* y *A. hydrophila*, siendo las tres primeras especies las más virulentas.
13. El hecho de que por primera vez se haya demostrado la presencia del sistema de secreción tipo III en la mayoría de cepas clínicas de *A. veronii* y *A. hydrophila*, demuestra que dichas cepas poseen un potencial virulento comparable al de otros patógenos tales como *Escherichia coli*, *Yersinia* spp. y *Salmonella* spp.

Aeromonas spp. and Traveler's Diarrhea: Clinical Features and Antimicrobial Resistance

Jordi Vila,* Joaquin Ruiz,* Francisco Gallardo,* Martha Vargas,* Lara Soler†, Maria José Figueras,† and Joaquin Gascon‡

Traveler's diarrhea is the most common health problem of international travelers. We determined the prevalence of *Aeromonas* spp. associated with traveler's diarrhea and analyzed the geographic distribution, clinical features, and antimicrobial susceptibility. *Aeromonas* spp. were isolated as a cause of traveler's diarrhea in 18 (2%) of 863 patients. *A. veronii* biotype *sobria* was isolated in nine patients, *A. caviae* in seven patients, and *A. jandaei* and *A. hydrophila* in one patient each. *Aeromonas* spp. were isolated with a similar prevalence in Africa, Latin America, and Asia. Watery and persistent diarrhea, fever, and abdominal cramps were common complaints. All strains were resistant to ampicillin; showed variable resistance to chloramphenicol, tetracycline, and cotrimoxazole; and were susceptible to cefotaxime, ciprofloxacin, and nalidixic acid. The persistence of symptoms made antimicrobial treatment necessary.

Traveler's diarrhea is the main infectious disease reported in persons traveling abroad. Among the microorganisms responsible, bacteria represent approximately 61% (1). Enterotoxigenic *Escherichia coli*, enteroaggregative *E. coli*, and *Shigella* spp. are the most common bacteria involved (1,2). Other bacteria that cause diarrhea, such as *Salmonella*, *Campylobacter*, *Yersinia*, *Aeromonas*, and *Plesiomonas* spp., are isolated less often (1).

The genus *Aeromonas* has high diversity: at least 16 DNA hybridization groups are recognized (3). Among these genospecies, *A. hydrophila*, *A. caviae*, and *A. veronii* biotype *sobria* are considered of clinical significance (4,5). The spectrum of infectious diseases caused by *Aeromonas* species includes gastrointestinal infections as well as extraintestinal infections such as cellulitis, wound infections, septicemia, urinary tract infections, and hepatobiliary and ear infections, among others (6). Although healthy carriers of *Aeromonas* spp. have been described, several case-control studies have shown that these bacteria cause diarrhea (6). With the incorporation of genotypic techniques, identification of *Aeromonas* to species level has

improved (7). The main objective of this study was to determine the prevalence of *Aeromonas* spp. as a cause of traveler's diarrhea and to analyze the species' geographic distribution, clinical features, and susceptibility to antimicrobial agents.

Methods

Patients

A total of 863 patients with traveler's diarrhea were recruited from the Tropical Medicine Unit of the Hospital Clinic of Barcelona, Spain, during the period January 1999–December 2001. All patients completed an epidemiologic questionnaire; their clinical history was taken, and a physical examination was performed. Traveler's diarrhea was defined as the occurrence of three or more episodes of watery stool within a 24-hour period, with or without other symptoms, or the occurrence of unformed stools accompanied by one of the following: vomiting, nausea, abdominal cramps, fever, chills, prostration, or tenesmus. Persistent diarrhea was defined as that of >14 days' duration.

Microbiologic Tests

A stool sample was collected, sent to the Laboratory of Clinical Microbiology, and processed for bacterial, viral, and parasitologic studies. To isolate *Aeromonas* spp., blood agar supplemented with ampicillin and a selective media, CIN (cefsulodin-irgasan-novobiocin) agar, were used. After incubation at 37°C for 24–48 hours, an oxidase test was performed on the colonies compatible with bacilli. Biochemical criteria were used to identify *Aeromonas*. Identification of the species was performed by 16S rDNA–restriction fragment length polymorphism as previously described (7,8). The biotype of *A. veronii* strains was identified on the basis of a positive reaction to arginine dihydrolase and negative response to bilis-esculin hydrolysis and production of ornithine decarboxylase (9).

Susceptibility Testing

Antimicrobial susceptibility tests were performed by using an agar disk diffusion method advocated by the

*Hospital Clinic, Barcelona, Spain; †Universitat Rovira i Virgili, Reus, Spain; and ‡Universitat de Barcelona, Barcelona, Spain

National Committee for Clinical Laboratory Standards (10). Antimicrobial disks (ampicillin 10 µg; cefotaxime 30 µg; chloramphenicol 30 µg; ciprofloxacin 5 µg; nalidixic acid 30 µg; tetracycline 30 µg; and trimethoprim-sulfamethoxazole 1.25/23.75 µg) were obtained from Becton Dickinson (Cockeysville, MD). *E. coli* ATCC 25922 and *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 were used as quality-control strains.

Results

Distribution and Geographic Origin of Species Causing Traveler's Diarrhea

Aeromonas spp. were isolated as a cause of traveler's diarrhea in 18 (2%) of 863 patients. *A. veronii* biotype sobria was isolated in nine patients, *A. caviae* in seven patients, and *A. jandaei* and *A. hydrophila* in one patient each (Table 1). In three of these patients, another enteropathogen was also found: in one patient who had traveled to Mexico, *Shigella sonnei* was isolated together with *A. veronii*; in another patient traveling to India, *Giardia lamblia* was detected together with *A. veronii*; in the third patient, who had traveled to Thailand, *Salmonella* Typhimurium was found with *A. veronii*. The frequency of *Aeromonas* spp. as a cause of traveler's diarrhea was similar in patients returning from Africa (1.7%), Latin America (1.8%), and Asia (2.3%) (Table 1).

Clinical Features

The signs and symptoms of *Aeromonas* enteritis in these 18 patients are summarized in Table 2. Sixteen of the 18 patients had watery diarrhea; these were the cases associated with *A. veronii* biotype sobria and *A. caviae*. The patients with enteritis caused by *A. hydrophila* and *A. jandaei* had loose stools. Fifty percent of the patients had fever and abdominal cramps, whereas nausea and vomiting were uncommon complaints. Gross blood was observed in the stools of one patient, but this could be attributed to the

S. sonnei isolated in the same stool. In 9 of the 18 patients, diarrhea was persistent.

Antimicrobial Susceptibility

The antimicrobial susceptibility of *Aeromonas* spp. isolates causing traveler's diarrhea is shown in Table 3. All strains were resistant to ampicillin but susceptible to cefotaxime, ciprofloxacin, and nalidixic acid. The susceptibility to chloramphenicol, tetracycline, and trimethoprim-sulfamethoxazole varied. Some 66.6% of *A. veronii* biotype sobria strains and 71.4% of *A. caviae* strains were susceptible to chloramphenicol; 55.6% of *A. veronii* biotype sobria strains and 71.4% of the *A. caviae* strains were susceptible to tetracycline; and 77.8% of *A. veronii* biotype sobria and 100% of *A. caviae* were susceptible to trimethoprim-sulfamethoxazole.

Treatment

While travelling, two patients received treatment, amoxicillin in one case and amoxicillin plus clavulanic acid in the other. Patients with persistent diarrhea were treated with the following antibiotics: norfloxacin (one patient), ciprofloxacin (six patients), and trimethoprim-sulfamethoxazole (two patients); all recovered.

Discussion

In this study we describe the prevalence of different types of *Aeromonas* species associated with traveler's diarrhea in a cohort of travelers to a variety of tropical and subtropical countries. In contrast, other published studies have often been selective in terms of the types of travelers, geographic areas visited, or attempts to isolate specific microorganisms with the aim of testing antibiotic efficiency. In our study, *Aeromonas* spp. were isolated in 18 (2%) of 863 patients with traveler's diarrhea. *A. veronii* biotype sobria and *A. caviae* were the most frequently isolated species. These findings agree with the results of Hänninen et al. (11), who reported that these were the most common

Table 1. Species and geographic distribution of clinical isolates of *Aeromonas* spp. causing traveler's diarrhea

Geographic area	<i>A. veronii</i> biotype sobria (n=9)	<i>A. caviae</i> (n=7)	<i>A. jandaei</i> (n=1)	<i>A. hydrophila</i> (n=1)
Guatemala	1	1		
India	2	1 ^a	1 ^a	1
Iran		1		
Kenya	1			
Mali/Burkina Faso	1			
Mexico	2 ^b			
Nicaragua		1		
Paraguay		1		
Sahara	1			
Senegal		2		
Thailand	1			

^aThis patient traveled to India and Nepal.

^bOne traveler also visited Guatemala.

Table 2. Clinical features of patients with traveler's diarrhea associated with *Aeromonas* spp.

Sign or symptom	No. of patients with symptoms/ total patients (n=18)		Overall ^a
	<i>A. veronii</i> biotype sobria	<i>A. caviae</i>	
Watery diarrhea	9/9	7/7	16/18
Abdominal cramps	6/9	3/7	10/18
Persistent diarrhea	3/9	5/7	9/18
Fever	6/9	3/7	10/18
Nausea, vomiting, or both	2/9	0/7	3/18
Gross blood in stools	1 ^b /9	0/7	1/18

^aAlso includes *A. hydrophila* and *A. jandai*.^bIn this patient, a *Shigella sonnei* strain was also isolated.

Aeromonas spp. associated with traveler's diarrhea in tourists traveling to Morocco. Likewise, Yamada et al. (12) found that *A. veronii* biotype sobria was the *Aeromonas* species most frequently implicated as a cause of traveler's diarrhea in Japanese travelers returning from unindustrialized countries. In our study, the geographic distribution of *Aeromonas* species did not favor any predominant area: species were isolated with a similar prevalence in Africa, Latin America, and Asia. However, all four species (*A. veronii* biotype sobria, *A. caviae*, *A. jandaei*, and *A. hydrophila*) were isolated from patients returning from India. In India, *Aeromonas* spp. has been identified as an enteric pathogen in 1.8% of patients with diarrhea (13). In a recent study performed in Dhaka (Bangladesh), *Aeromonas* spp. were significantly associated with diarrhea, similar to occurrences in other countries (14–17).

In our study, 3 (16.7%) of the *Aeromonas* isolates were detected together with other enteropathogens. This situation allowed us to consider that the symptoms we observed in the patients with traveler's diarrhea associated with *Aeromonas* spp. were due to the presence of this *Aeromonas* organisms. In our study, watery stools, fever, and abdominal cramps were the most common symptoms, which is consistent with other reports (11,18). Albert et al. (18) suggested that isolates of *Aeromonas* spp. positive for both the *alt* and *ast* genes, which encode enterotoxins, were associated with watery diarrhea but that isolates pos-

itive only for the *alt* gene were associated with loose stools.

Fifty percent of the patients with *Aeromonas* spp. enteritis had persistent diarrhea. Chronic diarrhea lasting more than 1 year caused by *A. caviae* has been reported (2). A direct link between drinking water and food contaminated with *Aeromonas* spp. and gastrointestinal disease has been demonstrated (19).

Patients with prolonged enteritis required treatment. A quinolone was the drug of choice, although increased occurrence of quinolone-resistant *Aeromonas* spp. strains has been reported in industrialized countries (20,21). Regarding the β -lactam antibiotics, *Aeromonas* spp. strains analyzed in this study were, as expected, uniformly resistant to ampicillin, whereas third-generation cephalosporins, such as cefotaxime, showed good activity. These results are in accordance with those reported by other authors, showing that third-generation cephalosporins are active against *Aeromonas* spp. (2,22). The percentage of strains with resistance to chloramphenicol, tetracycline, or trimethoprim-sulfamethoxazole ranged from 22.9% to 45%. These levels of resistance are likely related to the extensive use of these antimicrobial agents in unindustrialized countries.

In summary, *A. veronii* biotype sobria and *A. caviae* are the *Aeromonas* species most frequently associated with traveler's diarrhea; watery diarrhea, fever, and abdominal cramps are the predominant clinical features. The persistence of symptoms makes the use of antimicrobial treatment necessary.

This work was partially supported by grant FIS00/0997 of Fondo de Investigaciones Sanitarias.

Dr. Vila is a professor of microbiology, School of Medicine, University of Barcelona, and consultant to the Clinical Microbiology Laboratory of the Hospital Clinic, Barcelona. His research interests lay in the molecular bases of antimicrobial resistance.

References

- Gascón J, Vila J, Valls ME, Ruiz L, Vidal J, Corachan M, et al. Etiology of traveller's diarrhea in Spanish travellers to developing countries. *Eur J Epidemiol* 1993;9:217–23.
- Rautelin H, Hänninen ML, Sivonen A, Turunen U, Valtonen V. Chronic diarrhea due to single strain of *Aeromonas caviae*. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1995;14:51–4.
- Figueras MJ, Guarro J, Martínez-Murcia AJ. Clinical relevant *Aeromonas* species. *Clin Infect Dis* 2000;30:988–9.
- Janda JM. Recent advances in the study of the taxonomy, pathogenicity, and infectious syndromes associated with the genus *Aeromonas*. *Clin Microbiol Rev* 1991;4:397–410.
- Janda JM, Abbott SL. Evolving concepts regarding the genus *Aeromonas*: an expanding panorama of species, disease presentations, and unanswered questions. *Clin Infect Dis* 1998;27:332–44.

Table 3. Antimicrobial susceptibility of *Aeromonas* spp. causing traveler's diarrhea

Antimicrobial agent	No. of isolates showing susceptibility	
	<i>A. veronii</i> biotype sobria (n=9)	<i>A. caviae</i> (n=7)
Ampicillin	0	0
Cefotaxime	9	7
Chloramphenicol	6	5
Ciprofloxacin	9	7
Nalidixic acid	9	7
Tetracycline	5	5
Trimethoprim/ sulfamethoxazole	7	7

6. Janda JM, Abbott SL, Morris JG Jr. *Aeromonas*, *Plesiomonas*, and *Edwardsiella*. In: Blaser MJ, Smith PD, Ravdin JI, Greenberg HB, Guerrant RL, editors. *Infections of gastrointestinal tract*. New York: Raven Press; 1995.
7. Borrell N, Acinas SG, Figueras MJ, Martínez-Murcia AJ. Identification of *Aeromonas* clinical isolates by restriction fragment length polymorphism of PCR-amplified 16S rDNA genes. *J Clin Microbiol* 1997;35:1671–4.
8. Figueras MJ, Soler L, Chacón MR, Guarro J, Martínez-Murcia AJ. Extended method for discrimination of *Aeromonas* spp. by 16S rDNA-RFLP analysis. *Int J Syst Evol Microbiol* 2000;50:2069–73.
9. Borrell N, Figueras MJ, Guarro J. Phenotypic identification of *Aeromonas* genomospecies from clinical and environmental sources. *Can J Microbiol* 1998;44:7–12.
10. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: approved standard M100-S11. Wayne (PA): The Committee; 2001.
11. Hänninen ML, Salmi S, Mattila L, Taipalinen R, Siitonen A. Association of *Aeromonas* spp. with travellers' diarrhoea in Finland. *J Med Microbiol* 1995;42:26–31.
12. Yamada S, Matsushita S, Dejsirilert S, Kudoh Y. Incidence and clinical symptoms of *Aeromonas*-associated traveller's diarrhoea in Tokyo. *Epidemiol Infect* 1997;119:121–6.
13. Deodhar LP, Saraswathi K, Varudkar A. *Aeromonas* spp. and their association with human diarrheal disease. *J Clin Microbiol* 1991;29:853–6.
14. Albert JM, Faruque ASG, Faruque SM, Sack RB, Mahalanabis D. Case-control study of enteropathogens associated with childhood diarrhea in Dhaka, Bangladesh. *J Clin Microbiol* 1999;37:3458–64.
15. Begue RE, Castellares G, Hayashi KE, Ruiz R, Meza R, English CK, et al. Diarrheal disease in Peru after the introduction of cholera. *Am J Trop Med Hyg* 1994;51:585–9.
16. Kühn I, Albert MJ, Ansaruzzaman M, Bhuiyan NA, Alabi SA, Islam MS, et al. Characterization of *Aeromonas* spp. isolated from humans with diarrhea, from healthy controls, and from surface water in Bangladesh. *J Clin Microbiol* 1997;35:369–73.
17. Ogunsanya TI, Rotimi VO, Adenuga A. A study of the aetiological agents of childhood diarrhea in Lagos, Nigeria. *J Med Microbiol* 1994;40:10–4.
18. Albert MJ, Ansaruzzaman M, Talukder KA, Chopra AK, Kuhn I, Rahman M, et al. Prevalence of enterotoxin genes in *Aeromonas* spp. isolated from children with diarrhea, healthy controls, and the environment. *J Clin Microbiol* 2000;38:3785–90.
19. Joseph SW. *Aeromonas* gastrointestinal disease: a case study in causation? In: Austin B, Altwegg M, Gosling PJ, Joseph S, editors. *The genus Aeromonas*. New York: John Wiley & Sons; 1996.
20. Goñi-Urriza M, Pineau L, Capdepu M, Roques C, Caumette P, Quentin C. Antimicrobial resistance of mesophilic *Aeromonas* spp. isolated from two European rivers. *J Antimicrob Chemother* 2000;46:297–301.
21. Vila J, Marco F, Soler L, Chacón M, Figueras MJ. In vitro antimicrobial susceptibility of clinical isolates of *Aeromonas caviae*, *Aeromonas hydrophila* and *Aeromonas veronii* biotype sobria. *J Antimicrob Chemother* 2002;49:701–2.
22. Motyl MRG, MacKinley G, Janda JM. In vitro susceptibilities of *Aeromonas hydrophila*, *Aeromonas sobria*, and *Aeromonas caviae* to 22 antimicrobial agents. *Antimicrob Agents Chemother* 1985;28:151–3.

Address for correspondence: Jordi Vila, Laboratori de Microbiologia, Institut d'Infeccions i Immunologia, Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer, Facultat de Medicina, Universitat de Barcelona, Villarroel, 170; 08036 Barcelona, Spain; fax: 34.93.2279372; email: vila@medicina.ub.es

SEARCH EID ONLINE

www.cdc.gov/eid

V. DISCUSIÓN

5.1. Taxonomía

5.1.1. Identificación por métodos bioquímicos y moleculares

La identificación bioquímica de las especies de *Aeromonas* es extremadamente compleja, habiéndose propuesto numerosos protocolos bioquímicos para la identificación de las cepas a nivel de especie o GH (Abbott y cols., 1992; Kämpfer y Altwegg, 1992; Noterdaeme y cols., 1996; Oakey y cols., 1996; Janda y cols., 1996; Borrell y cols., 1998; Kaznowski, 1998; Altwegg, 1999; Carson y cols., 2001; Valera y Esteve, 2002; Miñana-Galbís y cols., 2002; Fosse y cols., 2003). No obstante estos protocolos involucran un elevado número de pruebas bioquímicas y no garantizan una identificación fiable de las especies (Janda, 2001).

Con el fin de identificar todas las especies del género de forma rápida y fiable, Borrell y cols. (1997) diseñaron un método que se basaba en el análisis de los patrones de RFLP del gen 16S rRNA obtenidos tras digerir el gen completo (1502 pb) con distintas endonucleasas. La digestión con las endonucleasas *AluI*-*MboI* permitía identificar 10 de las 13 especies descritas en aquél momento, entre las cuales se encontraban las más frecuentemente aisladas en muestras clínicas (*A. caviae*, *A. veronii* y *A. hydrophila*). Las tres especies que no podían ser identificadas eran *A. bestiarum*, *A. salmonicida* y *A. popoffii*. Ésta última fue descrita por Huys y cols. en 1997b simultáneamente a la publicación de Borrell y cols. (1997) y por tanto no se había contemplado en el estudio. Uno de los primeros objetivos de esta tesis fue ampliar el protocolo de identificación basado en los RFLP del gen 16S rRNA para que estas tres especies pudieran también identificarse de forma inequívoca. Esto se consiguió tras analizar las secuencias del gen 16S rRNA (Martínez-Murcia y cols., 1992a; Demarta y cols., 1999) y comprobar que cuando en la primera digestión se obtenía un patrón común podía recurrirse a digerir de nuevo todo el gen con *NarI*, generándose un patrón de RFLP característico y común a las especies *A. bestiarum* y *A. salmonicida*, que podían diferenciarse definitivamente mediante una nueva digestión con *SfaNI* o *PstI*, aunque se recomienda el uso del *PstI* ya que el *SfaNI* es extremadamente caro. En caso de que el patrón obtenido con *NarI* no se correspondiera con el de las especies anteriores se requeriría de dos nuevas digestiones con las endonucleasas *HaeIII* y *AlwNI* para identificar la especie *A. popoffii* (Figueras y cols., 2000c). A pesar de que este protocolo puede parecer aparentemente

complejo, las especies con mayor prevalencia clínica y ambiental requieren de una única digestión para su identificación. A pesar de que Demarta y cols. (1999) aportaron datos que ponían de manifiesto que, en 12 cepas de *A. popoffii*, existían variaciones en dos o tres posiciones nucleotídicas en el gen 16S rRNA de esta especie, estas variaciones no afectaban a los puntos de corte de las endonucleasas propuestas por Figueras y cols. (2000c), obteniéndose por tanto el patrón de restricción esperado para las 26 cepas de la especie ensayadas. La aplicación de la técnica del 16S rDNA-RFLP permitió identificar por primera vez la especie *A. popoffii* en muestras de agua de mar pudiéndose establecer su incidencia en un total de 113 muestras de agua (aguas dulces superficiales y aguas de mar) recogidas en nuestra área geográfica. Se estableció que esta especie presenta una incidencia del 8% en aguas dulces superficiales y un 6.8% en aguas de mar, siendo estos los primeros aislados de la especie en España, y además, los primeros aislados procedentes de aguas de mar (Soler y cols., 2002). Además esta técnica también ha permitido establecer que las especies más frecuentemente aisladas en muestras de pescado destinado al consumo humano, en México y Polonia, son *A. salmonicida*, *A. bestiarum*, *A. veronii* y *A. encheleia*, aunque en México D.F. también pudo aislarse *A. hydrophila* (Castro-Escarpulli y cols., 2003) y en Polonia *A. sobria* (Kozłńska y cols., 2002). En nuestro país, las especies de *Aeromonas* más frecuentemente aisladas en muestras de pescado destinado al consumo humano coinciden con las anteriores, aunque también se han aislado cepas de las especies *A. jandaei*, *A. caviae*, *A. schubertii* y *Aeromonas* sp. (GH11) (González y cols., 2001) o *A. eucrenophila* (González-Rodríguez y cols., 2002). La elevada incidencia de *A. salmonicida* en peces ya ha sido descrita por diversos autores (Hänninen y cols., 1997; Wiklund y Dalsgaard, 1998; Lee y cols., 2002). Es importante destacar que las cepas aisladas de pescado también fueron identificadas bioquímicamente, y que el espectro de distribución de especies fue bastante distinto debido a los errores que se cometen con estos sistemas de identificación (Castro-Escarpulli y col., 2003; Kozłńska y cols., 2002), aspecto que discutimos más adelante.

Utilizando la técnica del 16S rDNA-RFLP se espera que generalmente se obtengan patrones especie-específicos semejantes a los descritos (Borrell y cols., 1997; Figueras y cols., 2000c), es por ello que cuando se obtienen nuevos patrones, estos pueden ser debidos tanto a que en el lugar de restricción del gen 16S rRNA exista variabilidad intraespecífica o a que se trate de una nueva especie. En ambos

casos serán necesarios estudios complementarios, como la secuenciación del gen 16S rRNA o incluso estudios de hibridación DNA-DNA, para validar la hipótesis. Recientemente en nuestro laboratorio encontramos un grupo de 37 aislamientos, procedentes de una red de distribución de agua potable, con un patrón de 16S rDNA-RFLP hasta ahora desconocido (datos no publicados). Tras la secuenciación del gen 16S rRNA de dos de estos aislados se demostró que se trataban de aislados de la nueva especie *A. culicicola* (Pidiyar y cols., 2002). Además en nuestro laboratorio también hemos encontrado variabilidad intraespecífica en la secuencia del gen 16S rRNA de *A. caviae*, ya que el 7.4% de las cepas de esta especie (24 de 326 cepas identificadas mediante los RFLP del gen 16S rRNA) presentaron una banda atípica. Esta posible variabilidad fue confirmada mediante la secuenciación del gen 16S rRNA en estas cepas (datos no publicados).

Otros estudios han intentado identificar las especies de *Aeromonas* mediante protocolos también basados en la técnica del 16S rDNA-RFLP, pero utilizando otras endonucleasas y regiones concretas del gen (Graff, 1999b; Lee y cols., 2002), en lugar de utilizar el gen completo. Graff en 1999b trató de validar el método de Borrell y cols. (1997), pero para ello utilizó un protocolo diferente que se basaba en la amplificación de los primeros 600 pb del gen y posterior digestión con las endonucleasas *AluI*, *CfoI* y *MnII*. Con este método, este autor obtenía diversos patrones de restricción para la especie *A. veronii*, lo cual era debido a la incorrecta identificación de las cepas utilizadas y a la utilización de endonucleasas poco adecuadas (Figueras y cols., 2000b; Figueras y cols., 2000c). Además, según Graf la enzima *AluI* era capaz de separar las especies *A. veronii*, *A. caviae* y *A. hydrophila*. Para verificar este hecho realizamos una simulación informática y comprobamos que esta endonucleasa solo producía patrones especie-específicos para *A. sobria*, *A. jandaei*, *A. schubertii* y *A. veronii* (esta última presentaba idéntico patrón a la *Aeromonas* Grupo 501). Esto demostraba que el protocolo propuesto por Graff (1999b) se basaba en endonucleasas elegidas al azar, y que por lo tanto no era comparable al descrito previamente (Borrell y cols., 1997). Lee y cols. (2002) han diseñado recientemente un protocolo que permite, en primer lugar, identificar el género *Aeromonas* mediante la utilización de cebadores específicos para el gen 16S rRNA del género. Con estos cebadores se amplifica un fragmento de 953 pb que posteriormente es digerido con las endonucleasas *AluI*, *CfoI*, *PvuII* y *XhoI*. Estos autores consiguen identificar todas las especies del género a excepción de *A. bestiarum*, *A. salmonicida*, *A. encheleia* y

Aeromonas sp. (GH11), especies que si pueden ser identificadas con nuestro protocolo (Figueras y cols., 2000c). La especie *A. culicicola*, descrita por Pidiyar y cols. (2002) tampoco está incluida en el estudio de Lee y cols. (2002), probablemente por la coincidencia en el tiempo de ambas publicaciones.

Otras técnicas de identificación molecular aplicadas al género *Aeromonas* son el ribotipado (Martinetti-Lucchini y Altwegg, 1992), AFLP (Huys y cols., 1996b; Huys y Swings, 1999) y la aplicación de sondas especie-específicas (Husslein y cols., 1992; Ash y cols., 1993a,b; Dorsh y cols., 1994; Cascon y cols., 1996; Demarta y cols., 1999). Sin embargo, cabe destacar que tanto el ribotipado como el AFLP son técnicas complejas, y que por lo tanto su utilización rutinaria no es tan factible como la del 16S rDNA-RFLP. Además, ambas técnicas generan patrones muy complejos, por lo que cada vez son más utilizadas con fines epidemiológicos que con fines taxonómicos (Demarta y cols., 2000; Lund y cols., 2002; Bauab y cols., 2003). En cuanto a la utilización de sondas especie-específicas, ésta tiene el inconveniente de que no existen sondas para todas las especies y además es necesario utilizar muchas de ellas para llegar a la correcta identificación (Chacón y cols., 2002).

A pesar de que, como hemos demostrado, existen métodos genéticos capaces de identificar de forma rápida y fiable todas las especies del género, los laboratorios destinados al diagnóstico clínico siguen utilizando métodos bioquímicos miniaturizados semiautomáticos. Sin embargo, se ha demostrado que la correlación entre la identificación mediante algunos de éstos métodos (BBL Crystal E/NF y MicroScan W/A) y la identificación obtenida con la técnica del 16S rDNA-RFLP, en cepas clínicas, es muy baja (estudio 4.1.1.2). Con el sistema BBL Crystal solo se identifican correctamente el 26.9% de las cepas, y únicamente el 19.3% de ellas con el MicroScan. Este último resultado contrasta con el obtenido por Vivas y cols. (2000) cuando ensayaron el sistema MicroScan con cepas de *Aeromonas* identificadas con protocolos bioquímicos clásicos, ya que estos autores obtuvieron un 78.8% de concordancia entre ambos métodos. La falta de fiabilidad de los protocolos bioquímicos clásicos ha sido ya demostrada por numerosos estudios (Kaznowski, 1998; Castro-Escarpulli y cols., 2003; Kozińska y cols., 2002) y podría explicar perfectamente estas discrepancias. Por otro lado, el BBL Crystal y el MicroScan, respectivamente, identificaron incorrectamente el 71.4% y 85.7% de las cepas como *A. hydrophila* (estudio 4.1.1.2). Según Vivas y cols. (2002) esta es la especie más frecuentemente aislada en muestras clínicas. En nuestro laboratorio, sin embargo

hemos identificado 490 cepas de origen clínico mediante la técnica genética del 16S rDNA-RFLP y hemos encontrado que esta especie sólo representa el 8.1% de los aislados clínicos, siendo las especies más prevalentes *A. caviae* y *A. veronii* (datos no publicados). Resultados parecidos han sido obtenidos por otros autores al utilizar métodos genéticos (Janda y Abbott, 1998; Janda, 2001). Debido a la tendencia de los sistemas comerciales miniaturizados a identificar las cepas de *Aeromonas* como *A. hydrophila*, actualmente esta especie tiene una relevancia clínica inmerecida y más elevada de lo que le corresponde, quitándole importancia a otras especies del género más relevantes (Overman y cols., 1985; Overman y Overley, 1986; Kuijper y Peeters, 1991). Estos errores de identificación a nivel de especie son básicamente debidos a que las bases de datos de estos sistemas son inapropiadas e incompletas (estudio 4.1.1.2), siendo necesario desarrollar nuevos métodos que aseguren la identificación correcta de las especies de *Aeromonas* aisladas a partir de muestras clínicas.

Bajo nuestro punto de vista, es importante identificar las cepas de *Aeromonas* mediante técnicas genéticas, ya que las basadas en métodos bioquímicos, incluso cuando se utilizan protocolos bioquímicos complejos definidos específicamente para este género, producen un elevado grado de error (Borrell y cols., 1997; Kozińska y cols., 2002; Castro-Escarpulli y cols., 2003; estudio 4.1.1.2). Esto provoca que la incidencia real de las especies del género esté desvirtuada.

Otro aspecto importante es que los sistemas bioquímicos tienden a confundir *Aeromonas* spp. con otros géneros bacterianos, de hecho, el MicroScan y el BBL Crystal confundieron respectivamente el 21.6% y el 8.1% de las cepas de *Aeromonas* con otros géneros (estudio 4.1.1.2). Generalmente esta confusión es con bacterias del género *Vibrio* (Abbott y cols., 1998). En nuestro estudio (4.1.1.2) el sistema MicroScan confundió un 10.8% de las cepas de *Aeromonas* con *Vibrio fluvialis*, resultado similar al encontrado (8%) por Vivas y cols. (2000), mientras que el sistema BBL Crystal confundió un 2.7% de las cepas de *Aeromonas* con *Vibrio cholerae* (estudio 4.1.1.2). Estos resultados ponen de manifiesto la necesidad de desarrollar métodos alternativos para identificar correctamente las bacterias del género *Aeromonas*, para evitar la confusión con las del género *Vibrio*. En este sentido, Chacón y cols. (2002) desarrollaron una sonda basada en un fragmento de 237 pb del gen que codifica para la glicerofosfolípido-colesterol aciltransferasa (GCAT) que hibrida con todas las especies de *Aeromonas*, pero no con cepas de otros géneros, incluido el género *Vibrio*. Esta sonda fue marcada con digoxigenina y utilizada mediante la técnica de

colony blot para reconocer colonias de *Aeromonas* en cultivo primario. Se demostró además que esta sonda era igualmente efectiva en cualquiera de los medios de cultivo utilizados de forma rutinaria para el aislamiento clínico de enteropatógenos (MacConkey, SS, agar sangre y Hecktoen). Como hemos mencionado previamente, existen sondas especie-específicas para *Aeromonas* (Husslein y cols., 1992; Ash y cols., 1993a,b; Dorsh y cols., 1994; Cascon y cols., 1996; Demarta y cols., 1999; Byers y cols., 2002a; 2002b), aunque se desconoce si estas también hibridan con bacterias de otros géneros. Kämpfer y cols. (1996) diseñaron una sonda basada en el gen 16S rRNA que era capaz de detectar *Aeromonas* spp. por hibridación *in situ* en muestras de agua, sin embargo esta sonda no ha sido ensayada con todas las especies del género. Además, en un estudio posterior esta sonda fue utilizada para detectar *Aeromonas* en biofilms sin obtenerse señal en ninguna de las muestras ensayadas (MacDonald y Brözel, 2000), a pesar de que se ha descrito que *Aeromonas* es uno de los microorganismos más comunes en los biofilms (Szewzyk y cols., 2000).

La utilización de la sonda diseñada por Chacón y cols. (2002) permitió identificar las colonias de *Aeromonas* spp. de forma fiable en sólo 36 horas, en lugar de las 72 horas necesarias si se utilizan los métodos bioquímicos clásicos.

5.1.2. Estudio de especies taxonómicamente complejas

Aunque se han llevado a cabo muchas aproximaciones para clarificar las relaciones filogenéticas de las especies de *Aeromonas* (Martínez-Murcia y cols., 1992a; Huys y cols., 1996b; Martínez-Murcia, 1999), la taxonomía del género sigue confusa. Como ya se ha mencionado, uno de los problemas más evidentes reside en la definición de la especie *A. bestiarum*, ya que aunque los porcentajes de hibridación DNA-DNA entre esta especie y las especies *A. hydrophila* y *A. salmonicida* eran muy elevados y no aportaban resultados concluyentes, se propuso como una especie válida (Hänninen, 1994; Ali y cols., 1996).

La secuenciación del gen 16S rRNA está considerada una herramienta taxonómica fiable y ha sido muy utilizada en taxonomía bacteriana. La secuencia de este gen sólo difiere en dos nucleótidos (posiciones 1011 pb y 1018 pb) entre las especies *A. bestiarum* y *A. salmonicida*, y las subespecies *A. salmonicida* subsp. *achromogenes* y *A. salmonicida* subsp. *masoucida* presentan una secuencia idéntica a

la de *A. bestiarum* (Martínez-Murcia y cols., 1992a). A pesar de que mediante la aplicación de la técnica de identificación basada en los RFLP del gen 16S rRNA se pueden diferenciar las cepas tipo de ambas especies, un 60% de las cepas pertenecientes a estas especies comparten el patrón de *A. bestiarum* y *A. salmonicida*. Al secuenciar este gen en estas cepas se demostró que compartían operones ribosómicos de ambas especies por lo que se denominaron *A. bestiarum/A. salmonicida* (estudio 4.1.2.1). Estos resultados evidenciaban de nuevo la proximidad genética entre ambas especies y corroborarían la teoría del entrecruzamiento de Sneath (1993), la cual postula que en los ancestros de especies de *Aeromonas* se han producido entrecruzamientos genéticos que han podido dar lugar a híbridos para el gen 16S rRNA. Según este autor es difícil que estos entrecruzamientos se hayan dado en todas las copias del operón ribosómico. En *Aeromonas* se ha indicado que probablemente existen 10 copias de este operón (Dodd y Pemberton, 1998) y en nuestro trabajo se demuestra que estos entrecruzamientos no se han dado en todas las copias del operón ribosómico de *A. bestiarum* y *A. salmonicida*, ya que un 60% de las cepas de éstas especies comparten operones de ambas (estudio 4.1.2.1).

Con ánimo de obtener más información sobre la posición taxonómica de estas especies, se llevó a cabo un estudio de caracterización bioquímica, ya que un requisito esencial para que dos especies puedan ser consideradas distintas es que sean separables mediante pruebas bioquímicas (Vandamme y cols. 1996). Tradicionalmente la especie *A. salmonicida* ha sido considerada psicrófila, con una temperatura óptima de crecimiento de entre 22°C y 25°C (Kimura, 1969a; 1969b; Popoff, 1984; Austin y cols., 1989; Austin y cols., 1998). Sin embargo algunos autores ya han indicado que algunas cepas de *A. salmonicida* son capaces de crecer a 37°C (Austin y cols., 1989; Pavan y cols., 2000), esta característica claramente mesófila de algunas cepas de *A. salmonicida* ha sido confirmada en nuestro estudio, y coincidió con el comportamiento observado por nosotros y ya descrito para *A. bestiarum* (estudio 4.1.2.1). Las pruebas bioquímicas clásicamente utilizadas para separar las subespecies de *A. salmonicida* son el indol y la movilidad (Popoff, 1984; Wiklund y Dalsgaard, 1998; Pavan y cols., 2000; Janda, 2001). Sin embargo estas pruebas no fueron útiles para este propósito (estudio 4.1.2.1). Otra prueba tradicionalmente utilizada para diferenciar *A. salmonicida* subsp. *salmonicida* del resto de subespecies es la producción de pigmento marrón (Kimura, 1969a; Kimura, 1969b; Millership, 1996; Austin y cols., 1989; Wiklund y Dalsgaard, 1998). Hemos demostrado que la

producción de pigmento marrón depende de la temperatura de incubación y no es específica para *A. salmonicida* subsp. *salmonicida* (Austin y cols., 1998; estudio 4.1.2.1). Además se ha descrito que *A. salmonicida* subsp. *achromogenes* también puede producir este tipo de pigmento (Dalsgaard y cols., 1998), sin embargo las cepas que nosotros estudiamos no fueron productoras de éste pigmento (estudio 4.1.2.1). En el intento de encontrar pruebas bioquímicas capaces de diferenciar las subespecies de *A. salmonicida*, se ensayó por primera vez la utilización del ácido urocánico en todas las subespecies, sin embargo, todas resultaron ser negativas a esta prueba, y por lo tanto no fue de utilidad (estudio 4.1.2.1). Otras pruebas bioquímicas ensayadas en nuestro estudio y recomendadas para la separación de las subespecies de *A. salmonicida* son la oxidación del gluconato, producción de ácido de la lactosa y sacarosa, la hidrólisis de la esculina, utilización de la N-acetil-glucosamina y producción de la elastasa (Austin y cols., 1989; Oakey y cols., 1996; Austin y cols., 1998; Wiklund y Dalsgaard, 1998; Pavan y cols., 2000). Sin embargo ninguna de ellas fue útil en nuestro estudio (4.1.2.1) coincidiendo con Noterdaeme y cols. (1996) que tampoco fueron capaces de diferenciar las subespecies de *A. salmonicida* a pesar de utilizar un total de 128 pruebas bioquímicas. De hecho, la sinonimización de las subespecies de *A. salmonicida* ha estado en discusión durante muchos años (McCarthy, 1978; Belland y Trust, 1988; Austin y cols., 1989), pero no se ha llegado a ningún consenso. A pesar de ello recientemente se ha descrito la nueva subespecie *A. salmonicida* subsp. *pectinolytica* (Pavan y cols., 2000), los aislados de la cual hemos comprobado que comparten operones ribosómicos de *A. bestiarum* y *A. salmonicida* (estudio 4.1.2.1). Debido a la gran dificultad en asignar las cepas de *A. salmonicida* a una de sus subespecies, cada vez es más frecuente la aparición de publicaciones donde se describen cepas atípicas de esta especie (Austin y cols., 1989; Wiklund y Dalsgaard, 1998; Austin y cols., 1998; Høie y cols., 1999; Sørum y cols., 2000; Lund y cols., 2002).

En la literatura se encuentran muchos datos contradictorios acerca de la respuesta bioquímica de las especies *A. hydrophila*, *A. bestiarum* y *A. salmonicida* a las pruebas consideradas útiles para su separación: producción de ácido del sorbitol (Abbott y cols., 1992), ramnosa (Abbott y cols., 1992; Hänninen, 1994; Ali y cols., 1996) y lactosa (Abbott y cols., 1992; Ali y cols., 1996; Kaznowski, 1998), utilización del ácido urocánico y del DL-lactato (Ali y cols., 1996). Nuestros resultados al ensayar estas pruebas en un número representativo de cepas de *A. hydrophila*, *A. bestiarum* y

A. salmonicida, todas ellas identificadas con la técnica del 16S rDNA-RFLP, indicaban que la utilización del DL-lactato y la producción de ácido del sorbitol y de la lactosa eran las pruebas más útiles para diferenciarlas, aunque ninguna de ellas podría ser considerada como criterio inequívoco para la identificación de éstas especies (estudio 4.1.2.1).

Según Huys y cols. (1997b), las pruebas de mayor utilidad para diferenciar *A. popoffii* de *A. hydrophila*, *A. bestiarum* y *A. salmonicida* son la producción de ácido de la D-sacarosa, utilización del DL-lactato y descarboxilación de la lisina. Sin embargo estos autores solo ensayaron un grupo de siete cepas de *A. popoffii*. En nuestro estudio (4.1.2.1) ensayamos 26 cepas de *A. popoffii* que incluían todas las descritas hasta la fecha y nuevos aislamientos, demostrándose que las pruebas bioquímicas útiles para su identificación eran la hidrólisis de la esculina y la producción de ácido de la D-sacarosa. La utilización del DL-lactato solo fue útil para diferenciar *A. popoffii* de *A. bestiarum* y *A. salmonicida*, pero no de *A. hydrophila*.

También hemos analizado los patrones de RFLP del espaciador intergénico 16S-23S de las especies del complejo fenotípico “*A. hydrophila*”. El espaciador intergénico 16S-23S contiene genes que codifican para tRNA, y DNA que no codifica, es por este motivo que se considera un buen marcador filogenético a corto plazo, o un reloj molecular rápido (Zavaleta y cols., 1996). El análisis de los patrones de restricción del espaciador intergénico 16S-23S demostró que las especies *A. hydrophila* y *A. popoffii* formaban dos grupos bien diferenciados, mientras que todas las cepas que en base a los RFLP del gen 16S rRNA se habían identificado como *A. bestiarum*, *A. salmonicida* y *A. bestiarum/A. salmonicida* formaban un único grupo (estudio 4.1.2.1). Este resultado sugeriría que estas especies representan un único taxon, resultado que está de acuerdo con el de estudios previos (Hänninen, 1994; Martínez-Murcia y cols., 1992a; Yañez y cols., 2003).

Todos estos resultados pusieron de manifiesto que no existen suficientes criterios fenotípicos y/o genéticos para diferenciar las especies *A. bestiarum* y *A. salmonicida*, ya sea porque se trata de una única especie o porque las técnicas seleccionadas en nuestro trabajo (4.1.2.1) no son suficientemente discriminativas.

Como ya hemos mencionado, actualmente el *Ad-hoc committee* requiere que para la definición de nuevas especies bacterianas se secuencien cinco genes que codifiquen para funciones esenciales (*housekeeping*) de las cepas estudiadas (Stackebrandt y cols., 2002). Entre estos genes se encuentra el gen *gyrB*, que codifica

para la subunidad B de la DNA girasa (Stackebrandt y cols., 2002). Recientemente se ha demostrado, en *Aeromonas*, que el análisis de la secuencia del gen *gyrB* es un buen cronómetro molecular para realizar estudios filogenéticos en el género, obteniéndose resultados congruentes con los obtenidos con el análisis del gen 16S rRNA (Yañez y cols., 2003). Otro gen estructural de interés es el *rpoD*, que codifica para el factor σ^{70} de la RNA polimerasa, y del cual hasta la fecha no existen datos para el género *Aeromonas*. Se ha descrito que en *Pseudomonas* el gen *rpoD* evoluciona más rápido que el gen 16S rRNA, y además se demostró que el análisis conjunto de los genes *rpoD* y *gyrB* permite establecer la filogenia de este género con mayor precisión (Yamamoto y cols., 2000). Por este motivo, y con ánimo de clarificar de forma más precisa la posición taxonómica de *A. bestiarum* se procedió a la secuenciación de los genes *gyrB* y *rpoD* en un grupo representativo de cepas identificadas como *A. bestiarum*, *A. bestiarum/A. salmonicida* y *A. salmonicida* mediante la técnica del 16S rDNA-RFLP junto con las cepas tipo y otras cepas de referencia de todas las especies del género (estudio 4.1.2.2). Los resultados derivados del análisis filogenético basado en las secuencias del gen *rpoD* de todas las especies del género demostró ser también bastante congruente con los obtenidos con el análisis del gen 16S rRNA y *gyrB* (Martínez-Murcia y cols., 1992a; Martínez-Murcia, 1999; Yañez y cols., 2003). Los resultados del análisis filogenético basado en el gen *gyrB* de las especies *A. bestiarum* y *A. salmonicida* demostraron que el porcentaje de sustitución de nucleótidos entre estas especies era de entre un 2.2 y un 3.3%, considerándose este valor en el límite establecido, en base a este gen, para establecer diferencias intra e inter-específicas (Yañez y cols., 2003). A pesar de que *A. bestiarum* y las subespecies de *A. salmonicida* poseen una secuencia del gen 16S rRNA idéntica (Martínez-Murcia y cols., 1992a; Martínez-Murcia, 1999), el análisis de la secuencia del gen *rpoD* demostró que las cepas de *A. bestiarum* incluidas en la definición de la especie formaban un grupo bien diferenciado y distante de *A. salmonicida* y sus subespecies. Esta observación se ratificó con el análisis combinado de los genes *gyrB* y *rpoD* (estudio 4.1.2.2). Es interesante destacar que la mejor resolución interespecífica para separar *A. bestiarum* de *A. salmonicida* del gen *rpoD* no se observó para las especies *Aeromonas* sp. (GH11)/*A. encheleia* y *A. veronii/A. culicicola/A. allosaccharophila*, que presentaron una mejor resolución con el gen *gyrB*. El análisis combinado de ambos genes resolvió mejor la filogenia de *Aeromonas*, tal y como sucede en *Pseudomonas* (Yamamoto y cols., 2000). El hecho de que en los

dendogramas obtenidos en base a los genes *rpoD* y *gyrB*, tanto el grupo que incluye todas las cepas de referencia de *A. salmonicida* y su cepa tipo, como el otro grupo que incluye la cepa tipo de *A. bestiarum* y dos cepas de referencia de esta especie, incluyan cepas identificadas como *A. bestiarum/A. salmonicida*, que comparten operones del gen 16S rRNA de ambas especies, evidencia la poca utilidad del gen 16S rRNA para diferenciar estas especies. También es interesante destacar que tanto las cepas del grupo de *A. salmonicida* como del grupo de *A. bestiarum*, tenían una respuesta a la ramnosa que coincidía con la descrita por diversos autores para diferenciar estas especies (Abbott y cols., 1992; Hänninen, 1994; Ali y cols., 1996). Los resultados obtenidos con los genes *rpoD* y *gyrB* contradicen los obtenidos utilizando el análisis de los RFLP del espaciador intergénico 16S-23S que indicaban que ambas especies podían corresponder a un mismo taxon (estudio 4.1.2.1). A pesar de que los resultados obtenidos con los genes *rpoD* y *gyrB* parecen apoyar la separación de las especies *A. bestiarum* y *A. salmonicida*, para llegar a una conclusión definitiva, sería necesario realizar estudios de hibridación DNA-DNA, tal como indica el comité de sistemática, entre las cepas incluidas en cada uno de los dos grupos. En colaboración con el Dr. Erko Stackebrandt (*DSMZ-German Collection of Microorganisms and Cell Cultures GMBH, Braunschweig, Alemania*) iniciamos ya hace unos meses los estudios de hibridación DNA-DNA entre cepas de estos dos grupos de microorganismos que permitirán obtener resultados más concluyentes. Además, creemos que para la completa clarificación de este conflicto sería necesario el análisis de otros genes que codifiquen para funciones esenciales tal y como recomienda el comité de sistemática.

5.2. Sensibilidad a los agentes antimicrobianos

La patología más comúnmente asociada al género *Aeromonas* es la diarrea; generalmente ésta es poco grave y se autolimita rápidamente, no siendo necesario el estudio bacteriológico (Monteil y Harf-Monteil, 1997). Sin embargo, el aumento de movilidad de personas entre los diferentes países y continentes, debido a la elevada facilidad para realizar viajes internacionales, ha conllevado un incremento de la denominada diarrea del viajero, como lo demuestran las numerosas publicaciones recientes que hacen referencia a esta patología (Ramzan, 2001; Kolars y Fischer, 2002; Diemert, 2002; Cheng y Thielman, 2002; Chen y Wilson, 2002; Rendi-Wagner y

Kollaritsch, 2002). Existen pocos estudios que investiguen la incidencia de *Aeromonas* en este tipo de diarrea (Gascón y cols., 1993; Hänninen y cols., 1995; Yamada y cols., 1997; Vila y cols., 2003). En el estudio retrospectivo (Enero de 1999 – Diciembre de 2001) llevado a cabo en colaboración con la Unidad de Medicina Tropical del Hospital Clínico de Barcelona hemos demostrado que un 2% de las diarreas del viajero fueron debidas a *Aeromonas*, siendo las especies más frecuentes: *A. veronii* bt sobria y *A. caviae* (Vila y cols., 2003), resultado coincidente con el obtenido por Hänninen y cols. (1995) cuando analizó las especies más frecuentes aisladas en pacientes que habían viajado a Marruecos. Así mismo, Yamada y cols. (1997), vieron que *A. veronii* bt sobria era la especie más frecuente aislada en pacientes japoneses que habían viajado a países en vías de desarrollo. Vila y cols. (2003) no encontraron diferencias entre las especies más aisladas y el continente de destino de los pacientes (África, América y Asia), aunque en los pacientes que habían visitado la India se aisló una mayor diversidad de especies (*A. veronii* bt sobria, *A. caviae*, *A. jandaei* y *A. hydrophila*). Hay que tener en cuenta, que *Aeromonas* es el patógeno causante del 1.8% de las diarreas en la India (Deodhar y cols., 1991) y además tanto en la India como en otros países *Aeromonas* spp. está significativamente asociada a episodios de diarrea (Ogunsanya y cols., 1994; Begue y cols., 1994; Kühn y cols., 1997a; Albert y cols., 2000).

Los síntomas más frecuentes asociados a la diarrea del viajero producidas por *Aeromonas* son la diarrea líquida persistente, fiebre y dolores abdominales (Hänninen y cols., 1995; Albert y cols., 2000; Vila y cols., 2003), y en la mayoría de casos se prescribe un tratamiento antimicrobiano. A pesar de que la resistencia a las quinolonas ha aumentado en los países desarrollados (Goñi-Urriza y cols., 2000b; Vila y cols., 2002), fueron los agentes antimicrobianos más utilizados para el tratamiento de los enfermos con diarrea del viajero, consiguiéndose la total recuperación de los mismos (Vila y cols., 2003). El análisis retrospectivo, de la resistencia a los agentes antimicrobianos, en éstas cepas, demostró que las quinolonas y las cefalosporinas de tercera generación eran las que presentaban mejor actividad, mientras que el porcentaje de cepas resistentes al cloramfenicol, tetraciclina o trimetoprim-sulfametoxazol varió entre el 23 y el 45% (Vila y cols., 2003). Este porcentaje se ha relacionado con el uso indiscriminado de estos agentes antimicrobianos en los países en vías de desarrollo (Vila y cols., 2003).

Aeromonas se asocia también a un amplio abanico de patologías (septicemia, síndrome urémico-hemolítico, meningitis, infección urinaria...) (Janda y Abbott, 1998; Janda, 2001), lo que justifica la necesidad de conocer cuales pueden ser las mejores terapias antimicrobianas para combatir estas infecciones. En este sentido, Vila y cols. (2002) estudiaron la respuesta a 24 agentes antimicrobianos de 43 cepas clínicas de *Aeromonas* identificadas por la técnica del 16S rDNA-RFLP (Borrell y cols., 1997; Figueras y cols., 2000c), pertenecientes a las especies *A. caviae*, *A. hydrophila* y *A. veronii* bt sobria, aisladas en hospitales españoles. Soler y cols. (2002) analizaron los patrones de sensibilidad de *A. popoffii* a 26 agentes antimicrobianos, diez de los cuales nunca se habían ensayado en esta especie con anterioridad (piperacilina-tazobactam, cefalotina, ceftibuteno, meropenem, fosfomicina, ácido pipemídico, colistina, ampicilina-sulbactam, amoxicilina-ácido clavulánico y trimetoprim-sulfametoxazol). Esta especie fue estudiada en profundidad ya que su sensibilidad a los agentes antimicrobianos sólo se han investigado con anterioridad en las 7 cepas utilizadas para la descripción de la especie (Huys y cols., 1997b; Kämpfer y cols., 1999). La sensibilidad a diferentes agentes antimicrobianos también ha sido investigada en esta tesis en 77 cepas de *Aeromonas* spp. identificadas genéticamente (Borrell y cols., 1997; Figueras y cols., 2000c) y aisladas en muestras de pescado congelado destinado al consumo humano en México D.F. (Castro-Escarpulli y cols., 2003). En todos estos estudios se ha demostrado, tal y como era de esperar, que todas las cepas de *Aeromonas* ensayadas eran resistentes a la ampicilina. Esta característica es específica del género, cumpliéndola todas las especies a excepción de *A. trota* (Carnahan y cols., 1991b), especie que nunca hemos aislado en los estudios mencionados. La piperacilina presentó una buena actividad frente a las cepas de *Aeromonas* aisladas de pescado congelado (Castro-Escarpulli y cols., 2003), resultado que concuerda con los previamente publicados (Morita y cols., 1994; Ko y cols., 1996). La combinación del ácido clavulánico con la ampicilina aumentó la actividad antimicrobiana, tanto en las cepas clínicas estudiadas como en *A. popoffii*, mientras que el tazobactam no incrementó la actividad de la piperacilina (Vila y cols., 2002; Soler y cols., 2002). Así mismo, el sulbactam también incrementó la actividad de la ampicilina en *A. popoffii* (Soler y cols., 2002). Estos resultados demostraron que la combinación de una penicilina con un inhibidor de β -lactamasas, es útil para reducir la resistencia de *Aeromonas* spp. a los antibióticos β -lactámicos, la cual en este género ha sido considerada dependiente de enzimas codificadas por el cromosoma de la

bacteria (β -lactamasas) (Shanon y cols., 1986; Bakken y cols., 1988; Iaconis y Sanders, 1990; Hayes y cols., 1994; Walsh y cols., 1995; Alksne y Rasmussen, 1997; Walsh y cols., 1997; Ko y cols., 1998). El 44.1% de las cepas de *Aeromonas* aisladas de pescado congelado fueron resistentes a la tetraciclina (Castro-Escarpulli y cols., 2003). La resistencia a la tetraciclina en piscifactorías ha sido atribuida a la transferencia de un plásmido R de alto peso molecular (Richards y cols., 1992; Inglis y cols., 1993; Sandaa y Enger, 1994; 1996) que es capaz de ser transferido a otras cepas clínicas y ambientales de la misma especie (Adams y cols., 1998; Rhodes y cols., 2000).

Las cefalosporinas, aminoglucósidos y fluoroquinolonas presentaron una buena actividad frente a las cepas ensayadas (Vila y cols., 2002; Soler y cols., 2002; Castro-Escarpulli y cols., 2003), resultado que es congruente los previamente descritos (Motyl y cols., 1985; Chang y Bolton, 1987; Morita y cols., 1994; Ko y cols., 1996; Kämpfer y cols., 1999). En cuanto a las cefalosporinas, cabe destacar que todas las especies ensayadas mostraron cierta resistencia (60% *A. hydrophila*, 54% *A. popoffii*, 47% *A. caviae* y 21% *A. veronii*) a la cefazolina (Vila y cols., 2002; Soler y cols., 2002). Estos resultados son coincidentes con los previamente descritos para estas especies (Janda y cols., 1995; Huys y cols., 1997b; Kämpfer y cols., 1999; Overman y Janda, 1999). Todas las cepas de *A. salmonicida* fueron resistentes a la cefalotina (Castro-Escarpulli y cols., 2003), resultado que contrasta con el obtenido por Dalsgaard y cols. (1994), ya que todas las cepas de esta especie ensayadas por estos autores fueron sensibles a la cefalotina.

En el caso de los aminoglucósidos, la gentamicina y la amikacina fueron más activas que la tobramicina en las cepas de origen clínico (Vila y cols., 2002), fenómeno que también ha sido observado en cepas aisladas en Australia, Taiwán y Estados Unidos (Janda y cols., 1995; Ko y cols., 1996; Overman y Janda, 1999). Sin embargo estas diferencias no se han observado en cepas de origen ambiental, como es el caso de la especie *A. popoffii* (Huys y cols., 1997b; Kämpfer y cols., 1999; Soler y cols., 2002).

Las quinolonas son consideradas el tratamiento antimicrobiano de elección para las infecciones producidas por *Aeromonas* spp. (Janda y cols., 1995; Sanford y cols., 1997; Overman y Janda, 1999), sin embargo, respectivamente, un 20%, 26% y 88% de las cepas de *A. hydrophila*, *A. caviae* y *A. veronii* fueron resistentes al ácido nalidíxico aunque sensibles al ciprofloxacino (Vila y cols., 2002). En estos casos, las

quinolonas no deberían elegirse como tratamiento, ya que la resistencia al ácido nalidíxico indica que ya existe una mutación en el gen *gyrA*, y que por lo tanto es fácil que se produzca una segunda mutación en este gen que convierta a la cepa en resistente al ciprofloxacino (Ruiz y cols., 2002). En cepas aisladas de pescado congelado se observó el efecto contrario, un 41.5% de las cepas eran sensibles al ácido nalidíxico y resistentes al ciprofloxacino (Castro-Escarpulli y cols., 2003).

Todas las cepas de *A. hydrophila*, *A. caviae*, *A. veronii* y *A. popoffii* fueron sensibles al imipenem (Vila y cols., 2002; Soler y cols., 2002), sin embargo Overman y Janda (1999) encontraron un 67% de cepas clínicas de *A. veronii* resistentes. Estos resultados son sin embargo comparables al 50% encontrado para cepas de esta especie aisladas de peces congelados destinados al consumo humano y fue común para la especie *A. hydrophila* (50%), encontrándose menos resistencia al imipenem para las otras especies: 19% de *A. bestiarum* y el 3.8% de *A. salmonicida* (Castro-Escarpulli y cols., 2003).

Las cepas de *A. salmonicida* se han descrito como sensibles al cloramfenicol, neomicina, polimixina B y rifampicina (Dalsgaard y cols., 1994), sin embargo en el estudio realizado por Castro-Escarpulli y cols. (2003), esta especie presentó una resistencia variable a estos agentes antimicrobianos que osciló entre el 9% y el 85.7%.

Los estudios realizados por Vila y cols. (2002), Soler y cols. (2002) y Castro-Escarpulli y cols. (2003) muestran que las cefalosporinas de tercera generación son las más activas frente a *Aeromonas* spp., las cuales ya han sido recomendadas para el tratamiento de infecciones producidas por estas bacterias (Sanford y cols., 1997). No se observaron diferencias importantes en cuanto a la resistencia a los diferentes agentes antimicrobianos y la especie estudiada, fenómeno que ya había sido previamente descrito (Kämpfer y cols., 1999), ni tampoco se observaron diferencias en cuanto al origen geográfico de las cepas, las cuales si habían sido descritas por Ko y cols. (1996). En general si se ha observado una mayor resistencia a los agentes antimicrobianos en las cepas aisladas en pescado (Castro-Escarpulli y cols., 2003) que en el resto de cepas estudiadas (Vila y cols., 2002; Soler y cols., 2002). Otros autores que han investigado la resistencia a los agentes antimicrobianos en cepas aisladas de pescado procedente de piscifactorías a lo largo de varios años han indicado que esta ha aumentado (Schmidt y cols., 2000). Este hecho se ha correlacionado con el incremento en el uso indiscriminado de éstos agentes

antimicrobianos en las piscifactorías (DePaola y cols., 1988; McPhearson y cols., 1991; Spanggaard y cols., 1993; Guardabassi y cols., 2000).

5.3. Técnicas de tipado molecular

Tal y como se ha comentado en la introducción, existen numerosos trabajos que han tratado de determinar las relaciones epidemiológicas de las cepas de *Aeromonas*, habiéndose utilizado para ello un gran número de técnicas diferentes, ya sean de carácter fenotípico o molecular. De estas, merece la pena destacar el PFGE, ya que ha sido considerada la mejor técnica para tipar cepas bacterianas (Maslow y cols., 1993), y ha sido recientemente aplicada con éxito en *Aeromonas* spp. (Hänninen y Hirvelä-Koski, 1999; García y cols., 2000; Bonadonna y cols., 2002; Villari y cols.; 2003; Borchardt y cols., 2003). A pesar de ello, Talon y cols. (1998) evaluaron el PFGE en comparación con la técnica de los RAPDs en *A. hydrophila* y comprobaron que los RAPDs eran más fáciles, rápidos y baratos de realizar, y por lo tanto más idóneos para el tipado epidemiológico de *Aeromonas*. Sin embargo, también existen trabajos que han criticado el uso de los RAPDs, por ser una técnica que amplifica al azar regiones del genoma, pudiéndose obtener bandas de igual peso molecular que en realidad se correspondan a regiones del genoma diferentes (Oakey y cols., 1998). Las técnicas de ERIC y REP-PCR, descritas por Stern y cols. (1984), son una alternativa a los RAPD's debido a que se basan en la amplificación por PCR de secuencias de DNA repetitivas y conservadas del genoma denominadas de forma global como rep-PCR (Stern y cols., 1984; Hulton y cols., 1991), y por lo tanto no son técnicas arbitrarias (Versalovic y cols., 1991). Estas técnicas han sido aplicadas, en numerosas ocasiones, con finalidades epidemiológicas en otros géneros bacterianos (Vila y cols., 1996; Sander y cols., 1998; Marshall y cols., 1999). En el género *Aeromonas* el ERIC fue utilizado con éxito para trazar una infección nosocomial producida por *A. hydrophila* (Davin-Regli y cols., 1998). Sin embargo, hasta la fecha el REP no había sido aplicado a cepas de *Aeromonas* spp. En el presente trabajo se ha presentado el primer estudio en *Aeromonas* donde se evalúa el REP, sólo y conjuntamente con el ERIC (Soler y cols., 2003) en todas las cepas de *A. popoffii* descritas hasta la fecha (Huys y cols., 1997b; Demarta y cols., 1999; Soler y cols., 2002). Además, éstas técnicas también las hemos evaluado comparativamente en estas mismas cepas con la técnica del 16S-23S ISR-

RFLP. Ésta última técnica fue elegida porque el 16S-23S ISR es una región del genoma que no se transcribe ni codifica, por lo que no tiene presión evolutiva y puede presentar variaciones tanto de tamaño como de secuencia (Zavaleta y cols., 1996). Es por este motivo que ha sido utilizada con éxito para tipar cepas implicadas en brotes epidemiológicos, en los que se han encontrado involucradas bacterias pertenecientes a distintos géneros bacterianos (Kostman y cols., 1995; Abed y cols., 1995; Cartwright y cols., 1995; García-Martínez y cols., 1996) entre ellos *Aeromonas*. En concreto se aplicó al estudio de cepas de origen clínico y ambiental pertenecientes a la especie *A. veronii*, pudiéndose demostrar la colonización de una red de distribución de agua potable por una misma cepa (Martínez-Murcia y cols., 2000).

En *A. popoffii* el ERIC produjo patrones cepa-específicos para todas las cepas no relacionadas, sin embargo tanto el REP como el 16S-23S ISR-RFLP produjeron patrones idénticos para algunas cepas para las que se había obtenido un patrón cepa-específico con el ERIC (Soler y cols., 2003). Algunos autores han indicado que cuando los resultados obtenidos mediante diferentes métodos de tipado son combinados, la resolución es mayor que cuando estos son analizados por separado (Vinuesa y cols., 1998; Metha y cols., 2001). En nuestro estudio combinamos dos a dos los resultados obtenidos del 16S-23S ISR-RFLP, ERIC y REP, y también los analizamos los tres conjuntamente. Observamos que mediante cualquier combinación dos a dos de éstas técnicas conseguíamos patrones cepa-específicos para cepas que parecían idénticas al utilizar el 16S-23S ISR-RFLP o REP por separado. Nuestros resultados indican que cuando se utilizan las técnicas del 16S-23S ISR-RFLP o REP para tipar cepas de *Aeromonas* spp., es necesario combinar los resultados de ambas técnicas entre sí o con los resultados del ERIC, para poder obtener resultados fiables (Soler y cols., 2003). Además se observó que cuando se analizaba el ERIC sólo, o conjuntamente con el REP, existía una tendencia de las cepas a agruparse según su origen geográfico, tendencia que se veía reforzada por la adición del 16S-23S ISR-RFLP (Soler y cols., 2003). Recientemente, se ha demostrado en *Aeromonas* spp. que los patrones de ERIC de las cepas ambientales de distintos orígenes eran más similares entre sí que los de las cepas clínicas (Sechi y cols., 2002).

Con las tres técnicas utilizadas, seis de los ocho aislados de *A. popoffii* procedentes de Suiza, presentaron patrones idénticos, así mismo estos aislados también presentaron idéntica respuesta bioquímica, sensibilidad a los agentes antimicrobianos y poseían los mismos genes de virulencia, sugiriendo todos estos

resultados que estos seis aislados pertenecían a un mismo grupo clonal. Por esta razón consideramos que los ocho aislados descritos por Demarta y cols. (1999) representan en realidad tres cepas (Soler y cols., 2003). Las cepas de *A. popoffii* aisladas en España fueron las que presentaron una mayor diversidad genética, lo cual puede ser atribuido a la gran diversidad de las muestras de donde provenían (embalses, ríos y agua de mar), además se demostró que en un mismo lugar podían coexistir dos clones diferentes de una misma especie (Soler y cols., 2003). Utilizando la técnica del ribotipado, cuatro de las cepas de *A. popoffii* utilizadas en nuestro estudio producían patrones idénticos (Huys y cols., 1997b; Demarta y cols., 1999), sin embargo, estas cepas demostraron ser diferentes con las técnicas del 16S-23S ISR-RFLP, ERIC y REP (Soler y cols., 2003). Estos datos confirman los resultados obtenidos por otros autores en (Maslow y cols., 1993; Demarta y cols., 2000) en el sentido de que el ribotipado no es suficientemente discriminativo para ser utilizado como herramienta epidemiológica en *Aeromonas*.

A pesar de que generalmente, un único método no es suficiente para estudiar las relaciones epidemiológicas entre cepas (Marshall y cols., 1999), nuestros resultados indican que el ERIC es suficientemente resolutivo en *Aeromonas* como para poderse utilizar sólo. En caso de poderse utilizar dos métodos, la mejor combinación es el ERIC y el REP, por ser los más resolutivos, rápidos y sencillos de realizar, además, aunque su reproducibilidad ha sido puesta en duda (Tyler y cols., 1997), si se estandariza la extracción del DNA, las condiciones de PCR y electroforesis, la tasa de reproducibilidad es muy elevada, tal y cómo hemos demostrado (Soler y cols., 2003).

La utilidad de la técnica del ERIC también ha sido demostrada en cepas de la especie *A. jandaei* (estudio 4.4.3). En este trabajo, la utilización del ERIC permitió poner de manifiesto que diez de las cepas recibidas de colecciones personales e internacionales representaban sólo cuatro cepas distintas, aspecto que se confirmó después de investigar minuciosamente su procedencia real a través de las diferentes colecciones internacionales. El dendograma resultante del análisis de los patrones de ERIC de esta especie reveló que las cepas tendían a agruparse según su origen geográfico (estudio 4.4.3), aspecto que coincidía con el obtenido para *A. popoffii* (Soler y cols., 2003).

5.4. Distribución de los factores de virulencia

La enteropatogenicidad de *Aeromonas* spp. se ha atribuido a la producción de enzimas extracelulares, exotoxinas y adhesinas, entre ellos se incluyen la aerolisina/hemolisina, serina proteasa, lipasas extracelulares (*lip*, *plc*, *pla*, *lipH3*), GCAT, DNasas, enterotoxinas citotónicas (*alt* y *ast*) y flagelo lateral, sin embargo no se ha establecido la importancia y mecanismo exacto por el que cada factor de virulencia está asociado a la patogenicidad (Pemberton y cols., 1997).

Aunque existen datos acerca de la distribución de algunos factores de virulencia como la aerolisina (Granum y cols., 1998; Kingombe y cols., 1999; Heuzenroeder y cols., 1999; González-Serrano y cols., 2002; González-Rodríguez y cols., 2002; Sechi y cols., 2002; Wang y cols., 2003) la GCAT y la serina proteasa (Austin y cols., 1998; Høie y cols., 1999) estos nunca han sido analizados de forma conjunta, ni junto a otros factores de virulencia en representantes de todas las especies del género *Aeromonas* identificadas utilizando métodos genéticos. En este sentido, Chacón y cols. (2003) han reportado el primer estudio que evalúa, en cepas de origen clínico y ambiental de todas las especies del género identificadas genéticamente, la distribución de los genes que codifican para cinco factores de virulencia (aerolisina/hemolisina, serina proteasa, lipasas extracelulares (*lip*, *plc*, *pla*, *lipH3*), GCAT y DNasas) estudiando también la actividad fenotípica asociada a dichos genes. La distribución de éstos mismos genes ha sido también estudiada de forma específica en *A. popoffii*, con el fin de esclarecer si esta especie de origen ambiental de la que se conocía poco, poseía un potencial virulento comparable al de especies típicamente clínicas (Soler y cols., 2002). Los mismos factores de virulencia se han investigado en un grupo de 77 cepas aisladas de pescado congelado destinado al consumo humano en México D.F. (Castro-Escarpulli y cols., 2003). A continuación se discutirán los aspectos más importantes referentes a estos trabajos.

En el género *Aeromonas* se han descrito diversas β -hemolisinas, sin embargo su caracterización se ha visto dificultada por la identificación imprecisa de las cepas en las que se han estudiado y por la terminología múltiple con la que se las ha descrito, aerolisina (Howard y Buckley, 1987), hemolisina (Hirono y cols., 1992) o enterotoxina citotóxica (Chopra y cols., 1993). Este hecho ha generado cierta controversia, ya que algunos autores consideran que muchas de ellas son muy similares o incluso idénticas (Buckley y Howard, 1999). La aerolisina es probablemente el factor de virulencia más

conocido en el género *Aeromonas*. Además algunas cepas de *Aeromonas* poseen más de un gen que codifica para hemolisinas en su genoma (Hirono y cols., 1992), por lo que es muy difícil saber exactamente el número y tipo de hemolisinas características del género. Es por estos motivos, y por el hecho de que su elevada homología hace prácticamente imposible diseñar cebadores para caracterizarlas individualmente, que en el presente trabajo se han diseñado cebadores para amplificar regiones homólogas a todas estas toxinas y se ha denominado al amplificado obtenido como aerolisina/hemolisina (Soler y cols., 2002; Castro-Escarpulli y cols., 2003; Chacón y cols., 2003). Se ha demostrado que la aerolisina está directamente implicada en la virulencia de las cepas, ya que los mutantes de delección para este gen son menos virulentos que las cepas salvajes (Chackraborty y cols., 1987). En nuestro estudio, los genes que codifican para la aerolisina/hemolisina fueron detectados en todas las cepas tipo, a excepción de *A. media*, *A. allosaccharophila* y *A. schubertii* (Chacón y cols., 2003), sin embargo, en un estudio previo la aerolisina/hemolisina tampoco fue detectada en las cepas tipo de estas especies ni en las de *A. caviae*, *A. jandaei* y *A. trota* (Kingombe y cols., 1999). Estas diferencias pueden ser atribuidas a que Kingombe y cols. (1999) utilizaron una mezcla de ocho cebadores que aparentemente tenían un grado de especificidad menor que los cebadores utilizados por Chacón y cols. (2003). Cuando los genes de la aerolisina/hemolisina se investigaron en las 234 cepas, pertenecientes a todas las especies del género, un 72.6% de las cepas los presentaron, y se encontraron significativamente más presentes en cepas clínicas que ambientales (Chacón y cols., 2003). En *A. caviae*, la presencia de la aerolisina/hemolisina, así como la actividad β -hemolítica se encontró en menor proporción (40% y 37.5%, respectivamente) que en otras especies como *A. veronii* (94% y 85.7%, respectivamente) clásicamente también aislada en muestras clínicas (Chacón y cols., 2003). Este fenómeno también ha sido observado por otros autores (Granum y cols., 1998; Kingombe y cols., 1999; Heuzenroeder y cols., 1999; Wang y cols., 2003). En *A. popoffii* la aerolisina/hemolisina se detectó en un 92% de las cepas (Soler y cols., 2002), resultado comparable al de especies de origen clínico, como por ejemplo *A. veronii*, o al de especies consideradas patógenas de peces como *A. salmonicida*. Además, la presencia de la aerolisina/hemolisina en *A. popoffii* es mayor que en otras especies de origen ambiental, como *A. sobria*, en la que la prevalencia de este gen fue sólo del 50% (Kingombe y cols., 1999). En otros estudios estos genes se han detectado en todas las cepas de *A. hydrophila* estudiadas (González-Serrano y

cols., 2002; González-Rodríguez y cols., 2002), aunque otros autores sólo los detectan en el 45% (Sechi y cols., 2002). La incidencia de la aerolisina/hemolisina en *A. hydrophila* en nuestros estudios fue del 58% (Chacón y cols., 2003) y 100% (Castro-Escarpulli y cols., 2003), la diferencia entre ambos estudios puede ser debida a que en el estudio de Castro-Escarpulli y cols. (2003) sólo se investigaron 2 cepas de esta especie. Cabe destacar que en los estudios mencionados de otros autores las cepas habían sido sólo identificados bioquímicamente y no genéticamente como en nuestros estudios. La aerolisina/hemolisina se detectó en el 96% de las cepas aisladas de pescado en México (Castro-Escarpulli y cols., 2003), resultado comparable al obtenido por Rahman y cols. (2002) quien encontró este gen en todas las cepas aisladas en peces enfermos. En *A. jandaei*, el gen se detectó en el 40.7% de las 26 cepas que estudiamos (estudio 4.4.3). Éste resultado contrasta con la no detección para la misma especie por Kingombe y cols. (1999) cuando estudió 3 cepas y Chacón y cols. (2003) que obtuvo un 83.3% cuando estudió sólo 6 cepas.

Cuando se analizó la actividad fenotípica asociada a la aerolisina (β -hemólisis), se observaron diferencias según el tipo de sangre utilizada (humana o de carnero) y la temperatura empleada (Soler y cols., 2002; Chacón y cols., 2003). Estos resultados concuerdan con los de otros trabajos donde también se ha demostrado que la actividad β -hemolítica depende del tipo de sangre utilizada (Brenden y Janda, 1987; Gossling, 1996; Santos y cols., 1999). Ninguna de las cepas de *A. popoffii* mostró β -hemólisis cuando fue ensayada a 37°C en agar sangre de carnero, lo cual concuerda con los resultados de la descripción original de la especie (Huys y cols., 1997b). Sin embargo, el 73% de las cepas mostraron β -hemólisis cuando se utilizó agar sangre humana a 20°C, aspecto desconocido hasta la fecha (Soler y cols., 2002). Es interesante destacar que ninguna cepa de *A. encheleia* presentó actividad β -hemolítica, aunque todas demostraron poseer el gen que codifica para la aerolisina/hemolisina (Castro-Escarpulli y cols., 2003; Chacón y cols., 2003).

La serina proteasa ha sido implicada en la activación de la pre-pro-aerolisina (Abrami y cols., 1998) y la pro-GCAT (Eggset y cols., 1994; Vipond y cols., 1998). En concreto, la aerolisina se transcribe como una pre-pro-aerolisina que contiene una región N-terminal que es eliminada durante el paso por la membrana interna dando lugar a una pro-aerolisina (Husslein y cols., 1988; Chopra y cols., 1993; van der Goot y cols., 1994), proceso que está mediado por la serina proteasa (Abrami y cols., 1998). Así mismo esta pro-aerolisina es secretada al exterior de la célula por un proceso

durante el cual se elimina la región C-terminal de la proteína convirtiéndola en una aerolisina activa (Howard y cols., 1996). En cuanto a la GCAT, esta es secretada por la bacteria como pro-GCAT, la cual debe sufrir un corte en el extremo C-terminal para convertirse en la GCAT activa (Hilton y cols., 1990; Ausio y cols., 1993). Este corte es producido por la serina proteasa (Eggset y cols., 1994; Vipond y cols., 1998). Chacón y cols. (2003) han encontrado significativamente más presencia de los genes que codifican para la aerolisina/hemolisina y serina proteasa en cepas β -hemolíticas, lo cual apoya los resultados de Abrami y cols. (1998). Sin embargo, no se ha encontrado una asociación estadísticamente significativa entre la presencia de los genes que codifican para la GCAT y la serina proteasa en cepas lipolíticas, esto ha sido debido a que prácticamente todas las cepas presentaban simultáneamente actividad lipolítica y el gen que codifica para la GCAT (Chacón y cols., 2003). Los resultados publicados por otros autores indicaban que cuando la GCAT y la serina proteasa se inyectaban simultáneamente e intramuscularmente en salmónidos, se producía furunculosis (Ellis, 1997), sin embargo posteriormente se publicaron resultados contradictorios sobre la importancia de ambas enzimas para la virulencia de *A. salmonicida* (Vipond y cols., 1998). Hasta la fecha la distribución de los genes que codifican para la GCAT y la serina proteasa sólo habían sido investigados en cepas de *A. salmonicida*, demostrándose que entre el 92% y el 100% de las cepas poseían la GCAT, y entre el 32% y el 40% la serina proteasa (Austin y cols., 1998; Høie y cols., 1999). En el presente trabajo tal y como hemos indicado anteriormente, se ha demostrado que los genes que codifican para la GCAT se encuentran presentes en todas las cepas del género (Soler y cols., 2002; Castro-Escarpulli y cols., 2003; Chacón y cols., 2003). Éste resultado nos ha permitido diseñar una sonda, correspondiente a un fragmento de éste gen, para la detección de colonias de *Aeromonas* spp. (Chacón y cols., 2002). Además, también hemos demostrado que el gen que codifica para la serina proteasa se encuentra en todas las especies del género con porcentajes que oscilan entre el 75 y el 96% (Soler y cols., 2002; Castro-Escarpulli y cols., 2003; Chacón y cols., 2003). Al investigar la actividad fenotípica que se asocia a la serina proteasa, evaluando la actividad azocaseína, se observó que esta era significativamente mayor en cepas de origen ambiental que en cepas clínicas (Chacón y cols., 2003). En el estudio de los factores de virulencia en cepas aisladas de pescado, la actividad proteasa también fue estudiada en paralelo mediante las técnicas de la azocaseína, gelatinasa y la caseinasa. Las pruebas de la gelatinasa y la azocaseína proporcionaron resultados

similares, sin embargo, la prueba de la caseinasa proporcionó un elevado número de falsos negativos, siendo por lo tanto ésta última la de menor utilidad para determinar la actividad proteasa en *Aeromonas* spp. (Castro-Escarpulli y cols., 2003).

Las lipasas tienen función nutricional en las bacterias (Pemberton y cols., 1997), sin embargo en *A. hydrophila* se ha demostrado que mutantes de inserción para el gen *plc*, que codifica para la lipasa Plc, reducen la DL₅₀ en ratones y peces, demostrándose así su implicación en la virulencia (Merino y cols., 1999). Hasta la fecha no existían estudios que determinasen la incidencia de los genes que codifican para las lipasas *lipH3* (Anguita y cols., 1993), *lip* (Chuang y cols., 1997), *apl-1* (Ingham y Pemberton, 1995) y *plc* (Merino y cols., 1999) en *Aeromonas*. En la presente tesis se ha demostrado que estos genes se encuentran presentes en todas las especies del género, y su presencia se correlaciona con la actividad lipolítica de las cepas, no encontrándose diferencias entre la presencia de lipasas y el origen clínico o ambiental de las cepas (Soler y cols., 2002; Chacón y cols., 2003; Castro-Escarpulli y cols., 2003). Castro-Escarpulli y cols. (2003) evaluaron tres métodos diferentes para determinar la actividad lipolítica de las cepas (medio mantequilla-resarsurina, α -lecitina y agar tributirina), no encontrándose diferencia entre ellos y recomendándose el uso del agar tributirina por ser más fácil y rápido de interpretar.

Otro factor de virulencia de interés son las DNasas, las cuales son consideradas de gran importancia en bacterias de otros géneros como *Streptococcus* para producir la infección de las células huéspedes humanas y hacer que ésta progrese (Podbielski y cols., 1996; Ericksson y cols., 1999). En *Aeromonas*, hasta la fecha los únicos estudios realizados sobre las DNasas han sido los de la descripción y caracterización de los tres genes publicados hasta la fecha (Chang y cols., 1992; Dodd y Pemberton, 1996; 1999), pero se desconoce la distribución de éstas en las especies del género. Chacón y cols. (2003) han demostrado que estos genes se encuentran significativamente más presentes en cepas de *Aeromonas* de origen clínico (95%) que ambiental (85%), aunque esta diferencia no se observó a nivel de expresión fenotípica del gen. Por otro lado todas las cepas de *A. popoffii* estudiadas presentaban los genes de las DNasas y la actividad fenotípica que las caracteriza (Soler y cols., 2002). Este gen se encontró presente en el 83% de las cepas procedentes de pescado congelado, aunque todas las cepas presentaron actividad DNasa (Castro-Escarpulli y cols., 2003).

La habilidad de captar el rojo congo ha sido utilizada como marcador de virulencia de muchas bacterias enteropatógenas como *Yersinia enterocolitica* (Farmer

y cols., 1992), *Edwardsiella tarda* (Ling y cols., 2000), *Vibrio cholerae* (Nataro y Kaper, 1998), *Escherichia coli* enteroinvasiva y *Shigella flexneri* (Rico-Martinez, 1995; Nataro y Kaper, 1998). Así mismo, Ishiguro y cols. (1985) sugirieron que este era un buen marcador del potencial virulento de *A. salmonicida*, mientras que Ellis y cols. (1988) lo pusieron en duda. Se ha sugerido que los responsables de la captación del rojo congo en *Aeromonas* spp. son los sideróforos (Santos y cols., 1999), cuya función se asocia a la captación del hierro de la hemoglobina del huésped (Janda, 2001). Castro-Escarpulli y cols. (2003) demostraron que todas las cepas aisladas de pescado congelado eran capaces de captar el rojo congo, resultado que coincidía con otros estudios (Statner y George, 1987; Palumbo y cols., 1989; Paniagua y cols., 1990).

La adherencia agregativa a células HEp-2, se ha asociado a la presencia de pilis tipo IV en la bacteria (Thornley y cols., 1994; Kirov y cols., 2000). Se demostró que todas las cepas aisladas de pescado congelado presentaban una adherencia agregativa a células HEp-2 independiente de la especie de *Aeromonas* de que se tratara (Castro-Escarpulli y cols., 2003). Este patrón de adherencia a estas células se ha descrito también para todas las cepas de *A. caviae* estudiadas por otros autores (Thornley y cols., 1994).

Todos estos datos demuestran que las cepas de origen ambiental presentan una carga genética de factores de virulencia similar a la de las cepas de origen clínico, sugiriendo por lo tanto que el ambiente es un reservorio de cepas de *Aeromonas* spp. con capacidad patógena. Además se sugiere que las cepas procedentes de pescado pueden actuar como vehículo de transmisión de *Aeromonas*, si se tiene en cuenta que este tipo de pescado se consume crudo en México (Castro-Escarpulli y cols., 2003). También se ha considerado importante conocer que cepas o especies de las aisladas de peces enfermos pueden producir patología en peces sanos. En el presente estudio se ha demostrado por primera vez, realizando estudios *in vivo* en carpa común (*Cyprinus carpio*), la patogenicidad de la especie *A. bestiarum* y de las cepas mesófilas y móviles de *A. salmonicida* (Kozłowska y cols., 2002). A pesar de que *A. bestiarum* había sido aislada de peces enfermos (Huys y cols., 1996b), no existían datos hasta la fecha sobre sus características patógenas. Además se ha demostrado que no todas las cepas de *A. sobria* son patógenas, tal y como habían indicado estudios anteriores, realizados también en carpas (Kozłowska, 1996) y en otras especies de pez (Santos y cols., 1988; Toranzo y cols., 1989). En estos estudios, sin embargo, las cepas no habían sido identificadas genéticamente. Sólo una de las cepas

de *A. sobria* de las 6 que se ensayaron demostró ser capaz de provocar lesiones cutáneas localizadas en un 30% de los peces (Kozínska y cols., 2002). La especie *A. encheleia* demostró no ser patógena en las carpas, tal y cómo se había descrito previamente para las anguilas (Esteve y cols., 1995c).

Además de los factores de virulencia mencionados, se han descrito otros en el género, entre ellos el flagelo lateral, responsable de la movilidad rápida o pululante “*swarming*” implicada en adherencia y colonización (Gavín y cols., 2002). Así mismo, una enterotoxina termolábil codificada por el gen *alt* (Chopra y cols., 1986) y una enterotoxina termoestable codificada por el gen *ast* (Chopra y cols., 1994) han sido recientemente implicadas de forma directa en la producción de diarrea, ya que mutantes defectuosos para estos dos genes reducen en un 36% la secreción de fluido en un modelo experimental de diarrea en ratón (Sha y cols., 2002). Además, la presencia simultánea de éstos genes en las cepas aisladas en niños con cuadros diarreicos, se ha asociado a la producción de diarrea líquida o severa (Albert y cols., 2000), aunque esta asociación se realizó en base a un número muy reducido de casos (11 pacientes). El gen *act* codifica para una enterotoxina citotóxica que presenta una homología del 79-93% con la aerolisina/hemolisina a nivel de aminoácidos (Chopra y cols., 1993) y de hasta un 96% a nivel de nucleótidos, siendo por lo tanto imposible diferenciar ambos genes por PCR. Además ambas toxinas han sido recientemente consideradas la misma (Buckley y Howard, 1999). Mutantes dobles para los genes *act* y *ast*, *act* y *alt* reducen en un 62% y 73% respectivamente la secreción de fluidos en un modelo experimental de ratón, mientras que un triple mutante para los genes *act*, *alt* y *ast* reduce esta secreción en un 100% (Sha y cols., 2002). En nuestro estudio (4.4.3) se investigó la presencia de los genes *lafA* (codifica para el flagelo lateral), *alt*, *ast* y aerolisina/hemolisina por PCR y *dot blot* (excepto para el gen *alt*) en un grupo de 32 cepas de *A. jandaei* de origen ambiental, clínico y animal. El 63% de las cepas de *A. jandaei* presentaron el gen *lafA*, que sólo había sido estudiado y encontrado hasta la fecha en la cepa tipo de esta especie (Kirov y cols., 2002). En nuestro estudio no se observaron diferencias entre la presencia de éste gen y el origen de las cepas, lo cual no es de extrañar, ya que la presencia del flagelo lateral es beneficiosa tanto en cepas de origen ambiental (formación de biofilms), como en cepas de origen clínico (colonización y adherencia). La detección de este gen por PCR fue menos efectiva que su detección por *dot blot*, ya que 12 de las cepas fueron negativas por PCR pero positivas por *dot blot*. Dado que el gen *lafA* no presenta homología (por análisis

BLAST) con otros genes, la detección de falsos positivos es muy poco probable. Probablemente la baja efectividad de la detección por PCR sea debida a variaciones en la secuencia en las dianas de unión de los cebadores, tal y cómo ha sido sugerido en otros estudios donde se detectó por PCR el gen que codifica para la GCAT (Chacón y cols., 2002; Chacón y cols., 2003). En nuestro estudio el gen *ast* sólo fue detectado en una cepa aislada de un niño con diarrea, esta cepa también presentaba los genes *alt* y *lafA*, sin embargo un 92.3% de las cepas de *A. jandaei* aisladas de diarrea no presentaron ninguna asociación entre los genes *ast* y *alt* (estudio 4.4.3). Este resultado no concuerda con la hipótesis formulada por Albert y cols. (2000), de que la combinación de ambos genes sería responsable de la diarrea líquida. Para clarificar este último punto sería necesario investigar la presencia de estos genes en un número mayor de cepas y procedentes de pacientes con diarrea con una historia clínica clara y completa. En nuestro estudio ninguna de las cepas de *A. jandaei* procedente de diarrea presentó simultáneamente los genes *alt*, *ast* y aerolisina/hemolisina. Los genes *lafA* y aerolisina/hemolisina se detectaron simultáneamente en un 34.7% de las cepas independientemente de su origen, y únicamente una cepa con origen animal, presentó simultáneamente los genes *alt* y aerolisina/hemolisina.

Consideramos que los factores de virulencia estudiados en *A. jandaei*, deben jugar un papel importante en la patogenicidad de esta especie, ya que al menos uno de ellos (*alt*, *ast*, aerolisina/hemolisina o *lafA*) se encontró mucho más presente (73.7%) en las cepas clínicas, que en las cepas ambientales (40%) (estudio 4.4.3).

5.5. Mecanismos de patogenicidad

Cómo se ha demostrado, los diferentes factores de virulencia se encuentran ampliamente presentes en cepas de *Aeromonas* de diferentes especies, tanto clínicas como ambientales (Soler y cols., 2002; Castro-Escarpulli y cols., 2003; Chacón y cols., 2003; estudio 4.4.3). Recientemente, se han aportado evidencias de la existencia del sistema de secreción tipo III (TTSS) en una cepa de *A. salmonicida* subsp. *salmonicida* aislada de peces enfermos, describiéndose ocho genes que forman parte del TTSS (Burr y cols., 2002), y una toxina (AexT) secretada por este sistema (Braun y cols., 2002). Este mecanismo de secreción está especializado en hacer llegar directamente

al citoplasma de las células huésped toxinas que la destruyen, al mismo tiempo que inhiben la actividad de las células fagocíticas e inducen su apoptosis (Hueck, 1998; Muller y cols., 2001; Ramamurthy y Schneewind, 2002).

En el presente trabajo se describen dos nuevos genes, obtenidos a partir de una cepa clínica de *A. veronii*, que codifican para proteínas homólogas del TTSS de *Yersinia* spp. entre otros microorganismos, y que han sido designados como *ascF* y *ascG* (estudio 4.5.1). Así mismo también se han identificado otros dos nuevos genes, *ascJ* y *ascL*, que codifican para proteínas homólogas a las YscJ e YscL de *Yersinia enterocolitica*, aunque no se dispone todavía de su secuencia completa, y por tanto su caracterización queda pendiente para futuros trabajos. Las proteínas AscF y AscG, codificadas por los genes ya caracterizados, presentan un punto isoeléctrico y peso molecular similar al de sus homólogas en *Yersinia enterocolitica*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Protorhabdus luminescens*, lo cual sugiere que la función de éstas proteínas en *Aeromonas* será parecida a la descrita en estas bacterias. Se ha sugerido que en *Yersinia pestis* estas proteínas (YscF e YscG) están involucradas en la regulación de la expresión y secreción de proteínas de respuesta a la baja concentración de calcio (Plano y Straley, 1995). También se ha sugerido que la proteína YscG es una chaperona *Syc-like* que se une directamente la componente citoplasmático YscE del TTSS (Day y cols., 2000).

La detección de factores de virulencia por PCR en *Aeromonas* es un método válido para determinar el potencial virulento de las cepas del género (Soler y cols., 2002; Casto-Escarpulli y cols., 2002; Chacón y cols., 2003). Sin embargo, la presencia de TTSS es una característica de virulencia que se correlaciona bien con la patogenicidad de las cepas, por lo que se ha sugerido que su presencia puede ser utilizada como un indicador general de virulencia (Winstanley y Hart, 2000; Stuber y cols., 2003). Es en este sentido que hemos evaluado (estudio 4.5.1) la presencia de tres genes que codifican para el TTSS (*ascF-G* y *ascV*) y uno que codifica para una toxina secretada por el mismo (*aexT*), en un grupo representativo de cepas de origen clínico de las especies *A. hydrophila*, *A. caviae* y *A. veronii*. En este estudio se demostró que los genes investigados de éste sistema de secreción, se encuentran en la mayoría de cepas de *A. veronii* y *A. hydrophila*, siendo predominantes (100% y 86% respectivamente) en cepas de origen extraintestinal. En *A. caviae*, sin embargo, dichos genes no se detectaron en las cepas de origen intestinal, mientras que si se detectaron, aunque en baja proporción (14%), en las cepas extraintestinales. La baja

presencia del TTSS en cepas de *A. caviae* estaría en concordancia con la menor presencia de factores de virulencia descrita en cepas de ésta especie en numerosos estudios (Granum y cols., 1998; Kingombe y cols., 1999; Heuzenroeder y cols., 1999; Wang y cols., 2003). En la presente tesis también se ha evaluado la presencia de éstos genes en dos cepas de origen extraintestinal de *A. jandaei*, habiéndose encontrado que una de ellas también posee dichos genes, demostrándose por lo tanto que el TTSS es un mecanismo común en cepas con capacidad patógena de diversas especies del género.

Uno de los objetivos a alcanzar mediante el estudio del TTSS en *Aeromonas*, es la identificación de toxinas que sean secretadas por este sistema. Hasta la fecha sólo se conoce la toxina AexT, la cual fue aislada de *A. salmonicida* subsp. *salmonicida* y demostró poseer una elevada similitud con las toxinas ExoS y ExoT (secretadas vía TTSS en *Pseudomonas aeruginosa*) y fue capaz de producir toxicidad en cultivos de células de gónadas de pez RTG-2 (Braun y cols., 2002). En nuestro estudio se ha demostrado la presencia del gen que codifica para la toxina AexT en cepas de *Aeromonas* de origen clínico, siendo importante destacar que a excepción de dos cepas intestinales de *A. hydrophila* y una de *A. veronii*, todas las cepas que presentaron los genes *ascF-G* y *ascV*, también presentaron el gen que codifica para la toxina AexT.

A pesar de que hasta la fecha sólo se han podido secuenciar dos nuevos genes completos del TTSS de *Aeromonas*, es importante destacar que en la actualidad disponemos de un clon que contiene un fragmento de un tamaño aproximado de 10 Kb que contiene por lo menos los genes *ascV*, *ascF*, *ascG*, *ascJ* y *ascL*. El gen *ascV* se encuentra en uno de los extremos del tándem de genes que codifican para el TTSS en otras bacterias, mientras que los genes *ascF* y *ascG* se encuentran en la parte central, y los genes *ascJ* y *ascL* se encuentran en el extremo opuesto (Hueck, 1998). El TTSS en otras bacterias está formado por unos 20 genes de un tamaño aproximado de entre 300 y 800 pb cada uno (Hueck, 1998), lo cual implica que el tamaño total aproximado del tándem que codifica para el TTSS es de unos 8-12 Kb. Es por este motivo que creemos que cuando el clon que hemos aislado sea completamente secuenciado, dispondremos de todos o prácticamente todos los genes que codifican para el TTSS en *Aeromonas*. En la actualidad dicho trabajo se está llevando a cabo en colaboración con el Dr. J. Tomás y Dra. S. Merino del Departamento Microbiología de la Facultad de Biología de la Universidad de

Barcelona. Además esta información permitirá estudiar detalladamente la función de cada uno de los genes, mediante la generación de mutantes de delección y ensayo de dosis letales en animales de experimentación, y así establecer el grado de implicación real del TTSS en la virulencia de *Aeromonas* y ayudará a descubrir nuevas toxinas secretadas por este sistema.

El hecho de que por primera vez se haya demostrado la presencia del sistema de secreción tipo III en la mayoría de cepas clínicas de *Aeromonas*, demuestra que dichas cepas poseen un potencial virulento comparable al de otros patógenos tales como *Escherichia coli*, *Yersinia* spp. y *Salmonella* spp.



Comparison of three molecular methods for typing *Aeromonas popoffii* isolates

Lara Soler¹, Maria Jose Figueras^{1,*}, Matilde R. Chacón¹, Josep Guarro¹ and Antonio J. Martinez-Murcia²

¹Unitat de Microbiologia. Departament de Ciències Mèdiques Bàsiques, Facultat de Medicina i Ciències de la Salut, Universitat Rovira i Virgili, Sant Llorenç 21, 43201 Reus, Spain; ²Servicio de Diagnóstico Molecular. Escuela Politécnica Superior, Universidad Miguel Hernandez, Ctra. Beniel Km.3,2, 03312 Orihuela (Alicante), Spain; *Author for correspondence (e-mail: mjfs@fmcs.urv.es; phone: 34-977759321; fax: 34-977759322)

Received 14 January 2002; accepted in revised form 17 October 2002

Key words: 16S-23S ISR-RFLP, *Aeromonas popoffii*, ERIC, REP

Abstract

Three typing methods, restriction fragment length polymorphism (RFLP) of the 16S-23S intergenic spacer region (ISR), PCR amplification of the enterobacterial repetitive intergenic consensus (ERIC) and of the repetitive extragenic palindromic units (REP), were evaluated for typing 26 isolates of *Aeromonas popoffii* from different geographical origins. When the methods were independently studied, ERIC showed the highest discriminatory power. When the methods were combined, the best combination of two methods was ERIC with REP since strains showed a tendency to cluster according to their geographical origin. However, this tendency was reinforced with the addition of ISR-RFLP.

Introduction

Members of the genus *Aeromonas* are gram-negative bacteria, and ubiquitous in aquatic environments, although they are also involved in a variety of human infections (Janda and Abbott 1998). *Aeromonas popoffii* is the most recently described species (Huys et al. 1997) and is commonly found in freshwater and seawater (Soler et al. 2002). Although to our knowledge there is no report of this species in clinical samples, the presence of common virulence factors such as aerolysin/hemolysin, serine protease, DNases and lipases in *A. popoffii* has been demonstrated (Soler et al. 2002).

Studies involving clinical and environmental *Aeromonas* strains using ribotyping have indicated that apparently unrelated strains can show identical patterns (Demarta et al. 2000) which, together with its laborious nature may be a shortcoming of the technique. Pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) has been considered to be one of the best typing methods

(Maslow et al. 1993). However, when compared with RAPDs for typing *A. hydrophila* isolates, the latter was simpler, cheaper, and quicker to perform, and consequently more suitable for epidemiological studies (Talon et al. 1998). Recently, restriction fragment length polymorphism (RFLP) of the 16S-23S intergenic spacer region (ISR) has been used successfully for typing *Aeromonas veronii* strains (Martínez-Murcia et al. 2000). However, this technique is laborious when compared with other typing methods based on the PCR amplification of short and repetitive sequences present on the genome of bacteria, such as enterobacterial repetitive intergenic consensus (ERIC) and repetitive extragenic palindromic units (REP) (Versalovic et al. 1991). These motifs are genetically stable and differ only in their copy number and chromosomal locations, making them a good target for strain differentiation (Hulton et al. 1991). RAPD and ERIC were used for typing *Aeromonas* isolates and both methods proved to be effective for demonstrating a nosocomial transmission of *A. hy-*

drophila (Davin-Regli et al. 1998). Despite that, there are only few comparative studies on the reproducibility and discriminatory power of molecular typing methods in *Aeromonas*.

We have evaluated three molecular methods (16S-23S ISR-RFLP, ERIC and REP) alone and in combination for typing isolates of *A. popoffii* of different origins. We have collected all the available strains of this species in order to evaluate their genetic diversity.

Materials and methods

Strains

We tested 26 *A. popoffii* strains, 7 from Belgium and Scotland (Huys et al. 1997), 8 from Switzerland (Demarta et al. 1999) and 11 from Spain (Soler et al.

2002) (Table 1). The latter were identified by 16S rDNA-RFLP. Strains received from other authors were also re-identified using the same methodology (Borrell et al. 1997; Figueras et al. 2000). The type strains of *A. hydrophila*, *A. bestiarum* and *A. salmonicida* were chosen as outgroups.

16S-23S rDNA ISR-RFLP (ISR-RFLP) analysis

Genomic DNA extraction and PCR amplification of the 16S-23S ISR was performed as previously described (Martínez-Murcia et al. 2000), although in the present study we employed a different enzyme combination. The 16S-23S ISR amplified product was digested with the enzymes *Hinf*I-*Cfo*I, *Hinf*I-*Taq*I and *Alu*I. Digested products were electrophoresed on 4% Metaphor agarose (FMCS Bioproducts Europe, Denmark) for 6 h on Tris-acetate-EDTA buffer. Molecular

Table 1. Isolates used in the study and genotypes determined by 16S-23S ISR RFLP, REP and ERIC-PCR analyses.

16S rDNA RFLP	Isolate	Origin	Types				
			16S-23S ISR-RFLP			REP-PCR	ERIC-PCR
			<i>Hinf</i> I- <i>Cfo</i> I	<i>Hinf</i> I- <i>Taq</i> I	<i>Alu</i> I		
<i>A. hydrophila</i>	CECT 839T	Tin of milk with fishy odour	1	1	1	1	1
<i>A. bestiarum</i>	CECT 4227T	Fish	2	2	2	2	2
<i>A. salmonicida</i>	CECT 894T	Atlantic salmon	3	3	3	3	3
<i>A. popoffii</i>	LMG 17541T	Drinking water production plant (Oelegem); Belgium	8	7	6	4	4
<i>A. popoffii</i>	LMG 17542	Drinking water production plant (De Blankkaart); Belgium	6	4	9	5	5
<i>A. popoffii</i>	LMG 17543	Drinking water production plant (Snellegem); Belgium	7	10	5	6	6
<i>A. popoffii</i>	LMG 17544	Drinking water production plant (Eeklo); Belgium	8	7	6	7	7
<i>A. popoffii</i>	LMG 17545	Drinking water production plant (Snellegem); Belgium	8	7	5	8	8
<i>A. popoffii</i>	LMG 17546	Drinking water service reservoir (Undy Station); Scotland	8	8	6	9	9
<i>A. popoffii</i>	LMG 17547	Drinking water production plant (Turrieff); Scotland	9	9	6	11	11
<i>A. popoffii</i>	F533E	Tap water (Pregassona); Switzerland	10	10	10	10	10
<i>A. popoffii</i>	F548B	Tap water (Vinagello); Switzerland	10	10	10	10	10
<i>A. popoffii</i>	F548C	Tap water (Vinagello); Switzerland	10	10	10	10	10
<i>A. popoffii</i>	F600B	Tap water (Vinagello); Switzerland	10	10	10	10	10
<i>A. popoffii</i>	F600C	Tap water (Vinagello); Switzerland	10	10	10	10	10
<i>A. popoffii</i>	F539A	Tap water (Vinagello); Switzerland	10	10	10	10	10
<i>A. popoffii</i>	F479E	Fountain swab (Vezio); Switzerland	8	6	4	12	12
<i>A. popoffii</i>	F498B	Tap water (Cadro); Switzerland	8	10	8	13	13
<i>A. popoffii</i>	137	Baells Reservoir; Spain	8	9	6	14	14
<i>A. popoffii</i>	159	Segre River; Spain	5	13	4	15	15
<i>A. popoffii</i>	203	Seawater. El Masnou-Barcelona; Spain	8	9	6	16	16
<i>A. popoffii</i>	210	Seawater. Rivermouth of Llobregat; Spain	8	9	6	17	17
<i>A. popoffii</i>	254	Noguera Pallaresa River; Spain	6	11	11	18	18
<i>A. popoffii</i>	274	Noguera Pallaresa River; Spain	10	6	6	19	19
<i>A. popoffii</i>	366	Freshwater. Riera de Merles; Spain	4	13	6	20	20
<i>A. popoffii</i>	370	Baells Reservoir; Spain	8	5	7	21	21
<i>A. popoffii</i>	594	Freshwater. Riera de Merles; Spain	9	14	6	14	22
<i>A. popoffii</i>	32	Seawater. Rivermouth of Fluvia; Spain	11	15	12	14	23
<i>A. popoffii</i>	638	Fluvia River; Spain	8	12	6	14	24

Weight Marker V (Roche, Madrid, Spain) (5 μ l) was electrophoresed twice in each gel.

REP and ERIC analysis

DNA extraction was performed with the Instagene Matrix (Bio-Rad Laboratories, California, USA). The DNA was quantified with the GeneQuant *pro* (Amersham Pharmacia Biotech, Cambridge, England) and an amount of 100 ng was used per PCR reaction in a GeneAmp PCR System 2400 (Perkin Elmer, Foster City, USA), using primers and conditions previously

described (Vila et al. 1996). Samples (25 μ l) of each PCR end product were electrophoresed on polyacrylamide 10% w/v gels at a voltage of 56 mA for 4 h. AmpliSize™ Molecular Ruler 50–2,000 bp Ladder (Bio-Rad) (8 μ l) was electrophoresed twice in each gel.

Image comparison, analyses and reproducibility

Gel images were saved as TIFF files, normalized with the above mentioned molecular size markers, and further analysed by BioNumerics software, version

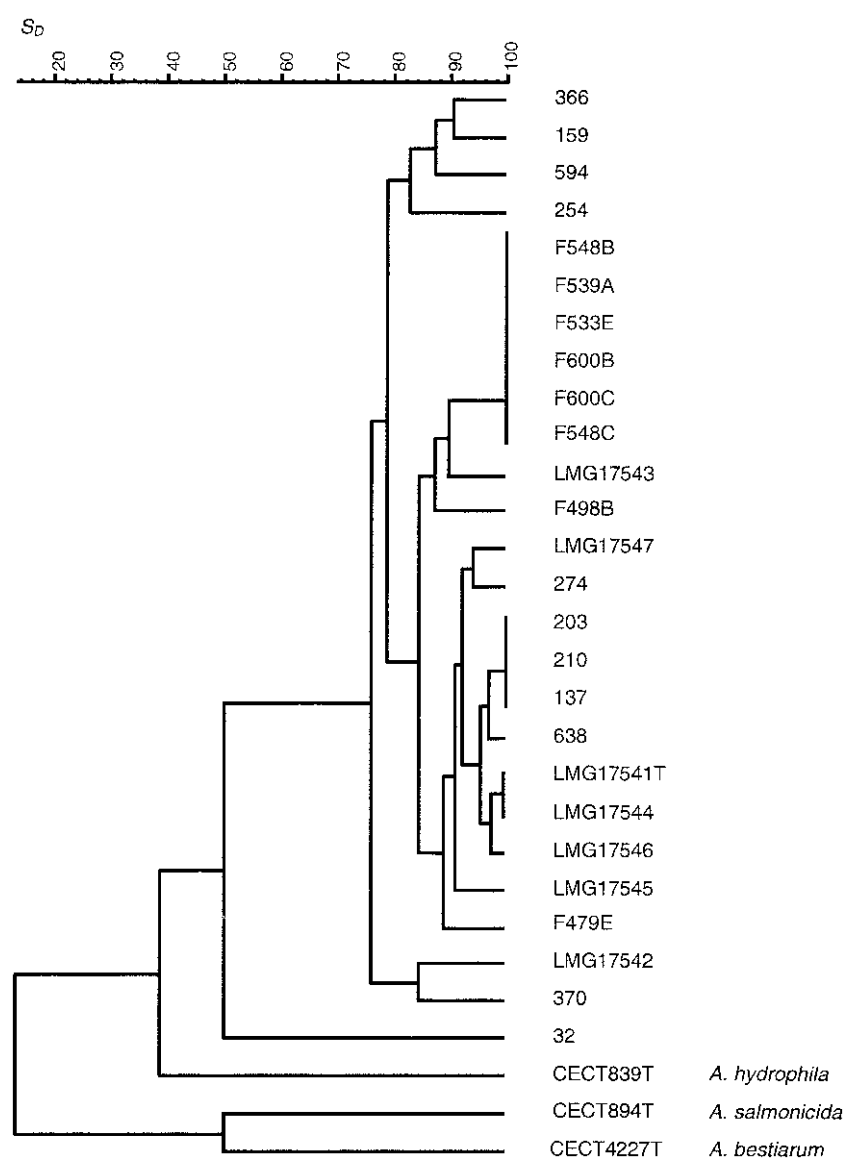


Figure 1. S_D /UPGMA cluster analysis based on the combined *Hinf*I-*Cfo*I, *Hinf*I-*Taq*I and *Alu*I ISR-RFLP produced patterns.

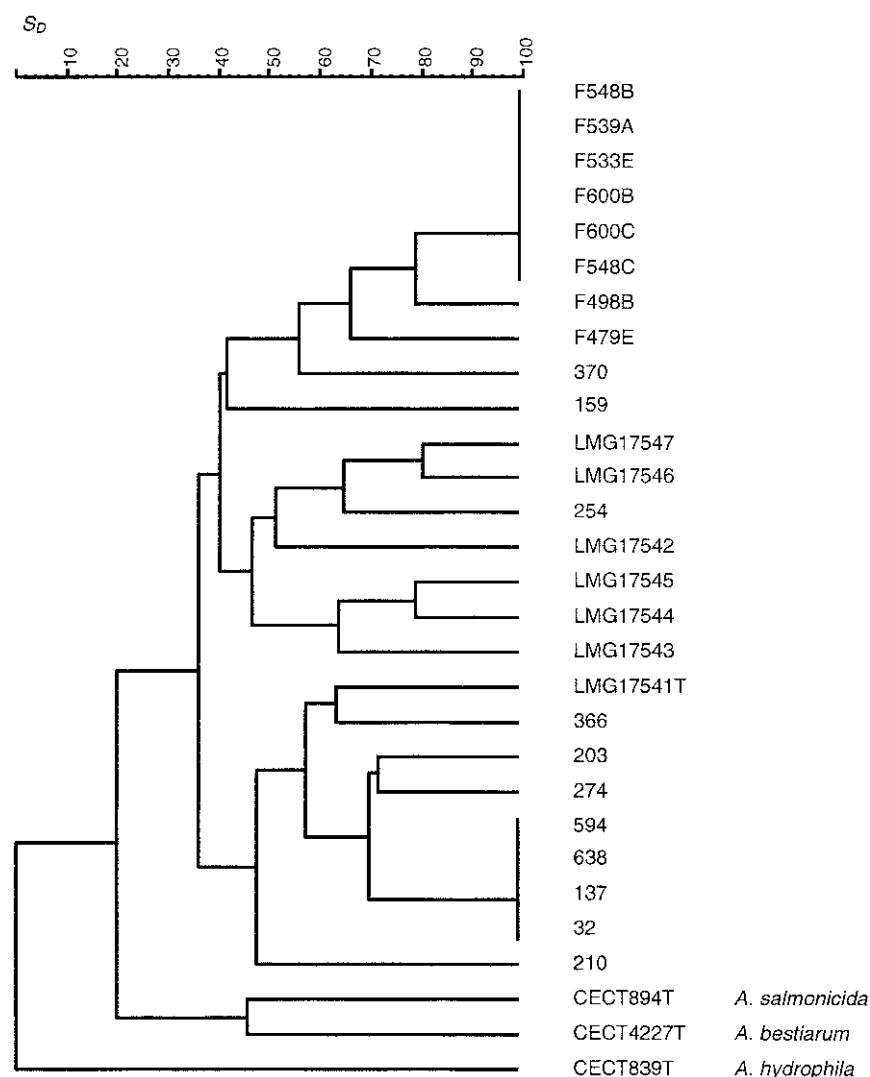


Figure 2. S_D /UPGMA cluster analysis based on the REP-PCR produced patterns.

1.5 (Applied Maths, Kortrijk, Belgium). To construct the dendrograms, levels of similarity between the profiles were calculated by using the band-matching Dice coefficient (S_D) and the cluster analysis of similarity matrices was calculated with the unweighted pairgroup method with arithmetic averages (UPGMA). Isolates were assigned to a different type when any band differences were observed.

Three different assays using duplicates of three different strains (LMG17542, F539A and F479E) were performed to analyze the reproducibility of the REP and ERIC methods. In the first, DNA extraction

and PCR were performed in the same experiment and electrophoresis in the same gel for all strains. In the second, only electrophoresis was done in different gels for the duplicate strains. In the third, DNA extraction, PCR and electrophoresis were done in separate experiments for each duplicate. A band-matching tolerance of 75% was chosen, and similarity matrices of whole densitometric curves of the gel tracks were calculated using the pair-wise Pearson's product-moment correlation coefficient (r-value) (Vinueza et al. 1998). In the present study, DNA extraction, PCR and electrophoresis were done in the

same experiment whenever possible, otherwise, strains already analysed were included as controls in subsequent experiments.

Results and discussion

Aeromonas popoffii, the latest described species of the genus, was originally isolated from drinking water production plants and reservoirs in Belgium and Scotland (Huys et al. 1997). Recently more isolates were recovered from the same origin in Switzerland (Demarta et al. 1999) and Spain (Soler et al. 2002). In

the present study we have investigated the genetic relatedness of all those isolates using three different molecular methods (ISR-RFLP, ERIC and REP). The genotypes obtained are summarized in Table 1 and Figure 1–5 show the dendrograms obtained. The type strains of *A. hydrophila*, *A. bestiarum* and *A. salmonicida* each presented a unique genotype and formed 3 clear outgroups with all methods tested. It is interesting to note that 6 of the 8 isolates from Switzerland (F548B, F548C, F600B, F600C, F539A and F533E) showed identical patterns with the three methods (Table 1, Figures 1–5) Figures 6 and 7 illustrate the identical patterns obtained with ERIC

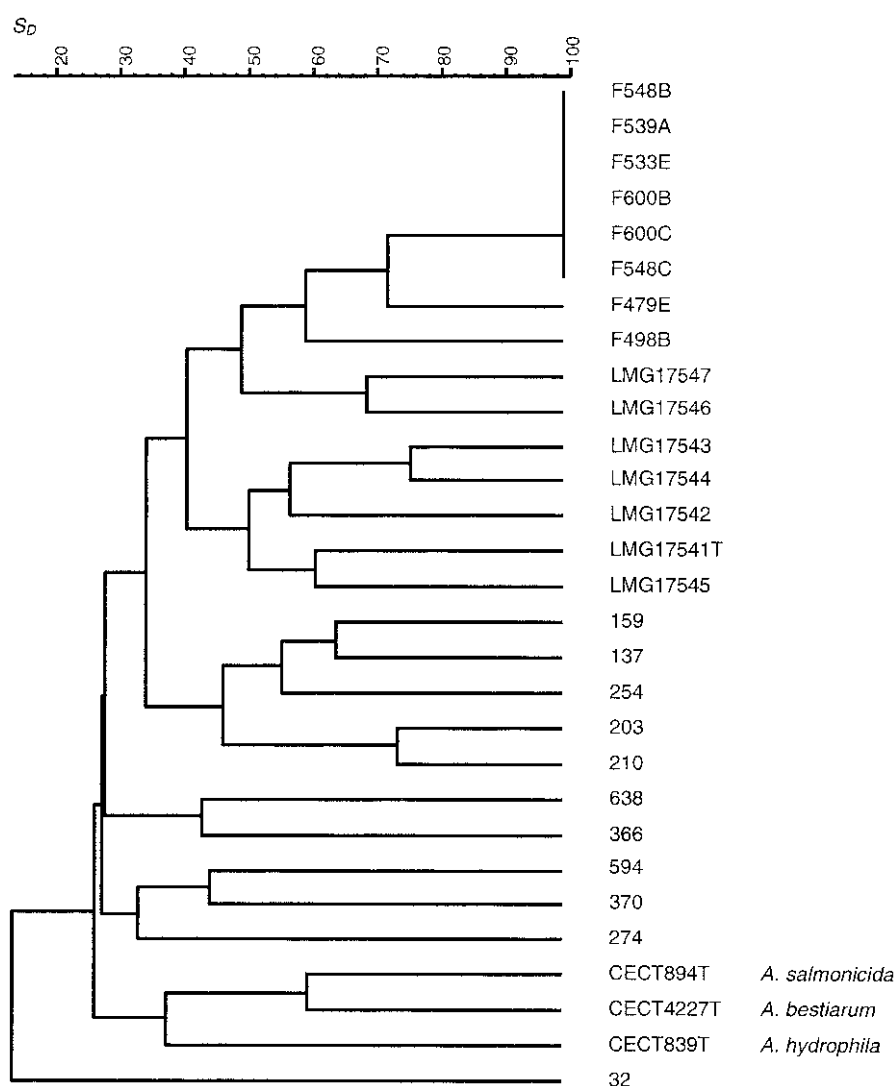


Figure 3. S_D /UPGMA cluster analysis based on ERIC-PCR produced patterns.

and REP for those isolates. These isolates also presented identical biochemical responses and antimicrobial susceptibility patterns which seems to indicate that they belong to the same clonal group. Therefore, we assume that, the 8 isolates from Switzerland (Demarta et al. 1999) represented only 3 strains.

Our study, using ISR-RFLP, ERIC and REP demonstrated that the isolates LMG17546 (genotype 8/8/6/9/9) and LMG17547 (genotype 9/9/6/11/11); LMG17541^T (genotype 8/7/6/4/4) and F498B (genotype 8/10/8/13/13) are different, disagreeing with results obtained by ribotyping in the previous studies (Huys et al. 1997; Demarta et al. 1999). This confirms that ribotyping is not discriminatory enough

as already indicated by other authors (Maslow et al. 1993; Demarta et al. 2000). Patterns for the rest of the isolates investigated were strain-specific or not, depending on the discriminatory power of the method. For instance, an identical ISR-RFLP type was obtained for isolates 203, 210 and 137 (Figure 1), while they showed specific patterns with the other two methods (Figures 2, 3). This may be considered a shortcoming of the ISR-RFLP method and additionally, as already commented, it is more complex to perform. The remaining fifteen isolates presented strain-specific ISR-RFLP patterns. The usefulness of the ISR-RFLP method was demonstrated for typing *A. veronii* in a previous study by our group. By using

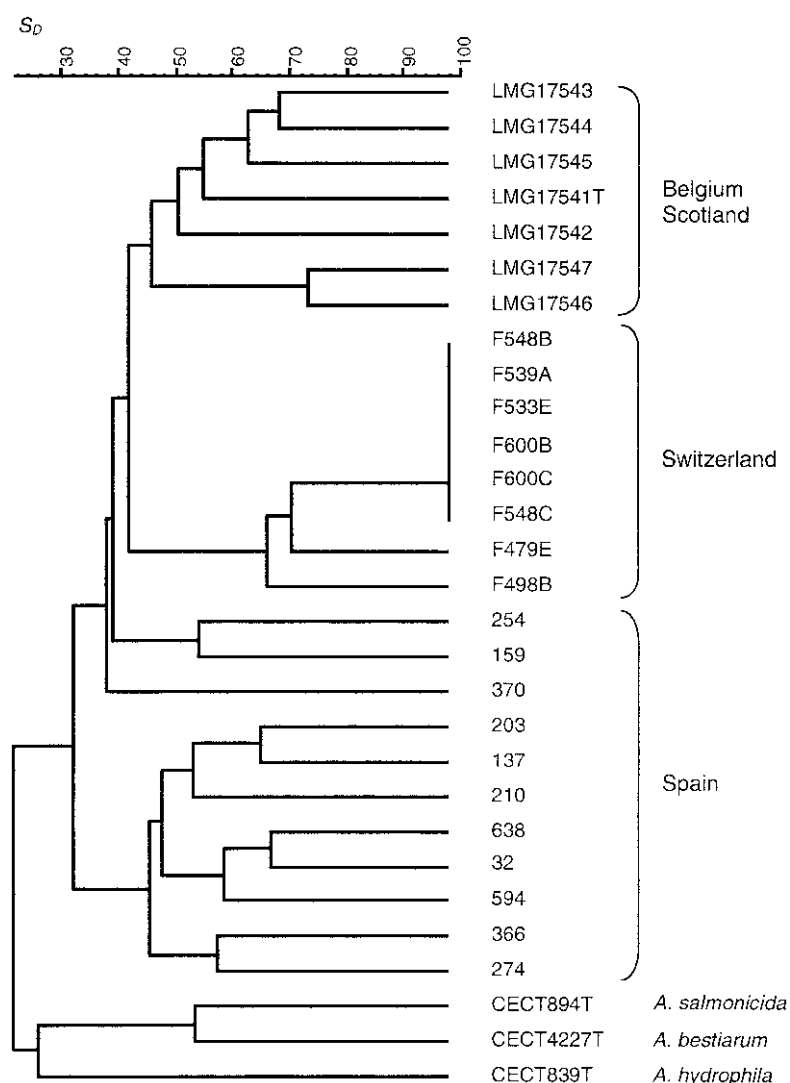


Figure 4. S_D /UPGMA cluster analysis based on the combined REP-PCR and ERIC-PCR produced patterns.

this method, we were able to recognize an identical clone from the same patient in sequential stool samples. In addition, we were able to trace related strains within a drinking water supply (Martínez-Murcia et al. 2000). However, in that study some unrelated strains also showed identical patterns.

When using the REP method, a total of 21 types were obtained (Table 1), type 14 being common to four strains (594, 638, 137 and 32) from different sources (Figure 2). However, they presented different types with the other two methods (Figures 1, 3).

With the ERIC-PCR method, a total of 24 types were obtained (Table 1) and all strains showed a distinct pattern, with the exception of the six men-

tioned isolates from Switzerland (Figure 3). These results confirm ERIC-PCR as the most discriminatory of the three methods investigated. The REP and ERIC methods have been broadly applied for typing purposes in several genera of bacteria (Vila et al. 1996; Sander et al. 1998; Marshall et al. 1999). Of those, only ERIC-PCR has been applied in *Aeromonas*, proving to be useful for tracing a nosocomial infection produced by *A. hydrophila* (Davin-Regli et al. 1998).

It has been argued that the reproducibility of the ERIC and REP methods depends upon standardization. Important parameters are the quantification of DNA and primers, the annealing temperature, the type of *Taq* DNA polymerase, $MgCl_2$ concentration and

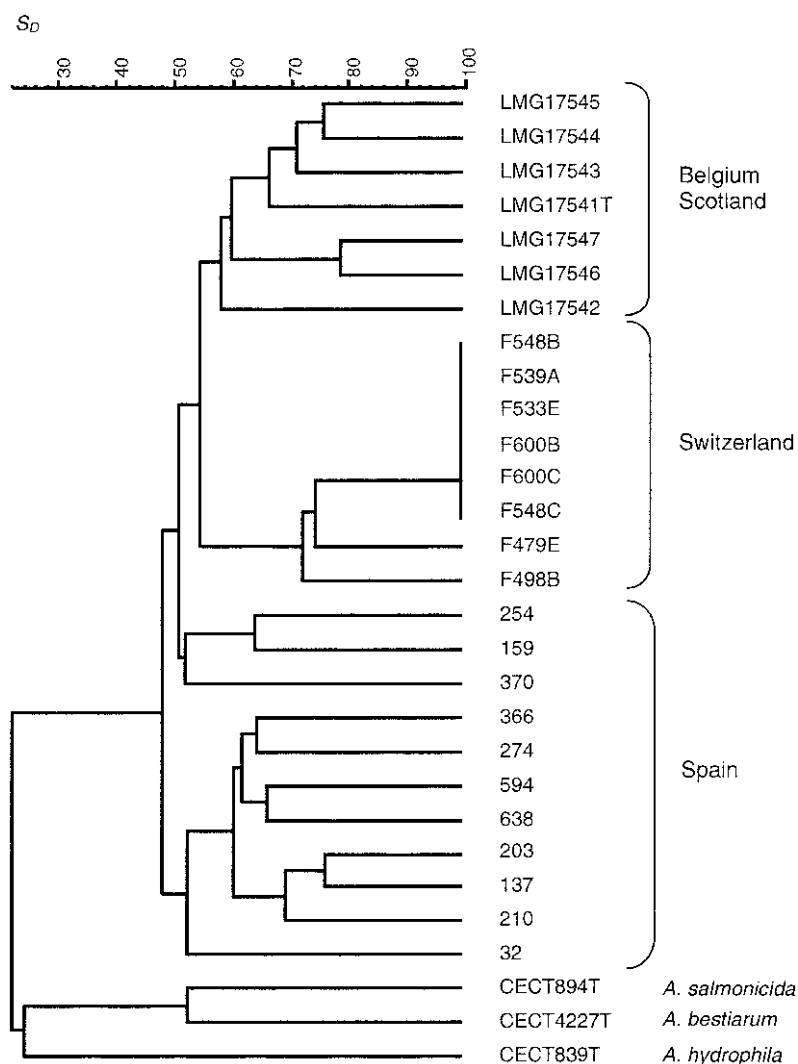


Figure 5. S_D /UPGMA cluster analysis based on the combined *Hinf*I-*Cfo*I, *Hinf*I-*Taq*I and *Alu*I ISR-RFLP, REP-PCR and ERIC-PCR produced patterns.

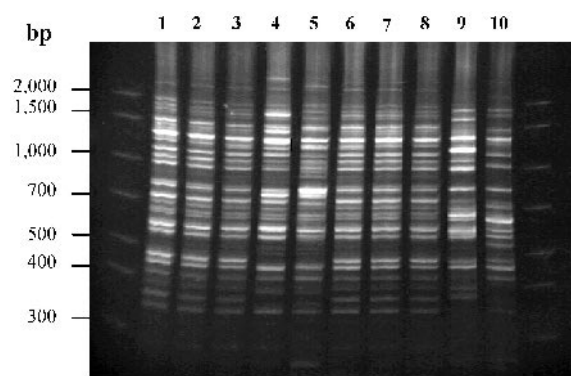


Figure 6. ERIC-PCR of *A. popoffii* strains. 1, F533E; 2, F600C; 3, F600B; 4, F498B; 5, F479E; 6, F548B; 7, F548C; 8, F539A; 9, 254; 10, 137

the thermocycler used (Tyler et al. 1997). We evaluated the reproducibility of these methods for three strains in duplicate, with the above mentioned parameters constant. When DNA extraction and PCR were performed in the same experiment and electrophoresis in the same gel for all strains, a correlation coefficient (r -value) of 0.92 to 0.96 was obtained for ERIC, and 0.90 to 0.95 for REP. DNA extraction and PCR done in the same experiments and duplicate strains electrophoresed in different gels lead to r -values of 0.78 to 0.86 for ERIC and 0.84 to 0.86 for REP. However, when DNA extraction, PCR and electrophoresis were performed in separate experiments, the r -values obtained were 0.50 to 0.67 for ERIC and 0.70 to 0.79 for REP. These results agree with those obtained by Vila et al. (1996) and Vinuesa et al. (1998) and indicate that the ERIC and REP methods are highly reproduc-

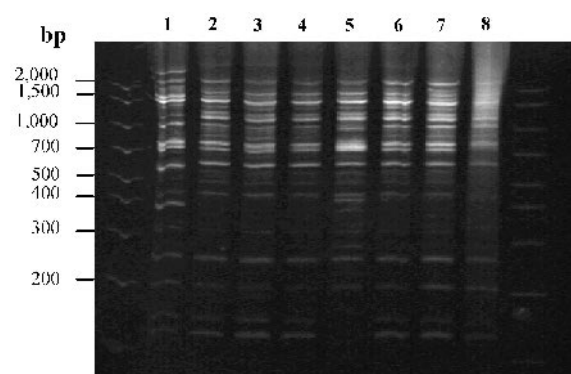


Figure 7. REP-PCR of *A. popoffii* strains. 1, F479E; 2, F600C; 3, F539A; 4, F533E; 5, F498B; 6, F548C; 7, F548B; 8, F600B.

ible if DNA extraction, PCR and electrophoresis are done simultaneously for the strains being compared.

Some studies have demonstrated that when different typing methods are combined, a higher resolution is obtained than when they are used individually (Vinuesa et al. 1998; Metha et al. 2001). Therefore, we evaluated the results obtained by pairing the different methods. Results obtained when combining ISR-RFLP and REP, ISR-RFLP and ERIC (data not shown) or ERIC and REP (Figure 4), produced a clear differentiation among all the strains. These results suggest that to avoid misinterpretations in epidemiological studies using either ISR-RFLP or REP, a combination of the methods is necessary. In addition, the ERIC and REP combination showed a tendency of the strains to cluster according to their geographical origin (Switzerland, Belgium, Scotland and Spain), although some freshwater isolates from Spain (254, 159 and 370) formed an intermediate group (Figure 4). When adding ISR-RFLP to the ERIC and REP combination each strain again had a unique profile (Figure 5). Furthermore, the overall topology of the dendrogram was maintained and reinforced both the tendency of strains to cluster according to their geographical origin and the genetic proximity of all *A. popoffii* strains. Isolates from Spain showed the highest intraspecific diversity. This could be attributed to the origins of the samples from Spain (sea water, rivers and reservoirs), as strains from the other geographical areas were all from freshwater (Huys et al. 1997; Demarta et al. 1999). Interestingly, two isolates (254 and 274) from the same river sample showed different ISR-RFLP, ERIC and REP types, indicating that different clones coexist in the same place.

According to our results, when using only one technique, ERIC-PCR was the most discriminatory, faster and easier to perform than ISR-RFLP and REP-PCR. The best combination of two methods found in our study was ERIC with REP because strains showed a tendency to group according to their geographical origin. However, this tendency was reinforced with the addition of ISR-RFLP.

Acknowledgements

This work was supported by the grants: FIS 99/0944 and FIS 96/0579 from the Spanish Ministry of Health, CIRIT (SGR 1999/00103), Generalitat Valenciana (GV98-21-05), Fundació Ciència i Salut and a fellowship from the Universitat Rovira i Virgili. We

would like to thank the Colección Española de Cultivos Tipo (CECT), the Belgium Co-ordinated Collection of Micro-organisms (LMG) and Dr. Demarta for kindly providing isolates.

References

- Borrell N., Acinas S.G., Figueras M.J. and Martínez-Murcia A. 1997. Identification of *Aeromonas* clinical isolates by restriction fragment length polymorphism of PCR-amplified 16S rRNA genes. *J. Clin. Microbiol.* 35: 1671–1674.
- Davin-Regli A., Bollet C., Chamorey E., Colonna D'istria V. and Cremieux A. 1998. A cluster cases of infections due to *Aeromonas hydrophila* revealed by combined RAPD and ERIC-PCR. *J. Med. Microbiol.* 47: 499–504.
- Demarta A., Tonolla M., Caminada A.-P., Ruggeri N. and Peduzzi R. 1999. Signature region within the 16S rDNA sequences of *Aeromonas popoffii*. *FEMS Microbiol. Lett.* 172: 239–246.
- Demarta A., Tonolla M., Caminada A., Beretta M. and Peduzzi R. 2000. Epidemiological relationships between *Aeromonas* strains isolated from symptomatic children and household environments as determined by ribotyping. *Eur. J. Epidemiol.* 16: 447–453.
- Figueras M.J., Soler L., Chacón M.R., Guarro J. and Martínez-Murcia A.J. 2000. Extended method for discrimination of *Aeromonas* spp. by 16S rDNA-RFLP. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 50: 2069–2073.
- Hulton C.S.J., Higgins C.F. and Sharp P.M. 1991. ERIC sequences: a novel family of repetitive elements in the genome of *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium* and other enterobacteria. *Mol. Microbiol.* 5: 825–834.
- Huys G., Kampfer P., Altwegg M., Kersters I., Lamb A., Coopman R. et al. 1997. *Aeromonas popoffii* sp nov., a mesophilic bacterium isolated from drinking water production plants and reservoirs. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 47: 1165–1171.
- Janda J.M. and Abbott S.L. 1998. Envolving concepts regarding the genus *Aeromonas*: An expanding panorama of species, disease presentation, and unanswered questions. *Clin. Infect. Dis.* 27: 332–344.
- Marshall S., Clark C.G., Wang G., Mulvey M., Kelly M.T. and Johnson W.M. 1999. Comparison of molecular methods for typing *Vibrio parahaemolyticus*. *J. Clin. Microbiol.* 37: 2473–2478.
- Martínez-Murcia A.J., Borrell N. and Figueras M.J. 2000. Typing of clinical and environmental *Aeromonas veronii* strains based on the 16S-23S rDNA spacers. *FEMS Immun. Med. Microbiol.* 28: 225–232.
- Maslow J.N., Mulligan M.E. and Arbeit R.D. 1993. Molecular epidemiology: application of contemporary techniques to the typing of microorganisms. *Clin. Infect. Dis.* 17: 153–164.
- Metha A., Leite J.R.P. and Rosato Y.B. 2001. Assessment of the genetic diversity of *Xylella fastidiosa* isolated from citrus in Brazil by PCR-RFLP of the 16S rDNA and 16S-23S intergenic spacer and rep-PCR fingerprinting. *Antonie van Leeuwenhoek.* 79: 53–59.
- Sander A., Ruess M., Bereswill S., Schuppler M. and Steinbrueckner B. 1998. Comparison of different DNA fingerprinting techniques for molecular typing of *Bartonella henselae* isolates. *J. Clin. Microbiol.* 36: 2973–2981.
- Soler L., Figueras M.J., Chacón M.R., Vila J., Marco F., Martínez-Murcia A.J. et al. 2002. Potential virulence and antimicrobial susceptibility of *Aeromonas popoffii* recovered from freshwater and seawater. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 32: 243–247.
- Talon D., Mulin B. and Thouverez M. 1998. Clonal identification of *Aeromonas hydrophila* strains using randomly amplified polymorphic DNA analysis. *Eur. J. Epidemiol.* 14: 305–310.
- Tyler K.D., Wang G., Tyler S.D. and Johnson W.M. 1997. Factors affecting reliability and reproducibility of amplification-based DNA fingerprinting of representative bacterial pathogens. *J. Clin. Microbiol.* 35: 339–346.
- Versalovic J., Koeuth T. and Lupski J.R. 1991. Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes. *Nucleic Acids Res.* 19: 6823–6831.
- Vila J., Marcos M.A. and Jimenez de Anta M.T. 1996. A comparative study of different PCR-based DNA fingerprinting techniques for typing of the *Acinetobacter calcoaceticus*-*A. baumannii* complex. *J. Med. Microbiol.* 44: 482–489.
- Vinuesa P., Redemaker J.L.W., Bruijn F.J. and Werner D. 1998. Genotypic characterization of *Bradyrhizobium* strains nodulating endemic woody legumes of the Canary Islands by PCR-restriction fragment length polymorphism analysis of genes encoding 16S rRNA (16S rDNA) and 16S-23S rDNA intergenic spacers, repetitive extragenic palindromic PCR genomic fingerprinting, and partial 16S rDNA sequencing. *Appl. Environ. Microbiol.* 64: 2096–2104.

Phenotypic characteristics and pathogenicity of *Aeromonas* genomospecies isolated from common carp (*Cyprinus carpio* L.)

A. Kozińska¹, M.J. Figueras², M.R. Chacon² and L. Soler²

¹Department of Fish Disease, National Veterinary Research Institute, Putawy, Poland and ²Departamento de Ciencias Médicas Básicas, Facultad de Medicina y Ciencias de la Salud, Universidad Rovira y Virgili, Reus, Spain

2002/134: received 25 March 2002, revised 19 August 2002 and accepted 6 September 2002

A. KOZIŃSKA, M.J. FIGUERAS, M.R. CHACON AND L. SOLER. 2002.

Aims: To evaluate the relationship between the genomospecies, phenotypic profile and pathogenicity for carp of 37 motile *Aeromonas* strains.

Methods and Results: *Aeromonas* strains were identified to genomospecies level by the 16S rDNA restriction fragment length polymorphism (RFLP) method and characterized phenotypically by the API 20E and API Zym systems and by conventional tube or plate methods. 16S rDNA RFLP analysis showed that the strains belonged to five species, *Aeromonas bestiarum* (5), *Aerom. salmonicida* (13), *Aerom. veronii* (11), *Aerom. sobria* (6) and *Aerom. encheleia* (2). Most strains of *Aerom. bestiarum* (80%) and *Aerom. salmonicida* (85%) could be separated by growth at 4 and 42°C, autoagglutination after boiling, reaction for lipase (C14) and naphthol-AS-BI-phosphohydrolase. All strains of *Aerom. veronii* corresponded to *Aerom. veronii* biotype *sobria* and could be separated from *Aerom. sobria* by citrate utilization, growth at 37 and 42°C, amygdalin and cellobiose fermentation. All strains of *Aerom. bestiarum* and most strains of *Aerom. salmonicida* (76.9%) and *Aerom. veronii* (63.6%) were pathogenic for carp.

Conclusions: The biochemical identification of carp *Aeromonas* strains is not entirely clear. Some association between *Aeromonas* species, phenotypic profile and specific disease signs was observed.

Significance and Impact of the Study: The results will be useful for ichthyopathology laboratories in the diagnosis of motile aeromonad septicemia in carp.

INTRODUCTION

Aeromonas spp. are ubiquitous waterborne bacteria responsible for a wide spectrum of diseases among poikilothermic and homoiothermic organisms including humans (Austin and Austin 1987; Khardori and Fainstein 1988).

Two phenotypically distinct groups are well known within the genus *Aeromonas*: (i) psychrophilic and non-motile *Aeromonas salmonicida*, which are relatively homologous phenotypically and (ii) mesophilic and motile aeromonads, which are heterologous. Within the latter group three phenospecies have been recognized, *Aerom. hydrophila*,

Aerom. caviae and *Aerom. sobria* (Popoff 1984). All these phenospecies are well known as fish pathogens (Toranzo *et al.* 1989; Candan *et al.* 1995; Kozińska 1996; Ogara *et al.* 1998; Austin and Austin 1999).

In recent years, the classification of the genus *Aeromonas* has undergone major changes. Extended DNA–DNA hybridization studies or other molecular techniques and improved phenotypic methods have resulted in the recognition of 14 well-defined genomic species within the genus (Altwegg and Geiss 1989; Janda 1991; Martinez-Murcia *et al.* 1992; Joseph and Carnahan 1994; Esteve *et al.* 1995b; Ali *et al.* 1996; Huys *et al.* 1997a, 1997b). These species are as follows: *Aerom. hydrophila*, *Aerom. bestiarum*, *Aerom. salmonicida* (comprising non-motile and psychrophilic as well as motile and mesophilic strains), *Aerom. caviae*, *Aerom.*

Correspondence to: A. Kozińska, National Veterinary Research Institute, Department of Fish Diseases, Al. Partyzantów 57, 24-100 Pulawy, Poland.

media, *Aerom. eucrenophila*, *Aerom. sobria*, *Aerom. veronii* (with two biotypes *sobria* and *veronii*), *Aerom. jandaei*, *Aerom. trota*, *Aerom. schubertii*, *Aerom. encheleia*, *Aerom. allosaccharophila* and *Aerom. popoffii*.

A wide range of *Aeromonas* species have been found in association with diseased or healthy fish (Martinez-Murcia *et al.* 1992; Sugita *et al.* 1994, 1995; Esteve *et al.* 1995a; Esteve *et al.* 1995b; Huys *et al.* 1996), but only some of them have been documented as fish pathogens (Torres *et al.* 1993; Esteve *et al.* 1995a). Since the changes in *Aeromonas* classification, the importance of recently described species in fish pathology is mostly unknown. DNA–DNA hybridization techniques are used to accurately identify isolates to the genomospecies level, but are not available in routine ichthyopathology laboratories. For this reason, most of these laboratories identify motile *Aeromonas* as members of the ‘*Aerom. hydrophila*’ complex, which includes *Aerom. hydrophila*, *Aerom. bestiarum* and the motile biogroup *Aerom. salmonicida*; the ‘*Aerom. caviae*’ complex, which includes *Aerom. caviae*, *Aerom. media* and *Aerom. eucrenophila*; and the ‘*Aerom. sobria*’ complex, which includes *Aerom. sobria*, *Aerom. veronii*, *Aerom. jandaei* and *Aerom. trota* (Janda 2001).

Recently, 16S rDNA restriction fragment length polymorphism (RFLP) methods have been developed for the identification of all known *Aeromonas* species (Borrel *et al.* 1997; Figueras *et al.* 2000). Moreover, several schemes for the phenotypic identification of *Aeromonas* genomospecies from clinical and environmental sources have been proposed (Altwegg *et al.* 1990; Abbot *et al.* 1992; Oakey *et al.* 1996; Brunner and Stolle 1997; Borrel *et al.* 1998). The identification of some of the genomic species mentioned above is still difficult because of some discrepancies between the DNA homology and phenotypic characters of various *Aeromonas* species.

There has been only a limited amount of investigation into the association of specific biochemical characters with specific *Aeromonas* species originating from fish (Austin *et al.* 1989; Esteve 1995; Noterdaeme *et al.* 1996; Carson *et al.* 2001; González *et al.* 2001). In the present study, numerous strains from common carp (*Cyprinus carpio* L.) were identified by 16S rDNA RFLP analysis and characterized phenotypically. The relationship between the genomospecies, phenotypic profile and pathogenicity for carp of these strains was evaluated.

MATERIALS AND METHODS

Bacterial strains

Thirty-four strains of motile aeromonads isolated from healthy or diseased carp and two strains from tank water were used in this study. All strains were obtained from carp farms in Poland during the last 10 years. Bacteria were

isolated by inoculating plates of R–S agar (Shotts and Rimler 1973) with fish skin and kidney or water samples and incubating the cultures at 28°C for 24 h. Yellow colonies were then selected and identified to the genus *Aeromonas* with a panel of tests according to Popoff (1984). All strains were Gram-negative rods, positive for oxidase, catalase, motility, glucose oxidation/fermentation (O/F test), 0/129 resistance and growth in nutrient broth without but not with 6% NaCl. Additionally, one strain previously identified biochemically as non-pigmented *Chromobacterium violaceum*-like (Kozłńska and Antychowicz 1996) was used.

Identification to the genomospecies level

All strains were identified by the 16S rDNA RFLP technique as previously described (Borrel *et al.* 1997; Figueras *et al.* 2000). In brief, the method consists of the digestion of the complete polymerase chain reaction-amplified 16S rDNA gene using two endonucleases (*AluI* and *MboI*) simultaneously, which enables the identification of *Aerom. hydrophila*, *Aerom. caviae*, *Aerom. media*, *Aerom. veronii*, *Aerom. jandaei*, *Aerom. eucrenophila*, *Aerom. sobria*, *Aerom. trota*, *Aerom. allosaccharophila* and *Aerom. schubertii*. However, *Aerom. bestiarum*, *Aerom. salmonicida*, *Aerom. popoffii* and *Aerom. encheleia* exhibit the same RFLP pattern after this digestion (Borrel *et al.* 1997). To identify *Aerom. popoffii* and *Aerom. encheleia*, further digestion with the enzyme *NarI* followed by *HaeIII* and *AluNI* is necessary while for *Aerom. bestiarum* and *Aerom. salmonicida* *NarI* followed by *PstI* is required (Figueras *et al.* 2000).

Extended phenotypic studies

All strains were tested for 20 characteristics by the API 20E system, 19 characteristics by the API Zym system (bio Mérieux, MarcyL’Etoile, France) and 26 other phenotypic characters. Selected biochemical tests were carried out according to Abbot *et al.* (1992) and Carson *et al.* (2001) enabling discrimination of *Aeromonas* genomospecies. These tests included gas production from glucose, aesculin hydrolysis, salicin fermentation, gluconate oxidation, elastase production, H₂S production from cysteine, DL-lactate utilization, phenylalanine deaminase, acid production from D-mannose, cellobiose, glycerol, lactose, resistance to cephalothin and ampicillin. Moreover, all strains were characterized for the fermentation of xylose, trehalose, maltose, fructose and raffinose, growth at 4, 37 and 42°C, agglutination in brain heart infusion (BHI) broth before and after boiling (1 h at 100°C) and haemolysis activity (on trypticase soy broth supplemented with 5% (v/v) horse blood). Additionally, ornithine decarboxylase, lysine decarboxylase, arginine dihydrolase, citrate utilization (Simmons) and fermentation of D-mannitol and L-arabinose were

performed using conventional tube tests to confirm the results obtained by the API 20E tests. Bacterial strains were incubated at 27°C and the results read off after 24 h for API 20E, API Zym, haemolysis and autoagglutination or after 2–7 d for the remaining tests.

Pathogenicity assays

Common carp (*C. carpio* L.) of 150 g average weight were obtained from a fish farm in Poland and certified as disease free. The fish were maintained in 100-l aquaria with aerated fresh water at 16°C for 2 weeks and fed commercial pellets (Carp K30; Aqua Pasze, Olsztyn, Poland) in order to adapt to laboratory conditions. All fish were anaesthetized with MS-222 (Sigma, St. Louis, MO, USA) (80 mg l⁻¹) and then injected subcutaneously with 0.1 ml of a suspension containing 10⁶ bacterial cells in phosphate-buffered saline (PBS). Ten fish were injected per strain and ten other fish were injected with 0.1 ml of sterile PBS as controls. The fish were then replaced into the aquaria and held under the same conditions as before injection. The morbidity and death of the fish were monitored daily for 7 d and the virulence level of the strains estimated and grouped as follows: more than six fish with disease symptoms and mortality of five to 10 fish (strongly virulent); more than six fish with disease symptoms and mortality of one to four fish (virulent); more than four fish with disease symptoms and without mortality (weakly virulent) and one to four fish with slight pathological signs and without mortality or neither pathological signs nor mortality noted (avirulent). Recently dead fish and any survivors after 7 d were tested bacteriologically for the presence of injected bacterium in damaged fish tissues.

RESULTS

Most *Aeromonas* strains (92%) could be subdivided into two phenogroups (phenospecies) according to Popoff's criteria. The first group, '*Aerom. hydrophila*' complex, comprised 14 strains which were positive for arabinose and salicin

fermentation and aesculin hydrolysis. The second group, '*Aerom. sobria*' complex, comprised 19 strains which were negative for the former two tests and revealed variable results for aesculin hydrolysis. Three remaining strains of *Aeromonas* spp. could not be classified to phenospecies by these criteria.

16S rDNA restriction fragment length polymorphism analysis

Of 14 strains from the phenotypic '*Aerom. hydrophila*' complex, 10 were assigned to *Aerom. salmonicida* and four to *Aerom. bestiarum* by 16S rDNA RFLP analysis. No strain was classified as *Aerom. hydrophila* (*sensu stricto*). Of 19 phenotypic '*Aerom. sobria*' strains, six exhibited the RFLP pattern of *Aerom. sobria* (*sensu stricto*), nine the RFLP pattern of *Aerom. veronii* and two the RFLP pattern of *Aerom. encheleia* and *Aerom. salmonicida*. Three different *Aeromonas* spp. strains were identified as *Aerom. bestiarum*, *Aerom. salmonicida* and *Aerom. veronii*. One strain, previously identified phenotypically as *Ch. violaceum*-like, showed the RFLP pattern of *Aerom. veronii* (Table 1).

Phenotypic analysis

All strains tested were invariably positive for maltose and fructose fermentation and resistant to ampicillin and 0/129. All strains were positive, by API 20E, for ortho-nitro-phenyl-galactosidase (ONPG), gelatinase and D-glucose and, by API Zym, for alkaline phosphatase, esterase, esterase lipase, leucine arylamidase and acid phosphatase. Moreover, D-mannitol fermentation and arginine dihydrolase were positive for each strain by API 20E as well as conventional tube tests. Invariably, negative results were observed for hydrogen sulphide, urease, inositol (all by API 20E), α -chymotrypsin, α -galactosidase, β -glucuronidase, α -mannosidase, α -fucosidase (all by API Zym), ornithine decarboxylase and lactose fermentation. Only one strain (*Aerom. salmonicida*) was negative for indole production (by API 20E) and positive for the fermentation of

Phenospecies	% identity by 16S rDNA RFLP				
	<i>Aerom. bestiarum</i>	<i>Aerom. salmonicida</i>	<i>Aerom. sobria</i>	<i>Aerom. veronii</i>	<i>Aerom. encheleia</i>
<i>Aerom. hydrophila</i>	80.0 (4)	76.9 (10)			
<i>Aerom. sobria</i>		15.4 (2)	100 (6)	81.8 (9)	100.0 (2)
<i>Aeromonas</i> spp.	20.0 (1)	7.7 (1)		9.1 (1)	
<i>Chromobacterium violaceum</i> -like				9.1 (1)	

Table 1 Phenotypic and genotypic identification of strains used in this study

Numbers in parentheses = number of strains.

RFLP, Restriction fragment length polymorphism.

Table 2 Phenotypic properties for the separation of motile *Aeromonas* species isolated from carp

Character	% of positive strains				
	<i>Aerom. bestiarum</i> (5)*	<i>Aerom. salmonicida</i> (13)	<i>Aerom. veronii</i> (11)	<i>Aerom. sobria</i> (6)	<i>Aerom. encheleia</i> (2)
API 20E					
Citrate utilization	0	46	64	17	0
Tryptophan deaminase	0	0	9	0	0
Voges-Proskauer reaction	100	92	56	50	0
Sorbitol	40	62	0	50	0
Rhamnose	60	62	0	0	0
Amygdalin	80	92	0	100	100
Arabinose	100	69	0	17	0
Nitrate reduction to nitrite	100	100	91	100	100
Nitrite reduction	0	0	9	0	0
API ZYM					
Lipase (C14)	20	92	64 (w)	67 (w)	0
Trypsin	80	92	18	17	100
Naphthol-AS-BI-phosphohydrolase	0	77	100	100	50
α -glucosidase	20	15	18	67	0
β -glucosidase	80	85	0	0	0
Other characters					
Acid production from:					
salicin	60	69	0	17	0
cellobiose	60	62	18	83	50
Aesculin hydrolysis	100	69	0	33	50
Elastase production	80	77	0	0	0
β -haemolysis (after 24 h)	100	100	73	33	100
Growth at (°C):					
4	100	23	36	0	0
37	100	100	91	17	100
42	80	23	73	17	0
Autoagglutination	0	15	45	17	0
Agglutination after boiling	20	69	100	83	100
Resistance to cephalothin	100	92	9	17	100

*Number of strains.

w, Weakly positive reaction.

xylose and two strains (one each of *Aerom. bestiarum* and *Aerom. veronii*) were negative for the fermentation of trehalose.

The *Aeromonas* strains tested revealed variable results for 39 tests. Of these, 25 tests (Table 2) were found to be useful in separating motile *Aeromonas* genomospecies. Strains belonging to both *Aerom. bestiarum* and *Aerom. salmonicida* could be differentiated from remaining genomospecies on the basis of the reactions for rhamnose, arabinose, salicin, elastase and β -glucosidase. At least three of these tests were positive for individual strains of *Aerom. bestiarum* or *Aerom. salmonicida*. A few other tests could be useful to separate *Aerom. bestiarum* and *Aerom. salmonicida*. Most strains of the former species, as opposed to the latter, were negative for lipase, naphthol-AS-BI-phospho-

hydrolase and agglutination after boiling but positive for growth ability at 4 and 42°C.

Most strains of *Aerom. veronii* differed from *Aerom. sobria* and *Aerom. encheleia* by positive reactions for citrate utilization (by both API 20E and tube methods), Voges-Proskauer test, growth at 42°C and a failure to ferment amygdalin and cellobiose. Most strains of *Aerom. sobria* differed from those of *Aerom. encheleia* by positive reactions for lipase, α -glucosidase and negative results for trypsin, β -haemolysis, growth at 37°C and resistance to cephalothin.

The strain *Aerom. veronii*, previously identified as *Ch. violaceum*, differed distinctly from other *Aeromonas* species. This strain was positive for tryptophan deaminase and negative for nitrate reduction to nitrite but positive for nitrite reduction (by API 20E tests).

Table 3 Virulence for common carp of motile *Aeromonas* species

Virulence level	% of strains with respective virulence level				
	<i>Aerom. bestiarum</i>	<i>Aerom. salmonicida</i>	<i>Aerom. veronii</i>	<i>Aerom. sobria</i>	<i>Aerom. encheleia</i>
Strongly virulent	20 (1)	31 (4)	9 (1)		
Virulent	60 (3)	31 (4)	55 (6)		
Weakly virulent	20 (1)	15 (2)			
Avirulent		23 (3)	36 (4)	100 (6)	100 (2)

Numbers in parentheses = number of strains.

Pathogenicity for carp

There was no death or sign of disease in fish injected with sterile PBS. Table 3 presents the virulence level of *Aeromonas* strains tested in this study. Four strains of *Aerom. bestiarum* were classified as strongly virulent or virulent for carp. These strains caused motile aeromonad septicaemia with intensive external signs including haemorrhages, necrosis and ulcers. Between 10 and 80% of the fish died during the experiment, depending on the infection strain used. Only one *Aerom. bestiarum* strain presented weak virulence for carp and caused no mortality. There were differences in the pathogenicity among individual strains of *Aerom. salmonicida* and *Aerom. veronii*. Ten strains (from a total of 13 tested) of *Aerom. salmonicida* were pathogenic for carp with various levels of virulence. The symptoms caused by these pathogenic strains were similar to those observed in fish infected with *Aerom. bestiarum*. The *Aerom. veronii* strain previously identified as *Ch. violaceum* was classified as strongly virulent for carp. It caused intensive external as well as internal lesions which presented ascitic fluid in the peritoneal cavity and haemorrhages in the kidney and liver with 100% mortality. Six other strains of this species were classified as virulent and four as avirulent. The symptoms caused by pathogenic strains of *Aerom. veronii* were usually similar to those observed in fish challenged with *Aerom. bestiarum* but, in some fish, there was also a swelling of infected areas and accumulation of red-tinged ascitic fluid in subcutaneous tissue. Pure cultures of injected bacteria were obtained from samples of recently dead fish and also from the damaged skin and kidney of survivors (after 7 d). Of six *Aerom. sobria* strains, only one caused slight clinical signs with local damage of skin in 30% of fish. *Aeromonas encheleia* strains caused neither signs of disease nor mortality.

Strongly virulent, virulent and these avirulent strains formed separate phenotypic groups within *Aerom. salmonicida* as shown in Table 4. Similarly, all virulent strains differed phenotypically from avirulent strains of *Aerom. veronii* (Table 5). However, the strongly virulent strain of *Aerom. veronii* differed markedly from the remaining pathogenic strains of the species.

Table 4 Phenotypic differences among *Aeromonas salmonicida* strains showing different virulence levels

Character	Strains		
	Strongly virulent (4) and virulent (4)	Weakly virulent (2)	Avirulent (3)
Acid from:			
rhamnose	+	d	–
arabinose	+	d	[–]
salicin	+	d	–
Aesculin hydrolysis	+	d	–
Elastase production	+	d	[–]

+, All strains positive; d, differences among strains, one strain positive and another negative; –, all strains negative; [–], two strains (67%) negative and one strain (33%) positive. Numbers in parentheses = number of strains.

Table 5 Phenotypic differences among virulent and avirulent *Aeromonas veronii* strains

Character	Strains	
	Virulent (6)	Avirulent (4)
Voges–Proskauer reaction	+	–
Growth at (°C):		
4	–	+
42	+	[–]
Autoagglutination	–	+

+, All strains positive; –, all strains negative; [–], three strains (75%) negative and one strain (25%) positive. Numbers in parentheses = number of strains.

DISCUSSION

The taxonomy of the genus *Aeromonas* has been extended in recent years because of the description of new mesophilic species. These species can be accurately identified by molecular techniques but biochemical systems for the discrimination of genomospecies have recently been developed. Some of these biochemical schemes have been used mainly for the identification of clinical and environmental isolates and have enabled most of the strains (90–99%) to be identified (Abbot *et al.* 1992; Janda *et al.* 1996; Brunner and Stolle 1997; Borrel *et al.* 1998). The protocol described by Carson *et al.* (2001) was useful in the discrimination of numerous strains from farmed and wild salmonid fish. To the authors' knowledge, the present study is the first investigation concerning the phenotypic differentiation of *Aeromonas* carp isolates accurately identified by 16S rDNA RFLP analysis.

Abbot *et al.* (1992) suggested that elastase production, fermentation of D-sorbitol, salicin and lactose are specifically

positive for *Aerom. salmonicida* and D-rhamnose for *Aerom. bestiarum* (formerly HG2). Most strains of *Aerom. bestiarum* examined by Carson *et al.* (2001) were positive for rhamnose and salicin fermentation. In our investigations, most *Aerom. salmonicida* as well as *Aerom. bestiarum* isolates were positive for salicin, rhamnose and elastase and all were negative for lactose. These results are in agreement with those obtained by Noterdaeme *et al.* (1996). Thus, the discrimination of *Aerom. bestiarum* and *Aerom. salmonicida* isolates from carp was very difficult if based on these characteristics. A similar problem has been reported by Figueras *et al.* (2000). These authors identified unequivocally only 18% of *Aerom. bestiarum* and *Aerom. salmonicida* when biochemical tests were applied. Other properties seem to be helpful in separating carp strains of these species. In this study, we found that growth at 4 and 42°C was specific for *Aerom. bestiarum* and positive reactions for lipase (C14), naphthol-AS-BI-phosphohydrolase and agglutination after boiling were specific for most *Aerom. salmonicida* strains. These tests were still not sufficient to correctly identify all these strains; the differentiation of one *Aerom. bestiarum* and two *Aerom. salmonicida* strains was very difficult because of phenotypic homogeneity across both species. This aspect is common to other strains and is currently under investigation (M.J. Figueras, personal communication).

The phenotypic separation of the species *Aerom. sobria*, *Aerom. veronii* and *Aerom. encheleia* was also problematic because of large variations within individual species. The reported biochemical profile of *Aerom. sobria* is usually negative for arginine dihydrolase and the Voges-Proskauer reaction (Abbot *et al.* 1992; Noterdaeme *et al.* 1996; Borrel *et al.* 1998). All *Aerom. sobria* strains tested in this study were arginine positive as previously found by Carson *et al.* (2001). All strains of *Aerom. veronii* corresponded phenotypically to *Aerom. veronii* biotype *sobria* according to the profile proposed by Hickman-Brenner *et al.* (1987). They were positive for arginine and negative for ornithine and aesculin.

In our study, *Aerom. veronii* strains could be separated from *Aerom. sobria* and *Aerom. encheleia* by the ability to utilize citrate, growth at 37 and 42°C, negative reactions for amygdaline and cellobiose fermentation. All *Aerom. sobria* strains, in disagreement with the results of Carson *et al.* (2001), were resistant to ampicillin.

Two strains of *Aerom. encheleia* corresponded biochemically to the species described by Esteve *et al.* (1995b) except for the fermentation of rhamnose and lysine decarboxylase. The strains tested in our study were negative for the former and positive for the latter. The separation of *Aerom. encheleia* and *Aerom. sobria* strains was possible by lipase, α -glucosidase (negative for the former species and positive for the latter), β -haemolysis, growth at 37°C and resistance to cephalothin (again positive for the former species and negative for the latter).

Generally, members of the genus *Aeromonas* are considered positive for nitrate reduction to nitrite but negative for nitrite reduction (Popoff 1984). Our study revealed that the strain of *Aerom. veronii* previously identified as *Ch. violaceum* reduced nitrite by the API 20E test.

In most pathology studies, motile aeromonads isolated from fish have been assigned to Popoff's species or simply reported as motile *Aeromonas* or '*Aerom. hydrophila*' complex (Santos *et al.* 1988; Del Corral *et al.* 1990; Chabot and Thune 1991; Kozińska 1996). Other documented species pathogenic for fish are *Aerom. hydrophila*, *Aerom. jandaei* and *Aerom. veronii* (Esteve *et al.* 1995a; Austin and Austin 1999; Guzman-Murillo *et al.* 2000). *Aeromonas bestiarum* (formerly HG2 *Aerom. hydrophila*) has been recovered from diseased fish (Huys *et al.* 1996). However, negligible information is available about its pathogenicity. There is also no information about the pathogenicity for fish of mesophilic and motile strains of *Aerom. salmonicida* (formerly HG3 *Aerom. hydrophila*). This is the first report to document the pathogenicity of these new species for fish. All *Aerom. bestiarum* and most *Aerom. salmonicida* strains (motile) were isolated from diseased carp and, after experimental infection, caused the disease in fish.

Earlier reports indicated that *Aerom. sobria* strains can be pathogenic for carp (Kozińska 1996) as well as for other fish species (Santos *et al.* 1988; Toranzo *et al.* 1989). The present study showed that all pathogenic strains from the phenotypic '*Aerom. sobria*' group belong, in fact, to *Aerom. veronii*. *Aeromonas sobria* (*sensu stricto*) appeared to be non-pathogenic for carp.

It is important in pathology studies to differentiate the pathogenic from the non-pathogenic strains. The results of our study showed that the taxonomic designation of some species, such as *Aerom. salmonicida* and *Aerom. veronii*, is insufficient to determine their pathogenicity for carp. It was found in previous studies that pathogenic strains of motile aeromonads differ from non-pathogenic strains in their haemolytic, proteolytic and cytotoxic activity, presence of fimbriae and normal serum resistance (Leung *et al.* 1994; Kozińska 1996; Sopińska *et al.* 1997). The present study showed that some other biochemical or cultural properties can be helpful to separate pathogenic and non-pathogenic strains within individual *Aeromonas* species. Only one highly virulent strain of *Aerom. veronii* differed markedly from the remaining pathogenic strains of the species. The strain may be considered as atypical because its biochemical profile is not quite compatible with the genus *Aeromonas* (Kozińska and Antychowicz 1996). Further studies are needed to find an explanation for this.

In conclusion, it seems that biochemical protocols proposed previously to differentiate *Aeromonas* genomospecies will require further revision because of the diversity of these organisms. While some schemes can correctly identify

aeromonads from human specimens and the environment, their use in the detection of species of ichthyopathological importance is limited. Despite some phenotypic differences between *Aeromonas* species isolated from carp, their identification by biochemical methods is not entirely clear and must be regarded as only presumptive. At least three *Aeromonas* species are virulent for carp. Some differences in the lesions observed in infected fish suggest the association of individual species with specific disease symptoms. Further studies are needed to confirm this suggestion.

REFERENCES

- Abbott, S.L., Cheung, W.K.W., Kroske-Bystrom, S., Malekzadeh, T. and Janda, J.M. (1992) Identification of *Aeromonas* strains to the genospecies level in the clinical laboratory. *Journal of Clinical Microbiology* **30**, 1262–1266.
- Ali, A., Carnahan, A.M., Altwegg, M., Lüthy-Hottenstein, J. and Joseph, S.W. (1996) *Aeromonas bestiarum* sp. nov. (formerly genospecies DNA group 2 *A. hydrophila*), a new species isolated from non-human sources. *Medical Microbiological Letters* **5**, 156.
- Altwegg, M. and Geiss, H.K. (1989) *Aeromonas* as a human pathogen. *Critical Reviews in Microbiology* **16**, 253–286.
- Altwegg, M., Steigerwalt, A.G., Altwegg-Bissig, R., Lüthy-Hottenstein, J. and Brenner, D.J. (1990) Biochemical identification of *Aeromonas* genospecies isolated from humans. *Journal of Clinical Microbiology* **28**, 258–264.
- Austin, B. and Austin, D.A. (1987) Motile aeromonads In *Bacterial Fish Pathogens*, 1st edn. pp. 171–177. Chichester, UK: Ellis Horwood.
- Austin, B. and Austin, D.A. (1999) *Bacterial Fish Pathogens*, 3th edn. Chichester, UK: Springer-Praxis.
- Austin, D.A., McIntosh, D. and Austin, B. (1989) Taxonomy of fish associated *Aeromonas* spp., with the description of *Aeromonas salmonicida* subsp. *smithia* subsp. nov. *Systematic and Applied Microbiology* **11**, 277–290.
- Borrel, N., Acinas, S.G., Figueras, M.J. and Martinez-Murcia, A.J. (1997) Identification of *Aeromonas* clinical isolates by restriction fragment length polymorphism of PCR-amplified 16S rRNA genes. *Journal of Clinical Microbiology* **35**, 1671–1674.
- Borrell, N., Figueras, M.J. and Guarro, J. (1998) Phenotypic identification of *Aeromonas* genospecies from clinical and environmental sources. *Canadian Journal of Microbiology* **44**, 103–108.
- Brunner, B. and Stolle, A. (1997) Computer-aided assignment of motile *Aeromonas* strains to genospecies level by standard biochemical tests. *Journal of Veterinary Medicine B* **44**, 221–233.
- Candan, A., Kücük, M.A. and Karatas, S. (1995) Motile aeromonad septicemia in *Salmo salar* cultured in the black sea in Turkey. *Bulletin of the European Association of Fish Pathologists* **15**, 195–196.
- Carson, J., Wagner, T., Wilson, T. and Donachie, L. (2001) Miniaturized tests for computer-assisted identification of motile *Aeromonas* species with an improved probability matrix. *Journal of Applied Microbiology* **90**, 190–200.
- Chabot, D.J. and Thune, R.L. (1991) Proteases of the *Aeromonas hydrophila* complex: identification, characterization and relation to virulence in channel catfish, *Ictalurus punctatus* (Rafinesque). *Journal of Fish Diseases* **14**, 171–183.
- Del Corral, F., Shotts, E.B. Jr and Brown, J. (1990) Adherence, haemagglutination and cell surface characteristics of motile aeromonads virulent for fish. *Journal of Fish Diseases* **13**, 255–268.
- Esteve, C. (1995) Numerical taxonomy of *Aeromonadaceae* and *Vibrionaceae* associated with reared fish and surrounding fresh and brackish water. *Systematic and Applied Microbiology* **18**, 391–402.
- Esteve, C., Amaro, C., Garay, E., Santos, Y. and Toranzo, A.E. (1995a) Pathogenicity of live bacteria and extracellular products of motile *Aeromonas* isolated from eels. *Journal of Applied Bacteriology* **78**, 555–562.
- Esteve, C., Gutiérrez, M.C. and Ventosa, A. (1995b) *Aeromonas encheleia* sp. nov., isolated from European eels. *International Journal of Systematic Bacteriology* **45**, 462–466.
- Figueras, M.J., Soler, L., Chacon, M.R., Guarro, J. and Martinez-Murcia, A.J. (2000) Extended method for discrimination of *Aeromonas* spp. by 16S rDNA RFLP analysis. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **50**, 2069–2073.
- González, C.J., Santos, J.A., Garcia-Lopez, M.-L., González, N. and Otero, A. (2001) Mesophilic aeromonads in wild and aquacultured freshwater fish. *Journal of Food Protection* **64**, 687–691.
- Guzman-Murillo, M.A., Merino-Contreras, M.L. and Ascencio, F. (2000) Interaction between *Aeromonas veronii* and epithelial cells of spotted sand bass (*Paralabrax maculatofasciatus*) in culture. *Journal of Applied Microbiology* **88**, 897–906.
- Hickman-Brenner, F.W., MacDonald, K.L., Steigerwalt, A.G., Fanning, G.R., Brenner, D.J. and Farmer, J.J. (1987) *Aeromonas veronii* a new ornithine decarboxylase-positive species that may cause diarrhea. *Journal of Clinical Microbiology* **25**, 900–906.
- Huys, G., Coopman, R., Janssen, P. and Kersters, K. (1996) High-resolution genotypic analysis of the genus *Aeromonas* by AFLP fingerprinting. *International Journal of Systematic Bacteriology* **46**, 572–580.
- Huys, G., Kämpfer, P., Altwegg, M., Coopman, R., Janssen, P., Gillis, M. and Kersters, K. (1997a) Inclusion of *Aeromonas* DNA hybridization group 11 in *Aeromonas encheleia* and extended descriptions of the species *Aeromonas eucrenophila* and *A. encheleia*. *International Journal of Systematic Bacteriology* **47**, 1157–1164.
- Huys, G., Kämpfer, P., Altwegg, M., Kersters, I., Lamb, A., Coopman, R., Lüthy-Hottenstein, J., Vancanneyt, M., Janssen, P. and Kersters, K. (1997b) *Aeromonas popoffii* sp. nov., a mesophilic bacterium isolated from drinking water production plants and reservoirs. *International Journal of Systematic Bacteriology* **47**, 1165–1171.
- Janda, J.M. (1991) Recent advances in the study of the taxonomy, pathogenicity and infectious syndromes associated with the genus *Aeromonas*. *Clinical Microbiology Reviews* **4**, 397–410.
- Janda, J.M. (2001) *Aeromonas* and *Plesiomonas*. In *Molecular Medical Microbiology* ed. Sussman, M. pp. 1237–1270. San Diego, USA: Academic Press.
- Janda, J.M., Abbott, S.L., Khashe, S., Kellogg, G.H. and Shimada, T. (1996) Further studies on biochemical characteristics and serologic properties of the genus *Aeromonas*. *Journal of Clinical Microbiology* **34**, 1930–1933.
- Joseph, S. and Carnahan, A. (1994) The isolation, identification and systematics of the motile *Aeromonas* species. *Annual Review of Fish Diseases* **4**, 315–343.

- Khardori, N. and Fainstein, V. (1988) *Aeromonas* and *Plesiomonas* as etiological agents. *Annual Review of Microbiology* **42**, 395–419.
- Kozińska, A. (1996) *Wskaźniki patogenności Aeromonas hydrophila, Aeromonas caviae i Aeromonas sobria*. Praca doktorska. Puławy: Państwowy Instytut Weterynaryjny.
- Kozińska, A. and Antychowicz, J. (1996) Izolacja nowej bakterii patogennej dla karpia. *Medycyna Weterynaryjna* **52**, 657–660.
- Leung, I.V., Yeep, I.V., Lam, T.I. and Sin, I.M. (1994) Serum resistance as a good indicator for virulence in *Aeromonas hydrophila* strains isolated from diseased fish in South-East Asia. *Journal of Fish Diseases* **18**, 511–518.
- Martinez-Murcia, A.J., Esteve, C., Garay, E. and Collins, M.D. (1992) *Aeromonas allosaccharophila* sp. nov., a new mesophilic member of the genus *Aeromonas*. *FEMS Microbiology Letters* **91**, 199–206.
- Noterdaeme, L., Bigawa, S., Steigerwaldt, A.G., Brenner, D.J. and Ollevier, F. (1996) Numerical taxonomy and biochemical identification of fish associated motile *Aeromonas* spp. *Systematic and Applied Microbiology* **19**, 624–633.
- Oakey, H.J., Ellis, J.T. and Gibson, L.F. (1996) A biochemical protocol for the differentiation of current genomospecies of *Aeromonas*. *Zentralblatt für Bacteriologie* **284**, 32–46.
- Ogara, W.O., Mbuthia, P.G., Kaburia, H.F.A., Sorum, H., Kagunya, D.K., Nduthu, D.I. and Colquhoun, D. (1998) Motile aeromonads associated with rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) mortality in Kenya. *Bulletin of the European Association of Fish Pathologists* **18**, 7–9.
- Popoff, M. (1984) Genus III *Aeromonas*. In *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, Vol. 1. ed. Krieg, N.R. and Holt, J.G. pp. 545–548. Baltimore, MD, USA: Williams & Wilkins.
- Santos, Y., Toramnzo, A.E., Barja, J.L., Nieto, T.P. and Villa, G. (1988) Virulence properties and enterotoxin production of *Aeromonas* strains isolated from fish. *Infection and Immunity* **56**, 3285–3293.
- Shotts, E.B. Jr and Rimler, R. (1973) Medium for the isolation of *Aeromonas hydrophila*. *Applied Microbiology* **26**, 550–553.
- Sopińska, A., Grochola, A. and Guz, L. (1997) Badanie zależności pomiędzy patogennością bakterii z rodzaju *Aeromonas* dla karpia a ich cytotoksycznością. *Medycyna Weterynaryjna* **53**, 394–397.
- Sugita, H., Nakamura, T., Tanaka, K. and Deguchi, Y. (1994) Identification of *Aeromonas* species isolated from freshwater fish with the microplate hybridization method. *Applied and Environmental Microbiology* **60**, 3036–3038.
- Sugita, H., Tanaka, K., Yoshinami, M. and Deguchi, Y. (1995) Distribution of *Aeromonas* species in the intestinal tracts of river fish. *Applied and Environmental Microbiology* **61**, 4128–4130.
- Toranzo, A.E., Barja, A.M., Romalde, J.L. and Hetrick, F.M. (1989) Association of *Aeromonas sobria* with mortalities of adult gizzard shad, *Dorosoma cepedianum* Lesuer. *Journal of Fish Diseases* **12**, 439–448.
- Torres, J.L., Tajima, K. and Shariff, M. (1993) Numerical taxonomy and virulence screening of *Aeromonas* spp. isolated from healthy and epizootic ulcerative syndrome-positive fishes. *Asian Fisheries Sciences* **6**, 11–16.

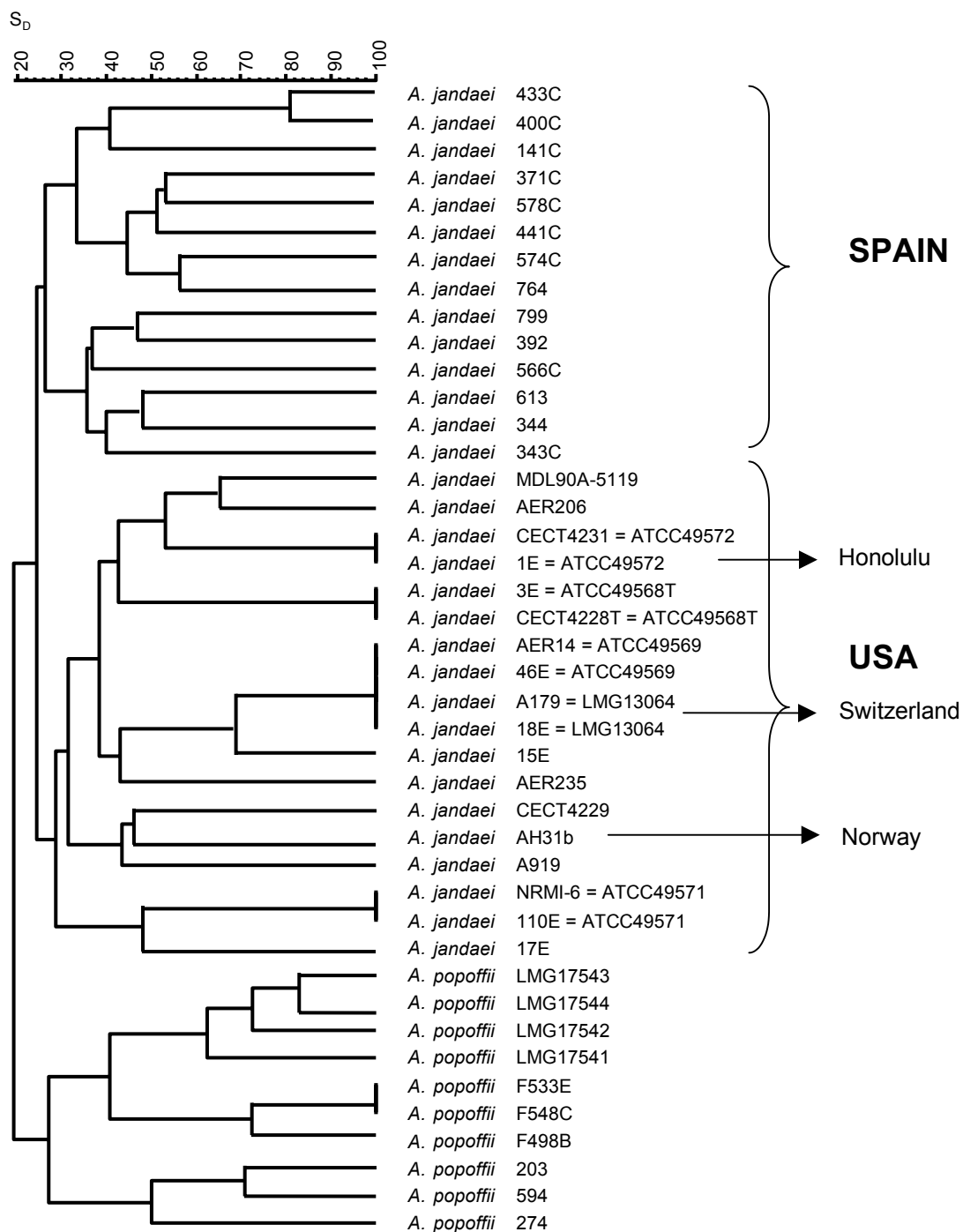


Figure 1. S_D /UPGMA cluster analysis based on ERIC-PCR patterns

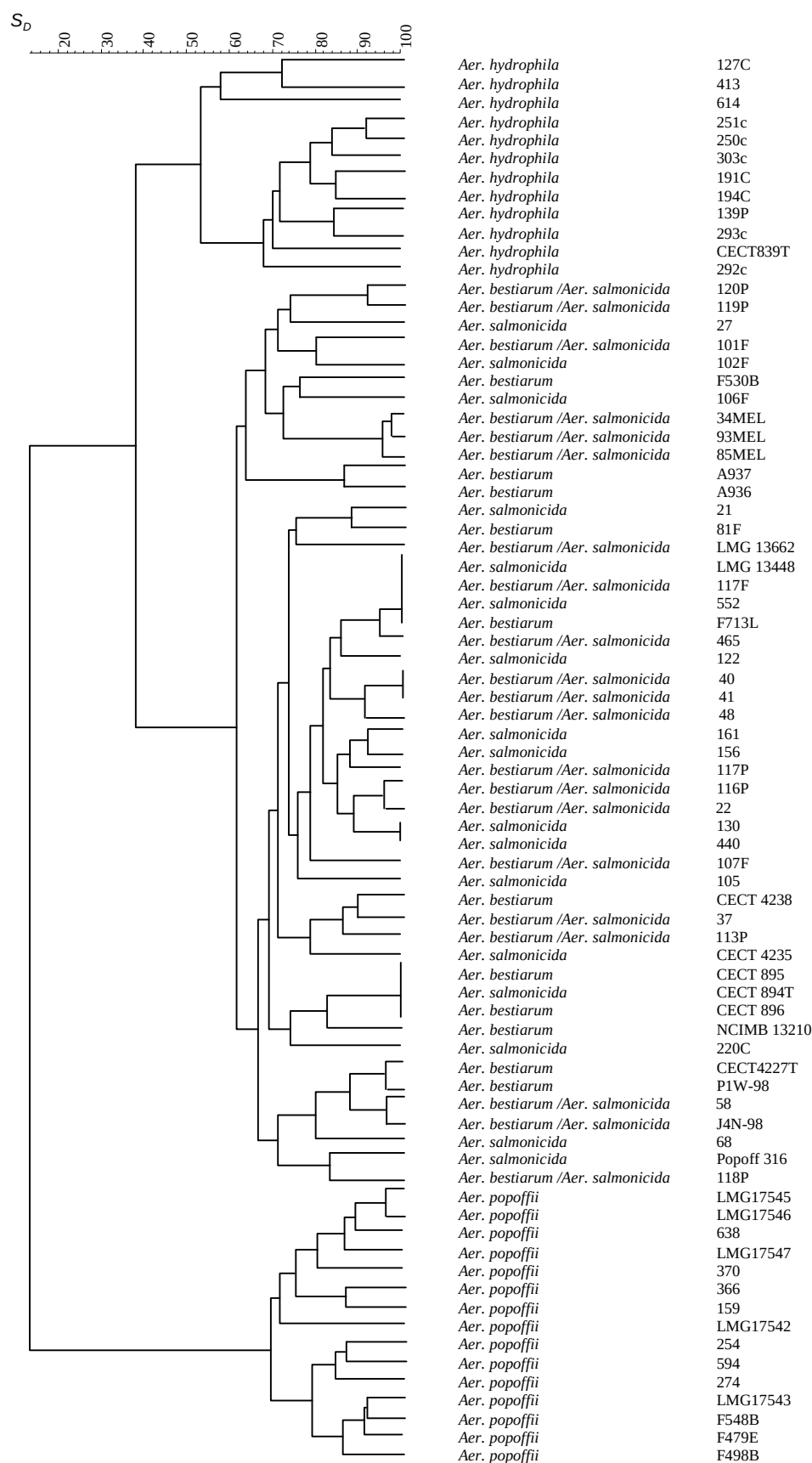


Figure 2. S_D /UPGMA cluster analysis based on the combined *Hinf*I-*Cfo*I and *Hinf*I-*Taq*I restriction patterns of amplified 16S-23S ISRs of the 76 of the *Aeromonas* strains identified by the 16S rDNA RFLP method.

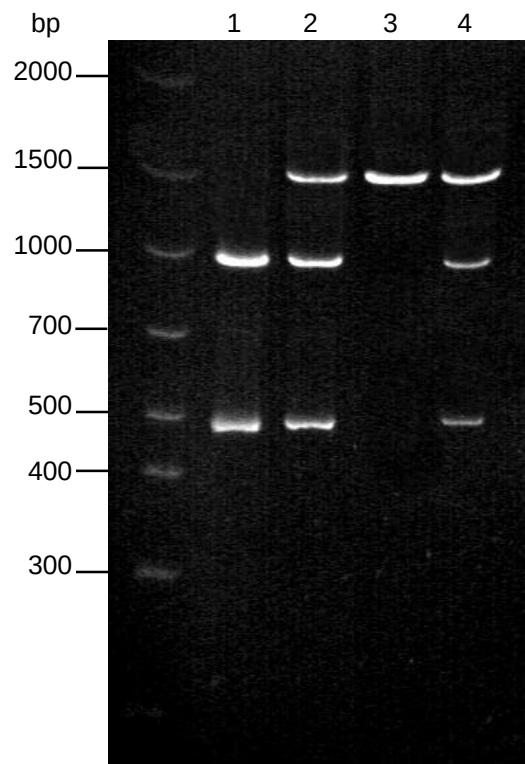


Figure 1. Acrylamide gel showing the RFLP patterns, obtained by using the endonuclease *Pst*I, of 16S rRNA gene amplified by PCR. Lanes: 1, pattern typical of *Aer. bestiarum* (strain CECT4227^T); 3, pattern typical of *Aer. salmonicida* (strain CECT894^T); 2 and 4, mixture of the two previous patterns (strains J4N-98 and LMG13662, respectively).

A DNA probe specific for *Aeromonas* colonies

M. R. Chacón^a, G. Castro-Escarpulli^{a,b}, L. Soler^a, J. Guarro^a, M. J. Figueras^{a,*}

^aDepartamento de Ciencias Médicas Básicas, Facultad de Medicina y Ciencias de la Salud, Universidad Rovira y Virgili, San Lorenzo 21, 43201 Reus, Spain.

^bDepartamento de Bacteriología Médica, Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, Mexico, D.F.

Abstract

Members of the genus *Aeromonas* are important enteropathogens. Commercial identification systems are often unable to correctly identify *Aeromonas* strains and misidentification as *Vibrio* spp. is common. A digoxigenin-DNA probe based on a 237 bp of the glycerophospholipid-cholesterol acyltransferase gene has been tested in a colony hybridization assay. The probe hybridized with all *Aeromonas* species tested ($n = 16$) but not with strains of other enteropathogenic bacteria ($n = 20$). The probe allowed the unequivocal identification of *Aeromonas* in primary isolation media within 36 h. © 2002 Elsevier Science Inc. All rights reserved.

1. Introduction

The genus *Aeromonas* comprises oxidase-positive, facultative anaerobic, Gram-negative bacilli. Some species have been described as causative agents of various gastrointestinal and, to a lesser extent, extraintestinal diseases (Janda & Abbott, 1998; Altgwegg, 1999). The commercial biochemical systems currently employed in clinical laboratories for the identification of Gram-negative enterobacteria (API 20E, Vitek, MicroScan etc.) are unable to correctly identify *Aeromonas* spp. and confusion with *Vibrio* spp. (*V. fluvialis*, *V. damsela* or *V. cholerae*) is common (Overman et al., 1985; Overman and Overley, 1986; Abbott et al., 1998; Vivas et al., 2000). The confusion with *V. cholerae* is of special relevance due to its public health significance (Abbott et al., 1998).

Given the increasing importance of *Aeromonas* in clinical infections (Janda & Abbot, 1998) and the limitations of the existing methods, there is a need to design accurate systems that can unequivocally identify these microorganisms.

Molecular methods tend to be more accurate, the vast majority of them having been focused on species identification by using either the 16S rRNA gene (Ash et al., 1993; Dorsh et al., 1994; Borrell et al., 1997; Demarta et al., 1999; Figueras et al., 2000) or virulence associated genes such as aerolysin (Husslein et al., 1992; Khan et al., 1999) and

lipases (Cascon et al., 1996). These methods are useful and suitable in well-equipped research laboratories, but clinical laboratories need cheaper and faster methods for unequivocal detection of *Aeromonas*, especially at the genus level.

Glycerophospholipid-cholesterol acyltransferase (GCAT) is an unusual extracellular lipase released by members of the genus *Vibrio* and *Aeromonas* (MacIntyre et al., 1979). The enzyme is considered one of the potential virulence factors that can contribute to the pathogenesis of *Aeromonas* in fish (Lee and Ellis, 1990). The gene has been cloned and sequenced in strains of *A. salmonicida* and *A. hydrophila* (Thorton et al., 1988; Nerland, 1996). In a previous study, where the gene presence was investigated by PCR, we found it in practically all *Aeromonas* strains tested, including representatives of all species (Chacón et al., 2001, submitted for publication).

The aim of the present study was to evaluate if the 237 bp fragment of the GCAT gene could be used to distinguish *Aeromonas* sp. from other common enteropathogens in colony hybridization assays.

2. Materials and methods

2.1. Bacteria strains and media

A total of 36 bacteria strains belonging to 8 different genera were tested, although from 5 of them only one strain was assayed. The strains used in this study are listed in Table 1. The strains of the different species (up to 5 colonies) were inoculated in groups of 9 onto petri dishes (9 cm

* Corresponding author. Tel.: 34-977759321; fax: 34-977759322
E-mail address: mjfs@fmcs.urv.es (M. J. Figueras).

Table 1
Results of colony hybridization with digoxigenin labelled GCAT probe

Strain	Origin	Hybridization with dig-GCAT
<i>A. hydrophila</i> ATCC ^a 7966 ^T	Milk tin	+
<i>A. bestiarum</i> ATCC51108 ^T	Fish	+
<i>A. salmonicida</i> ATCC33658 ^T	Fish	+
<i>A. caviae</i> ATCC15468 ^T	Guinea pig	+
<i>A. media</i> ATCC33907 ^T	Fish	+
<i>A. eucrenophila</i> ATCC23309 ^T	Fish	+
<i>A. sobria</i> ATCC43979 ^T	Fish	+
<i>A. veronii</i> ATCC35624 ^T	Sputum	+
<i>A. jandaei</i> ATCC49568 ^T	Faeces	+
<i>Aeromonas</i> HG ^b 11 ATCC35941	Ankle suture	+
<i>A. schubertii</i> ATCC43700 ^T	Abscess	+
<i>A. trota</i> ATCC49657 ^T	Faeces	+
<i>A. encheleia</i> ATCC51929 ^T	Fish	+
<i>A. allosaccharophila</i> ATCC51208 ^T	Fish	+
<i>A. popoffii</i> LMG ^c 17541 ^T	Drinking water production plant	+
<i>Aeromonas</i> Group 501 CECT ^d 5178	N.S. ^e	+
<i>Vibrio fluvialis</i> ATCC33809 ^T	Faeces	–
<i>V. vulnificus</i> ATCC27562 ^T	Blood	–
<i>V. vulnificus</i> ATCC33147	Diseased fish	–
<i>V. vulnificus</i> CECT 4608	Water	–
<i>V. vulnificus</i> CECT 4606	Water	–
<i>V. vulnificus</i> CECT 4602	Water	–
<i>V. cholerae</i> NO:01 CECT 557	River water	–
<i>V. cholerae</i> NO:01 CECT 653	Water	–
<i>V. parahaemolyticus</i> ATCC17802 ^T	Food poisoning	–
<i>V. parahaemolyticus</i> CECT 612	Sea water	–
<i>V. parahaemolyticus</i> CECT 613	Marine plankton	–
<i>V. parahaemolyticus</i> CECT 611	Sea water	–
<i>V. parahaemolyticus</i> CECT 588	Mussels	–
<i>Escherichia coli</i> O:157:H7 CECT 4076	Human hemorrhagic colitis	–
<i>E. coli</i> O:128: K86(B) CECT 742	Enteropathogenic	–
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC25668	Human clinical isolate	–
<i>Salmonella typhimurium</i> ATCC13311	Food poisoning	–
<i>Shigella flexneri</i> CECT585	Dysentery	–
<i>Plesiomonas shigelloides</i> CECT 4262 ^T	Faeces	–
<i>Yersinia enterocolitica</i> CECT 754	Faeces	–

^a ATCC, American Type Culture Collection.

^b HG, Hybridization Group.

^c LMG, Belgian Coordinated Collections of Microorganisms, Belgium.

^d CECT, Colección Española de Cultivos Tipo.

^e N.S., Not specified

diameter). The media used were: tryptic soy agar (TSA) (Difco, Barcelona, Spain), 5% human agar blood, MacConkey agar (Difco), Salmonella-Shigella agar (SS) (Difco), xylose lysine desoxycholate agar (XLD) (Difco) and Hek-toen enteric agar (Difco). The plates were incubated at 37°C for 18–24 h.

2.2. Colony blot preparation

The colonies grown in the above mentioned media were blotted to a positively charged autoclaved nylon membrane (Boehringer Mannheim, Barcelona, Spain). The membrane was then transferred to a filter paper saturated with 10% SDS (Sodium dodecyl sulfate) for 3 min, followed by an incubation on a second filter paper soaked with 0.5 N NaOH-1.5 M NaCl for 5 min. The membrane was then

neutralized by placing it on a filter paper soaked with 1 M Tris Base, pH 7 and 1.5 M NaCl for 5 min followed by another incubation of 5 min on a new filter saturated with 10× SSC (1.5 M NaCl-0.15 M sodium citrate pH 7.2). Finally the membrane was UV-crosslinked for 3 min on an UV-transilluminator, rinsed in sterile double-distilled H₂O and air dried until used.

2.3. Primer design, PCR amplification and preparation of digoxigenin (DIG)-labeled probe

The sequences of the *Aeromonas* GCAT gene available (EMBL X70686, EMBL X07279) were aligned using the CLUSTAL W program (Thompson et al., 1994). Primers were designed using Primer Designer 3 software (Scientific Educational Software, Durham, USA). The primers used in

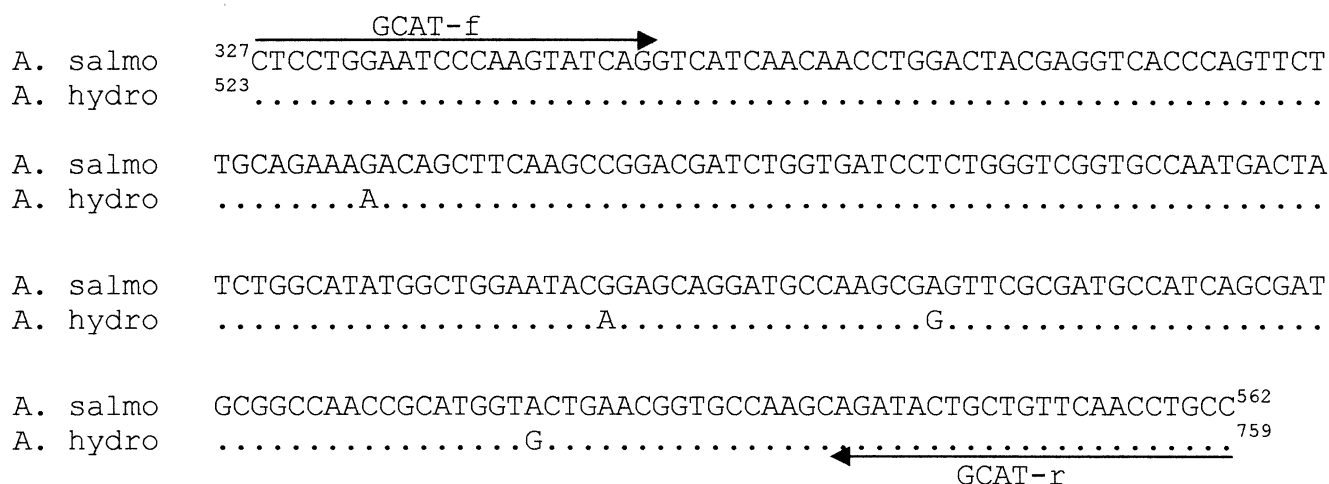


Fig. 1. Nucleotide sequence of the amplified GCAT gene fragment and position of the primers used following gene numbering for *A. salmonicida* (EMBL X70686) and *A. hydrophila* (EMBL X07279).

the PCR amplifications and the amplified sequence are shown in Figure 1. PCR amplification conditions were those of Chacón et al. (2001, submitted for publication), although the annealing temperature was adjusted to 65°C so that the primers gave only a specific signal for *Aeromonas* DNA. Briefly, PCR amplification was performed in a final volume of 50 µl containing 1.2–2 µg of DNA, 0.3 mM deoxynucleotide triphosphate mix, 1× PCR buffer (Gibco-BRL, Barcelona, Spain), 1.8 mM MgCl₂, 0.1 µM of primers and, 2.5 units of *Taq* polymerase (Gibco-BRL). PCRs were carried out in a Perkin-Elmer GeneAmp 2400 PCR System by using the following program: 3 min denaturation cycle at 95°C, 35 melting cycles at 94°C for 1 min, annealing for 1 min at 65°C, followed by a final elongation at 72°C for 1 min. The PCR products (12 µl) were analyzed on 1.5% agarose gel (Sigma-Aldrich Ltd., Madrid, Spain) and electrophoresed on 1× Tris-Borate-EDTA for 2 h at 60 V. The PCR product was visualized under UV light.

The GCAT-PCR amplified fragment (237 bp) was cleaned using Concert™ Rapid PCR Purification System (Life Technologies, Barcelona, Spain), and 25 ng of the clean fragment was labeled using Digoxigenin DNA labeling kit following the manufacturer's instructions (Roche Diagnostics, Barcelona, Spain).

2.4. Colony hybridization with the DIG-labeled probe

The nylon membranes were hybridized with the denatured digoxigenin-labeled GCAT probe overnight at 68°C using DIG Easy Hyb solution (Roche Diagnostics); followed by washes at room temperature 2 × 5 min in 2× SSC (Standard Saline Citrate)-0.1% SDS; at 68°C 2 × 15 min in 0.5% SSC-0.1% SDS and, a final wash 2 × 15 min in 0.1% SSC-0.1% SDS at the same temperature. Membrane detection signal was performed using the Digoxigenin detection kit as recommended by the manufacturer (Roche Diagnostics).

3. Results and Discussion

In a previous study we demonstrated that the GCAT gene was present in 98% of the 234 strains of *Aeromonas* of environmental and clinical origin representing all species (Chacón et al., 2001, submitted for publication). This demonstrates that this gene is widely distributed. Therefore, it was considered a good candidate to be tested as a genus probe. The primers designed, for the GCAT gene, amplified a fragment of the expected size (237 bp) and no other amplicons were generated. Lower annealing temperatures (56°C, 58°C, 60°C and 62°C) weakly amplify a fragment of the same size in some *Vibrio* isolates (data not shown). This drawback was overcome when the PCR temperature was increased to 65°C.

Table 1 shows the results obtained by testing the DIG-labeled GCAT 237 bp fragment on colony blot assays in the type strains of all the species ($n = 14$), in 2 reference strains of *Aeromonas* and in 20 strains of other genera. The probe was proven to be specific for *Aeromonas* because it did not react with strains from other genera tested. Furthermore, the three *Aeromonas* strains (one *A. bestiarum* and two *A. schubertii*) that were negative in a previous study where the presence of the GCAT gene was investigated by PCR (Chacón et al., 2001, submitted for publication) gave a positive signal here. The failure to amplify the gene in those strains in the mentioned study could have been due to a possible mismatch of the primers.

To evaluate if the specificity of the probe could be influenced by the composition of the culture media routinely used in clinical laboratories to recover bacteria from stool samples, we tested four of the most common media i.e., MacConkey, SS, blood agar and Hecktoen. Equal results were found in all the media tested. Figure 2 illustrates an example of the hybridization results obtained when colo-

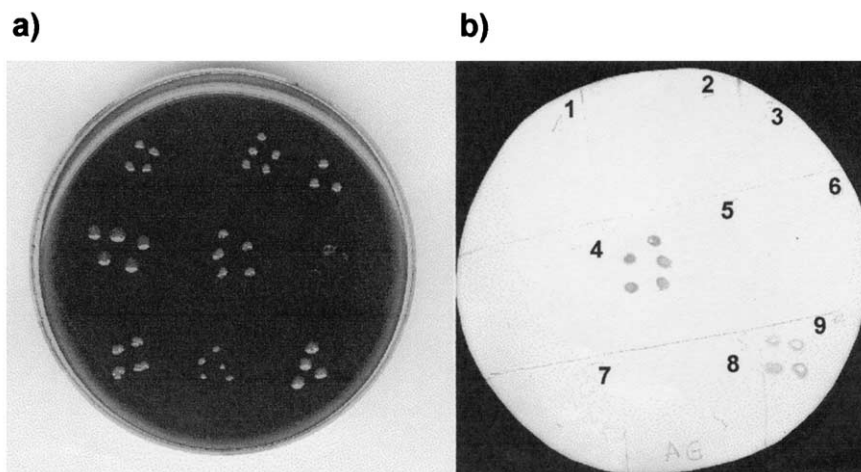


Fig. 2 a–b. An example of colony blot hybridization result. 2 a. Colonies grown on blood agar. 2 b. Simetrical replica filter with the detection signals. 1. *E. coli* CECT4076, 2. *S. typhimurium* ATCC13311^T, 3. *Sh. flexneri* CECT585, 4. *V. parahaemolyticus* ATCC17802^T, 5. *A. hydrophila* ATCC7966^T, 6. *V. fluvialis* CECT4217, 7. *V. cholerae* CECT557, 8. *Y. enterocolitica* CECT754, 9. *A. veronii* ATCC35624^T.

nies of *Aeromonas* and other enteropathogens were grown on blood agar (Figure 2 A). A positive signal was observed on the replica filter for *A. hydrophila* and *A. veronii*, but the probe did not hybridize with *V. cholerae*, *V. parahaemolyticus* or *V. fluvialis* (Figure 2 B).

The DNA probes reported to date for the detection of *Aeromonas* are species-specific (Husslein et al., 1992; Ash et al., 1993; Dorsh et al., 1994; Cascon et al., 1996; Demarta et al., 1999) and nothing is known about their possible cross-reactivity with other enteric bacteria. The use of these probes to detect *Aeromonas* strains could be costly and time consuming because of the need to test more than one probe, and no probes have yet been designed for all the species.

To our knowledge, there is only one oligonucleotide DNA probe for the genus *Aeromonas*, based on the 16S rRNA gene. It has been used for fluorescent “in situ” hybridization (FISH) of these microorganisms in water samples (Kämpfer et al., 1996). However, this probe has not yet been tested in all the recent *Aeromonas* spp. This probe was recently used to detect possible *Aeromonas* strains present in biofilms, although no signal was obtained by FISH in any sample tested (MacDonald and Brözel, 2000).

Although clinical identification of *Aeromonas* by conventional techniques can be completed in 72 h the results, as we have already mentioned, are frequently unreliable. Confusion with *Vibrio* spp. could be avoided by using two complementary tests, i.e., growth in nutrient broth in the presence of 6% NaCl and susceptibility to the vibriostatic agent O/129 (2,4-diamino-6, 7-diisopropylpteridine), although their performance is still more time consuming. The main advantage of the probe here described is that it can give unequivocal results within 36 h and requires no specific skill by the end user for its application and interpretation.

Acknowledgments

This work has been supported by the grants: FIS 99/0944 from the Spanish Ministry of Health, from Fundació Ciència i Salut and by a fellowship PSR/99–01 from the Universitat Rovira i Virgili. We would like to thank the Colección Española de Cultivos Tipo for kindly providing isolates.

REFERENCES

- Altwegg, M. (1999). *Aeromonas* and *Plesiomonas*. In P. R. Murray, E. J. Baron, M. A. Pfaller, F. C. Tenover, & R. H. Tenover (Eds.), *Manual of Clinical Microbiology*, 7th ed (pp. 507–516). Washington, DC: American Society for Microbiology.
- Abbott, S. L., Seli, L. S., Catino, M. JR., Hartley, M. A., & Janda, J. M. (1998). Misidentification of unusual *Aeromonas* species as members of the genus *Vibrio*: a continuing problem. *Journal of Clinical Microbiology*, 36, 1103–1104.
- Ash, C., Martínez-Murcia, A. J. & Collins, M. D. (1993). Identification of *Aeromonas schubertii* and *Aeromonas jandaei* by using a polymerase chain reaction-probe test. *FEMS Microbiology Letters*, 108, 151–156.
- Borrell, N., Acinas, S. G., Figueras, M. J., & Martínez-Murcia, A. J. (1997). Identification of *Aeromonas* clinical isolates by restriction fragment length polymorphism of PCR-amplified 16S rRNA gene. *Journal of Clinical Microbiology*, 35, 1671–1674.
- Cascon, A., Anguita, J., Hernanz, C., Sánchez, M., Fernández, M. & Naharro, G. (1996). Identification of *Aeromonas hydrophila* hybridization group 1 by PCR assays. *Applied and Environmental Microbiology*, 62, 1167–1170.
- Chacón, M. R., Figueras, M. J., Castro-Escarpulli, G., Soler, L & Guarro, J. (2001). Distribution of virulence genes in clinical and environmental isolates of *Aeromonas* spp. *Antonie van Leeuwenhoek* (submitted for publication).
- Demarta, A., Tonolla, M., Caminada, A. -P, Ruggeri, N. & Pedruzzi, R. (1999). Signature regions within the 16S rDNA sequences of *Aeromonas popoffii*. *FEMS Microbiology Letters*, 172, 239–246.
- Dorsch, M., Ashbolt, N. J., Cox, P. T. & Goddman, A. E. (1994). Rapid identification of *Aeromonas* species using 16S rDNA targeted oligo-

- nucleotide primers: a molecular approach based on screening of environmental isolates. *Journal of Applied Bacteriology*, 77, 722–726.
- Figueras, M. J., Soler, L., Chacón, M. R., Guarro, J. & Martínez-Murcia, A. J. (2000). Extended method for discrimination of *Aeromonas* spp by 16S rDNA-RFLP. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 50, 2069–2073.
- Husslein, V., Chackraborty, T., Carnahan, A. & Joseph, S. W. (1992). Molecular studies on the aerolysin gene of *Aeromonas* species and discovery of a species-specific probe for *Aeromonas trota* species nova. *Clinical Infectious Diseases*, 14, 1061–1068.
- Janda, J. M. & Abbott, S. L. (1998). Evolving concepts regarding the genus *Aeromonas*: an expanding panorama of species, disease, and unanswered questions. *Clinical Infectious Diseases*, 27, 332–344.
- Kämpfer, P., Erhart, R., Beimfohr, C., Böhringer, J., Wagner, M. & Amann, R. (1996). Characterization of bacterial communities from activated sludge: culture-dependent numerical identification using group- and genus-specific rRNA-targeted oligonucleotide probes. *Microbial Ecology*, 32, 101–121.
- Khan, A. A., Nawaz, M. S., Khan, S. A. & Cerniglia, C. E. (1999). Identification of *Aeromonas trota* (hybridization group 13) by amplification of the aerolysin gene using polymerase chain reaction. *Molecular and Cellular Probes*, 13, 93–98.
- Lee, K.-K. & Ellis, A. E. (1990). Glycerophospholipid:cholesterol acyltransferase complexed with lipopolysaccharide (LPS) is a major lethal exotoxin and cytotoxin of *Aeromonas salmonicida*: LPS stabilizes and enhances toxicity of the enzyme. *Journal of Bacteriology*, 172, 5382–5393.
- MacDonald, R. & Brözel, V. S. (2000). Community analysis of bacterial biofilms in a simulated recirculating cooling-water system by fluorescent *in situ* hybridization with rRNA-targeted oligonucleotide probes. *Water Resources*, 34, 2439–2446.
- MacIntyre, S., Trust, T. S. & Buckley, J. T. (1979). Distribution of glycerophospholipid-cholesterol acyltransferase in selected bacterial species. *Journal of Bacteriology*, 139, 132–136.
- Nerlan, A. H. (1996). The nucleotide sequence of the gene encoding GCAT from *Aeromonas salmonicida* ssp. *salmonicida*. *Journal of Fish Diseases*, 19, 145–150.
- Overman, T. L. & Overley, K. J. (1986). Feasibility of same-day identification of members of the family *Vibrionaceae* by the API 20E system. *Journal of Clinical Microbiology*, 23, 715–717.
- Overman, T. L., Kessler, J. & Seabolt, J. P. (1985). Comparison of API 20E, API Rapid E, and API Rapid NFT for identification of members of the family *Vibrionaceae*. *Journal of Clinical Microbiology* 22, 778–781.
- Thompson, J. D., Higgins, D. G. & Gibson, T. J. (1994). Clustal W: Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, positions-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research*, 22, 4673–4680.
- Thorton, J., Howard, S. P. & Buckley, J. T. (1988). Molecular cloning of a phospholipid-cholesterol acyltransferase from *Aeromonas hydrophila*. Sequence homologies with lecitin-cholesterol acyltransferase and other lipases. *Biochimica et Biophysica Acta*, 959, 153–159.
- Vivas J., Tinajas, A. I. S., Barbeyto, L. & Rodríguez, L. A. (2000). Identification of motile *Aeromonas* strains with the MicroScan Walk-Away system in conjunction with Combo Negative Type 1S panels. *Applied and Environmental Microbiology*, 66, 1764–1766.

	Página
ÍNDICE DE ABREVIATURAS	v
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. Taxonomía.....	2
1.1.1. Descripción del género	2
1.1.2. Perspectivas históricas	2
1.1.3. Identificación bioquímica	9
1.1.4. Identificación molecular	13
1.1.5. Otras técnicas de identificación	18
1.1.6. Controversias taxonómicas actuales	19
1.2. Epidemiología	22
1.2.1. Ecología	22
1.2.2. Infecciones en humanos	25
1.2.2.1. Intestinales	25
1.2.2.2. Extraintestinales	29
1.2.2.3. Brotes epidémicos	30
1.2.3. Infecciones en peces	32
1.2.4. Sensibilidad a agentes antimicrobianos	34
1.2.5. Técnicas de tipado.....	37
1.2.5.1. Métodos fenotípicos	37
1.2.5.2. Métodos genéticos	39
1.3. Factores de virulencia y mecanismos de patogenicidad.....	45
1.3.1. Componentes estructurales	45
1.3.2. Productos extracelulares	52
1.3.2.1. Sistemas de secreción	62
2. INTERÉS Y OBJETIVOS.....	66
3. MATERIALES Y MÉTODOS	72
3.1. Origen y aislamiento de las cepas	73
3.1.1. Cepas clínicas	73
3.1.2. Cepas ambientales	73
3.1.3. Cepas de colección y de referencia	74
3.1.4. Cepas pertenecientes a otros géneros.....	74
3.2. Resiembra y conservación de cepas	74
3.2.1. Conservación a corto plazo	74
3.2.2. Conservación a largo plazo	74
3.3. Pruebas bioquímicas utilizadas para la identificación de las cepas a nivel de especie.....	75
3.3.1. Cepas clínicas	75

	Página
3.3.2. Cepas pertenecientes al complejo fenotípico “ <i>A. hydrophila</i> ”	76
3.3.3. Cepas aisladas de carpa común (<i>Cyprinus carpio</i> L.)	76
3.3.4. Cepas aisladas de pescado congelado	76
3.4. Identificación genética (RFLP del gen 16S rRNA)	77
3.5. Diseño de una sonda para la identificación del género	81
3.5.1. <i>Colony blot</i>	81
3.6. Secuenciación de genes esenciales	82
3.6.1. Gen <i>rpoD</i> (factor σ^{70} de la RNA polimerasa)	82
3.6.2. Gen <i>gyrB</i> (subunidad B de la DNA girasa)	83
3.6.3. Gen 16S rRNA	84
3.6.4. Análisis de las secuencias y construcción de los dendogramas	85
3.7. Técnicas de tipado	85
3.7.1. RFLP del 16S-23S ISR	85
3.7.2. ERIC-PCR	86
3.7.3. REP-PCR	87
3.7.4. Análisis de geles y dendogramas	87
3.8. Sensibilidad a agentes antimicrobianos	87
3.9. Estudio de factores de virulencia	88
3.9.1. Amplificación de los genes de virulencia	88
3.9.2. <i>Dot blot</i>	89
3.9.3. Pruebas fenotípicas para la detección de factores de virulencia	89
3.9.4. Ensayos de patogenicidad	91
3.9.5. Análisis estadístico	92
3.10. Estudio del Sistema de Secreción Tipo III (TTSS)	92
3.10.1. Diseño de cebadores para genes conservados del TTSS	92
3.10.2. Amplificación por PCR de genes del TTSS en <i>Aeromonas</i> y secuenciación de los productos amplificados	92
3.10.3. Construcción de genoteca en cósmidos	93
3.10.4. Cribado de la genoteca	94
3.10.5. Extracción de los cósmidos	95
3.10.6. Caracterización de los cósmidos	96
3.10.7. Análisis e interpretación de las secuencias	99
3.10.8. Distribución del TTSS en <i>Aeromonas</i> spp	99
3.11. Anexos	101

	Página
4. RESULTADOS	124
4.1. TAXONOMÍA	125
4.1.1. Identificación por métodos bioquímicos y moleculares	126
4.1.1.1. Figueras M.J., Soler L., Chacón M.R., Guarro J. y Martínez-Murcia A.J. (2000c). Extended method for discrimination of <i>Aeromonas</i> spp by 16S rDNA-RFLP. <i>International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology</i> , 50: 2069-2073	126
4.1.1.2. Soler L., Marco F., Vila J., Chacón M.R., Guarro J. y Figueras M.J. Evaluation of two miniaturized systems, MicroScan W/A and BBL Crystal E/NF, for the identification of clinical isolates of <i>Aeromonas</i> spp. (En preparación)	133
4.1.1.3. Chacón M.R., Castro-Escarpulli G., Soler L., Guarro J. y Figueras M.J. (2002). A DNA probe specific for <i>Aeromonas</i> colonies. <i>Diagnostic Microbiology and Infectious Diseases</i> , 44: 221-225.	142
4.1.2. Estudio de especies taxonómicamente complejas	148
4.1.2.1. Soler L., Yáñez M.A., Chacón M.R., Guarro J., Martínez-Murcia A. J. y Figueras M. J. (2003). A molecular and phenotypic approach to the taxonomy of the “ <i>Aeromonas hydrophila</i> ” complex. <i>Journal of Applied Microbiology</i> (Sometido)	148
4.1.2.2. Soler L., Yáñez A., Chacón M.R., Aguilera-Arreola M.G., Catalan V., Figueras M.J. y Martínez-Murcia A.J. Phylogenetic analysis of the genus <i>Aeromonas</i> based on two housekeeping genes. (En preparación)	173
4.2. SENSIBILIDAD A LOS AGENTES ANTIMICROBIANOS	198
4.2.1. Vila J., Marco F., Soler L., Chacón M.R. y Figueras M.J. (2002). In vitro antimicrobial susceptibility of clinical isolates of <i>Aeromonas caviae</i> , <i>Aeromonas hydrophila</i> and <i>Aeromonas veronii</i> biotype sobria. <i>Journal of Antimicrobial Chemotherapy</i> , 49: 701-702.	199
4.2.2. Vila J., Ruiz J., Gallardo F., Vargas M., Soler L., Figueras M.J. y Gascon J. (2003). <i>Aeromonas</i> spp. as a cause of traveler's diarrhea: Clinical features and antimicrobial resistance. <i>Emerging Infectious Diseases</i> , 9: 552-555.	202
4.3. TÉCNICAS DE TIPADO MOLECULAR	208
4.3.1. Soler L., Figueras M.J., Chacón M.R., Guarro J. y Martínez-Murcia A.J. (2003). Comparison of three molecular methods for typing <i>Aeromonas popoffii</i> isolates. <i>Antonie van Leeuwenhoek</i> , 83: 341-349.	209

	Página
4.4. DISTRIBUCIÓN DE FACTORES DE VIRULENCIA	219
4.4.1. Chacón M.R., Figueras M.J., Castro-Escarpulli G., Soler L. y Guarro J. (2003). Distribution of virulence genes in clinical and environmental isolates of <i>Aeromonas</i> spp. <i>Antonie van Leeuwenhoek</i> . (En prensa)	220
4.4.2. Soler L., Figueras M.J., Chacón M.R., Vila J., Marco F., Martínez-Murcia A.J. y Guarro J. (2002). Potential virulence and antimicrobial susceptibility of <i>Aeromonas popoffii</i> recovered from freshwater and seawater. <i>FEMS Immunology and Medical Microbiology</i> , 32: 243-247	232
4.4.3. Soler L., Chacón M.R., Aguilera-Arreola G., Janda J.M., Esteve C., Guarro J. y Figueras M.J. Presence of virulence markers on clinical and environmental isolates of <i>Aeromonas jandaei</i> (En preparación)	239
4.4.4. Castro-Escarpulli G., Figueras M.J., Aguilera-Arreola G., Soler L., Fernández-Rendón E., Aparicio G.O., Guarro J. y Chacón M.R. (2003). Characterisation of <i>Aeromonas</i> spp. isolated from frozen fish intended for human consumption in Mexico. <i>International Journal of Food Microbiology</i> , 84: 41-49	258
4.4.5. Kozińska A., Figueras M.J., Chacon M.R. y Soler L. (2002). Phenotypic characteristics and pathogenicity of <i>Aeromonas</i> genomospecies isolated from common carp (<i>Cyprinus carpio</i> L.). <i>Journal of Applied Microbiology</i> , 93: 1-8.	269
4.5. MECANISMOS DE PATOGENICIDAD	278
4.5.1. Chacón M.R., Soler L., Groisman E.A., GuarroJ. y Figueras M.J. First evidence of the existence of Type III secretion system in clinical strains of <i>Aeromonas</i> (En preparación)	279
5. DISCUSIÓN	292
5.1. TAXONOMÍA	293
5.1.1. Identificación por métodos bioquímicos y moleculares	293
5.1.2. Estudio de especies taxonómicamente complejas	298
5.2. SENSIBILIDAD A LOS AGENTES ANTIMICROBIANOS	303
5.3. TÉCNICAS DE TIPADO MOLECULAR	308
5.4. DISTRIBUCIÓN DE LOS FACTORES DE VIRULENCIA	311
5.5. MECANISMOS DE PATOGENICIDAD	318
6. CONCLUSIONES	322
7. BIBLIOGRAFIA	326

μg	Microgramo
μl	Microlitro
μm	Micrómetro
μM	Micromolar
(NH₄)₂SO₄	Sulfato de amonio
ΔTm	Incremento de la temperatura de desnaturalización
16S rRNA	Subunidad 16S del RNA ribosómico
16S rDNA-RFLP	Polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción del gen que codifica para la subunidad 16S del RNA ribosómico
16S-23S ISR	Espaciador intergénico 16S-23S
AA	Aminoácidos
ADA	Agar Dextrina-Ampicilina
AFLP	<i>Amplified Fragment Length Polymorphism</i> (Polimorfismos de fragmentos de amplificación)
Ala	Alanina
APC	Vía alternativa de activación del complemento
AP-PCR	<i>Arbitrary primed</i> PCR (PCR con cebadores al azar)
ARDRA	<i>Amplified ribosomal DNA restriction analysis</i> (Análisis de restricción del DNA ribosomal amplificado)
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i> , Rockville, Estados Unidos
ATP	Adenosina Trifosfato
bdH₂O	Agua bidestilada
Blast	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i> (Herramienta básica para el alineamiento de secuencias)
Blastn	<i>Standard nucleotide-nucleotide blast</i> (blast estándar nucleótido-nucleótido)
CaCl₂	Cloruro de calcio
cAMP	3'-5'-adenosina-monofosfato cíclico
CCUG	<i>Culture Collection of the University Göteborg</i> , Göteborg, Suecia
CDC	<i>Centers for Disease Control</i> , United States Public Health Service, Atlanta, Estados Unidos
CECT	Colección Española de Cultivos Tipo, Universidad de Valencia, Valencia, España
CHO	Línea celular de células de ovario de hamster chino
CIAP	<i>Calf Intestine Alkaline Phosphatase</i> (Fosfatasa alcalina del intestino de ternera)
CIN	Agar Cefsulodina - Irgasan - Novobiocina
CIP	<i>Collection bactérienne de l'Institut Pasteur</i> , Paris, Francia

cm	Centímetro
CPC	Vía clásica de activación del complemento
dH₂O	Agua destilada
DL₅₀	Dosis letal 50
DMSZ	<i>Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH</i> , Braunschweig, Alemania
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DNasa	Desoxirribonucleasa
dNTPs	Desoxirribonucleótidos
DTT	Dithiothreitol
EDTA	<i>Di-sodium ethylenediaminetetra-acetate.2H₂O</i> (Di-sodio etilenediaminetetra-acetato. 2H ₂ O)
EMBL	<i>European Bioinformatics Institute, European Molecular Biology Laboratory</i> , Wellcome Trust Genome Campus Hinxton; Cambridge, Reino Unido
EPC	<i>Epithelioma carp papulosum cell line</i> (células epiteliales de carpa)
ERIC	<i>Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus sequences</i> (Secuencias intergénicas consenso repetitivas de Enterobacterias)
FAME	Perfiles de ácidos grasos metil-éster
g	Gramos
GenBank	<i>National Center for Biotechnology Information</i> , Rockville Pike, Bethesda (Estados Unidos)
GH	Grupo de hibridación
Gly	Glicina
h	Horas
HEp-2	Línea celular de células epiteliales humanas
IFN-γ	Interferón gamma
JCM	<i>Japan Collection of Microorganisms</i> , Institute of Chemical and Physical Research, Saitama, Japón
Kb	Kilobase
KCl	Cloruro de potasio
kDa	Kilodalton
l	Litro
LB	Medio de cultivo Luria-Bertani
LFREA	Low-frequency restriction enzyme analysis (Análisis de enzimas de restricción de baja frecuencia de corte)
LMG	<i>Culture Collection of the Laboratorium voor Microbiologie Gent</i> , Universiteit Gent, Gent, Bélgica

LPS	Lipopolisacárido
M	Molar
MDa	Megadálton
MEE	<i>Multiloci enzyme electrophoresis</i> (Electroforesis enzimática multiloci)
mg	Miligramo
MgCl₂	Cloruro de magnesio
MgSO₄	Sulfato de magnesio
MH	Mueller-Hinton
min	Minutos
ml	Mililitro
mM	Milimolar
mTorr	MiliTorr
N	Normal
NaCl	Cloruro sódico
NaOAc	Acetato sódico
NaOH	Hidróxido sódico
NBT	<i>Nitro blue tetrazolium chloride</i>
NCIMB	<i>National Culture Collection of Industrial and Marine Bacteria</i> , Aberdeen, Escocia
ng	Nanogramo
nm	Nanómetro
nmol	Nanomol
O/129	2,4-Diamino-6,7-di-iso-propilpteridina fosfato
°C	Grados centígrados
OMP	<i>Outer membrane protein</i> (proteína de la membrana externa)
ORF	<i>Open reading frame</i> (pauta de lectura abierta)
p/v	Peso/volumen
PAI	Isla de patogenicidad
pb	Pares de bases
PBS	Tampón fosfato salino
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i> (Reacción en cadena de la polimerasa)
PFGE	<i>Pulsed Field Gel Electrophoresis</i> (Electroforesis de campo pulsado)
PGE₂	Prostaglandina-2
pmol	Picomol
PMSF	<i>Phenylmethanesulfonyl fluoride</i>

RAPD	<i>Random Amplified Polymorphic DNA</i> (Amplificación al azar de fragmentos polimórficos de DNA)
REA	<i>Restriction Enzyme Analysis</i> (Análisis de restricción enzimática)
REP	Repetitive Extragenic Palindromic sequences (Secuencias palindrómicas extragénicas repetitivas)
rep-PCR	<i>Repetitive Element PCR Fingerprinting</i> (Amplificación de elementos repetitivos)
RFLP	<i>Restriction Fragments Length Polymorphism</i> (Polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción)
RNA	Ácido ribonucleico
RNasa	Ribonucleasa
rpm	Revoluciones por minuto
rRNA	Ácido ribonucleico ribosómico
RTG-2	Células de gónadas de trucha
S_D	Coeficiente de Similitud de Dice
SDS	Sodio dodecil sulfato
SDS-PAGE	<i>Sodium-dodecil-sulfate polyacrylamide gel electrophoresis</i> (Electroforesis de proteínas en geles de sodio-dodecil-sulfato poliacrilamida)
seg	Segundos
SS	Agar Salmonella-Shigella
SSC	Citrato de sodio salino
ssDNA	Ácido desoxirribonucleico de cadena sencilla
T	Cepa tipo
T4 DNA ligasa	Bacteriófago T4 DNA ligasa
T4 DNA polimerasa	Bacteriófago T4 DNA polimerasa
TAE	Tampón tris-acetato-EDTA
Taq polimerasa	<i>Thermus aquaticus</i> DNA polimerasa
TBE	Tampón tris-borato-EDTA
tblastx	<i>Nucleotide query-translated database blast</i> (blast entre una secuencia de nucleótidos y la base de datos traducida)
TE	Tris-EDTA
Tris	Tris[hidroximetil]aminometano
Tris-HCl	Tris[hidroximetil]aminometano – ácido clorhídrico
tRNA	RNA de transferencia
TSA	Triptona-Soja-Agar
TSB	Triptona-Soja-Caldo
TSI	Agar triple azúcar y hierro

TTSS	Sistema de secreción tipo III
U	Unidad enzimática
ufc	Unidad formadora de colonia
UPGMA	<i>Unweighted Pairgroup Method with Arithmetic Averages</i> (Análisis de agrupamientos por ligamiento promedio)
v	Volumen
XLD	Agar xilosa-lactosa-desoxicolato
Y1	Células de la glándula adrenal de ratón

I. INTRODUCCIÓN

1.1. Taxonomía

1.1.1. Descripción del género

El género incluye bacilos cortos Gram-negativos anaerobios facultativos, oxidasa y catalasa positivos que reducen el nitrato y fermentan la D-glucosa como fuente principal de carbono y energía. Todas las especies, excepto *A. salmonicida* y *A. media*, son móviles por un flagelo polar y se consideran mesofílicas, excepto *A. salmonicida* que se considera psicrófila. Las especies son productoras de exoenzimas como son: proteasas, DNAsas, RNAsas, elastasas, lecitinasas, amilasas, gelatinasas y lipasas, entre otras (Altwegg, 1999). La gran mayoría utilizan las sales de amonio como única fuente de nitrógeno. Estos bacilos no son halofílicos y son resistentes al factor vibriostático O/129 a las concentraciones de 10 y 150 µg. Su temperatura mínima de crecimiento es de 4°C y la máxima de 45°C. Su crecimiento óptimo es a 30°C y a un pH de 4.5 a 9.0. Su hábitat más frecuente son las aguas dulces ambientales en asociación con fauna acuática y sedimento. Algunas especies son patógenas para el hombre y otras para los peces, así como para otros vertebrados e invertebrados (Popoff, 1984).

1.1.2. Perspectivas históricas

Se considera la publicación de Saranelli en 1891 como la primera descripción de un aislamiento de *Aeromonas*, con el nombre *Bacillus hydrophilus fuscus*, a partir de sangre y tejido ganglionar de una rana infectada. Este autor demostró la capacidad patógena del microorganismo reproduciendo la clínica de septicemia al inocular, la cepa en cuestión, en diversos tipos de animales. Posteriormente, Chester en 1901 definió al microorganismo como *Bacterium hydrophilum*. La primera descripción de una especie inmóvil de *Aeromonas* fue realizada por Emmerich y Weibel en 1894, al describir un bacilo epizootico de las truchas que fue denominado *Bacillus der Forellenseuche*. Los trabajos posteriores de Lehmann y Neumann (1896) y Chester (1901) sobre bacterias similares causantes de furunculosis en los peces, supusieron un cambio de nombre por el de *Bacterium salmonicida*. A partir de entonces varios autores describieron cepas similares aisladas en diferentes animales y su nomenclatura fue cambiando progresivamente desde *Bacterium punctatum* (Lehman y Neumann, 1896), *Aerobacter liquefaciens* (Beijerinck, 1900), hasta *Achromobacter punctatum* (Bergey y cols., 1923). Posteriormente esta especie fue transferida al

género *Pseudomonas* con el nombre de *P. punctata* (Schäperclaus, 1930, Hitchner, 1948) y más tarde a los géneros *Proteus*, *Escherichia*, *Achromobacter* (Miles y Halnan, 1937, Stainer, 1943), *Flavobacterium* y *Vibrio* (Caselitz, 1955). En 1936, Kluver y van Neil propusieron su asignación a un nuevo género, *Aeromonas*, término que deriva de las palabras griegas *aer*, que significa aire o gas y *monas*, que significa unidad, es decir unidades productoras de gas, nomenclatura confirmada en los estudios taxonómicos de Stainer (1943). De este modo, en la séptima edición del Manual Bergey (Snieszko, 1957) el género se incluyó en la familia Pseudomonadaceae con cuatro especies: tres de ellas móviles (*A. hydrophila*, *A. punctata*, *A. liquefaciens*) y una especie inmóvil (*A. salmonicida*).

En la década de los sesenta se realizaron numerosos estudios taxonómicos entre los que destaca el realizado por Ewing y cols. (1961) que propusieron que el género estuviese formado por tres especies. Estas serían *A. hydrophila* y *A. shigelloides*, que corresponderían a las especies móviles y mesófilas aisladas de nuestras clínicas, y *A. salmonicida* que agruparía cepas inmóviles y psicrófilas aisladas de peces enfermos. No obstante, otros estudios no estaban de acuerdo con la propuesta anterior e indicaban que las dos especies móviles eran *A. punctata* y *A. caviae*, con *A. punctata* como la especie tipo (Eddy, 1960; Eddy y Carpenter, 1964; McCarthy, 1975). Habs y Schubert (1962) reclasificaron la especie *A. shigelloides* como *Plesiomonas shigelloides* y así permanece hasta el momento. Años más tarde Schubert (1969) propuso la clasificación del género en tres especies con ocho subespecies del siguiente modo: dos especies móviles, *A. hydrophila* con las subespecies *hydrophila*, *anaerogenes* y *proteolytica* y *A. punctata* con las subespecies *punctata* y *caviae*; y una especie inmóvil, *A. salmonicida*, con las subespecies *salmonicida*, *achromogenes* y *masoucida*. Esta aproximación taxonómica fue publicada en la octava edición del Manual de Bergey siendo incluido el género en la familia Vibrionaceae (Schubert, 1974).

Popoff y Veron en 1976 realizaron uno de los estudios de taxonomía numérica más importantes destinados a clarificar la posición taxonómica del género *Aeromonas*. En este estudio se logró diferenciar dos grupos taxonómicos distintos que corresponderían a las especies móviles designadas como *A. hydrophila*, con dos biovariedades (*A. hydrophila* biotipo *hydrophila* y *A. hydrophila* biotipo *anaerogenes*) y a una nueva especie designada como *A. sobria*. Sin embargo, un estudio posterior que empleaba la técnica de la hibridación DNA-DNA, demostró que la variedad *A.*

hydrophila biotipo *anaerogenes* pertenecía a la especie *A. caviae* y que las especies *A. hydrophila*, *A. caviae* y *A. sobria* incluían a 2 ó 3 grupos de hibridación (GH) que no podían identificarse mediante métodos fenotípicos (Popoff y cols., 1981). Éstos resultados son recogidos en la primera edición del Manual de Bergey en Sistemática (Popoff, 1984) donde se establece que el género incluye tres especies móviles (*A. hydrophila*, *A. caviae* y *A. sobria*) y una especie inmóvil, *Aeromonas salmonicida* con tres subespecies: *A. salmonicida* subsp. *salmonicida* (que representa la cepa tipo de la especie), *A. salmonicida* subsp. *achromogenes* y *A. salmonicida* subsp. *masoucida*. Cada una de estas especies estaba constituida por más de un GH: tres en *A. hydrophila* (GH1, GH2, GH3), dos en *A. caviae* (GH4, GH5) y al menos dos en *A. sobria* (GH7, GH8). El GH5 fue asignado a la nueva especie *A. media* (Allen y cols., 1983). Estos resultados fueron ratificados por los estudios realizados en el CDC (Hickman-Brenner y cols., 1987). Posteriormente Austin y cols. (1989) describieron una nueva subespecie *A. salmonicida* subsp. *smithia* como queda reflejado en la última edición de este manual (Holt y cols., 1994) y muy recientemente se han descrito las nuevas subespecies *A. salmonicida* subsp. *pectinolytica* (Pavan y cols., 2000), *A. hydrophila* subsp. *dhakensis* (Huys y cols., 2002) y *A. hydrophila* subsp. *ranae* (Huys y cols., 2003).

Durante muchos años el género *Aeromonas* fue clasificado dentro de la familia Vibrionaceae junto con los géneros *Vibrio*, *Plesiomonas* y *Photobacterium*. Según Colwell y cols. (1986), los principales problemas para poder definir la verdadera posición taxonómica del género *Aeromonas* provienen de que las especies incluidas en él poseen unas propiedades fenotípicas definidas *a priori* como características pertenecientes a dos familias de Eubacterias distintas, Vibrionaceae y Enterobacteriaceae. Estos autores demostraron, a partir del análisis de las secuencias de los genes 16S rRNA, 5S rRNA y de los resultados de la hibridación RNA-DNA, que el género *Aeromonas* presentaba una evolución filogenética suficientemente distinta de las familias Enterobacteriaceae y Vibrionaceae, y propusieron elevar el género *Aeromonas* a la categoría de familia con rango taxonómico propio. Estudios filogenéticos basados en la secuenciación del gen 16S rRNA han ratificado la propuesta demostrando que *Aeromonas* forma una línea diferente dentro de la sub-clase gamma-Proteobacteria (Martínez-Murcia y cols., 1992a; Ruimy y cols., 1994). Si bien en la última edición del Manual de Bergey (Holt y cols., 1994) se sigue considerando que el género *Aeromonas* pertenece a la familia Vibrionaceae, son

numerosas las referencias que aluden a dicho cambio taxonómico, incluyendo al *International Committee on Systematic Bacteriology, Subcommittee on the taxonomy of Vibrionaceae* (Nair y Holmes, 2002). La inclusión del género *Aeromonas* en la familia *Aeromonadaceae* ha sido ya oficialmente aceptada (Joseph y Carnahan, 2000; Anzai y cols., 2000; Yañez y cols., 2003), y así aparece en la nueva edición del Manual de Bergey (Ludwig y Klenk, 2001). En la Figura 1.1 se ilustra la posición de la familia *Aeromonadaceae* respecto a otras familias pertenecientes a las *Proteobacterias*.

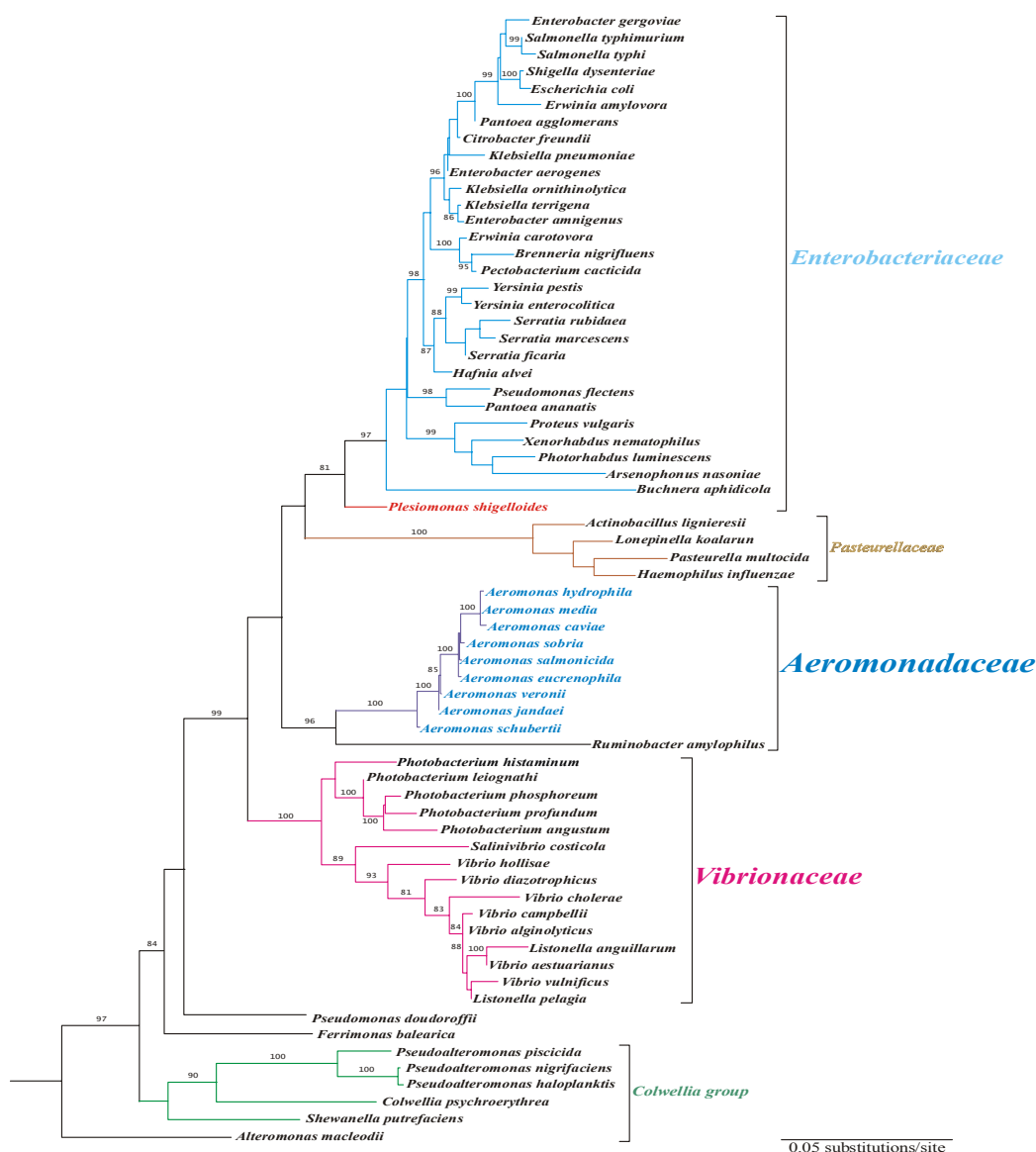


Figura 1.1. Posición filogenética de la familia *Aeromonadaceae* respecto a la familia *Vibrionaceae* y especies relacionadas. La posición deriva del análisis de similitud de la secuencia del gen 16S rRNA. Los porcentajes de *bootstrap* iguales o superiores al 80% indican la solidez de las ramas (Anzai y cols., 2000).

Clásicamente algunas especies de *Aeromonas* han sido difíciles de diferenciar de los miembros del género *Vibrio* con el que comparten muchas características fenotípicas (Overman y cols., 1985; Overman y Overley, 1986; Esteve y cols., 1995a; Abbott y cols., 1998). En 1987 Hickman-Brenner y cols. estudiaron las características microbiológicas y taxonómicas de 11 cepas recibidas en el CDC desde 1983, denominadas *Enteric Group 77* y consideradas como *Vibrio cholerae*, por su semejanza fenotípica y ser además ornitina descarboxilasa-positivas. En este estudio se comprobó que nueve de ellas constituían una especie nueva que se incluyó en el género *Aeromonas* con el nombre de *A. veronii* (GH10). En este mismo estudio se comparó la cepa tipo de *A. veronii* con un amplio conjunto de cepas pertenecientes al género *Aeromonas*. Se comprobó que existía un grupo de ellas con un elevado grado de hibridación genética con *A. veronii* pero que se caracterizaban por ser ornitina descarboxilasa-negativas por lo que estas cepas podían considerarse un biogrupo de *A. veronii*. Sin embargo, no fue hasta 1991 cuando Joseph y cols. definen los dos biotipos de esta especie *A. veronii* bt. *veronii* (GH10) y *A. veronii* bt. *sobria* (GH8). Las dos cepas restantes incluidas en el *Enteric Group 77* (ATCC 35941 y LMG 13076) presentaban un porcentaje de hibridación de DNA inferior al 70% a 60°C respecto a *A. veronii*, por lo que fueron catalogadas bajo el término GH11, pero sin asignárseles un nombre específico (Hickman-Brenner y cols., 1987). Huys y cols. (1996b) analizaron todas las especies del género *Aeromonas* mediante la técnica de los *polimorfismos de fragmentos de amplificación* (AFLP), y encontraron que las dos cepas del GH11 estaban íntimamente relacionadas con *A. eucrenophila* y *A. encheleia*. Posteriormente estos mismos autores analizaron mediante técnicas fenotípicas e hibridación de DNA las cepas de las especies *A. encheleia*, *A. eucrenophila* y GH11, proponiendo en base a sus resultados la inclusión de *A. eucrenophila* y GH11 en la especie *A. encheleia* (Huys y cols., 1996a; Huys y cols., 1997a), propuesta que no ha sido aceptada por otros autores que consideran que el análisis de las secuencias del gen 16S rRNA de estas especies apoya su separación (Martínez-Murcia, 1999).

Hickman-Brenner y cols. (1988) estudiaron 8 cepas, denominadas *Enteric Group 501*, bioquímicamente semejantes a *Vibrio damsela* pero que no requerían NaCl para su crecimiento y demostraron que, en base a la hibridación DNA-DNA, 7 de ellas podían considerarse una nueva especie a la que designaron como *A. schubertii* (GH12). La cepa restante ATCC 43946 sigue formando parte del denominado

Aeromonas Group 501, con las características de ser manitol negativa e indol positiva. También en ese mismo año, Schubert y Hegazi (1988) describieron una nueva especie mesófila, aislada de ríos y aguas naturales, muy parecida bioquímicamente a *A. caviae* y que designaron como *A. eucrenophila* (GH6).

En 1990 se proponen dos nuevas especies más: *A. enteropelogenes* (Schubert y cols., 1990a) y *A. ichthiosmia* (Schubert y cols., 1990b). No obstante, estas especies posteriormente se sinonimizaron con *A. trota* y *A. veronii* respectivamente en base a que poseían las mismas secuencias del gen 16S rRNA (Collins y cols., 1993). A pesar de ello *A. enteropelogenes* todavía ha aparecido publicada en una lista reciente de especies clínicas relevantes (Bruckner y cols., 1999), error que han puesto de manifiesto otros autores (Figueras y cols., 2000a). Recientemente se ha reevaluado la posición taxonómica de *A. ichthiosmia* y *A. veronii* mediante estudios de hibridación DNA-DNA que han confirmado que *A. ichthiosmia* es sinónima de *A. veronii*, en concreto de *A. veronii* bt. *sobria* (Huys y cols., 2001).

Carnahan y cols. (1991c), en el transcurso de un estudio de taxonomía numérica, detectaron un grupo de cuatro cepas caracterizadas por ser muy parecidas a *A. sobria* pero sacarosa negativas. Los estudios de hibridación DNA-DNA realizados por estos autores, permitieron reconocer que estas cepas pertenecían a una nueva especie que definieron como *A. jandaei* (GH9). Recientemente, Esteve y cols. (2003) han ampliado la definición de esta especie indicando que incluye cepas sacarosa positivas aisladas de muestras clínicas y ambientales, y que pueden ser patógenas en peces y humanos. Carnahan y cols. (1991b) realizaron un estudio taxonómico sobre un grupo especial de cepas con fenotipo *A. sobria*, pero que presentaban la característica de ser inusualmente sensibles a la ampicilina y carbenicilina. Este grupo constituyó una nueva especie designada como *A. trota* (Carnahan y cols., 1991b). Posteriormente Martínez-Murcia y cols. (1992b) realizaron un análisis de las secuencias del gen que codifica para el 16S rRNA de dos cepas de *Aeromonas* de origen animal y una cepa de origen humano causante de diarrea (la única cepa que quedaba incluida en el grupo *Enteric Group 77* estudiado por Hickman-Brenner y cols., 1987). El análisis reveló que las tres cepas presentaban secuencias del gen 16S rRNA idénticas entre sí, pero suficientemente distintas a las de las demás especies descritas hasta el momento, por lo que propusieron una nueva especie a la que le asignaron el nombre de *A. allosaccharophila*. Posteriormente Esteve y cols. (1995b) ratificaron dichos resultados mediante estudios de hibridación DNA-DNA. Fueron estos últimos

autores los que también describieron la nueva especie *A. encheleia*, aislada a partir de anguila (Esteve y cols., 1995c). La secuencia del gen 16S rRNA de su cepa tipo demostró también ser distinta de las demás secuencias de las especies del género (Martínez-Murcia, 1999).

En un estudio donde se caracterizaba un número representativo de cepas de *Aeromonas* mediante la técnica de los AFLP, se descubrió un grupo de cepas aisladas de plantas potabilizadoras de agua que estaban relacionadas con *A. bestiarum* (*A. bestiarum-like*) pero que se agrupaban formando un grupo independiente (Huys y cols., 1996c). Posteriormente en base a estudios de hibridación DNA-DNA y a sus características bioquímicas, estas cepas fueron descritas como pertenecientes a la nueva especie *A. popoffii* (Huys y cols., 1997b).

Recientemente se ha descrito la nueva especie *A. culicicola* a partir de tres cepas aisladas de mosquitos hembra, en concreto, la cepa tipo fue aislada de *Culex quinquefasciatus* y las otras dos cepas de *Aedes aegyptii* (Pidiyar y cols., 2002). El género por tanto incluye en la actualidad 15 especies (Tabla 1.1).

Tabla 1.1. Especies aceptadas en el género *Aeromonas*

Especie	Cepa tipo	Equivalentes en otras colecciones	Origen	Autores
<i>A. hydrophila</i> ^a	ATCC 7966 ^T	CECT839 ^T ; NCIMB 9240 ^T	Leche	Stainer, 1943
<i>A. bestiarum</i>	ATCC 51108 ^T	CECT4227 ^T ; NCIMB 1134 ^T	Pez enfermo	Ali y cols., 1996
<i>A. salmonicida</i> ^b	NCIMB 1102 ^T	CECT894 ^T ; ATCC 33658 ^T	Salmón	Griffin y cols., 1953
<i>A. caviae</i> ^c	ATCC 15468 ^T	CECT838 ^T	Cobaya	Schubert y Hegazi, 1988
<i>A. media</i>	ATCC 33907 ^T	CECT4232 ^T ; NCIMB 2237 ^T	Agua de piscifactoría	Allen y cols., 1983
<i>A. eucrenophila</i>	NCIMB 74 ^T	CECT4224 ^T ; ATCC 23309 ^T	Pez de agua dulce	Schubert y Hegazi, 1988
<i>A. sobria</i>	NCIMB 12065 ^T	ATCC 43979 ^T ; CECT4245 ^T	Pez	Popoff y cols., 1981
<i>A. veronii</i> ^d	ATCC 35624 ^T	CECT4257 ^T ; NCIMB 13015 ^T	Esputo	Hickman-Brenner y cols., 1987
<i>A. jandaei</i>	ATCC 49568 ^T	CECT4228 ^T ; LMG 12221 ^T	Heces humanas	Carnahan y cols., 1991c
<i>A. schubertii</i>	ATCC 43700 ^T	CECT4241 ^T ; NCIMB 13161 ^T	Abceso cutáneo	Hickman-Brenner y cols., 1988
<i>A. trota</i> ^e	ATCC 49657 ^T	CECT4255 ^T ; LMG 12223 ^T	Heces humanas	Carnahan y cols., 1991b
<i>A. allosaccharophila</i>	CECT4199 ^T	ATCC 51208 ^T ; LMG 14059 ^T	Anguila	Martínez-Murcia y cols., 1992b
<i>A. encheleia</i>	CECT4342 ^T	ATCC 51929 ^T ; LMG 16330 ^T	Anguila	Esteve y cols., 1995c
<i>A. popoffii</i>	LMG17541 ^T	CECT 4995 ^T ; ATCC BAA-243 ^T ; NCIMB 13618 ^T	Agua potable	Huys y cols., 1997b
<i>A. culicicola</i>	MTC 3249 ^T	CECT 5761 ^T ; NCIMB 5147 ^T	Mosquito	Pidiyar y cols., 2002

^a especie tipo del género *Aeromonas* para la que se han descrito tres subespecies (*A. hydrophila* subsp. *hydrophila*; *A. hydrophila* subsp. *dhakensis* y *A. hydrophila* subsp. *ranae*); ^b incluye cinco subespecies (*A. salmonicida* subsp. *salmonicida*; *A. salmonicida* subsp. *achromogenes*; *A. salmonicida* subsp. *masoucida*; *A. salmonicida* subsp. *smithia* y *A. salmonicida* subsp. *pectinolytica*); ^c comparte la misma cepa tipo que *A. punctata*, nombre propuesto para la especie con anterioridad, está todavía por resolver cual de ambos es el nombre específico correcto; ^d incluye dos biotipos (*A. veronii* bt. *sobria* y *A. veronii* bt. *veronii*); *A. ichtiosmia* es un sinónimo de esta especie; ^e *A. enteropelogenes* es un sinónimo de esta especie.

Recientemente dos nuevos estudios de taxonomía numérica, han descubierto nuevos grupos que podrían pertenecer a nuevas especies (Valera y Esteve, 2002; Miñana-Galbis y cols., 2002; Yañez y cols., 2003), aunque estos datos quedan aún pendientes de confirmación.

1.1.3. Identificación bioquímica

Las diferentes especies de *Aeromonas* pueden crecer en los medios diferenciales y selectivos empleados para el aislamiento de bacterias Gram-negativas. Sin embargo los medios selectivos de elección para el aislamiento de *Aeromonas* son: agar sangre ampicilina o agar dextrina ampicilina (ADA) (Palumbo y cols., 1985). En el caso de *A. trota*, que es sensible a la ampicilina, se recomienda utilizar para su aislamiento el agar que contiene cefsulodina-irgasan-novobiocina denominado comercialmente como CIN (Altwegg, 1999). Otros medios de cultivo que han sido recomendados para el aislamiento de *Aeromonas* son: agar m-*Aeromonas* (Rippey y Cabelly, 1979), medio Ryan (Holmes y Sartory, 1993), y agar SCAP-10C (Huguet y Ribas, 1991). En el caso de muestras poco contaminadas, se recomienda el pre-enriquecimiento con agua peptonada alcalina (Moyer y cols., 1991).

Para la identificación del género debe tenerse en cuenta la respuesta a las siguientes 6 pruebas bioquímicas básicas: tinción de Gram negativa, citocromo oxidasa positiva, crecimiento en caldo nutritivo adicionado con 3 o 6% de NaCl negativa, producción de ácido de inositol negativa, oxidación-fermentación de la glucosa positiva y crecimiento en presencia del factor vibriostático O/129 positiva (Altwegg, 1999).

Sistemas no automatizados

Para la identificación de las especies de *Aeromonas* se han aplicado numerosos protocolos bioquímicos (Millership, 1996). Algunos de ellos, sin embargo, sólo discriminan a los tres grandes grupos fenotípicos tradicionales (“*A. hydrophila*”, “*A. caviae*” y “*A. sobria*”) (Namdari y Bottone, 1990; Piersimoni y cols., 1990; Wilcox y cols., 1992), mientras que otros se han propuesto para llegar a caracterizar las cepas a nivel de especie o GH (Carnahan y cols., 1991a; Abbott y cols., 1992; Kämpfer y Altwegg, 1992; Carnahan y Joseph, 1993; Joseph y Carnahan, 1994; Oakey y cols., 1996; Janda y cols., 1996; Kaznowski, 1998; Altwegg, 1999). De todos estos estudios se deduce que el 85% de las cepas que se caracterizan a partir de muestras clínicas

corresponden a las especies *A. hydrophila*, *A. caviae* y *A. veronii* bt. sobria. Existen pocos trabajos taxonómicos que incluyan de forma mayoritaria cepas de origen ambiental (Renauld y cols., 1988; Austin y cols., 1989; Okpolwasili, 1991; Martínez-Murcia y cols., 1992b; Esteve, 1995; Noterdaeme y cols., 1996; Kaznowski, 1998; Borrell y cols., 1998), y no todos ellos identifican las cepas a nivel genotípico, sin embargo estos estudios ponen de manifiesto que el espectro de especies aisladas de muestras ambientales tiende a ser más amplio que el que se obtiene en muestras clínicas.

En 1992, Abbott y cols. propusieron un esquema bioquímico para la identificación de la mayoría de grupos de hibridación basado en analizar la respuesta bioquímica frente a 58 substratos. Éste protocolo fue ensayado en 133 cepas identificadas previamente mediante hibridación DNA-DNA y presenta la ventaja de incluir 9 pruebas iniciales que permiten diferenciar las especies incluidas en los grupos fenotípicos "*A. hydrophila*" y "*A. caviae*". Posteriormente, Borrell y cols. (1998) seleccionaron 13 pruebas bioquímicas del protocolo de Abbott y cols. (1992) y 6 del protocolo de Altwegg y cols. (1990) y las ensayaron en un grupo de 983 cepas de origen clínico y ambiental obteniéndose que un 7% de las cepas no se podía identificar y un 12% presentaban características bioquímicas de *A. caviae* y *A. media* simultáneamente por lo que tampoco podían separarse adecuadamente.

Kämpfer y Altwegg (1992) examinaron la respuesta de 176 cepas de *Aeromonas* frente a 329 características bioquímicas en microplaca, entre los que se incluía la utilización de diversas fuentes de carbono, la hidrólisis de 42 substratos cromogénicos y la fermentación de varios azúcares. Estos autores concluyeron que, con la aplicación de 30 pruebas bioquímicas, se podían diferenciar 13 grupos de hibridación.

Kaznowski (1998) realizó un estudio exhaustivo con 71 cepas de *Aeromonas* previamente identificadas mediante hibridación DNA-DNA e investigó la respuesta de las cepas frente a 136 caracteres bioquímicos. Este estudio puso de manifiesto discrepancias respecto a algunas de las pruebas discriminativas propuestas por otros autores, principalmente por Altwegg y cols. (1990).

Janda (2001) propuso un protocolo basado en la utilización de 12 pruebas bioquímicas capaz de identificar a las especies de *Aeromonas* frecuentemente o ocasionalmente aisladas de muestras clínicas.

Valera y Esteve (2002) realizaron un estudio de taxonomía numérica utilizando 121 pruebas bioquímicas y 153 cepas de *Aeromonas*, la mayoría de las cuales son consideradas cepas *bona fide*, obteniendo una buena correlación entre los datos bioquímicos y los datos genéticos y filogenéticos ya existentes sobre las cepas utilizadas.

Miñana-Galbis y cols. (2002) ensayaron la respuesta de 202 cepas de *Aeromonas* aisladas de moluscos bivalvos, agua y muestras clínicas a 64 pruebas bioquímicas, y observaron que estas se agrupaban en 8 grupos fenotípicos. Tres de estos grupos contenían las fenoespecies “*A. hydrophila*” (*A. hydrophila*, *A. bestiarum* y *A. salmonicida*), “*A. sobria*” (*A. sobria* y *A. jandaei*) y “*A. caviae*” (*A. caviae* y *A. eucrenophila*), en otros dos grupos se encontraron separadamente las especies *A. encheleia*, *A. trota* y los tres grupos restantes incluían cepas que no pudieron ser identificadas y que podrían pertenecer a nuevas especies.

Recientemente, Fosse y cols. (2003) analizaron, en un grupo de 387 cepas de *Aeromonas* identificadas bioquímicamente, la resistencia inducida a la colistina tras incubar las cepas durante toda la noche con 50 µg de éste antibiótico. El resultado obtenido indicó que en el complejo fenotípico “*A. hydrophila*” la resistencia a la colistina se induce en un 85.5%, en el complejo fenotípico “*A. caviae*” en un 2.1%, y en el “*A. veronii*” en un 2.5%, a excepción de *A. jandaei* donde es del 100%. En base a estos resultados, Fosse y cols. (2003) pudieron identificar correctamente el 96.2% de las cepas a nivel de fenoespecie y el 93.6% a nivel de especie.

Sistemas automatizados

Los sistemas miniaturizados de origen comercial son los más utilizados de forma rutinaria en los laboratorios para la identificación de bacterias. Éstos sistemas están diseñados principalmente para la identificación de bacterias Gram-negativas, oxidasa negativas y aerobias o anaerobias facultativas pertenecientes a la familia Enterobacteriaceae y prestan poca atención a bacterias oxidasa positivas pertenecientes a los géneros *Vibrio* y *Aeromonas* (Overman y cols., 1985; Abbott y cols., 1998). Altwegg y cols. (1990) estudiaron comparativamente la viabilidad de diversos sistemas comerciales API (20E, 50E y ATB-326N) (bioMérieux, Lyon, France), para la discriminación a nivel de GH, utilizando un conjunto de cepas previamente identificadas mediante hibridación DNA-DNA y electroforesis enzimática multiloci (MEE), llegando a la conclusión de que éstos métodos eran capaces de

diferenciar los grupos fenotípicos "*A. hydrophila*" y "*A. caviae*". Sin embargo, posteriormente se ha demostrado que la mayoría de los sistemas API (Rapid E, 5, 20, 20E), independientemente de la especie de *Aeromonas* de la que se trate, siempre tienden a identificar la cepa como *A. hydrophila* (Overman y cols., 1985; Overman y Overley, 1986; Kuijper y cols., 1989a; Kuijper y Peters, 1991).

Los resultados obtenidos mediante el empleo del sistema *Biolog GN microplates* (Biolog Inc. Hayward, CA, USA) fueron algo mejores ya que permitieron diferenciar los 3 grandes grupos de *Aeromonas* (Carnahan y cols., 1989). La base de datos actual de este sistema incluye 12 especies, las dos biovariedades de *A. veronii*, los GH2, GH3 y GH11. Sin embargo, no existen resultados publicados de su utilización con un amplio número de cepas.

El sistema MicroScan Walk/Away (W/A) junto con el panel Combo Negative 1S type (Dade MicroScan Inc., West Sacramento, Calif.) fue evaluado con un grupo de cepas de *Aeromonas* previamente identificadas con otros métodos fenotípicos obteniéndose una concordancia entre ambas metodologías del 78.8% (Vivas y cols., 2000).

Recientemente se ha desarrollado un sistema miniaturizado (96 pocillos) que permite reconocer a todas las especies del género incluyendo a *A. popoffii*, descrita recientemente, aunque hasta el momento el sistema solo ha sido evaluado con 60 cepas (Carson y cols., 2001).

Los resultados obtenidos tras comparar la identificación bioquímica de las especies de *Aeromonas* utilizando sistemas no automatizados y sistemas automatizados mostraron una buena correlación (Vivas y cols., 2000). Sin embargo cuando ésta comparación se realizó con cepas identificadas genéticamente (16S rDNA-RFLP) la concordancia resultó ser muy baja (Borrell, 1998; Figueras y cols., 1999). El problema más importante que presenta la identificación con los sistemas bioquímicos automatizados es la confusión de cepas de *Aeromonas* con especies del género *Vibrio* (Overman y cols., 1985, 1986; Kuijper y cols., 1989a; Kuijper y Peeters, 1991; Abbott y cols., 1998; Vivas y cols., 2000), en especial con la especie *V. cholerae*.

1.1.4. Identificación molecular

Ribotipado

Esta técnica consiste en transferir los fragmentos obtenidos de la digestión del DNA genómico con enzimas de restricción a un soporte sólido, habitualmente una membrana de nitrocelulosa o de nylon, y realizar después una hibridación (*Southern Blot*) con parte del operón ribosómico de *Escherichia coli* o con éste contenido en un plásmido (Grimont y Grimont, 1986; Altwegg y Moyer, 1989). Si el ribotipado es realizado utilizando el rDNA del plásmido pKK3535, que contiene el operón que codifica para los genes 16S, 5S y 23S rRNA de *E. coli*, las bandas de alto peso molecular (3-4 Kb) ofrecen información de carácter epidemiológica (identificación de diferentes cepas), pero no se observa una correlación entre los patrones que se obtienen y la agrupación taxonómica (identificación de las especies) de las cepas (Martinetti-Lucchini y Altwegg, 1992; Carey y cols., 1994). Sin embargo, el análisis de los fragmentos de restricción de peso molecular inferior (0.8-4 Kb), obtenidos tras la hibridación realizada con el plásmido pGML1 (contiene 576 pb de la región 5' del gen 16S rRNA de *E. coli* cortado con la enzima *HindIII*), sí demuestra una correlación con los GH (Martinetti-Lucchini y Altwegg, 1992). Sin embargo el ribotipado ha sido utilizado principalmente como técnica epidemiológica (Demarta y cols., 2000) y no taxonómica, en el género *Aeromonas*.

AFLP (Polimorfismos de fragmentos de amplificación)

Ésta técnica se basa en la ligación de adaptadores al DNA genómico previamente digerido, seguido de una PCR con cebadores específicos para estos adaptadores que incluyen un isótopo radiactivo. Los patrones obtenidos contienen entre 40 y 200 bandas informativas. En bacteriología el AFLP aporta tanto información taxonómica como epidemiológica (Janssen y cols., 1996; Savelkoul y cols., 1999).

En el género *Aeromonas* el AFLP fue aplicado por primera vez por Huys y cols. (1996b) con finalidades taxonómicas. Mediante la aplicación de ésta técnica estos autores pudieron diferenciar las 14 especies de *Aeromonas* que existían en aquél momento. Sin embargo estos resultados demuestran algunas incongruencias con los obtenidos mediante la secuenciación del gen 16S rRNA (Martínez-Murcia, 1993, 1999) y la hibridación DNA-DNA (Esteve y cols., 1995c) considerada ésta última como el método de referencia para la definición de especies. En 1997a, Kühn y cols. utilizaron

con éxito el AFLP para identificar cepas de *Aeromonas* de origen clínico y ambiental a nivel de especie. Posteriormente ésta técnica ha sido modificada para poder ser utilizada con fluorescencia FAFLP (*Fluorescent Amplified Fragment Length Polymorphism*) en lugar de con isótopos radiactivos (Huys y Swings, 1999).

Aunque esta técnica ha demostrado ser útil con finalidades taxonómicas, el elevado número de bandas que genera la convierten en una técnica poco reproducible si no está extremadamente estandarizada, además la información que se obtiene de su utilización tiene más validez epidemiológica que taxonómica (Savelkoul y cols., 1999).

Hibridación DNA-DNA

La hibridación DNA-DNA consiste en desnaturalizar el DNA de dos microorganismos a estudiar (ssDNA) y a continuación hibridar estas cadenas de ssDNA entre sí. Esta metodología permite establecer el porcentaje de hibridación entre dos cadenas de DNA procedentes de diferentes bacterias así como la disminución de la estabilidad del híbrido a diferentes temperaturas, parámetros que son utilizados para delimitar especies bacterianas (Vandamme y cols., 1996). Existen distintas técnicas de hibridación DNA-DNA, siendo las más comunes: método de la hidroxiapatita (Brenner y cols., 1969); método de renaturalización óptica (De Ley y cols., 1970); y método de la nucleasa S1 (Crosa y cols., 1973; Grimont y cols., 1980). Sin embargo hay que tener en cuenta que éstas técnicas no siempre producen los mismos resultados (Grimont, 1988). Los valores de referencia establecidos para delimitar taxones son los siguientes: valores de hibridación DNA-DNA >70% entre dos cepas, indican que ambas pertenecen a la misma especie, mientras que valores <50% indican diferentes especies. Si el resultado de hibridación DNA-DNA está entre el 55 y el 75%, debe considerarse el valor de incremento de temperatura de desnaturalización (ΔT_m). Valores de ΔT_m de 0-2°C indican que ambas cepas pertenecen a la misma subespecie, ΔT_m de 3-5°C indican que ambas cepas pertenecen a diferentes subespecies, y ΔT_m >7°C indican que ambas cepas pertenecen a diferentes especies (Grimont, 1988). Sin embargo, el valor de ΔT_m no puede ser calculado con todas las técnicas de hibridación DNA-DNA.

En los últimos tiempos se han publicado algunas técnicas colorimétricas miniaturizadas que ya han sido aplicadas al género *Aeromonas* (Kaznowski, 1996). La falta de estandarización sobre qué técnica de hibridación DNA-DNA, la cual debe

considerarse de referencia para la definición de una especie nueva o para la reordenación de un taxón, puede ser la causa de los resultados contradictorios que se describen en la literatura para algunas especies de *Aeromonas* (Huys y cols., 1996a; Ali y cols., 1996).

Gen 16S rRNA

La estructura secundaria del gen 16S rRNA está formada por aproximadamente 50 hélices, las cuales presentan diferentes tasas evolutivas. El estudio de la secuencia del gen 16S rRNA es uno de los métodos más discriminativos y precisos para determinar el nivel de relación filogenética entre bacterias, ya que todas las características citadas inducen a este gen a mantener una función de cronómetro evolutivo (Wose, 1987).

La secuenciación del gen 16S rRNA de la mayoría de especies del género *Aeromonas* fue llevado a cabo por Martínez-Murcia y cols. (1992a,b) y Martínez-Murcia (1999), quien estableció la filogenia del género en base a este gen (Figura 1.2).

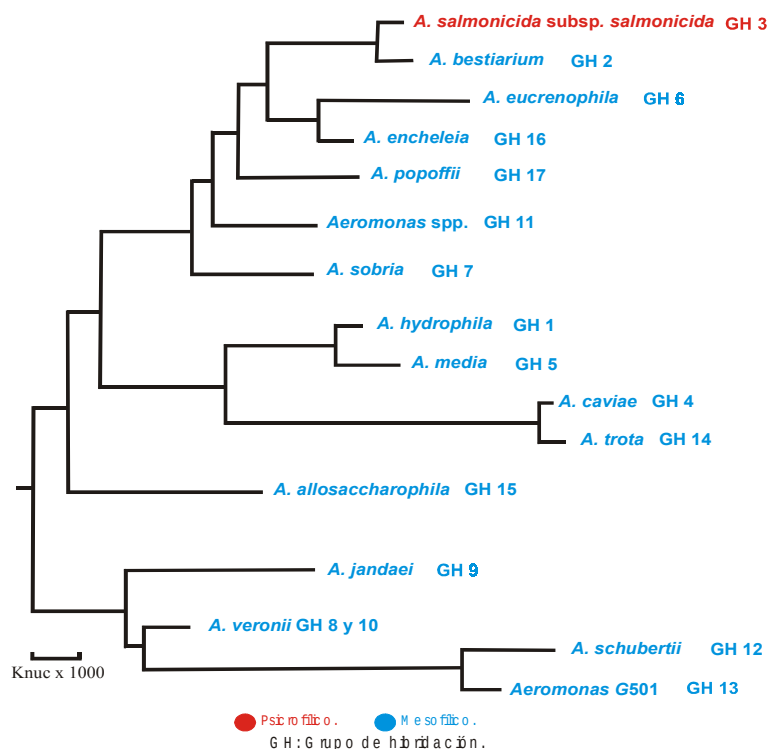


Figura 1.2. Relación filogenética entre las distintas especies incluídas en el género *Aeromonas* establecida en base a la secuencia del gen 16S rRNA (Modificado de Martínez-Murcia, 1999).

El gen 16S rRNA de la mayoría de especies mostró un elevado porcentaje de similitud entre sus secuencias (Martínez-Murcia y cols., 1992a; Martínez-Murcia, 1999). Aunque la mayoría de las relaciones filogenéticas obtenidas con la secuencia del gen 16S rRNA concordaban con los resultados obtenidos con la técnica de hibridación DNA-DNA, también se encontraron secuencias del gen 16S rRNA idénticas para especies que daban resultados de hibridación DNA-DNA diferentes (Martínez-Murcia y cols., 1992a; Martínez-Murcia, 1999). Por ejemplo, *A. bestiarum* (GH2) y *A. salmonicida* (GH3) sólo presentaron 2 bp de diferencia, mientras que las subespecies de *A. salmonicida*, *A. salmonicida* subsp. *achromogenes* y *A. salmonicida* subsp. *masoucida* presentaron la misma secuencia que *A. bestiarum*, sugiriendo que ambas especies están íntimamente relacionadas o incluso que deberían considerarse como una única especie (Carnahan y Altwegg, 1996).

Los fragmentos de las secuencias del gen 16S rRNA han sido ámpliamente utilizados para el diseño de sondas de *Aeromonas* especie-específicas para la detección de especies concretas: *A. hydrophila* (Ludwig y cols., 1994; Cascon y cols., 1996; Oakey y cols., 1999), *A. trota* (Khan y cols., 1999), *A. sobria* (Shibata y cols., 1996), *A. caviae* (Wang y cols., 1996) y *A. popoffii* (Demarta y cols., 1999). No obstante, estas sondas tienen la limitación de que se requiere probar diversas de ellas para cada uno de los aislados (Martínez-Murcia y cols., 1992a). También se han ensayado otros oligonucleótidos capaces de hibridar con regiones definidas como comunes a todas las especies de *Aeromonas* (Kämpfer y cols., 1996), aunque estos aun no han sido ensayados con las especies del género de reciente descripción.

Borrell y cols. (1997) diseñaron una técnica basada en el análisis de los patrones de restricción de todo el gen 16S rRNA (1502 pb), obtenidos tras la digestión con las endonucleasas *AluI* y *MboI*, que permitía identificar 10 de las 13 especies aceptadas (en aquél momento) en el género entre las que se incluían las especies más comúnmente aisladas en muestras clínicas como son *A. hydrophila*, *A. caviae* y *A. veronii*. La utilización de endonucleasas complementarias permitía identificar 12 de las 13 especies aceptadas (Borrell y cols., 1997). Estudios posteriores realizados por Graf (1999b) han indicado que los polimorfismos de patrones de restricción (RFLP) del gen 16S rRNA proporcionaban resultados contradictorios. Sin embargo, este autor utilizaba otro protocolo distinto al propuesto por Borrell y cols. (1997), ya que sólo amplificaba 600 pb del gen y aplicaba únicamente la endonucleasa *AluI* y no la digestión doble propuesta (*AluI*, *MboI*) sobre todo el gen 16S (Figueras y cols., 2000b).

En el año 2000 se publicó una ampliación del método propuesto por Borrell y cols. (1997) que permitía la identificación de las 14 especies aceptadas (en ese momento) dentro del género (Figueras y cols., 2000c). Recientemente se ha publicado un nuevo protocolo basado en los RFLPs del gen 16S rRNA (Lee y cols., 2002) en el que se utilizan cebadores específicos del gen, que amplifican un fragmento de 953 pb, para identificar el género. Tras la amplificación, el fragmento obtenido es digerido con las endonucleasas *AluI*, *CfoI*, *PvuII* y *XhoI* para la identificación de todas las especies, consiguiéndose identificar todas las especies del género con excepción de *A. bestiarum*, *A. salmonicida*, *A. encheleia* y HG11, especies que si podían ser diferenciadas con el protocolo propuesto por Borrell y cols. (1997) y Figueras y cols. (2000c).

Genes que codifican para funciones esenciales ("housekeeping")

Actualmente el *Ad-hoc committee* requiere que para la definición de nuevas especies bacterianas se secuencien un mínimo de cinco genes esenciales de las cepas estudiadas (Stackebrandt y cols., 2002). Entre estos genes estructurales se encuentra el gen *gyrB*. Este gen codifica para la subunidad B de la DNA girasa, y es útil para la identificación y el estudio de la biodiversidad bacteriana (Huang, 1996). Yamamoto y Harayama (1995) diseñaron cebadores universales para la amplificación del gen *gyrB*, facilitando así el estudio de este gen en posteriores trabajos. Estos mismos autores, en 1996 y 1998, estudiaron la clasificación taxonómica de *Pseudomonas putida* y *Acinetobacter* en base a este gen, demostrando que la tasa de evolución molecular del gen *gyrB* es mayor que la del gen 16S rRNA. El análisis mediante secuenciación y RFLP del gen *gyrB* ha permitido diferenciar las diferentes especies con implicaciones clínicas de las bacterias del género *Mycobacterium* (Niemann y cols., 2000). Recientemente se ha creado una base de datos para la identificación y clasificación de las bacterias (ICB) que contiene las secuencias de nucleótidos y de aminoácidos del gen *gyrB* de aproximadamente 850 cepas (Watanabe y cols., 2001). Fukushima y cols. (2002) han utilizado el análisis de éste gen para establecer las relaciones filogenéticas entre los géneros *Salmonella*, *Shigella* y *Escherichia*, habiendo conseguido diferenciar especies tan cercanas como *Shigella* de *E. coli*. Yañez y cols. (2003) han demostrado, en *Aeromonas* spp., que el análisis del gen *gyrB* proporciona resultados congruentes con los obtenidos con el análisis del gen 16S rRNA siendo por tanto un buen cronómetro molecular para realizar estudios

filogenéticos en el género. Además este gen presenta una elevada heterogeneidad a nivel intraespecífico, lo cual sugiere que podría proponerse un protocolo de identificación de las especies del género basado en el análisis de patrones de restricción de éste gen (Yañez y cols., 2003).

El gen *rpoD* codifica para el factor σ^{70} de la RNA polimerasa y su estudio también ha sido utilizado con finalidades taxonómicas. Solnick y cols. (1997) demostraron que el gen *rpoD* presenta un grado de heterogeneidad muy elevado, siendo mayor en las bacterias Gram-negativas que en las Gram-positivas. Un estudio realizado en *Borrelia burgdorferi* ratificó, mediante el estudio de los RFLP y secuenciación del gen *rpoD*, que existía una elevada heterogeneidad en el gen, pero que ésta concordaba con la clasificación de las especies del género. Recientemente, en el género *Pseudomonas* se ha demostrado que el gen *rpoD* evoluciona más rápido que el gen 16S rRNA, además se sugiere que el análisis conjunto de los genes *rpoD* y *gyrB* ofrece una resolución intermedia a la obtenida con el gen 16S rRNA y la hibridación DNA-DNA (Yamamoto y cols., 2000).

1.1.5. Otras técnicas de identificación

Otras metodologías utilizadas con finalidades taxonómicas en el género son la espectrofotometría de masa pirrólica (Magee y cols., 1993) y la electroforesis enzimática multiloci (MEE) (Altwegg y cols., 1991b; Tonolla y cols., 1991), aunque ya no se utilizan en la actualidad.

FAME (Perfiles de ácidos grasos metil-éster)

Los ácidos grasos son los constituyentes más importantes de los lipopolisacáridos de la pared celular de las bacterias habiéndose identificado más de 300 estructuras químicas. Éstos lipopolisacáridos presentes en la membrana externa de las bacterias gram-negativas han sido ampliamente utilizados con propósitos taxonómicos al ser analizados a través de electroforesis. La variabilidad en la longitud de la cadena, la posición de puentes dobles y los grupos sustitutivos han sido útiles para la caracterización de los taxones bacterianos (Suzuki y cols., 1993).

En 1978, Shaw y Hodder detectaron que el estudio de los residuos hexosa y heptosa de los lipopolisacáridos de la pared celular permitía la diferenciación de las especies de *Aeromonas* conocidas en aquél momento. Una década más tarde Canonica y Pisano (1988) demostraban la especificidad de los perfiles de ácidos

grasos, obtenidos mediante la técnica FAME, para la identificación de especies de *Aeromonas*. Estudios posteriores han confirmado la utilidad de ésta técnica para identificar las especies de *Aeromonas* (Havelaar y cols., 1992; Huys y cols., 1995, Kühn y cols., 1997a,b; Huys y cols., 2001) aunque en otros estudios los patrones obtenidos no fueron especie-específicos (Hansen y cols., 1991; Kämpfer y cols., 1994).

Algunos autores consideran que la composición de ácidos grasos metil-éster es estable en condiciones de cultivo estandarizadas, además consideran que la técnica del FAME es rápida y barata (Vandamme y cols., 1996).

SDS-PAGE (Electroforesis de proteínas en geles de sodio-dodecil-sulfato poliacrilamida)

Ésta técnica se utiliza para estimar el peso molecular de las proteínas. El SDS es un detergente aniónico con una larga cola hidrofóbica que se une a las cadenas hidrofóbicas laterales de los aminoácidos con un ratio constante y proporcional al peso molecular de la proteína, de esta manera se asegura que todas las proteínas tengan una carga eléctrica similar y que la migración por electroforesis sea debida únicamente a las masas moleculares de las mismas (Sambrook y cols., 1989). Además el SDS desnaturaliza las proteínas disociando las proteínas multiméricas en sus diferentes subunidades, evitando así que el plegamiento de la proteína afecte a su movilidad (Lodish y cols., 2000). Ésta técnica fue utilizada con éxito en las especies *A. hydrophila*, *A. sobria* y *A. caviae* (Muravada y cols., 1992). Posteriormente Hänninen (1994) demostró que las cepas incluidas en el GH3 (*A. salmonicida*) poseían bandas de pesos moleculares entre 24-26 kDa que no poseían las de los GH1 y GH2, lo que confería a esta técnica cierta utilidad taxonómica, sin embargo Alavandi y cols. (2001) no han encontrado una correlación entre la identificación bioquímica de las especies y la técnica del SDS-PAGE.

Debido a su alta sensibilidad, actualmente esta metodología se emplea como técnica epidemiológica (Esteban y cols., 1999).

1.1.6. Controversias taxonómicas actuales

A pesar de que se ha avanzado mucho en la taxonomía del género, algunas publicaciones recientes han originado cierta controversia. Se propuso el nombre *A. bestiarum* para el grupo de hibridación (GH2) que carecía de nombre específico hasta

entonces (Ali y cols., 1996). Sin embargo, el grado de homología del DNA de dicho taxón con las especies *A. hydrophila* (GH1) y *A. salmonicida* (GH3, cepa de Popoff 316) es extremadamente elevado (78% y 71% a 60°C, 65% y 62% a 75°C respectivamente). Por otro lado el análisis del gen *gyrB* pone de manifiesto que las diferencias entre *A. bestiarum* y *A. salmonicida* rozan el límite establecido en base a éste gen entre diferencias intra-específicas e inter-específicas (Yañez y cols., 2003). Estos aspectos conjuntamente con el hecho de que la secuencia del gen 16S rRNA de *A. bestiarum* es idéntica a la de las secuencias de *A. salmonicida* subsp. *mausocida* y *A. salmonicida* subsp. *achromogenes* (Martínez-Murcia y cols., 1992a) plantea dudas razonables sobre si la especie *A. bestiarum* puede considerarse una nueva especie. *A. salmonicida* es una especie muy heterogénea ya que engloba cepas que son psicrófilas e inmóviles, características propias de la descripción original de la especie (Griffin y cols., 1953), y otras cepas mesófilas y móviles que se parecen más en su comportamiento a *A. hydrophila* (Altwegg, 1999; Joseph y Carnahan, 2000). Además la complejidad de *A. salmonicida* se ve reflejada por el gran número de artículos que describen cepas con características bioquímicas y genéticas atípicas que no permiten incluirlas en ninguna de las subespecies (Austin y cols., 1989; Wilklund y Dalsgaard, 1998; Austin y cols., 1998; Høie y cols., 1999; Sørum y cols., 2000; Lund y cols., 2002).

Otra propuesta que está en discusión es la de Huys y cols. (1996a; 1997a) quienes consideran que *Aeromonas* sp. (GH11) y determinadas cepas de *A. eucrenophila* pertenecen a la especie *A. encheleia*. Sin embargo, los valores de DNA-DNA obtenidos por estos autores son contradictorios con los publicados por Esteve y cols. (1995c) en la descripción de la especie *A. encheleia* y la secuencia del gen 16S de ésta es muy diferente de la secuencia de la cepa de referencia de *Aeromonas* sp. (GH11) (Martínez-Murcia, 1999). En un estudio reciente basado en la aplicación de taxonomía numérica éstas cepas han demostrado presentar un patrón bioquímico atípico sugiriéndose que quizás podrían corresponder a un nuevo taxón (Valera y Esteve, 2002). Así mismo la secuenciación del gen *gyrB* de cepas de *A. encheleia*, *A. eucrenophila* y *Aeromonas* sp. GH11 tampoco ha clarificado cuales son las relaciones filogenéticas entre estas especies, y si deben o no considerarse sinónimos (Yañez y cols. 2003).

Estudios realizados con AFLP indicaron que existe una elevada similitud entre *A. allosaccharophila*, *A. veronii* y *A. ichthiosmia* (Huys y cols., 1996b), resultados que apoyan la sinonimia de *A. ichthiosmia* con *A. veronii*, previamente sugerida por Collins y cols. (1993) y recientemente ratificada (Huys y cols., 2001). En el caso de *A. allosaccharophila* y *A. veronii*, la hibridación DNA-DNA resultó ser de 78-82% de similitud entre ambas especies, pero éste resultado no es congruente con los resultados previos, ni con los datos filogenéticos y bioquímicos por lo que no se ha hecho una propuesta firme de sinonimización (Huys y cols., 2001). Recientemente este problema ha sido abordado de nuevo utilizando la taxonomía numérica (Valera y Esteve, 2002) y el análisis del gen *gyrB* (Yañez y cols., 2003) y se ha confirmado que *A. allosaccharophila* es claramente distinta de *A. veronii*, tal y como había sido previamente propuesto (Martínez-Murcia y cols., 1992b; Esteve y cols., 1995b).

Otro tema no resuelto es el de la sinonimia entre *A. caviae* y *A. punctata*, ya que ambas comparten la misma cepa tipo. De hecho *A. caviae* se describió con posterioridad por lo que en realidad el nombre válido debería ser *A. punctata* (Schubert y Hegazi, 1988). Este aspecto está todavía por resolver por el *Taxonomic Working Group on Aeromonas* perteneciente al *International Committee of Systematic Bacteriology* (Figueras y cols., 2000c).

Otro aspecto que genera una continua confusión es la utilización inapropiada del nombre específico *A. sobria* para cepas aisladas de muestras clínicas. En realidad la especie *A. sobria* (GH7) se ha aislado principalmente en muestras ambientales y muy raramente en muestras clínicas (Borrell y cols., 1997). El error surge porque la mayoría de métodos de identificación conservan el nombre *A. sobria*, propuesto en 1984 por Popoff, para definir el grupo fenotípico que englobaría a tres de los grupos de hibridación (GH7, GH8, GH10). Los grupos de hibridación definidos originalmente (GH8 y GH10) se corresponden de acuerdo con el estudio de Joseph y cols. (1991) con dos biotipos definidos para la especie *A. veronii*: *A. veronii* bt. *sobria* (GH8) y *A. veronii* bt. *veronii* (GH10). A pesar de que no existen diferencias en los valores de hibridación DNA-DNA y que ambos biotipos presentan secuencias del gen 16S rRNA idénticas, aunque poseen caracteres bioquímicos propios, en la actualidad todavía se les sigue asignando sus grupos de hibridación originales, aunque muchas veces aparecen referidos como *A. veronii* GH8/10. Dado que de los dos biotipos el correspondiente a *A. veronii* bt. *sobria* es el más común en muestras clínicas, la última edición del Manual Bergey's indica que la mayoría de cepas de origen clínico

identificadas como *A. sobria* se corresponde de acuerdo con la taxonomía actual con *A. veronii* (Holt y cols., 1994).

Tal y como se ha comentado repetidamente por numerosos autores, todos aquellos estudios que utilizan métodos fenotípicos para la identificación de las especies llegan a la identificación de grupo fenotípico y no a la de especie, ya que a ésta solo puede llegarse inequívocamente mediante métodos moleculares (Kämpfer y Altwegg, 1992; Carnahan, 1993; Borrell y cols., 1997; Figueras y cols., 2000b,c). Probablemente para evitar las continuas confusiones y la incertidumbre que se plantea sobre si las especies que aparecen en los trabajos que se publican son o no las correctas, sería más conveniente que se hiciera referencia a ellas como *Aeromonas* sp. o que fuera confirmada su identidad en laboratorios de referencia antes de su publicación (Figueras y cols., 1999). Además en la actualidad el término GH es un tanto obsoleto y debería abandonarse tal y como proponen Janda y Abbot (1998).

1.2. Epidemiología

1.2.1. Ecología

Agua

El hábitat más común de *Aeromonas* lo constituyen los ambientes acuáticos, como ya lo demostraron los primeros aislamientos realizados por Lehmann y Neumann (1896).

Numerosos trabajos estudian la incidencia de *Aeromonas* en aguas superficiales (Miranda y Castillo, 1996; Kersters y cols., 1996; Borrell y cols., 1998; Goñi-Urriza y cols., 1999; Montes y cols., 1999; Obi y cols., 2003) así como en agua de mar (Dumontet y cols., 1996; Okpokwasili y Akujobi, 1996; Borrell y cols., 1998; Sechi y cols., 2002). Existen datos que indican que *Aeromonas* puede persistir y reproducirse en el suelo manteniendo las cepas sus propiedades virulentas de citotoxicidad y capacidad invasiva en células eucariotas, considerándose el suelo un reservorio importante de estos microorganismos (Brandi y cols., 1996; Kühn y cols., 1997c). Un hecho de mayor trascendencia es que *Aeromonas* se ha aislado de sistemas de reserva y distribución de agua potable antes y después de ser tratadas con cloro (Villaruel, 1997), siendo *Aeromonas* el género de bacterias Gram-negativas

más abundantes a lo largo del proceso de tratamiento de aguas residuales (Kämpfer y cols., 1996). La incidencia de *Aeromonas* tanto en aguas potables cloradas como no cloradas, como en aguas embotalladas (Borrell y cols., 1998; Sisti y cols., 1998; Massa y cols., 2001; Ghenghesh y cols., 2001; Croci y cols., 2001; Biscardi y cols., 2002; Villari y cols., 2003) tiene especial relevancia para la salud pública. Estudios recientes han demostrado que la incidencia de *Aeromonas* está influenciada por las características fisicoquímicas del agua a lo largo del proceso de tratamiento (Nsabimana y cols., 2000) así como por la cantidad de biofilm presente en éstos sistemas (van der Kooij y cols., 1995; Chauret y cols., 2001).

La presencia de *Aeromonas* podría actuar como falso positivo en la detección de los coliformes presentes en el agua potable (Leclerc y Buttiaux, 1962; WHO, 1996; Geissler y cols., 2000). En Holanda se ha sugerido que el análisis rutinario de *Aeromonas* y su concentración sean utilizadas como un indicador de calidad en los sistemas de distribución y se ha establecido un valor guía de 200 ufc/100 ml (Havelaar y cols., 1990). En Estados Unidos se ha incluido también en la lista de microorganismos a investigar en muestras de aguas destinadas al consumo humano (Joseph y Carnahan, 2000). La presencia de *Aeromonas* en el agua potable puede considerarse un indicador de la necesidad de optimizar el sistema de tratamiento para eliminar la materia orgánica o restablecer los niveles de cloro adecuados (Szewzyk y cols., 2000). En la reciente guía para la calidad del agua potable de la OMS (WHO, 2002) se incluye *Aeromonas* como microorganismo a estudiar para garantizar la calidad del agua potable, sobretodo en aquellos lugares donde se encuentre expuesta población de riesgo.

Alimentos

Numerosos estudios investigan la incidencia de *Aeromonas* como parte de un conjunto de microorganismos que pueden estar presentes en distintos alimentos y afectar a su calidad. También se ha investigado la presencia de *Aeromonas* en distintos tipos de alimentos como carne (ternera, oveja, cerdo, pollo), vegetales, huevos, pescado y marisco (Borrell y cols., 1998; Wang y Silva, 1999; Neyts y cols., 2000; Scoglio y cols., 2000; Kumar y cols., 2000; Scoglio y cols., 2001; Sarimehmetoglu y Kuplulu, 2001; Isonhood y Drake, 2002), alimentos preparados (Encinas y cols., 1999; Villari y cols., 2000; Soriano y cols., 2000) y productos lácteos y de pastelería (Borrell y cols., 1998). La presencia de *Aeromonas* en los alimentos ha

sido atribuida al contacto del alimento con agua contaminada (Palumbo, 1996; Palumbo y cols., 1996).

El carácter psicrófilo de estos microorganismos les permite permanecer durante largos períodos de tiempo a las temperaturas de refrigeración (4-7°C) (Palumbo, 1996). Algunos autores consideran que *Aeromonas* debería incluirse en la lista de microorganismos que pueden actuar como agentes causantes de toxoinfecciones alimentarias (Kirov, 1993; Kirov y cols., 1993).

Animales

También debe tenerse en cuenta que las especies de éste género son consideradas agentes etiológicos de numerosas patologías en peces de interés en acuicultura, causando infecciones que van en detrimento de la producción (Austin y cols., 1998). Así pues, podemos destacar a *Aeromonas salmonicida* como el principal agente causal de bacteriemia en piscifactorías de zonas frías, donde el cultivo de salmónidos está muy extendido, y a *A. hydrophila* y *A. jandaei* causantes de las infecciones por *Aeromonas* en especies de peces cultivados en zonas templadas tales como la anguila o el pez gato (Austin y cols., 1998).

Se han descrito brotes epidémicos en granjas de conejos, con un alto nivel de mortalidad, atribuidos a *A. hydrophila* (Paniagua y cols., 1998). *Aeromonas* también se ha aislado en heces de perros y gatos (Ghenghesh y cols. 1999) con una mayor incidencia en los primeros (10.8%) que en los segundos (6.7%). Así como en heces de caballos (Hathcock y cols., 1999), pudiendo producir en estos patologías importantes, entre las que se incluyen desordenes reproductivos e incluso abortos (Forga y cols., 2000). Según estos hallazgos los animales domésticos deben ser considerados otra potencial fuente de infecciones por *Aeromonas*.

Otra posible fuente de contagio de *Aeromonas* son los mosquitos, dado que la nueva especie *A. culicicola* ha sido aislada del intestino de mosquitos hembra de las especies *Culex quinquefasciatus* y *Aedes aegyptii* (Pidiyar y cols., 2002).

1.2.2. Infecciones en humanos

1.2.2.1. Intestinales

Las *Aeromonas* son consideradas actualmente patógenos emergentes y se han aislado como agentes etiológicos de varios procesos infecciosos (Janda, 2001). Caselitz (1958) fue el primer autor en describir la capacidad enteropatógena de *Aeromonas* en los seres humanos. Este autor aisló de forma repetida una cepa de *Aeromonas* en las heces de un niño jamaicano con enteritis, demostrando además la presencia de aglutininas específicas en el suero de éste paciente. Desde entonces se ha sospechado la participación etiológica constante de *Aeromonas* en los procesos diarreicos agudos.

Desde el punto de vista geográfico la frecuencia de *Aeromonas* en heces asociada a sintomatología diarreica oscila entre el 80% en Canadá y el 0.18% en Dinamarca, otros países con alta frecuencia son Perú (52.4%), Japón (11.1%), Australia (11%), Tailandia (18%-31%) e Inglaterra (11%) (Borrell, 1998).

En los diferentes estudios que investigan procesos gastrointestinales bacterianos, *Aeromonas* suele ocupar entre el tercer y el quinto lugar en frecuencia, aunque en un estudio reciente realizado en Suecia ocupa el décimo lugar con una incidencia del 2%, coincidente con la de *Giardia lamblia* (Svenungsson y cols., 2000). Sin embargo, en este estudio se realizó el análisis de diversos tipos de virus y parásitos que no habían sido considerados, hasta entonces, en otros estudios. En nuestro país *Aeromonas* es el grupo bacteriano más aislado, después de *Salmonella enterica* y las diferentes campilobacterias termotolerantes, en los procesos diarreicos de la población pediátrica (Reina y Alomar, 1990; Borrell, 1998; BES, 1999). A pesar de que podríamos considerar que la incidencia de infecciones por *Aeromonas* en España está subestimada, el número de casos notificados entre 1995 y 1999 se ha incrementado en un 141% (BES, 1999). En un estudio prospectivo y retrospectivo realizado en España analizando las gastroenteritis en la población pediátrica, la incidencia de *Aeromonas* supuso el 3.3% de las gastroenteritis agudas bacterianas (Gómez-Campdera y cols., 1996).

La mayoría de los estudios que incluyen poblaciones de todas las edades generalmente apuntan a *A. caviae* como la especie más frecuentemente aislada, seguida de *A. hydrophila* y *A. veronii*. Una excepción de estos resultados es el estudio publicado por Kay y cols. (1986) en Bangladesh donde *A. veronii* fue la especie más

aislada (43%) seguida de *A. hydrophila* (30%) y *A. caviae* (27%). A pesar de que éstas son generalmente las tres especies más abundantes, otras especies pueden aislarse aunque con menor frecuencia (Janda y Abbott, 1998; Janda, 2001).

Los procesos entéricos causados por estos microorganismos afectan a todos los grupos de edad. Sin embargo, se ha descrito que la población infantil es la más afectada, en particular los niños con una edad inferior a los 2 años (Goodwin y cols., 1983; Janda y cols., 1983a,b; Freij, 1984; Kipperman y cols., 1984; Agger y cols., 1985; Burke y Gracey, 1986; Mégraud, 1986; Reina y cols., 1991; Gómez-Campdera y cols., 1996; Borrell, 1998; Albert y cols., 1999). Parece existir, no obstante, un pico de máxima incidencia entre los 2-6 meses de edad (George y cols., 1985; Golik y cols., 1990; Gluskin y cols., 1992).

Las tasas de portadores asintomáticos en los países no tropicales parece ser inferior al 1% (Cataras y Buttiaux, 1965; Panckova y Fulkalova, 1967; Eustatia y cols., 1982; Kuijper y cols., 1987) e incluso en algunas áreas no se han detectado portadores asintomáticos de este microorganismo (Casalino y cols., 1988), mientras que en las zonas tropicales puede llegar a alcanzar porcentajes del 20% (Pitarangsi y cols., 1982; Echeverria y cols., 1989) o incluso del 27% en Tailandia (Bauer y cols., 1985). Esta podría ser la razón por la que algunos estudios no han encontrado diferencias estadísticamente significativas en la tasa de aislamiento de *Aeromonas* entre los pacientes asintomáticos y sintomáticos, impidiéndoles este hecho establecer el significado clínico real de su aislamiento (Hänninen y cols., 1995; Janda y Abbott, 1998). Por el contrario en otros estudios si se han observado diferencias estadísticamente significativas, atribuyéndose significación clínica a los aislamientos (Graevenitz y Mensch, 1968; Gracey y cols., 1982a,b; Janda y cols., 1983a; Mikhail y cols., 1990; Pazzaglia y cols., 1991; Albert y cols., 1999). En un estudio reciente en grupos familiares el número de portadores asintomáticos en el grupo familiar se consideró relativamente alto (Demarta y cols., 2000).

De acuerdo con Janda y Abbott (1998) las evidencias clínicas que apoyan el papel que juega *Aeromonas* en los procesos diarreicos se derivan de unos pocos casos bien documentados (Tabla 1.2) y no de los innumerables estudios basados meramente en el aislamiento de estos microorganismos en las heces. En los casos expuestos en la tabla la mayoría de los pacientes estaban sanos, y en 7 de estos 8 casos existían evidencias serológicas de respuesta del sistema immune (Janda y Abbott, 1998).

Numerosos estudios han intentado evaluar la respuesta serológica frente a las infecciones por *Aeromonas* (Joseph, 1996; Janda y Abbott, 1998; Crivelli y cols., 2001). La respuesta inmunológica primaria de la mucosa intestinal frente a microorganismos patógenos viene mediada por la secreción de inmunoglobulinas A (IgA). Este tipo de respuesta inmunológica ha sido recientemente detectada en pacientes con infecciones intestinales por *Aeromonas*, indicando que por lo menos algunos biotipos de *Aeromonas* son enteropatógenos (Crivelli y cols., 2001).

Tabla 1.2. Casos bien documentados de gastroenteritis asociados a *Aeromonas* (Adaptado de Janda y Abbott, 1998).

Autor	Pacientes Sexo/Edad	Síndrome gastrointestinal	Serología*			Biopsia	Especie
			Antígeno	Fase Aguda	Fase Convalescente		
Rosner (1964)	F/10	Fiebre tifoidea	O	3,000	7,000	No	<i>A. hydrophila</i> [†]
Gurwith y cols. (1977)	F/67	Cólera [‡]	HA	<10	160	No	<i>A. hydrophila</i> [†]
Rahman y Willoughby (1980)	M/35	Disenteria [§]	...	...	...	Rectal	<i>A. hydrophila</i> [†]
Champsaur y cols. (1982)	F/67	Cólera	HA	40	1,280	...	<i>A. veronii</i>
Palfreeman y cols. (1983)	M/67	Enteritis	O	...	640	No	<i>A. hydrophila</i> [†]
Holmberg y cols. (1986)	F/30	Disenteria	O	...	128	No	<i>A. media</i>
Hickman- Brenner y cols. (1987)	M/80	Enteritis	O	...	512	No	<i>A. veronii</i>
Kokka y cols. (1992b)	F/24	Colitis ulcerosa	O	16	...	Intestino delgado	<i>A. veronii</i>
			WC	25			

HA, hemolisina (citotoxina); O, somático; WC, toda la célula. *Aglutinación, neutralización o inmunoreactividad (inmunoblot) anticuerpos (título); [†]Identificación previa a la taxonomía actual; [‡] También se aisló ETEC O159:H34; [§] También se aisló *Plesiomonas shigelloides*.

Son varios los casos descritos en la literatura en los que la resolución de la sintomatología sólo se produjo tras la administración de terapia antibiótica específica frente *Aeromonas*, con la consecuente desaparición de la diarrea y negativización de los coprocultivos (Janda, 1991; Janda y cols., 1994a; Janda y Abbott, 1998). La mayoría de autores consideran en la actualidad el aislamiento de estos microorganismos en los procesos gastrointestinales con significado clínico (Janda, 1991; Janda y Abbott, 1998; Altwegg, 1999; Albert y cols., 1999; 2000).

Uno de los mayores contratiempos en la demostración del poder enteropatógeno de estos microorganismos han sido los resultados obtenidos a nivel experimental, ya que ha sido difícil reproducir en modelos animales la sintomatología diarreica observada en el ser humano (Janda y Abbott, 1998). Se han podido reproducir procesos diarreicos en el modelo animal de conejo, rata tratada con clindamicina y ratones lactantes aunque con algunas discordancias en los resultados (Haberberger y cols., 1989, 1991; Pazzaglia y cols., 1990; 1994; Wong y cols., 1996; Kelleher y Kirov, 2000; Krzyminska y cols., 2001).

Según Janda y Duffey (1988) las principales formas clínicas de presentación de los procesos diarreicos descritos para *Aeromonas* son la diarrea secretora, diarrea disintérica, diarrea coleriforme, la diarrea crónica i la diarrea del viajero. Las diferentes especies de *Aeromonas* han sido sugeridas como posibles agentes causantes de la diarrea del viajero. Algunos estudios detectaron *Aeromonas* en las heces de un 10% de los pacientes con diarrea que habían viajado a Tailandia (Taylor y cols., 1985). Porcentajes inferiores fueron obtenidos en viajeros procedentes de Bangladesh (1%) (Speelman y cols., 1983) y de México (2%) (Mathewson y cols., 1985). En el estudio realizado por Echeverría y cols. (1981) en un grupo de voluntarios que habían visitado Tailandia se demostró que el 42% desarrollaron un proceso diarreico moderado causado por *Aeromonas* a las 5 semanas de su llegada a este país. Leonard y Hadley (1982) también describieron un caso de gastroenteritis asociada a dicho microorganismo en una enfermera que había realizado un viaje a Kenia hacía dos semanas. Posteriormente se describieron 8 casos (6 adultos y 2 niños) en personas que habían viajado al sudeste asiático e Italia (Gracey y cols., 1984). En una revisión realizada por Farthing (1994) se indica que el 5% de los casos de diarrea del viajero podrían atribuirse a *Aeromonas*. Hänninen y cols., 1995, revisaron las características del cuadro diarreico en un grupo de pacientes que habían viajado a Marruecos, indicando que clínicamente éste no difería del producido por otros enteropatógenos y destacaron a *A. caviae* y *A. veronii* bt. sobria como las especies más aisladas. Esta última especie representó el 4.1% de los casos en un estudio retrospectivo de los viajeros que regresaban al Japón entre 1992 y 1994 (Ueda y cols., 1996).

1.2.2.2. Extraintestinales

En 1954 se describió el primer caso de septicemia con miositis metastásica por *Aeromonas* en un paciente de 40 años previamente sano que falleció a las 48 horas de iniciar el cuadro clínico (Hill y cols., 1954). A partir de entonces el número de casos ha ido incrementando de forma progresiva. Sin embargo, no todos ellos se acompañan de suficientes datos clínicos y microbiológicos para poder estimar la significación del aislamiento o definir el poder patógeno de las diferentes especies del género. Los individuos más afectados por este síndrome son adultos inmunocomprometidos y niños menores de dos años con múltiples enfermedades de base que desarrollan la sepsis por *Aeromonas* a través del tracto gastrointestinal, dado que éstas atraviesan la barrera y pasan a la sangre (Janda y Abbott, 1996). Las enfermedades de base más comúnmente asociadas a los cuadros de septicemia son: leucemia y distintos tipos de cáncer (40-50%), enfermedades hepatobiliares (15-30%), diabetes (3-5%) y desordenes diversos entre los que se incluyen pancreatitis, trauma, anomalías cardíacas, desordenes gastrointestinales, anemia y problemas respiratorios (Janda, 1991; Janda y Abbott, 1998; Ko y cols., 2000). La mortalidad asociada a este tipo de infecciones varía entre el 30 y el 85% de los casos (Janda y Abbott, 1996).

Otra forma de septicemia por *Aeromonas* se da en pacientes con quemaduras en el 38-80% de su cuerpo. En éstos casos las quemaduras se dieron como resultado de accidentes de coche o otras heridas accidentales, siendo el contacto con el suelo o el agua contaminada la vía de entrada del patógeno (Purdue y Hunt, 1988; Barrillo y cols., 1996; Ko y cols., 2000).

Las especies reconocidas como causantes de septicemia en humanos son *A. hydrophila*, *A. veronii* bt. sobria, *A. veronii* bt. veronii, *A. caviae*, *A. jandaei*, *A. schubertii* y *A. trota* (Hickman-Brenner y cols., 1988; Carnahan y cols., 1991b,c; Abbott y cols., 1994; Janda y cols., 1994b; Duthie y cols., 1995; Abbott y cols., 1998; Altwegg, 1999; Kim y cols., 2001; Grobusch y cols., 2001; Murata y cols., 2001; Thomsen y Kristianse, 2001; Sarma, 2002). La incidencia de septicemias puede oscilar entre valores muy bajos <0.15-0.3% o llegar a alcanzar el 25% (Cordingley y Rajanayagen, 1981; Janda y cols., 1994b).

El síndrome urémico-hemolítico, asociado a cepas de *Escherichia coli* productora de verotoxinas (O157:H7) (Beutin y cols., 2002; Tozzi y cols., 2003) y a *Shigella dysenteriae* (O'Loughlin y cols., 2001; Imamura y cols., 2002) ha sido también asociado al género *Aeromonas*. Este síndrome se caracteriza por provocar un fallo

renal agudo, presencia de sangre en heces, hematuria, oliguria y anemia. El primer caso de síndrome urémico-hemolítico asociado a *A. hydrophila* es el descrito por Bogdanovic y cols. (1991) en un niño de 23 meses. Posteriormente Robson y cols. (1992) vieron que de un total de 82 casos típicos de síndrome urémico-hemolítico, dos eran debidos a *A. hydrophila*. Recientemente Fang y cols. (1999) han descrito el primer caso del síndrome, debido a *A. hydrophila*, en un paciente adulto sin ninguna patología de base.

El conjunto de infecciones extraintestinales causadas por las diferentes especies del género *Aeromonas* podrían clasificarse de acuerdo con Altwegg y Geiss (1989) en los siguientes grupos:

- Infecciones superficiales debido al contacto con aguas contaminadas
- Infecciones en pacientes con procesos neoplásicos, hematológicos u otros procesos oncológicos.
- Infecciones en pacientes con disfunciones hepatobiliares
- Infecciones en pacientes con o sin otras enfermedades de base

Otras infecciones donde el agente causal puede ser *Aeromonas*, pero menos frecuentes son: meningitis, infección urinaria, endocarditis, osteomielitis, amigdalitis, neumonía por aspiración y otitis media (Janda y Abbott, 1998).

1.2.2.3. Brotes epidémicos

Son pocos los brotes epidémicos descritos en la literatura. Esto es debido, tal y como indican algunos autores, a que las diarreas que produce *Aeromonas* presentan cuadros clínicos poco graves que se autolimitan rápidamente y hace innecesario un estudio bacteriológico (Monteil y Harf-Monteil, 1997). A continuación se describen los más significativos:

Brotes comunitarios

En el estudio realizado por Abeyta y cols (1986) se identificó a *A. hydrophila* como posible causante de 472 casos de gastroenteritis que habían ocurrido a finales de 1982. En este caso las ostras crudas fueron el vehículo implicado en este posible brote comunitario. La mayoría de los pacientes afectados presentaron náuseas, vómitos, diarrea y dolor abdominal. Las ostras examinadas tras el brote fueron

negativas para todos los enteropatógenos convencionales. En las heces de algunos pacientes se aisló *A. hydrophila*, aunque no se aisló en las ostras procedentes de la zona afectada. Unos años más tarde también se describió un pequeño brote asociado al consumo de ostras en Florida (Stelma, 1989). Al igual que en el caso anterior *A. hydrophila* pudo ser aislada de las heces de algunos pacientes, pero en este caso también en algunas ostras. Las ostras implicadas en esta ocasión procedían de la misma zona de Louisiana. Debido a la similitud entre estos dos brotes, las ostras del primer brote, que habían sido congeladas durante un período de 1.5 años, fueron reexaminadas, pudiéndose comprobar que algunas de ellas contenían cepas potencialmente enteropatógenas de *A. hydrophila* (Stelma, 1989). En este estudio se indicaba que la no existencia de sistemas de tipado epidemiológicos adecuados no permitía establecer de una forma definitiva si se trataba o no de la misma cepa de *A. hydrophila*.

No fue hasta 1991a cuando Altwegg y cols. establecieron la relación epidemiológica mediante ribotipado, entre un proceso diarreico de un adulto y el aislamiento de la misma cepa en los restos de un cóctel de camarones ingerido por el paciente en un restaurante.

En 1992a, Moyer y cols. demostraron, utilizando la técnica del ribotipado, que tres miembros de una misma familia habían sido contagiados por *Aeromonas* mediante una misma fuente de contagio, aunque ésta no se pudo hallar. En el mismo trabajo también se observó una relación directa entre la cepa de *A. caviae*, aislada repetidamente en un niño de 3 años, y la cepa aislada de su madre adoptiva al presentar ésta un cuadro de diarrea crónica tres meses más tarde, demostrándose así la transmisión familiar (Moyer y cols., 1992a).

En 1995, Krovacek y cols. describieron, en Suecia, un brote de gastroenteritis por *A. hydrophila* en personas que asistían a un banquete. Todas ellas presentaron, transcurridas entre 20 y 34 h después de la ingesta, signos y síntomas de diarrea aguda con dolor abdominal, cefalea, fiebre y vómitos que se les autolimitó a las 48 h. *Aeromonas hydrophila* fue el microorganismo aislado de los restos de comida con recuentos de 10^6 - 10^7 ufc/g.

Demarta y cols. (2000) utilizando la técnica del ribotipado estudiaron cepas aisladas de pacientes menores de 4 años con cuadros de diarrea y las compararon con las aisladas en las heces de sus familiares asintomáticos, y en el agua y superficies húmedas de sus hogares, demostrando que muchas de estas cepas eran

idénticas. Estos autores indicaron, al igual que habían ya apuntado otros autores (Moyer y cols., 1992b) que la transmisión familiar es probable.

Infecciones nosocomiales

Dickson y cols. (1984) y Mercer y cols. (1987) aislaron *Aeromonas* a partir de infecciones cutáneas producidas como consecuencia de la aplicación médica de sanguijuelas (*Hirudo medicinalis*), describiéndose que un 20% de los pacientes tratados son infectados (de Chalain, 1996; Haycox y cols., 1995; Snower y cols., 1989a,b; Graf, 1999a). Se ha descrito un caso de mionecrosis y un shock séptico después de la aplicación de sanguijuelas tras realizar una cirugía reconstructiva (Snower y cols., 1989a,b; Lineaweaver y cols., 1992a,b). A pesar de que se ha demostrado que estos parásitos están constantemente colonizados por estos microorganismos (Wilken y Appleton, 1993; Graf, 1999a), se han seguido utilizando para la descongestión vascular postcirugía plástica (Nehili y cols. 1994; Haycox y cols., 1995; Graf, 1999a). Originalmente se pensaba que la especie asociada era *A. hydrophila* (Nehili y cols., 1994; Whitlock y cols., 1983; Wilde, 1975), pero recientemente se ha descrito que la especie involucrada en esta simbiosis es *A. veronii* bt. sobria (Graf, 1999a; 2000).

En 1998 Davin-Regli y cols. demostraron la transmisión nosocomial de una cepa de *A. hydrophila* entre dos pacientes de la misma unidad de dermatología. Recientemente en nuestro país se ha descrito un pequeño brote hospitalario por una cepa de *A. hydrophila* asociado a biopsias de colon y atribuido a un endoscopio contaminado (Esteban y cols., 1999).

1.2.3. Infecciones en peces

Éstas infecciones se dan tanto en peces de agua dulce como en peces de agua de mar, siendo los más afectados los peces de agua dulce procedentes de piscifactorías (Lehane y Rawlin, 2000).

Catorce de las especies de *Aeromonas* han sido aisladas en peces sanos o enfermos (Martínez-Murcia y cols., 1992b; Surgita y cols., 1994; Esteve y cols., 1995a,b; González y cols., 2001; González-Rodríguez y cols., 2002), sin embargo sólo algunas de estas especies han sido documentadas como patógenas de peces (Toranzo y cols., 1989; Paniagua y cols., 1990; Joseph y Carnahan, 1994; Esteve y

cols., 1995c; Austin y cols., 1989; Austin y Adams, 1996). A continuación se detallan las consideradas más relevantes.

Aeromonas hydrophila

Ésta especie ha sido aislada en diferentes especies de peces de agua dulce procedentes de diferentes zonas geográficas, y ocasionalmente también en peces de agua de mar. Recientemente, *A. hydrophila* se ha asociado a signos de enfermedad y ha sido aislada en necropsias de peces enfermos (Topić Popović y cols., 2000). Además se ha demostrado que ésta es una de las especies más comunes en brotes epidémicos en piscifactorías de la China (Nielsen y cols., 2001) habiéndose desarrollado vacunas contra la misma (Chandran y cols., 2002).

A. hydrophila produce enfermedades como la putrefacción de las aletas y de la cola, y septicemias (Roberts, 1997). La septicemia hemorrágica se caracteriza por la presencia de pequeñas lesiones externas que provocan la caída de escamas así como hemorragia en las branquias y ano, úlceras, abscesos e hinchazón del abdomen. Internamente se produce acumulación de líquido ascítico en la cavidad peritoneal, anemia y aumento del tamaño del riñón e hígado.

Aeromonas salmonicida

Ésta especie es uno de los patógenos de peces más importantes y produce grandes pérdidas económicas, mayoritariamente en las piscifactorías donde se cultivan salmones. Es por este motivo que recientemente se han desarrollado diversos métodos moleculares para la identificación de ésta especie a partir de tejido de peces enfermos (Byers y cols., 2002a,b; Nilsson y Strom, 2002; Del Cerro y cols., 2002) así como vacunas (Sinyakov y cols., 2002).

A. salmonicida es el agente etiológico de la furunculosis, es decir, formación de lesiones (furúnculos) en la musculatura, la cual se considera una enfermedad crónica. La furunculosis se caracteriza por producir letargo, y múltiples hemorragias en las aletas, ano y músculo. A nivel interno produce hemorragias en el hígado y bazo y necrosis en el riñón (McCarthy, 1980). Aunque la furunculosis es típica de los salmones, también se ha descrito en otras especies como las carpas, peces de colores y peces de agua de mar (Fijan, 1972; Shotts y cols., 1980; Wiklund, 1995a; Kitao y cols., 1984, 1985).

Se han investigado las diversas rutas de transmisión de la furunculosis, habiéndose aceptado que ésta se produce por transmisión lateral de *A. salmonicida*, es decir, por contacto con el agua contaminada (Austin y Adams, 1996).

Cepas de *Aeromonas salmonicida* atípicas

Los aislados pertenecientes a esta categoría producen infecciones en un elevado número de especies de peces, tanto de agua dulce como de agua de mar, salvajes o procedentes de piscifactorías, principalmente del norte y centro de Europa, Sur-África, Norte-América, Japón y Australia (Wiklund y Dalsgaard, 1998). En peces que no pertenecen a la familia Salmonidae la manifestación clínica suele ser la aparición de úlceras en la piel y no suele existir afectación en los órganos internos (Wiklund y Dalsgaard, 1998). En peces de la familia Salmonidae la infección produce letargia, problemas respiratorios, erosión en las aletas, hemorragias cutáneas y lesiones musculares (Groman y cols., 1992). Además se han observado hemorragias en las branquias, hígado, corazón, intestino y cavidad peritoneal en peces de la especie *Salmo trutta* (salmón) (Ojala, 1966; Wichardt, 1983). En la especie *Oncorhynchus mykiss* (trucha) se observaron cambios en los órganos internos como la decoloración del hígado y el alargamiento del riñón (Boomker y cols., 1984).

Existen estudios que han tratado de determinar si cepas de *A. salmonicida* atípicas pueden causar patogenicidad en diferentes especies de peces. En algunos de estos estudios la cepa era patógena sólo para el huésped original y no para otras especies (Michel, 1981; Wiklund, 1995b), sin embargo otros estudios determinaron que la cepa era patógena para diferentes especies de peces independientemente del huésped original (Whittington y Cullis, 1988; Austin, 1993).

1.2.4. Sensibilidad a agentes antimicrobianos

La mayoría de trabajos que estudian la sensibilidad *in vitro* a los antibióticos han investigado solo la respuesta de las especies fenotípicas “*A. hydrophila*”, “*A. caviae*” y “*A. sobria*” (Fainstein y cols., 1982; Richardson y cols., 1982; Chang y Bolton, 1987; Koehler y Ashdown, 1993; Morita y cols., 1994; Ko y cols., 1996). Sin embargo, Kämpfer y cols. (1999) determinaron la sensibilidad de 217 cepas, que representaban las 14 especies de *Aeromonas* descritas hasta aquél momento, a 69 agentes antimicrobianos. Éstos autores determinaron que no existían diferencias significativas entre las diferentes especies. La mayoría de las cepas eran sensibles a las

tetraciclinas, quinolonas, cloramfenicol, nitrofurantoina, trimetoprim, la mayoría de aminoglucósidos, cefalosporinas, azlocilina y piperacilina, resultados que eran congruentes con los obtenidos por Motyl y cols. (1985), Chang y Bolton (1987) y Morita y cols. (1994). En paralelo al trabajo de Kämpfer y cols. (1999), Overman y Janda (1999) publicaron un estudio en el que evaluaban la sensibilidad a los antibióticos de cepas clínicas de las especies *A. jandaei*, *A. schubertii*, *A. trota* y *A. veronii* bt. *veronii*. Estas especies demostraron ser más sensibles a las cefalosporinas de primera generación que las especies más frecuentemente aisladas en muestras clínicas, siendo *A. jandaei* la que presentaba un patrón de resistencia a un mayor número de antibióticos, en concreto a piperacilina, ticarcilina e imipenem. Es interesante destacar que esta especie es, de las cuatro ensayadas, la más frecuentemente aislada en hemocultivos (Janda y Abbott, 1998). Recientemente Ko y cols. (2001) han evaluado la eficacia de la cefotaxima y la minociclina en ratones infectados con *A. hydrophila*, utilizados como modelo animal de la bacteriemia en humanos. En este modelo se ha determinado que ambos agentes actúan de forma sinérgica y que por lo tanto esta sería una buena terapia en casos de infección extraintestinal grave debida a *A. hydrophila*.

Un factor a tener en cuenta cuando se estudia la resistencia a diferentes antibióticos es la zona geográfica originaria de las cepas. En 1996, Ko y cols. describieron que las cepas clínicas de *Aeromonas* aisladas en Taiwan eran más resistentes a la tetraciclina y los aminoglucósidos que las aisladas de Estados Unidos (Motyl y cols., 1985) y Australia (Koehler y Ashdown, 1993), indicando que la resistencia a los diferentes antibióticos está claramente influenciada por factores geográficos y socio-económicos. Actualmente la aparición de nuevos patrones de resistencia en cepas de *Aeromonas* de origen ambiental se asocia a zonas con un elevado impacto humano (Goñi-Urriza y cols., 2000a,b).

Para el tratamiento de las infecciones por *Aeromonas*, actualmente se recomiendan las fluoroquinolonas (excepto en pacientes pediátricos) o como alternativas el trimetoprim-sulfametoxazol, los aminoglicósidos, imipenem, meropenem, cefalosporinas de segunda y tercera generación y las tetraciclinas (Sanford y cols., 1997).

Clásicamente, la oxitetraciclina se ha utilizado para tratar la furunculosis provocada por *A. salmonicida* en piscifactorías (Snieszko y Griffin, 1951; Austin y Austin, 1993; Smith y cols., 1994). En la actualidad se ha descrito un incremento en la

resistencia a éste antibiótico en las cepas de *Aeromonas* aisladas en piscifactorías (Schmidt y cols., 2000) y diversos estudios correlacionan éste incremento con la utilización de éstos antibióticos, tanto para tratar las infecciones producidas por *Aeromonas* (DePaola y cols., 1988) como por otros géneros bacterianos (McPhearson y cols., 1991; Spanggaard y cols., 1993; Guardabassi y cols., 2000). Este aumento de la resistencia a los antibióticos tanto en piscifactorías como en otros ambientes ha provocado que diversos autores hayan tratado de determinar el mecanismo por el cual *Aeromonas* adquiere la resistencia a los mismos. En 1987 Chang y Bolton aislaron un plásmido de 110 MDa en una cepa de *A. sobria* que confería resistencia a ocho antibióticos (ampicilina, kanamicina, estreptomicina, espectinomicina, sulfisoxazol, ticarcilina, tobramicina y trimetoprim). Sin embargo la resistencia a los antibióticos β -lactámicos se asocia a la síntesis de al menos dos β -lactamasas cromosómicas inducibles: una carbapenemasa y una cefalosporinasa (Shannon y cols., 1986; Baken y cols., 1988; Iaconis y Sanders, 1990; Hayes y cols., 1994; Walsh y cols., 1995; Alksne y Rasmussen, 1997; Walsh y cols., 1997; Ko y cols., 1998).

La resistencia asociada a la utilización de tetraciclinas en las piscifactorías se debe a la transferencia por conjugación de un plásmido R de alto peso molecular (Richards y cols., 1992; Inglis y cols., 1993; Sandaa y Enger, 1994, 1996) que es capaz de ser transferido a otras cepas clínicas y ambientales de la misma especie (Adams y cols., 1998; Rhodes y cols., 2000). Este tipo de plásmidos también es responsable de la transmisión de genes de resistencia para diferentes antibióticos asociados a integrones de clase 1 (Schmidt y cols., 2001a,b; L'Abée-Lund y Sørum, 2001).

La resistencia a las quinolonas ha sido atribuida a mutaciones en el gen *gyrA*, indicando que la DNA girasa es la principal diana para estos antibióticos, además la presencia simultánea de una mutación en el gen *parC* (que codifica para la subunidad A de la topoisomerasa IV) aumenta la resistencia tanto a las quinolonas no fluoradas como a las fluoradas, indicando que la segunda diana para estos antibióticos es la topoisomerasa IV (Goñi-Urriza y cols., 2002).

1.2.5. Técnicas de tipado

Debido a la dificultad para identificar bioquímicamente a las especies de *Aeromonas*, la mayoría de métodos de tipado empleados en este género han sido valorados también como métodos taxonómicos. Dado el escaso número de cepas bien documentadas relacionadas con brotes epidemiológicos, resulta difícil comparar adecuadamente estas metodologías. La mayoría de estudios centran su objetivo en establecer la sensibilidad de los métodos existentes para discriminar si cepas relacionadas epidemiológicamente presentan o no patrones idénticos.

1.2.5.1. Métodos fenotípicos

En *Aeromonas* se ha aplicado un amplio grupo de metodologías basadas en caracteres fenotípicos para el tipado de las cepas, sin embargo, algunas como el fagotipado (Peduzzi y Demarta, 1986; Altwegg y cols., 1988; Fukuyama y cols., 1991, 1992), patrón de resistencia a antibióticos (Dalsgaard y cols., 1994; Janda y Motyl, 1985; Talon y cols., 1996) y la electroforesis enzimática multiloci (Popoff y cols., 1981; Picard y Goullet, 1987; Tonolla y cols., 1991) ya no se utilizan en la actualidad.

Biotipado

El biotipado se basa en establecer el patrón de actividad de un número igual o superior a 20 enzimas metabólicas celulares (Maslow y cols., 1993). Este tipo de datos se obtienen de forma rutinaria en los laboratorios de microbiología clínicos por lo que parece una técnica rápida y sencilla, sin embargo ésta presenta un bajo poder de discriminación y la técnica solo posee un valor real para identificar diferentes cepas de una especie determinada (Altwegg, 1996). Ésta técnica fue aplicada para comparar 187 cepas de *Aeromonas* aisladas de heces y 263 aislamientos de agua potable, aunque solo se pudieron reconocer 10 biotipos (Havelaar y cols., 1992). Sin embargo en la actualidad existen métodos comerciales automatizados para el biotipado como el PhenePlate System (PhPlate Microplate Techniques AB, Stockholm, Suecia) que cuantifican el producto resultante de la reacción y que además usan reactivos específicos para las diferentes especies. Ésta técnica ha sido recientemente utilizada para tipar 52 cepas de *Aeromonas* (14 de peces con síndrome epizoótico ulcerativo, 26 ambientales y 12 de heces humanas), no habiéndose observado similitudes entre las cepas de origen clínico y ambiental, sin embargo, todas las cepas procedentes de peces con síndrome epizoótico ulcerativo pertenecieron a un único fenotipo, sugiriendo

que el agente causal de éste síndrome en Bangladesh era un grupo clonal de *A. veronii* bt sobria (Rahman y cols., 2002).

Serotipado

Es bien conocido que microorganismos de una misma especie pueden diferenciarse por su expresión de determinantes antigénicos en su superficie celular. El serotipado se basa en detectar estas diferencias mediante técnicas inmunológicas (Maslow y cols., 1993). Los trabajos preliminares para la caracterización serológica de *Aeromonas* incluyeron 12 antígenos somáticos (antígenos O) y 9 flagelares (antígenos H) para *A. hydrophila* (Ewing y cols., 1961). El primer esquema útil para serotipar las cepas de *Aeromonas* incluía 44 serogrupos (basados en antígenos O) en un total de 307 cepas de *A. hydrophila* y *A. caviae* (Sakazaki y Shimada, 1984). Este esquema fue posteriormente utilizado con éxito (Thomas y cols., 1990) e incluso ampliado hasta 64 serotipos (Misra y cols., 1989). Además se ha determinado que el serotipo O:11 es el más común en cepas muy virulentas (Kokka y cols., 1991) y suele estar asociado a cepas aisladas de muestras de sangre (Merino y cols., 1993), mientras que el serotipo O:34 es el más frecuente entre aquellas cepas poco virulentas que se aíslan frecuentemente en muestras de heces (Merino y cols., 1992, 1993).

Posteriormente se describió otro esquema para serotipar las especies de *Aeromonas* basado en 30 antígenos O y 2 K (Guinée y Jansen, 1987). Con este protocolo se pudo serotipar el 86% de las cepas ensayadas. Un tercer esquema fue descrito por Fricker (1987), aunque este no ha sido utilizado posteriormente.

Recientemente, Korbsrisate y cols. (2002) han utilizado el serotipado con un total de 256 cepas de *Aeromonas* aisladas de muestras clínicas, habiendo determinado que el 50% de éstas pertenecen a los serogrupos O:11, O:16, O:18 y O:34, además estos autores han producido un antisuero capaz de reaccionar específicamente con todas las cepas de *Aeromonas* permitiendo diferenciar este género de otros géneros de bacterias gram-negativas y oxidasa positivas.

SDS-PAGE (Electroforesis de proteínas en geles de sodio-dodecil-sulfato poliacrilamida)

El análisis del contenido proteico de la membrana bacteriana mediante la técnica del SDS-PAGE ha sido utilizado con éxito en numerosos organismos (Mulligan y cols., 1988). En el género *Aeromonas* este método demostró ser capaz de tipar

todas las cepas ensayadas, aunque presentaba el inconveniente de ser poco reproducible (Stephenson y cols., 1987; Arzese y cols., 1993). Kuijper y cols. realizaron diversos estudios utilizando esta técnica para caracterizar cepas aisladas repetidamente de un mismo paciente (Kuijper y Peeters, 1986, Kuijper y cols., 1989b), pudiendo comprobar que durante un proceso diarreico, el tracto digestivo de los pacientes puede ser colonizado por cepas distintas. Posteriormente Mulla y Millership (1993) realizaron un estudio dirigido específicamente a cepas de la especie *A. sobria*, pero no obtuvieron correlación entre los resultados obtenidos con la técnica del SDS-PAGE y el biotipado. Aunque se asume que la utilización de ésta técnica no es válida para la separación de cepas de *Aeromonas* (Altwegg, 1996), el SDS-PAGE ha sido recientemente utilizado con éxito en un brote nosocomial descrito en nuestro país en el que se aisló la misma cepa en un endoscopio contaminado y en las biopsias de varios pacientes (Esteban y cols., 1999). En un trabajo posterior Alavandi y cols. (2001) utilizaron en paralelo la técnica del SDS-PAGE y del RAPD, obtubiendo mejores resultados con ésta última técnica.

1.2.5.2. Métodos genéticos

Dado que las técnicas fenotípicas presentaban problemas de reproducibilidad y de poder de discriminación, en la década de los ochenta se desarrollaron técnicas basadas en el análisis del DNA que resultaron ser más estables y fiables, la aplicación de las cuales ha abierto nuevas perspectivas en el desarrollo de marcadores epidemiológicos. A continuación se detallan algunas de ellas.

Análisis plasmídico

El análisis plasmídico, que consiste en aislar los plásmidos de cada aislado y separarlos por electroforesis en geles de agarosa para determinar su número y tamaño, fue una de las primeras técnicas empleadas en diferentes microorganismos (Mayer, 1988). Una forma sencilla de mejorar esta técnica consiste en digerir con enzimas de restricción los plásmidos aislados y así comparar los patrones obtenidos con diferentes cepas (Maslow y cols., 1993). Esta técnica tiene la limitación de que se trata de una técnica limitada a cepas con presencia de plásmidos y que dichos plásmidos son por naturaleza inestables y móviles, por lo que cepas epidemiológicamente relacionadas pueden presentar diferentes patrones (Mickelsen y cols., 1985). Sin embargo esta técnica ha demostrado ser útil en el estudio de brotes

epidémicos producidos por cepas atípicas de *A. salmonicida* en peces (Sørum y cols., 2000).

REA (Análisis de Restricción Enzimática) y ribotipado

El REA consiste en la digestión del DNA cromosómico total mediante endonucleasas de alta frecuencia de corte y su posterior electroforesis en geles de agarosa. Esta metodología fue aplicada al género por varios autores (Kuijper y Peeters, 1986, Altwegg y cols., 1988, Kuijper y cols., 1989b). El REA tiene el inconveniente de que produce un número excesivo de bandas, lo que hace prácticamente imposible comparar un elevado número de cepas. Esta problemática puede solucionarse transfiriendo los fragmentos de DNA separados en el gel a una membrana de nylon para su posterior hibridación con una sonda que contenga los genes que codifican para el rRNA (Grimont y Grimont, 1986; Altwegg y Moyer, 1989). Ésta técnica recibe el nombre de ribotipado y reduce las bandas o marcadores a un número de entre 5 y 20. La reproducibilidad de este método ha resultado ser excelente tanto en cepas repetidamente cultivadas *in vitro* (Stull y cols., 1988) como recuperadas *in vivo* (Carey y cols., 1994), y su aplicabilidad ha sido ampliamente demostrada por autores como Moyer y cols. (1992a,b), Demarta y cols. (2000) y Bauab y cols. (2003).

PFGE (Electroforesis de campo pulsado)

El PFGE se basa en el empleo de endonucleasas de baja frecuencia de corte y posterior electroforesis en campo pulsado, permitiendo el análisis de fragmentos de DNA más grandes que los obtenidos con el REA (10 - 800 Kb) (Arbeit y cols., 1990; Maslow y cols., 1993). Teóricamente el PFGE se define como una técnica altamente reproducible, ya que los patrones pueden resolverse bien en un único gel de agarosa y representan el genoma completo de la bacteria, y aplicable a cualquier cepa bacteriana (Maslow y cols., 1993). El PFGE fue la técnica empleada para comparar 5 cepas de *A. hydrophila* aisladas en pacientes de un mismo hospital, con 10 cepas aisladas en el circuito de agua del hospital y 10 cepas no relacionadas, observándose que las 10 cepas no relacionadas presentaban patrones diferentes, considerándose por lo tanto que el PFGE era una técnica rápida y discriminatoria para el tipado de *Aeromonas* (Talon y cols., 1996). Posteriormente estos mismos autores compararon esta técnica con la técnica de los RAPD y encontraron que ésta última era más fácil, barata y rápida que el PFGE (Talon y cols., 1998).

Chomarat y cols. (1998) utilizaron el PFGE para tipar 44 cepas de *A. salmonicida* subsp. *salmonicida* aisladas de peces enfermos, encontrando 40 patrones diferentes, por lo que no se pudo demostrar una relación entre el patrón obtenido por PFGE y el origen patológico de la muestra, es por este motivo que estos autores consideraron que el PFGE sólo es válido para el tipado de brotes epidémicos de furunculosis si es utilizado en paralelo a otras técnicas como el ribotipado o el RAPD. Sin embargo, el PFGE ha demostrado ser una buena técnica epidemiológica que permite determinar la heterogeneidad genética en cepas atípicas de *A. salmonicida* (Hänninen y Hirvelä-Koski, 1999). La aplicación del PFGE ha sugerido la existencia de una distribución clonal de las cepas de la especie *A. salmonicida* subsp. *salmonicida* aisladas de diferentes países y especies de peces, y que la mayoría de infecciones debidas a esta especie provienen mayoritariamente de un mismo clon (García y cols., 2000). Recientemente se ha insistido en la aplicabilidad que tiene la técnica en estudios de carácter epidemiológico y/o ecológico en *Aeromonas* ratificando además que esta técnica es más resolutive que el biotipado tradicional (Bonadonna y cols., 2002).

Recientemente, mediante la aplicación del PFGE, se ha demostrado la persistencia de *Aeromonas* en aguas minerales embotelladas debido a la formación de biofilms en los acuíferos (Villari y cols., 2003).

El PFGE también ha servido para demostrar que las *Aeromonas* recuperadas en las heces de los pacientes de un hospital de Wisconsin (USA), no estaban relacionadas con las cepas recuperadas en los pozos privados de agua y en el agua potable que utilizaban los pacientes (Borchardt y cols., 2003).

AFLP (Polimorfismos de fragmentos de amplificación)

Tal y como se ha descrito anteriormente ésta es una técnica que puede ser utilizada tanto con finalidades taxonómicas como epidemiológicas, considerándose que cepas con patrones con un porcentaje de homología del 90 al 100% pertenecen a un mismo clon (Savelkoul y cols., 1999).

En 1997b, Kühn y cols. realizaron un estudio que duró 4 años en el que pretendían investigar la diversidad y persistencia de coliformes y *Aeromonas* en un pozo de agua potable. Durante este periodo de tiempo los autores hicieron diversos muestreos, en 28 de los cuales recuperaron cepas de *A. hydrophila* que al ser analizadas por AFLP demostraron pertenecer a un mismo clon, demostrándose así

que en el pozo residía un clon genéticamente estable de *A. hydrophila*. Recientemente el AFLP ha sido utilizado con éxito para determinar la diversidad genética de cepas de *A. salmonicida* atípicas, habiéndose demostrado que parece existir una correlación entre la similitud genética de las cepas y la especie del pez huésped del que se aíslan (Lund y cols., 2002). Esta observación coincidiría con los resultados obtenidos por García y cols. (2000) utilizando la técnica del PFGE.

El AFLP presenta una elevada reproducibilidad y un elevado poder de discriminación (Savelkoul y cols., 1999), sin embargo requiere de una infraestructura no disponible en todos los laboratorios.

16S-23S ISR (Espaciador intergénico 16S-23S)

En bacterias el operón ribosómico contiene los genes organizados secuencialmente en el siguiente orden: 16S-23S-5S. Entre éstos genes se encuentran los ISR que contienen genes que codifican para tRNA y secuencias diana para la RNasa III. La secuenciación del 16S-23S ISR en numerosas especies bacterianas ha demostrado que existen variaciones importantes en la secuencia y longitud de ésta región. La mayoría de bacterias tienen múltiples copias del operon ribosómico, incrementando la posibilidad de que existan diferencias en el 16S-23S ISR entre diferentes cepas, especies y géneros. Además se trata de una región sin actividad codificante por lo que presenta un ritmo evolutivo rápido. Ello hace posible la utilización de esta región con fines taxonómicos y epidemiológicos (Gürtler y Stanisich, 1996). De hecho, el análisis completo del 16S-23S ISR o de sus patrones de RFLP, obtenidos tras digestión enzimática, ya han permitido tipar con éxito cepas implicadas en procesos epidemiológicos en distintos géneros bacterianos (Kostman y cols., 1995; Abed y cols., 1995; Cartwright y cols., 1995; García-Martínez y cols., 1996). Se ha descrito que la longitud de esta región en *A. hydrophila* oscila entre 472 y 544 pb (Gürtler y Stanisich, 1996). El estudio de la viabilidad de los RFLP del 16S-23S ISR como técnica de marcaje epidemiológico fue evaluada en un grupo de cepas de origen clínico y ambiental de *A. veronii*, demostrándose que dicha técnica produce patrones cepa específicos y permite reconocer cepas derivadas de un mismo clon en un sistema de distribución de agua potable (Martínez-Murcia y cols., 2000). También en este mismo estudio se reconocieron como idénticas cepas procedentes del mismo paciente y obtenidas de dos coprocultivos distintos, uno realizado al ingresar el paciente en el hospital y el otro una semana más tarde.

RAPD (Amplificación al azar de fragmentos polimórficos de DNA)

Esta técnica se basa en la amplificación por PCR de regiones del genoma al azar, para ello se utiliza un único cebador con una longitud de entre 10 y 12 pb (Williams y cols., 1990). Los principales inconvenientes de esta metodología son: (i) requiere de una estandarización previa para que los resultados sean reproducibles (Meunier y Grimont, 1993; Tyler y cols., 1997); (ii) cuando se analizaron las secuencias de diferentes bandas obtenidas por RAPD en *A. hydrophila* se encontró que bandas con igual peso molecular contenían secuencias diferentes por lo que el resultado obtenido con esta técnica debe ser tomado con precaución (Oakey y cols., 1998).

Esta técnica fue utilizada en paralelo con el PFGE para tipar un grupo de cepas de *A. hydrophila* procedentes de muestras de pacientes de un hospital y de agua de la red de distribución del mismo demostrándose con ambas técnicas que el agua no era la fuente de contagio. El RAPD resultó ser una técnica más sencilla, rápida y barata que el PFGE (Talon y cols., 1998). El RAPD también fue utilizado con éxito para demostrar la transmisión nosocomial de una infección por *A. hydrophila* (Davin-Regli y cols., 1998). Recientemente esta técnica ha sido utilizada junto con el SDS-PAGE para investigar la relación entre 16 cepas de *Aeromonas* aisladas de niños con diarrea y 15 cepas aisladas del agua de los depósitos de sus hogares. Con el RAPD se obtuvieron dos grandes grupos, uno con las cepas clínicas y otro con las cepas de agua, sin embargo el SDS-PAGE no diferenció los aislados clínicos de los de agua (Alavandi y cols., 2001).

rep-PCR (Amplificación de elementos repetitivos)

El rep-PCR es una técnica alternativa al RAPD dado que se basa en la PCR de regiones conservadas del genoma. Al igual que en el caso del RAPD es necesaria una minuciosa estandarización de la técnica para asegurar su reproducibilidad (Tyler y cols., 1997). Dentro de éste grupo de técnicas se encuentran el REP y el ERIC. El REP son regiones de entre 33 y 40 pb que se repiten entre 500 y 1000 veces en el genoma de *Escherichia coli* y *Salmonella typhimurium*, ocupando aproximadamente el 1% de su genoma (Stern y cols., 1984). El ERIC son regiones de entre 124 y 127 pb que se repiten entre 30 y 150 veces en el genoma de las Enterobacterias (Hulton y cols., 1991).

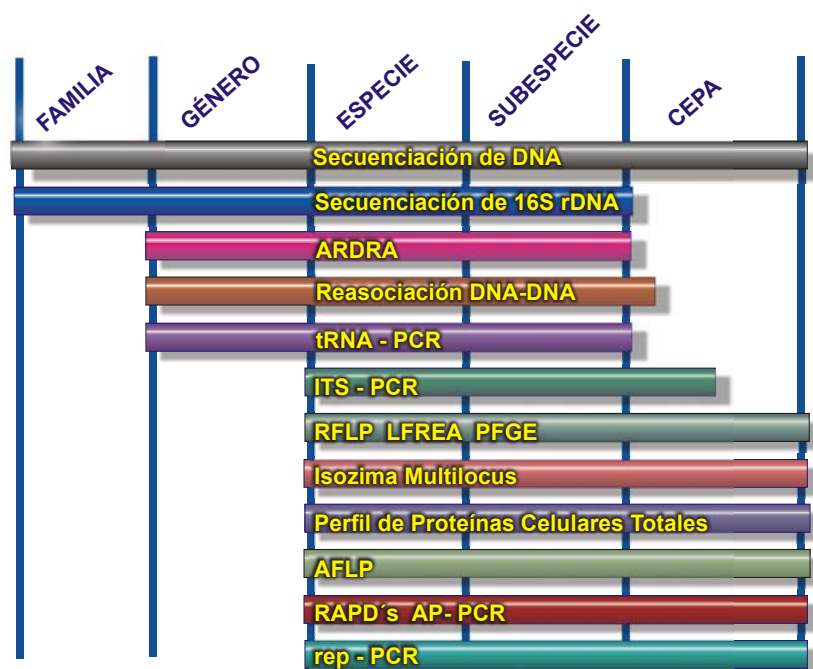
La técnica del REP-PCR no fue aplicada con finalidades epidemiológicas hasta 1992 (Woods y cols., 1992) y el ERIC hasta 1993 (Endtz y cols., 1993). La primera

publicación donde se aplicaron ambas técnicas en combinación data de 1995 (Lipman y cols., 1995).

El ERIC-PCR fue aplicada al estudio de un grupo de cepas de *A. hydrophila* aisladas durante un mismo periodo en 4 pacientes y en el agua de suministro del hospital, aunque no se pudo demostrar la relación entre las cepas aisladas del agua y las de los pacientes, sí se encontraron 2 pacientes colonizados por la misma cepa que habían utilizado la misma habitación, demostrándose la eficacia de esta técnica en estudios epidemiológicos (Davin-Regli y cols., 1998). Recientemente la aplicación de ésta técnica en *Aeromonas* sp. ha demostrado que las cepas de origen ambiental producen patrones diferentes de los producidos por cepas con origen clínico (Sechi y cols., 2002).

En la figura 1.3. se muestra la resolución de las diferentes técnicas de tipado según Savelkoul y cols. (1999).

Figura 1.3. Poder discriminativo de las técnicas de tipado (Adaptado de Savelkoul y cols., 1999).



ARDRA, Análisis de restricción del DNA ribosómico amplificado; tRNA-PCR, PCR del tRNA del espaciador intergénico; ITS-PCR, PCR del espaciador intergénico 16S-23S; RFLP, Polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción; LFREA, Análisis de enzimas de restricción de baja frecuencia de corte; PFGE, Electroforesis de campo pulsado; AFLP, Polimorfismos de fragmentos de amplificación; RAPD, Amplificación al azar de fragmentos polimórficos de DNA; AP-PCR, PCR con cebadores al azar; rep-PCR, Amplificación de elementos repetitivos.

1.3. Factores de virulencia y mecanismos de patogenicidad

La presencia de factores de virulencia en las especies de *Aeromonas* es un hecho reconocido, sin embargo la patogénesis de las infecciones causadas por *Aeromonas* se desconoce. Los factores de virulencia descritos en *Aeromonas* incluyen tanto componentes estructurales como productos extracelulares (Pemberton y cols., 1997; Chopra y Houston, 1999; Janda, 2001). A continuación se revisan estos factores de virulencia y el papel que se ha sugerido que pueden desempeñar en la patogénesis.

1.3.1. Componentes estructurales

La adhesión de las bacterias a los tejidos del huésped es un paso crítico en la fase inicial de las infecciones causadas por muchos microorganismos. Las bacterias se adhieren a los tejidos y células del huésped y alteran sus mecanismos de defensa iniciando así la colonización (Westerlund y Korhonen, 1993).

Los componentes estructurales más estudiados en *Aeromonas* que se han involucrado en el proceso de adhesión y patogenicidad son:

Flagelos

Los flagelos son orgánulos complejos requeridos para la movilidad, éstos se componen de un filamento, un gancho y un cuerpo basal. Los filamentos flagelares pueden ser homopolímeros de una única subunidad de flagelina, como en el caso de *Escherichia coli*, o heteropolímeros complejos con múltiples flagelinas, como es el caso de *Vibrio parahaemolyticus* (McCarter, 1995). El filamento se une al gancho mediante proteínas asociadas (HAPs), que al mismo tiempo se acoplan al motor localizado en el cuerpo basal (MacNab, 1996). La biosíntesis de la estructura completa y la rotación del filamento requiere aproximadamente 40 genes (MacNab, 1996).

Flagelo polar

Diversas flagelinas con pesos moleculares de 36 kDa (Honma y Nakasone, 1990) y 44-45 kDa (Merino y cols., 1990; Kirov y Sanderson, 1996) han sido caracterizadas en cepas de *A. hydrophila* y *A. veronii* bt sobria. En *A. salmonicida* Umelo y Trust (1997) describieron dos genes situados en tándem que codificaban para flagelinas y que se denominaron *flaA* y *flaB*. Recientemente se ha aislado en *A. caviae* un locus que contiene cinco genes que codifican para genes del flagelo polar, estos

genes se encuentran en tándem según el siguiente orden: *flaA*, *flaB*, *flaG*, *flaH* y *flaJ*, siendo el *flaA* y el *flaB* los que codifican para las flagelinas del filamento (Rabaan y cols., 2001). También en *A. caviae* se ha descrito otro operón compuesto por los genes *flmA*, *flmB*, *neuA*, *flmD* y *neuB* que está implicado en la biosíntesis del lipopolisacárido antígeno-O y en el ensamblaje del flagelo (Gryllos y cols., 2001).

En *A. hydrophila* el estudio de cepas mutantes Tn5 aflageladas demostró que la movilidad es imprescindible para la adhesión y que el flagelo es esencial para la invasión de líneas celulares de peces (Merino y cols., 1997). Mutantes de inserción para el flagelo han demostrado que la movilidad debida al flagelo en *A. caviae* es esencial para la adherencia a células HEp-2 (Rabaan y cols., 2001; Gryllos y cols., 2001).

Flagelo lateral

La presencia de flagelos laterales confiere a las bacterias una movilidad de tipo rápido o pululante “*swarming*”, propiedad que les permite moverse en superficies sólidas, y que se ha asociado a la formación de biofilms y a la virulencia de las bacterias (Harshey, 1994).

En *Aeromonas* los flagelos laterales fueron purificados en una cepa de *A. caviae* aislada de heces de un paciente con diarrea (Thornley y cols., 1997). Recientemente se han caracterizado los genes que codifican para estos flagelos, habiéndose identificado nueve genes que codifican para los flagelos laterales (*lafA-U*) en *A. hydrophila* y cuatro (*lafA1*, *lafA2*, *lafB* y *fliU*) en *A. caviae* (Gavín y cols., 2002). Mutantes para los genes *lafA1*, *lafA2*, *fliU* o *lafT* reducían la adherencia a células epiteliales humanas y la formación de biofilms (Gavín y cols., 2002). Recientemente se ha publicado un trabajo que estudia la distribución del gen *lafA* en diferentes especies de *Aeromonas* (Kirov y cols., 2002). En este estudio se describió la presencia de flagelos laterales en el 50% de las cepas de las especies más comúnmente asociadas a diarrea. Éstos autores ensayaron cuatro cepas de la especie *A. salmonicida* encontrando que éstas presentaban el gen. Recientemente se ha demostrado que aunque esta especie posee el operón entero que codifica para el flagelo lateral (*lafA-U*), una inserción de una transposasa 8 de la familia IS3 en el gen *lafA* inactiva este gen en todas las cepas por lo que la movilidad tipo *swarming* desaparece (Merino y cols., 2003).

Pilis

Los pilis son estructuras que al igual que los flagelos tienen función de adherencia a otras bacterias o a las células del huésped. Estas estructuras se forman a partir de subunidades proteicas llamadas pilinas y pueden ser diferenciadas del flagelo porque tienen un diámetro menor (3-8 nm frente a 15-20 nm de los flagelos) y normalmente no presentan una estructura enrollada. Su longitud varía entre 15-20 μm o varias veces la longitud de la célula (Murray y cols., 2002).

En la Tabla 1.3. se resumen las características de los pilis descritos en *Aeromonas* y su implicación en virulencia.

Tabla 1.3. Características de los pilis

Pili	Genes	Tamaño de la proteína		Especie (cepa)	Características	Estudios de virulencia	Conclusión del estudio
		AA	kDa				
Mini-pillin^a	-	-	17-18	<i>A. hydrophila</i> (AH26)	Pili rígido	No hemaglutina	No se demuestra implicación en virulencia
	<i>fxp</i>	70	4	<i>A. hydrophila</i> (AH26)	Pili flexible	Aglutina eritrocitos ovinos, bovinos de cobbya y de aves	Podría estar implicado en virulencia
Tipo IV (Familia Tap) ^b	<i>tapA</i>	151	17	<i>A. salmonicida</i> (A450)	Pre-pilina	Mutantes para el gen <i>tapA</i> demuestran que no son necesarios para adherencia a células HEp-2 ni para secreción de toxinas	No son necesarios para la colonización intestinal en estudios <i>in vitro</i>
	<i>tapB</i>	108	-		Ensamblaje del pili		
	<i>tapC</i>	413	-		Ensamblaje del pili		
	<i>tapD</i>	291	-		Peptidasa implicada en la secreción de la aerolisina y proteasas		
Tipo IV (Familia Bfp) ^c	-	-	19-23	<i>A. veronii</i> bt. sobria (BC88) <i>A. caviae</i> (195)	Adhesivo	La eliminación del pili por métodos mecánicos disminuye en un 50-80% la adhesión a células Henle 407	Implicado en las primeras fases de adhesión a células intestinales

^aHo y cols. (1990, 1992); ^bPepe y cols. (1996); Barnett y cols. (1997); Kirov y cols. (2000). ^cKirov y cols. (1999)

Los pilis tipo IV han sido los más estudiados en *Aeromonas* habiéndose descrito en *A. hydrophila*, *A. caviae*, *A. trota* y *A. veronii* bt sobria (Barnett y cols., 1997). Se ha determinado que los pilis de la familia Bfp son más importantes para la colonización intestinal que los de la familia Tap (Kirov y cols., 2000). Sin embargo, en un estudio reciente en el que se ha estudiado la presencia de los pilis de la familia Tap

y Bfp en cepas aisladas de muestras de agua y de muestras clínicas humanas, se ha visto que estos pilis sólo se encuentran en las cepas de origen ambiental, y sólo el 3.6% de las cepas ambientales presentan el pili Tap y el 14.3% el Bfp (Sechi y cols., 2002).

El gen *fxp* que codifica para el mini-pili rígido se encuentra codificado en un plásmido de 7.6 Kb, cuando se intentó detectar este gen en 66 cepas de *Aeromonas* así como en otros géneros bacterianos, mediante la técnica de *Southern Blot*, no fue detectado en ninguna cepa (Ho y cols., 1992).

Cápsula

La cápsula es una estructura formada por polisacáridos (disacáridos y trisacáridos) y polipéptidos que se encuentra recubriendo la membrana externa de la bacteria. Ésta estructura es importante para la supervivencia de la bacteria dentro del huésped ya que promueve la resistencia a la acción del complemento, puede actuar como barrera frente a moléculas hidrofóbicas tóxicas como los detergentes y puede ayudar a la adherencia a otras bacterias o a los tejidos del huésped (Murray y cols., 2002).

Los serogrupos O:34 y O:11 de *A. hydrophila* generan una cápsula de polisacáridos cuando crecen en medios ricos en glucosa (Martínez y cols., 1995) o cuando crecen en un lisado de vísceras de pescado, que simulan el crecimiento *in vivo* (Merino y cols., 1997). La resistencia a la acción del complemento favorece la patogenia de los microorganismos. Para las bacterias Gram-negativas el complemento se activa por la vía clásica de activación del complemento (CPC), la vía alternativa de activación del complemento (APC) o incluso por las dos simultáneamente. En el caso de *A. hydrophila* serogrupo O:34, que es resistente a la acción bactericida del complemento, sólo se activa el CPC (Merino y cols., 1994).

En *Escherichia coli* K12 la resistencia a la acción bactericida del complemento se debe a la producción de una cápsula de ácido colánico, la biosíntesis de la cual depende del operón *wca* (Gottesman y Stout, 1991). Recientemente se ha estudiado el mecanismo por el que *A. hydrophila* serogrupo O:34 forma la cápsula y se han identificado dos genes, el *orf1* y el *orf2* implicados en este proceso (Aguilar y cols., 1999). El gen *orf1* presenta una elevada homología con el gen *wca* de *Klebsiella pneumoniae* K2, y el gen *orf2* con el gen *wcaJ* de *E. coli* K12, llegándose a la

conclusión de que los genes *orf1* y *orf2* de *A. hydrophila* forman parte del operón *wca*, responsable de la producción de la cápsula.

Capa S (Capa A)

La capa S es una capa paracristalina que se encuentra, en algunas cepas, recubriendo la pared celular de la bacteria (Ishiguro y cols., 1986) protegiéndola de los mecanismos de defensa del huésped y por lo tanto facilitando la colonización del mismo (Munn y cols., 1982). La capa S está formada por subunidades proteicas (proteína A) que se disponen de forma tetragonal y que se unen a la superficie celular a través de los lipopolisacáridos (LPS) (Kay y Trust, 1991; Thomas y cols., 1992).

La capa S se ha detectado en especies (*A. hydrophila*, *A. veronii* y *A. schubertii*) que se asocian a patología en humanos (Kokka y cols., 1991; 1992a,b). En estas especies la capa S consiste en una única proteína ácida con un peso molecular de 52-53 kDa que se encuentra en el exterior de la pared celular (Dooley y cols., 1988; Kokka y cols., 1992a) y que es codificada por el gen *ahsA* (Thomas y Trust, 1995). La presencia de esta capa S suele asociarse a *Aeromonas* del serogrupo O:11 (Kokka y cols., 1991). Las cepas patógenas para humanos y que presentan capa S suelen causar enfermedades extraintestinales (bacteriemia, peritonitis e infecciones en heridas), habiéndose demostrado que existe respuesta inmunitaria (Kokka y cols., 1992a,b).

En *A. salmonicida* la capa S está formada por una única proteína de 50 kDa que es codificada por el gen *vapA* (Chu y cols., 1991). Mutantes isotécnicos o espontáneos para este gen aumentan 10.000 veces su DL_{50} en peces (Ishiguro y cols., 1981; Noonan y Trust, 1997), demostrando que la capa S es el factor de virulencia por excelencia en las cepas que generan patología en peces. En un estudio reciente, las cepas virulentas de *A. salmonicida* que presentaban la capa S eran capaces de adherirse, invadir y sobrevivir dentro de los macrófagos de peces con una eficacia de 10 a 20 veces superior que las cepas de *A. salmonicida* sin capa S (Garduño y cols., 2000). Sin embargo en este estudio se indica que la capa S no es un factor de invasión sino una adhesina que ayuda, pero no media, la invasión en líneas no-fagocíticas de peces. En la especie *A. hydrophila* la pérdida de la capa S no provocó un aumento de la DL_{50} tan elevado como en el caso de *A. salmonicida* (Noonan y Trust, 1997).

Se ha sugerido que el gen *vapA* siempre está presente en las cepas de *A. salmonicida*, siendo por lo tanto una buena diana para detectar la presencia de este patógeno en peces (Gustafson y cols., 1992). Sin embargo, Austin y cols. (1998) y Høie y cols. (1999) estudiaron la distribución de la capa S en cepas de *A. salmonicida*, diseñando cebadores específicos para el gen que codifica para la proteína A, y determinaron que éste solo se encuentra en el 65-75% de las cepas de la especie estudiadas.

LPS (Lipopolisacárido)

El LPS consiste en tres partes estructurales: el lípido A, el polisacárido central y el antígeno O, siendo el lípido A el principal responsable de la actividad endotóxica del LPS (Murray y cols., 2002). Actualmente y con base a los determinantes antigénicos únicos presentes en el LPS (antígeno O) se considera que el género *Aeromonas* contiene 96 serogrupos (Janda, 2001).

En el caso de *Aeromonas* el LPS es capaz de provocar una coagulación intravascular diseminada en individuos que presentan una septicemia (Ko y Chuang, 1995). Además se ha comprobado que el LPS que presentan las cepas con serogrupo O:34 juega un papel importante en la adherencia de la cepa a las células HEp-2 (Merino y cols., 1996). Sin embargo, un estudio realizado con mutantes para el LPS produjo una disminución de la DL₅₀ muy pequeña en comparación con la cepa salvaje, lo cual minimizaría el papel del LPS en la patogenicidad (Aguilar y cols., 1997).

Recientemente se ha caracterizado el operón que codifica para los antígenos O y para la cápsula en cepas virulentas de *A. hydrophila*. Éste operón tiene aproximadamente 17 Kb y comprende entre 13 y 17 genes. Tanto el antígeno O como los polisacáridos de la cápsula purificados aumentan la habilidad de las cepas no virulentas de *A. hydrophila* de sobrevivir en suero de peces, sin embargo los polisacáridos de superficie no presentan un efecto inhibitorio de la adhesión de las cepas en células epiteliales de peces (Zhang y cols., 2002).

OMP (Proteínas de la membrana externa)

Las OMP son proteínas que se encuentran ancladas en la membrana lipídica externa de la célula, y presentan dominios extracelulares de carácter hidrofóbico. Hay poca información sobre las proteínas de membrana externa del género *Aeromonas*. En la Tabla 1.4 se resumen las OMP que se conocen en *Aeromonas*.

Tabla 1.4. Características de las proteínas de membrana externa (OMP)

OMP	Tamaño del gen (pb)	Tamaño de la proteína		Especie (cepa)	Características	Conclusión del estudio
		AA	kDa			
Proteína I ^a	1337	445	47	<i>A. hydrophila</i> (Ah65) <i>A. salmonicida</i>	Maltoporina homóloga a la LamB de <i>E. coli</i>	Proteína formadora de canales
Proteína II ^b	1055	351	39	<i>A. hydrophila</i> (Ah65) <i>A. hydrophila</i> (AH3)	Porina homóloga a las porinas OmpN, PhoE y OmpF de <i>E. coli</i>	Receptor C1q del complemento responsable de la activación de la ruta CPC Confiere sensibilidad al suero humano
Proteína III ^c	-	-	36	<i>A. hydrophila</i> (Ah65)	Porina homóloga a la OmpC, PhoE y OmpF de <i>E. coli</i>	Proteína formadora de canales
Proteína IV ^d	-	-	27	<i>A. hydrophila</i> (Ah65)	Porina no homóloga a otras OMP	Proteína formadora de canales
OmpAI ^e	1019	339	33.5	<i>A. salmonicida</i> (NCIMB 1102)	Porina homóloga a la OmpA de la familia Enterobacteriaceae	Proteína formadora de canales
OmpAII ^e	992	330	32.5	<i>A. salmonicida</i> (NCIMB 1102)	Porina homóloga a la OmpA de la familia Enterobacteriaceae	Proteína formadora de canales
- ^f	-	-	43	<i>A. caviae</i> (Ae56, Ae391, Ae398)	Se une a la superficie celular de células HEP-2	Relacionada con la adherencia <i>in vitro</i> de <i>A. caviae</i>

^aJeanteur y cols. (1992); Dodsworth y cols. (1993); ^bJeanteur y cols. (1992); Nogueras y cols. (2000); ^cJeanteur y cols. (1992); ^dJeanteur y cols. (1992); Janda (2001); ^eCostello y cols. (1996); ^fRocha de Souza y cols. (2001)

Aunque se han caracterizado diversas OMP en *Aeromonas*, y se cree que su función principal será la de la adherencia, no existen estudios que impliquen directamente a estas moléculas con la capacidad patógena de la cepa.

1.3.2. Productos extracelulares

La interacción entre las bacterias patógenas y las células huéspedes viene dada, además de por los componentes extracelulares de éstas, por toxinas que son secretadas al espacio extracelular (Hueck, 1998). En *Aeromonas* existen varias toxinas que cumplen estas características, entre las cuales cabe destacar las proteasas, lipasas/fosfolipasas, DNasas, enterotoxinas citotónicas y hemolisinas (Merino y cols., 1995; Chopra y Houston, 1999; Janda, 2001). A continuación se detallan las más importantes:

Hemolisinas

Las hemolisinas fueron inicialmente descritas en *Escherichia coli* (Inukai y Kodama, 1965) y *Vibrio cholerae* (Wake y Yamamoto, 1966). En *Aeromonas* estudios fenotípicos pusieron de manifiesto que al menos había dos hemolisinas, una α -hemolisina que se producía principalmente a 22°C y que era incapaz de lisar completamente los eritrocitos y una β -hemolisina que era capaz de lisar completamente eritrocitos de diferentes especies animales, y que además se producía en mayor cantidad a 37°C (Ljungh y cols., 1981; Thelestam y Ljungh, 1981; Brenden y Janda, 1987; Singh y Sanyal, 1992a,b).

La caracterización de las β -hemolisinas se ha visto dificultada por la identificación imprecisa de las cepas en las que se han estudiado y por la terminología múltiple con la que se las ha descrito (hemolisina, aerolisina, enterotoxina citotóxica, 'Asao toxin'). Muchas de éstas β -hemolisinas son muy similares o incluso idénticas (Buckley y Howard, 1999), además algunas cepas de *Aeromonas* poseen más de un gen que codifica para hemolisinas en su genoma (Hirono y cols., 1992).

La **aerolisina** es el prototipo de hemolisina para el género y fue caracterizada y parcialmente purificada en el año 1974 por Bernheimer y Avigad. Al gen estructural se le da el nombre de *aerA*, y fue clonado y secuenciado por primera vez por Howard y Buckley (1987) en una cepa de *A. hydrophila*. Posteriormente este gen ha sido clonado en otras especies como *A. trota* (Husslein y cols., 1988) y *A. salmonicida* (Hirono y Aoki, 1993). Esta toxina comparte una pequeña parte de la secuencia de aminoácidos (Thr223-Thr232) con la α -toxina de *Staphylococcus aureus* (Howard y cols., 1987; Husslein y cols., 1988) y con la enterotoxina A de *Clostridium perfringens* (Parker y cols., 1996). La aerolisina se transcribe como una pre-pro-aerolisina hidrofílica de 54 kDa que contiene una región N-terminal de 23 aminoácidos que es

eliminada durante el paso por la membrana interna dando lugar a una pro-aerolisina de 52 kDa (Husslein y cols., 1988; Chopra y cols., 1993; van der Goot y cols., 1994). Se ha descrito que este proceso está mediado por una proteasa de la familia de las serina proteasas (Abrami y cols., 1998). A continuación la pro-aerolisina es secretada al exterior de la célula mediante el sistema de secreción tipo II con la participación de las proteínas ExeA y ExeB (Russel, 1998; Schoenhofen y cols., 1998). Durante este último paso se eliminan 25 aminoácidos de la región C-terminal de la proteína convirtiéndola en una aerolisina activa de 47.5 kDa (Howard y cols., 1996), este proceso puede estar mediado por enzimas como la tripsina o quimotripsina (Howard y Buckley, 1985; Garland y Buckley, 1988) o por la furina producida por las células CHO (Abrami y cols., 1998). La aerolisina activa se une a glicoproteínas de la membrana celular del huésped, en el caso de eritrocitos o células de mamíferos, o a la glicoproteína glicosilfosfatidilinositol (Thy-1), en el caso de los linfocitos antes de oligomerizarse (Buckley, 1992; Nelson y cols., 1997). La oligomerización se produce mediante la formación de heptámeros, éstos producen canales transmembrana de 0.7-1.7 nm provocando la lisis y posterior muerte celular (Chakraborty y cols., 1990; Parker y cols., 1996; Nelson y cols., 1997; Ferguson y cols., 1997). Recientemente se ha descrito la conformación molecular de la aerolisina así como sus sitios receptores (MacKenzie y cols., 1999).

Estudios con mutantes de delección para la aerolisina demostraron que estos tenían una DL_{50} en ratones superior a la de la cepa salvaje (Chakraborty y cols., 1987). En otro estudio de los mismos autores se demostró que la aerolisina purificada produce letalidad en ratones, acumulación de fluidos en ensayos de asa ligada en intestino de conejo, activación de mediadores de la inflamación de los granulocitos y mastocitos, y citotoxicidad *in vitro* en una elevada variedad de líneas celulares (Chakraborty y cols., 1990).

Como ya se ha mencionado anteriormente la nomenclatura de este grupo de toxinas es muy confusa. Hirono y cols. (1992) identificaron dos hemolisinas procedentes de *A. hydrophila* y una de *A. sobria*, el análisis de sus secuencias reveló que se trataba de aerolisinas. En 1993 estos mismos autores clonaron y caracterizaron otra hemolisina de *A. salmonicida* que presentaba una elevada homología con la aerolisina, era capaz de lisar eritrocitos procedentes de diferentes animales y era activada por la tripsina (Hirono y Aoki, 1993). Recientemente se ha descrito que la aerolisina (*aerA*) y la enterotoxina citotóxica (*act*) son la misma toxina (Buckley y

Howard, 1999). Sin embargo, Chopra y cols. defienden que ambas toxinas están íntimamente relacionadas pero no son idénticas (Chopra y Houston, 1999). El gen *act* fue caracterizado a partir de una cepa de *A. hydrophila*, y la toxina presentaba un peso molecular de 52 kDa y actividad hemolítica, citotóxica, enterotóxica y producía letalidad en ratones (Rose y cols., 1989; Ferguson y cols., 1997). A nivel de DNA existe un 75% de homología entre el gen *aerA* y el *act*, sin embargo la región 5' de ambas secuencias presenta muchas diferencias (Chopra y cols., 1993). A nivel de aminoácidos la homología entre ambas proteínas varía entre un 79 y un 93% (Chopra y cols., 1993). Estas diferencias pueden provocar variaciones en la estructura terciaria de la proteína respecto a la aerolisina (Howard y cols., 1987; Rose y cols., 1989). La activación de la toxina *act* es idéntica a la de la aerolisina (Ferguson y cols., 1997). Se ha descrito que a diferencia de la aerolisina, la enterotoxina citotóxica se une al grupo 3'OH del colesterol en la membrana de la célula huésped, momento en el cual la toxina se convierte en termoestable (Ferguson y cols., 1997). Además la enterotoxina citotóxica es capaz de inhibir la capacidad fagocítica de los fagocitos de ratón, propiedad que puede ser inhibida por el interferón gamma (IFN- γ) (Jin y Houston, 1992) y de estimular la actividad quimotáctica de los leucocitos humanos, los cuales se cree que poseen receptores para esta toxina (Jin y cols., 1992). Los mutantes de inserción en el gen *act* presentan una mayor DL₅₀ en ratones (Xu y cols., 1998). El gen *act* actúa en el macrófago aumentando la producción de citoquinas proinflamatorias y de la proteína antiapoptótica Bcl-2, además activa el metabolismo del ácido araquidónico de los macrófagos y los monocitos. Éste mecanismo aumenta la producción de la prostaglandina PGE₂ y el cAMP, los cuales al mismo tiempo potencian la secreción de fluidos en los modelos animales de asa ligada (Chopra y cols., 2000). Recientemente se ha descrito que la transcripción del gen *act* está regulada por el hierro, y que el operón *fur* es el responsable de ésta regulación (Sha y cols., 2002).

En la Tabla 1.5 se detallan las características de los genes que codifican para la aerolisina.

Tabla 1.5. Características moleculares de la familia de la aerolisina
(Adaptado a partir de Janda, 2001).

Especie (cepa)	Origen	Gen	Tamaño del gen (pb)	Tamaño de la proteína		Homología de la secuencia (%)		Referencias
				AA	kDa	AA	DNA	
<i>A. hydrophila</i> (AH65)	Pez	<i>aerA</i>	1457	463	53.8	100	100	Howard y Buckley (1987)
<i>A. trota</i> (AB3)	Heces humanas	<i>aerA</i>	1479	492	54.4	77	77	Husslein y cols. (1988)
<i>A. hydrophila</i> (AH1)	Humano	<i>aerA</i>	1455	485	53.8	92	-	Hirono y cols. (1992)
<i>A. hydrophila</i> (28SA)	Anguila	<i>aerA</i>	1476	492	54.0	94	-	Hirono y cols. (1992)
<i>A. sobria</i> (33)	Humano	<i>asa1</i>	1467	489	53.9	66	-	Hirono y cols. (1992)
<i>A. salmonicida</i> (17-2)	Pez	<i>aerA</i>	1469	489	53.9	97	86	Hirono y Aoki (1993)
<i>A. hydrophila</i> (SSU)	Heces humanas	<i>act</i>	1479	493	54.5	93	89	Chopra y cols. (1993)
<i>A. caviae</i> (A1883)	Humano	<i>aerA</i>	1479	493	54.5	83	77	Wang y cols. (1996)
<i>A. sobria</i> (357)	Heces humanas	<i>aerA</i>	1467	488	-	69	-	Fujii y cols. (1998)
<i>A. trota</i> (ATCC49659)	Apéndice humano	<i>aerA</i>	1479	492	54.3	-	74	Khan y cols. (1998)

Diversos estudios han tratado de determinar la incidencia del gen que codifica para la aerolisina en las diferentes especies de *Aeromonas*, indicando que su incidencia global es entre un 28% y un 65% (Granum y cols., 1998; Kingombe y cols., 1999; Rahman y cols., 2002; Sechi y cols., 2002). Sin embargo en ninguno de ellos se han utilizado cepas identificadas genéticamente, por lo que la distribución de este gen en las distintas especies se desconoce. Kingombe y cols. (1999) indicaron que *A. caviae* sería la especie menos virulenta ya que, de acuerdo con sus resultados, no posee el gen que codifica para la aerolisina.

Una segunda familia de β -hemolisinas es la que originalmente se designó como **AHH1** (Hirono y Aoki, 1991). Estos autores clonaron y secuenciaron el gen AHH1 el cual se encontraba presente en el 69% de cepas de *A. hydrophila* y en el 100% de cepas de *A. salmonicida* con actividad hemolítica (Hirono y Aoki, 1991). El gen AHH1 presenta una elevada homología con la hemolisina HlyA de *Vibrio cholerae* biotipo El Tor (Wong y cols., 1998), lo cual sugiere que ésta forma parte de la familia de

hemolisinas HlyA. El mecanismo de acción de las HlyA de *A. hydrophila* es desconocido, sin embargo en *V. cholerae* se ha descrito que las HlyA son toxinas formadoras de canal (Menzl y cols., 1996), por lo tanto, por analogía podría decirse que las HlyA de *A. hydrophila* también son toxinas formadoras de canal (Wong y cols., 1998), cuyas características se detallan en la Tabla 1.6.

Tabla 1.6. Características de las hemolisinas de la familia HlyA (Adaptado a partir de Janda, 2001)

Especie (cepa)	Origen	Gen	Tamaño del gen (pb)	Tamaño de la proteína		Homología de la secuencia (%)		Referencia
				AA	kDa	AA	DNA	
<i>A. hydrophila</i> (ATCC7966)	Leche	<i>ahh1</i>	1734	577	63.6	20	46	Hirono y Aoki (1991)
<i>A. hydrophila</i> (A6)	Heces humanas	<i>hlyA</i>	1865	621	69.0	18	-	Wong y cols. (1998)

Diversos estudios han tratado de determinar la incidencia de los genes *hlyA* y *aerA* en las especies *A. hydrophila*, *A. caviae* y *A. veronii* bt sobria, habiéndose encontrado que los genotipos más frecuentes son: *aerA*⁺/*hlyA*⁺ para *A. hydrophila*, *aerA*⁺/*hlyA*⁻ para *A. veronii* y *aerA*⁻/*hlyA*⁻ para *A. caviae* (Heuzenroeder y cols., 1999; González-Rodríguez y cols., 2002). Además, Heuzenroeder y cols. (1999) propusieron que la detección de estos genes en *A. hydrophila* y *A. veronii* bt sobria era un método válido para detectar si una cepa tenía la capacidad de provocar diarrea en humanos. Ésta teoría según González-Serrano y cols. (2002) no era válida, dado que cepas con el genotipo *aerA*⁻/*hlyA*⁻ eran enterotóxicas en un modelo de ratones lactantes. Este resultado era congruente con el de Wong y cols. (1998), quienes realizaron mutantes dobles para los genes *aerA* y *hlyA*, demostrando que éstos no atenuaban completamente su virulencia, lo cual indica que existen más factores de virulencia asociados a la patogenicidad de *Aeromonas*.

Recientemente, Wang y cols. (2003) han estudiado la distribución de los genes *ahh1*, *asa1* y *aerA* (Tablas 1.5 y 1.6) en cepas de *Aeromonas* de origen clínico. Estos autores han determinado que los genotipos más frecuentes son el *ahh1*⁺/*aerA*⁺ (37.5%) y *ahh1*⁺ (36%), mientras que un 8.5% de las cepas presentaron el genotipo *asa1*⁺ (8.5%), y que sólo el 4% el genotipo *ahh1*⁺/*asa1*⁺. El 14% de las cepas no presentó ninguno de éstos genes. Las cepas con el genotipo *ahh1*⁺/*aerA*⁺ fueron las

que presentaron mayor actividad citotóxica en células Vero y por lo tanto las cepas con éste genotipo deben ser las que presenten mayor virulencia.

Enterotoxina citotónica

Un segundo tipo de toxinas posiblemente implicadas en las gastroenteritis causada por *Aeromonas* son las enterotoxinas citotónicas (Chopra y Houston, 1999; Singh, 2000; Sha y cols., 2002). Este tipo de toxinas se distinguen *in vitro* de las aerolisinas y β -hemolisinas por su capacidad de producir elongación de las células pero no lisis (Janda, 2001).

En la Tabla 1.7 se resumen las diferentes enterotoxinas citotónicas caracterizadas hasta la fecha.

Tabla 1.7. Características de las enterotoxinas citotónicas.

Gen	Tamaño del gen (pb)	Tamaño de la proteína		Especie (cepa)	Características	Estudios de virulencia	Conclusión del estudio
		AA	kDa				
- ^a	-	-	15	<i>A. hydrophila</i>	No relacionada con la toxina colérica o con la toxina termoestable de <i>E. coli</i> (LT-I)	Produce acumulación de líquidos en asa ligada de conejo, rata y ratón	Mecanismo similar al de la toxina colérica para la acumulación de líquidos a nivel intestinal
- ^b	-	-	63	<i>A. sobria</i>	No relacionada con la toxina colérica Termolábil (56°C; 10 min)	Provoca acumulación de fluidos en asa ligada de rata y en ratones lactantes Citotóxica en cultivos celulares y hemolítica en eritrocitos humanos Inyectada intravenosamente es letal para ratones	Implicado en virulencia
- ^c	-	-	89	<i>A. hydrophila</i>	Comparte epítipo con la toxina colérica Termoestable (56°C; 20 min)	Produce efectos citotónicos en células adrenales Y1 y células CHO Aumenta el cAMP en células CHO	Existe homología a nivel de DNA entre la enterotoxina citotónica de <i>A. hydrophila</i> y la toxina colérica
	-	-	37				
	-	-	11				
<i>alt</i> ^d	1104	388	44	<i>A. hydrophila</i> (SSU)	No relacionada con la toxina colérica Termolábil (56°C; 20 min) Presenta una homología del 45-51% con la fosfolipasa C (<i>plc</i>)	Elevar el cAMP y la prostaglandina (PGE ₂) en células CHO Sus mutantes reducen en un 48% la secreción de fluidos en asa ligada de ratón	Implicado en virulencia

Tabla 1.7. Continuación

Gen	Tamaño del gen (pb)	Tamaño de la proteína		Especie (cepa)	Características	Estudios de virulencia	Conclusión del estudio
		AA	kDa				
<i>ast</i> ^e	1911	636	71	<i>A. hydrophila</i> (SSU)	No relacionada con la toxina colérica Termoestable (56°C; 20 min)	Eleva el cAMP en células CHO y provoca la secreción de fluidos en el intestino delgado de rata Sus mutantes reducen en un 43% la secreción de fluidos en asa ligada de ratón	Implicado en virulencia

^aDubey y cols. (1981); Ljungh y Kronevi (1982); Ljungh y cols. (1982); ^bPotomski y cols. (1987); ^cShultz y McCardell. (1988); ^dChopra y cols. (1986); Chopra y Houston (1989); Chopra y cols. (1992); Chopra y cols. (1996); Sha y cols. (2002); ^eChopra y cols. (1994); Chopra y Houston (1999); Sha y cols. (2002).

Granum y cols. (1998) estudiaron la distribución del gen *alt* en un grupo de 31 cepas de origen ambiental y encontraron que el 74.2% de éstas lo presentaban.

Albert y cols. (2000) propusieron que la acción sinérgica de los productos codificados por dos genes (*alt* y *ast*), podían ser los responsables de producir una diarrea severa en niños encontrándose ambos genes simultáneamente en el 55.7% de las cepas aisladas de los niños con diarrea, frente a el 22.2% de las aisladas en niños sin diarrea y al 33.3% de las cepas aisladas del ambiente. Recientemente se ha demostrado que los mutantes simples para los genes *act*, *alt* y *ast* producían una reducción en la secreción de fluidos en el modelo de asa ligada en ratón del 64%, 48% y 43% respectivamente, mientras que en los mutantes dobles para los genes *alt* y *ast*, *act* y *ast*, *act* y *alt*, la reducción era del 36%, 62% y 73% respectivamente y el triple mutante para los tres genes (*act*, *alt* y *ast*) reducía la secreción de fluidos en un 100% (Sha y cols., 2002). Estos resultados sugieren que *in vivo* existe una cierta interacción entre estas enterotoxinas.

Lipasas

Las *Aeromonas* spp. al igual que un gran número de bacterias patógenas secretan lipasas al medio que actúan como hidrolasas sobre los lípidos de membrana (Jaeger y cols., 1994). En la Tabla 1.8 se muestran las características de las lipasas identificadas hasta la fecha.

Tabla 1.8. Características de las lipasas.

Gen	Tamaño del gen (pb)	Tamaño de la proteína		Especie (cepa)	Características	Estudios de virulencia	Función en virulencia
		AA	kDa				
<i>lipH3</i> ^a	2051	684	71	<i>A. hydrophila</i> (AH3)	Termoestable (55°C; 30 min), actividad óptima a pH 7.2 y 37°C Actividad esterasa	-	Posible implicación en virulencia
<i>apl-1</i> ^b	2055	685	70	<i>A. hydrophila</i> (JMP636)	Actividad óptima a 50°C Actividad fosfolipasa C no hemolítica	-	Posible implicación en virulencia
<i>lip</i> ^c	2253	751	79.9	<i>A. hydrophila</i> (MCC-2)	Actividad óptima a pH 7.5-8.0 y 37°C Actividad esterasa y lipasa	-	Lípido asociado a la membrana celular
<i>pla</i> ^d	2415	805	83	<i>A. hydrophila</i> (AH3)	No hemolítica, citotóxica o enterotóxica	Sus mutantes no aumentan la DL ₅₀ ni en peces ni en ratones	No implicada en virulencia
<i>plc</i> ^d	1718	572	65	<i>A. hydrophila</i> (AH3)	Actividad citotóxica en células Vero y EPC Actividad hemolítica en eritrocitos de trucha	Sus mutantes aumentan la DL ₅₀ en peces y ratones	Implicada en virulencia
GCAT ^e	1368	281	35	<i>A. hydrophila</i> (Ah65) <i>A. salmonicida</i> (AS1102)	Transfiere grupos acilo de los glicerofosfolípidos a moléculas como el colesterol, produciendo ésteres de colesterol Hidroliza diacilglicerol y glicerofosfolípidos	Mutantes dobles para la GCAT y la serina proteasa no aumentan la DL ₅₀ en peces Implicada en la producción de furunculosis en peces	Implicada en la primera fase de invasión de la bacteria

^aAnguita y cols. (1993); Pemberton y cols. (1997); ^bIngham y Pemberton (1995); Pemberton y cols. (1997); ^cChuang y cols. (1997); ^dMerino y cols. (1999); ^eThornton y cols. (1988); Lee y Ellis (1990); Nerland (1996); Howard y cols. (1996); Vipond y cols. (1998).

De las lipasas aquí detalladas, la *plc* es la que parece tener una implicación más clara en virulencia (Merino y cols., 1999).

Es interesante detallar algunos aspectos de la glicerofosfolípido-colesterol aciltransferasa (GCAT), ya que esta se encuentra exclusivamente en *Aeromonas* spp.

y no presenta homología a nivel de nucleótidos con ninguna otra lipasa bacteriana. La GCAT es secretada por la bacteria sobre la bicapa lipídica como pro-GCAT, la pro-GCAT es capaz de hidrolizar lípidos o transferir grupos acilos en preparaciones de lípidos artificiales, sin embargo no es capaz de hidrolizar bicapas lipídicas. Cuando la pro-GCAT sufre un corte en el extremo C-terminal su conformación cambia convirtiéndose en un dímero (GCAT activa) (Hilton y cols., 1990; Ausio y cols., 1993). Este corte puede ser producido por proteasas de la misma bacteria como la tripsina o la serina proteasa (Eggset y cols., 1994). La importancia de la GCAT como factor de virulencia sólo ha sido estudiada en profundidad en cepas de *A. salmonicida* aisladas de peces enfermos (Lee y Ellis, 1990). Tanto la GCAT como una serina proteasa han sido implicadas en la producción de furunculosis en peces (Ellis, 1997). Para establecer la importancia que la GCAT y la serina proteasa tienen en la producción de furunculosis, se han generado mutantes de delección para la serina proteasa (Vipond y cols., 1998), observándose que las bacterias mutadas siguen secretando al medio pro-GCAT, pero ésta no se activa. Esto demuestra que la serina proteasa es necesaria para la activación de la GCAT, sin embargo mutantes dobles (GCAT y serina proteasa) no presentaron diferencias en sus DL_{50} al compararlos con una cepa control (Vipond y cols., 1998).

La presencia de la GCAT sólo ha sido investigada en la especie *A. salmonicida*, habiéndose determinado que entre el 92 y el 100% de las cepas poseen este gen (Austin y cols., 1998; Høie y cols., 1999).

Proteasas

Aeromonas produce al menos tres tipos de proteasas, las características de las cuales se detallan en la Tabla 1.9.

Se cree que el papel principal de las proteasas es establecer y mantener la infección, sobretodo en el caso de heridas e infecciones como la celulitis (Janda, 2001), habiéndose ya diseñado vacunas para peces utilizando la serina proteasa (Coleman y cols., 1993) así como métodos basados en la técnica de la ELISA dirigidos a monitorizar la respuesta humoral de los peces frente a una infección por *Aeromonas* (Wagner y cols., 2001).

Tabla 1.9. Características de las proteasas.

Familia	Gen	Tamaño del gen (pb)	Tamaño de la proteína		Especie (cepa)	Características	Estudios de virulencia	Conclusión del estudio
			AA	kDa				
Metaloproteasas	ahp ^a	-	-	19	<i>A. hydrophila</i>	Presenta un átomo de Zinc Resistente al EDTA	-	Hidroliza la unión de la secuencia Gly-Gly-Ala que se encuentra cerca del sitio de unión en la cadena gamma de la fibrina
	- ^b	1787	595	34	<i>A. caviae</i> (Ae6)	Presenta un átomo de Zinc Resistente al EDTA y estable a 60°C	-	Elevada homología con proteasas de la familia Vibrionaceae, incluida la proteasa - hemaglutinina de <i>Vibrio cholerae</i>
	ahpB ^c	1764	588	62	<i>A. hydrophila</i> (AG2)	Hidroliza la caseína y la elastina	Sus mutantes aumentan (100%) la DL ₅₀ en peces	Implicada en virulencia
Acetilcolinesterasa	- ^d	-	-	15.5	<i>A. hydrophila</i> (B32)	300 veces más toxica que el resto de proteínas extracelulares	Afecta al sistema nervioso central de los peces	Su antisuero neutraliza el efecto letal de la toxina (inyectada en peces), pero no induce su respuesta inmunitaria, capacidad que si tiene la pro-teína (45 kDa)
Serina proteasa	aspA ^e	1863	621	64.1	<i>A. salmonicida</i> (AS1102)	Inhibida por el diisopropil-florofosfato y el fenilmetilsulfonil fluorido	Sus mutantes no aumentan la DL ₅₀ en peces	No implicada directamente en la virulencia, aunque puede activar otras enzimas

^aLoewy y cols. (1993); ^bToma y cols. (1999); ^cCascón y cols. (2000); ^dNieto y cols. (1991); Perez y cols. (2002); ^eRivero y cols. (1991); Whitby y cols. (1992); Vipond y cols. (1998)

Tal como hemos comentado anteriormente, la serina proteasa es necesaria para la activación de la pro-GCAT a GCAT (Vipond y cols., 1998). Se ha sugerido que también puede activar la pro-aerolisina a aerolisina, aunque no existen todavía evidencias experimentales al respecto (Abrami y cols., 1998). Austin y cols. (1998) y Høie y cols. (1999) estudiaron la distribución de la serina proteasa en cepas de *A. salmonicida* utilizando la técnica de la PCR, y determinaron que ésta se encuentra en el 32-40% de las cepas de esta especie.

Desoxirribonucleasas

Se desconoce la posible función que pueden desempeñar las desoxirribonucleasas en la patogenia de *Aeromonas*, sin embargo en otros géneros como *Streptococcus* las nucleasas extracelulares son consideradas de gran importancia para el establecimiento (invasión de las células huéspedes) y desarrollo de la infección (Podbielski y cols. 1996; Ericksson y cols., 1999). En la Tabla 1.10 se resumen las desoxirribonucleasas caracterizadas en *Aeromonas*.

Tabla 1.10. Características de las desoxirribonucleasas.

Gen	Tamaño del gen (pb)	Tamaño de la proteína		Especie (cepa)	Características	Referencia
		AA	kDa			
<i>dns</i>	690	230	26.6	<i>A. hydrophila</i> (CHC-1)	Proteína secretada	Chang y cols. (1992)
<i>nucH</i>	3213	1070	114	<i>A. hydrophila</i> (JMP636)	Proteína secretada	Dodd y Pemberton (1996)
<i>dnsH</i>	713	237	26.6	<i>A. hydrophila</i> (JMP636)	Proteína no secretada	Dodd y Pemberton (1999)

La desoxirribonucleasas DnsH presenta una homología del 92% con la Dns de *A. hydrophila* (CHC-1), presentando ambas proteínas idéntico peso molecular cuando se encuentran en forma activa, la diferencia entre ambas reside en que la DnsH posee un péptido señal de mayor longitud.

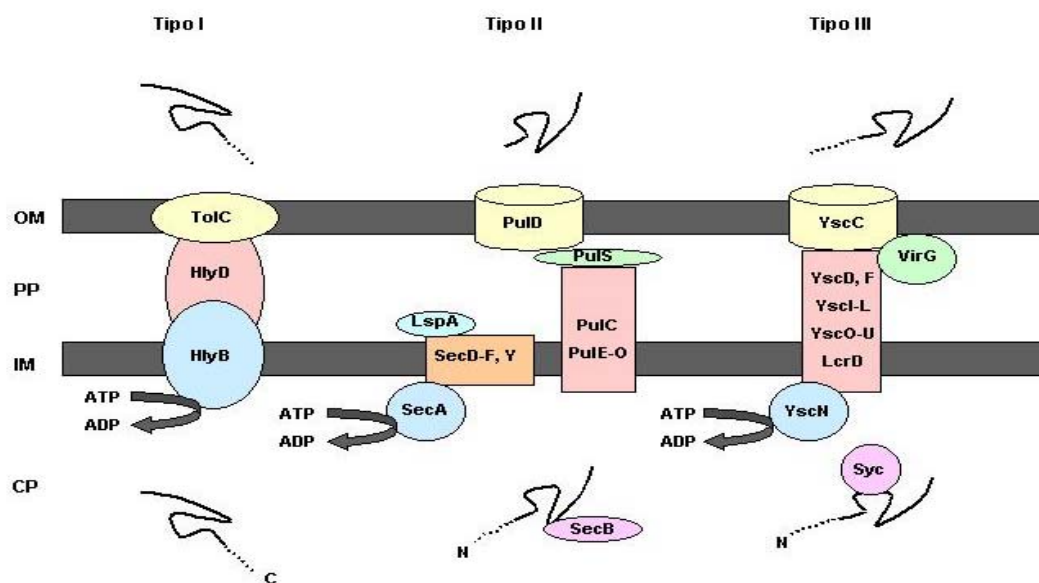
1.3.2.1 Sistemas de secreción

Hasta la fecha se conocen cinco sistemas para la secreción de proteínas extracelulares en bacterias Gram-negativas (Hacker y Kaper, 2000). Los sistemas de secreción tipo I, II, III y IV están implicados en la secreción extracelular de factores de virulencia en la superficie o directamente dentro de la célula huésped, mientras que el de tipo V está implicado en la transferencia de plásmidos por conjugación en *Agrobacterium tumefaciens* y en la secreción de toxinas de *Bordetella pertussis* (Hueck, 1998). Los sistemas de secreción tipo II, IV y V son Sec-dependientes, esto implica que los factores de virulencia secretados por estos mecanismos contienen péptidos-señal en el producto de traducción primario que son reconocidos por las proteínas Sec, de la vía secretora, permitiendo su traslocación de la membrana interna hacia el espacio periplásmico, sin embargo los sistemas de secreción I y III son Sec-

independientes y por lo tanto no requieren este sistema (Hueck y cols., 1998). Además se ha descrito que los sistemas de secreción tipo III y IV pueden encontrarse asociados a islas de patogenicidad (PAIs) (Hacker y Kaper, 2000). Las PAIs son regiones del genoma que tienen un tamaño comprendido entre 10 y 200 Kb, y que codifican para las proteínas responsables de la patogenicidad de numerosas bacterias Gram-negativas (*Escherichia coli*, *Salmonella enterica*, *Shigella flexneri*, *Yersinia* spp. y *Pseudomonas aeruginosa*) (Groisman y Ochman, 2000).

En la Figura 1.4 se muestra de forma esquemática la estructura y funcionamiento de los sistemas de secreción I, II y III.

Figura 1.4. Resumen esquemático de la secreción a través de la membrana bacteriana de la α -hemolisina de *Escherichia coli* (sistema de secreción tipo I), la secreción de la pullulanasa de *Klebsiella oxytoca* (sistema de secreción tipo II) y sistema de secreción Yop de *Yersinia* sp. (sistema de secreción tipo III). (Hueck, 1998).



OM, membrana externa; PP, periplasma; IM, membrana externa; CP, citoplasma. Se indica la hidrólisis vía ATP por las proteínas HlyB, SecA y YscN. La localización de las señales de secreción se muestra en las proteínas secretadas donde se ve una zona punteada. En el caso del TTSS esta señal debe encontrarse en la región 5' del mRNA que codifica para la proteína secretada. En el sistema de secreción tipo II y tipo III existen chaperonas citoplasmáticas (SecB y Syc, respectivamente) que se unen a las proteínas pre-secretadas. En el sistema de secreción tipo II, una peptidasa periplasmática (LspA) corta la secuencia señal N-terminal después de la exportación de la proteína por el sistema sec. Los sistemas de

secreción tipo II y tipo III comparten el componente de la membrana externa (PulD, YscC), mientras que las proteínas accesorias PulS y VirG, que facilitan la inserción en la membrana externa del PulD y YscC, respectivamente, difieren en los dos sistemas.

En *A. hydrophila* se ha identificado y caracterizado el operón *exe* que es responsable de la secreción tipo II (Jiang y Howard, 1992; Howard y cols., 1993). Este operón presenta una elevada homología con el operón pullulanasa, responsable de la vía secretora general en *Klebsiella oxytoca*. Los productos del operón *exe* son necesarios tanto para la secreción de enzimas extracelulares como para mantener la estructura normal de la membrana externa de *A. hydrophila*, habiéndose descrito que la aerolisina es secretada por este sistema (Schoenhofen y cols., 1998). Además del operón *exe*, *A. hydrophila* también posee un operón *sps* homólogo al operón pullulanasa de *K. oxytoca*, pero que a diferencia del anterior es específico para la secreción de la proteína S de la capa S y no interfiere en la secreción de enzimas extracelulares (Thomas y Trust, 1995).

El sistema de secreción tipo III (TTSS) está especializado en hacer llegar directamente al citoplasma de las células del huésped toxinas que la destruyen, al mismo tiempo que inhiben la actividad de las células fagocíticas o inducen su apoptosis (Hueck, 1998; Muller y cols., 2001, Ramamurthi y Schneewind, 2002). Dicho sistema está compuesto de aproximadamente 20 proteínas estructurales, y de una serie de proteínas secretadas, además está altamente conservado entre las diferentes bacterias que lo poseen y los genes que lo integran presentan una disposición en tándem bastante común (Hueck, 1998).

Braun y cols. (2002) identificaron la toxina ADP-ribosiltransferasa (AexT) en una cepa de *A. salmonicida* patógena de peces que presentaba una alta homología con la toxina ExoS de *Pseudomonas aeruginosa* que es secretada a través del TTSS. Ésta toxina tenía un papel crucial en la virulencia de esta cepa y sólo era secretada cuando la bacteria estaba en contacto con líneas celulares de pescado o en condiciones de baja presencia de calcio. Por este motivo estos autores especularon que *Aeromonas* debía de poseer un TTSS. Esta teoría ha sido recientemente demostrada por Burr y cols. (2002), quienes identificaron un fragmento de aproximadamente 6 Kb (operón *virA*) que contiene 9 genes homólogos a los ya descritos en el TTSS de *Yersinia enterocolitica*. Además la inactivación de uno de los genes (*scfV*) puso de manifiesto que la cepa mutada para este gen no tenía un efecto

tóxico sobre células RTG-2 de trucha, indicando que el sistema de secreción tipo III tiene un papel importante en la virulencia de este microorganismo (Figura 1.5).

Figura 1.5. Organización genética del operón *virA* de *A. salmonicida* subsp. *salmonicida* (Burr y cols., 2002).



Se ha propuesto que la presencia de genes que codifican para el TTSS en los microorganismos es un buen método para detectar si una cepa es virulenta. En este sentido, Stuber y cols. (2003) han diseñado un protocolo para detectar si una bacteria contiene o no este sistema. El protocolo se basa en hibridar de forma independiente y mediante la técnica del *Dot Blot* el DNA de la bacteria con diferentes sondas que se corresponden a genes del TTSS (*lcrD* de *Yersinia enterocolitica*, *sepA* de *Escherichia coli*, *invA* de *Salmonella thyphimurium*, *mxIA* de *Shigella sonnei* y *hrcV* de *Erwinia amylovora*). Este protocolo ha sido ensayado con 316 cepas bacterianas de diferentes especies, habiéndose comprobado que es un buen sistema para detectar la presencia de TTSS, puesto que se detectó esta presencia en cepas de las especies *Bordetella bronchiseptica*, *Bordetella pertussis*, *Aeromonas* sp. y *Campylobacter jejuni*, en las cuales nunca se había descrito. Además se comprobó que las cepas de las especies *Escherichia coli*, *Salmonella* spp., *Shigella* spp., *Yersinia* spp. y *Erwinia* spp., en las cuales la existencia del sistema es conocida, hibridaban con al menos una de las sondas del protocolo. Finalmente, las bacterias Gram-negativas no patógenas de origen ambiental no hibridaron con ninguna de las sondas, así como tampoco las bacterias Gram-positivas ensayadas, en las cuales aun no se ha descrito la existencia del TTSS.

La evidencia de que *Aeromonas* posee un TTSS nos abre nuevas perspectivas para poder comprender cual es el mecanismo por el que estas bacterias producen patogenicidad en el huésped.

Presence of virulence markers on clinical and environmental isolates of *Aeromonas jandaei*

Soler L.¹, Chacón M.R.¹, Aguilera-Arreola G.^{1,2}, Janda J.M.³, Esteve C.⁴, Guarro J.¹ y Figueras M.J.¹

¹Unitat de Microbiologia. Departament de Ciències Mèdiques Bàsiques, Facultat de Medicina i Ciències de la Salut, Universitat Rovira i Virgili, Sant Llorenç 21, 43201 Reus (Spain);

²Departamento de Microbiología, Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, Instituto Politécnico Nacional, 11340 México Distrito Federal, México. ³Microbial Diseases Laboratory, Division of Communicable Diseases Control, Berkeley, California. ⁴Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad de Valencia, Burgasot, Valencia. Spain

Running title: Virulence markers on *Aeromonas jandaei*.

*Author for correspondence:

Maria José Figueras

Departament de Ciències Mèdiques Bàsiques

Facultat de Medicina i Ciències de la Salut

Universitat Rovira i Virgili

Sant Llorenç 21

43201 Reus (Spain)

Phone: 34-977759321

Fax: 34-977759322

E-mail: mjfs@fmcs.urv.es

Presence of virulence markers on clinical and environmental isolates of *Aeromonas jandaei*

Abstract

We have investigated the presence of four virulence genes, i.e. *alt*, *ast*, aerolysin/hemolysin and *lafA* in 32 isolates of *A. jandaei* from clinical, environmental and animal origins. The *lafA* gene was the most widely distributed (61.5% of the isolates), followed by the aerolysin/hemolysin (42.3%), *alt* (11.5%) and *ast* (3.8%) genes. Only one human diarrhoeal isolate presented the *ast* gene in combination with *alt* and *lafA*. Simultaneous presence of the *lafA* gene and aerolysin/hemolysin was observed in 34.7% of the isolates regardless of their origin. A total of 72.2% of the clinical isolates presented any of the studied virulence genes, while only 40% of the environmental isolates did. Since 18 of the 32 isolates were obtained from different authors, all the isolates were typed with the PCR amplification of the enterobacterial repetitive intergenic consensus (ERIC) obtaining specific profiles for only 26 isolates. This indicated that the rest were duplicates.

1.Introduction

The genus *Aeromonas* includes 15 species (Figueras *et al.*, 2000b; Pidiyar *et al.*, 2002), *A. veronii* biotype *sobria*, *A. caviae* and *A. hydrophila* being the most prevalent in clinical samples, although other species such as *A. jandaei* are also isolated (Carnahan *et al.*, 1991; Joseph *et al.*, 1991; Gonzalez *et al.*, 2001; Overman *et al.*, 1999; Figueras *et al.*, 2000a; Carson *et al.*, 2001; Janda & Abbott, 1998; Valera & Esteve, 2002; Sarma, 2002). The incidence of *A. jandaei* in our studies using genetic identification methods was 2.6% of intestinal and 5.6% of extraintestinal isolates (unpublished data). This species has caused septicemia and intestinal diseases in humans (Janda & Abbott, 1998) and has showed more resistance to antibiotics than other clinical species such as *A. schubertii*, *A. trota* and *A. veronii* biotype *veronii* (Overman *et al.*, 1999).

Several virulence factors have been studied in *Aeromonas* including aerolysin/hemolysin, enterotoxins, proteases, lipases and deoxyribonucleases (Chopra et al., 1999; Janda, 2001; Chacón et al., 2003). A recent study by Albert et al. (2000) has revealed a significant statistical association between two cytotoxic enterotoxin genes, the *ast* gene that codifies for a heat stable enterotoxin (Chopra et al., 1994) and the *alt* gene that codifies for a heat labile enterotoxin (Chopra et al., 1986), in strains isolated from patients with diarrhoea. It was postulated that both genes act synergistically to induce severe diarrhoea. Moreover, double deletion mutants for the *ast* and *alt* genes lead important fluid secretion reduction in a mouse model (Sha et al., 2002). Another virulence factor of relevant interest in this genus is the cytotoxic enterotoxin *act*, which presents hemolytic, cytotoxic and enterotoxic activity (Rose et al., 1989; Ferguson et al., 1997), and is an aerolysin-related toxin (Chopra et al., 1993). Triple deletion mutants for *alt*, *ast* and *act* genes lead to a 100% reduction in fluid secretion in a mouse model (Sha et al., 2002).

The incidence of virulence genes in *A. jandaei* have been only rarely investigated (Kingombe et al., 1999; Albert et al., 2000; Kirov et al., 2002; Chacón et al., 2003). The present study investigates the presence of the *alt* and *ast* genes in 32 *A. jandaei* isolates from clinical, environmental and animal origins in order to evaluate if any relationship exists between these two genes and the presence of diarrhoea. The presence of the aerolysin/hemolysin (*act*) and *lafA* genes is also evaluated. The amplification of the enterobacterial repetitive intergenic consensus (ERIC), which is a good typing technique for *Aeromonas* (Soler et al., 2003), has been performed to ensure the uniqueness of each strain.

2. Materials and methods

Strains. The study included 32 *A. jandaei* isolates, 14 from our collection and 18 provided by other authors (Table 1). All the isolates have been re-identified by the 16S rDNA RFLP technique (Borrell et al., 1997; Figueras et al., 2000b). Ten *A. popoffii* isolates were used as outgroups for the ERIC dendogram.

Negative control strains from other related genera were used in the PCR amplification and Dot blot hybridization experiments (Table 1).

ERIC analysis. It was performed as previously described (Soler et al., 2003). Briefly, 100 ng of DNA were used per PCR reaction using primers and conditions previously described (Vila et al., 1996). Samples of each PCR end product were electrophoresed on 10% polyacrylamide gels. AmpliSize™ Molecular Ruler 50-2,000 bp Ladder (Bio-Rad, Barcelona, Spain) was electrophoresed twice in each gel. Gel images were saved as TIFF files, and further processed by BioNumerics software, version 1.5 (Applied Maths, Kortrijk, Belgium). To construct the dendograms, levels of similarity between the profiles were calculated by using the band-matching Dice coefficient (S_D) and the cluster analysis of similarity matrices was calculated with the unweighted pairgroup method with arithmetic averages (UPGMA).

Detection of virulence genes.

Primer design and PCR amplification. Sequences deposited in the GenBank and in the European Molecular Biology Laboratory (EMBL) under the gene denomination *ast* (Sha et al., 2002), *lafA* (A1 and A2) (Kirov et al., 2002; Gavin et al., 2002) and *alt* (Chopra et al., 1996) were used for primer design using Primer Designer 3 software (Scientific Educational Software, Durham, USA) (Table 2). The selected primers were then computer-aligned with the sequences in the GenBank and EMBL databases by BLAST analysis to ensure their specificity for the mentioned *Aeromonas* genes. Table 2 contains the list of primers designed for PCR detection. The primers *lafA*-F and *lafA*-R bind to the genes *lafA*, *lafA*1 and *lafA*2 and amplified similar fragments of the consensus region of those genes (Table 2). Primers and PCR conditions for aerolysin/hemolysin were described previously (Soler et al., 2002; Chacon et al., 2003). PCR amplifications for the remaining genes were performed in a final volume of 50 µl containing 3 µg of DNA, 0.3 mM deoxynucleotide triphosphate mix, 1X PCR

buffer (Gibco-BRL, Barcelona, Spain), 1.8 mM MgCl₂, 0.3 μM of primers and 2.5 units of *Taq* polymerase (Gibco-BRL). PCRs were carried out in a Perkin-Elmer GeneAmp 2400 PCR System by using the following programme: 5 min denaturation cycle at 95°C, 35 melting cycles at 94°C for 1 min, annealing for 1 min at 50°C followed by an elongation at 72°C for 1 min and a final extension cycle of 72°C for 10 min. 20 μl of the amplified product was electrophoresed in a 1% agarose gel. Two amplified PCR products of each amplified gene were confirmed by sequencing with an ABI-PRISM™ 310.

Dot blot. This methodology was only employed for the detection of *ast*, *lafA* and aerolysin/hemolysin genes. Dot blot experiments were not performed for the *alt* gene due to the high percentage of similarity to several lipase gene sequences. 10 μg of DNA of each strain were blotted onto a nylon membrane. The membrane was then placed on a filter paper saturated with a denaturing solution (0.5 N NaOH) for 5 min and then on a filter paper soaked in a neutralizing solution (0.5 M Tris-HCl pH 7, 1.5 M NaCl) for 5 min. The membrane was then placed for 5 min on a new filter paper saturated with 10 X SSC (Standard Saline Citrate) (1.5 M NaCl-0.15 M sodium citrate pH 7.2). Finally the membrane with the bound DNA was UV-crosslinked for 3 min on an UV-transilluminator, rinsed in sterile double-distilled H₂O and air dried until used.

Preparation of digoxigenin-labelled probe. Probes were Digoxigenin-labelled by PCR by adding 0.5 nmol of Dig-11-dUTP (Roche Diagnostics, Barcelona, Spain) to the PCR reaction. The efficiency of the labelling was determined by running 10 μl of the labelled product in parallel to 10 μl of an unlabelled control in a 1% agarose gel.

Dot blot hybridisation with the DIG-labelled probe. The bacterial DNA bound to the nylon membranes was hybridised with the denatured digoxigenin-labelled *ast* or *lafA* probe

overnight at 50°C using DIG Easy Hyb solution (Roche Diagnostics); followed by 2 X 5 min washes at room temperature in 2 X SSC-0.1% SDS (Sodium Dodecyl Sulphate) and 2 X 15 min in 0.5% SSC-0.1% SDS at 50°C. Membrane detection signal was performed using the Digoxigenin detection kit as recommended by the manufacturer (Roche Diagnostics).

3. Results and discussion

The present study includes 18 *A. jandaei* isolates received from different authors' personal collections. In order to avoid considering duplicate isolates when studying virulence gene distribution, the isolates were typed by the ERIC-PCR method, which has proved to be highly discriminative in other *Aeromonas* species (Soler et al., 2003). The blind analysis was done and recognized as identical, by pairs, six isolates of *A. jandaei* and a group of four isolates, all ten obtained from different authors under the nomenclature of their labs (Figure 1; Table 1). Therefore, we contacted those authors again in order to obtain more detailed information about the exact origin of the isolates confirming that three pairs of isolates were duplicates deposited under different labels in the authors' collections. However, the four isolates with identical patterns again had a labelling problem because although 2 by 2 were proven to belong to the same strain, their origins were different (blood, ATCC 49569 and feces LMG 13064). In a recent study using numerical taxonomy, isolates ATCC 49569 and LMG 13064 presented a percentage of phenotypic similarity of 89.2% (Jaccard coefficient) and 94.3% (Simple Matching coefficient), which were considered within the cut-off values for a duplicate of a single strain (Valera & Esteve, 2002). This all together suggests that a mistake must have occurred on the labelling of those isolates. Our results highlight the confusion generated by re-labelling or re-numbering strains. We therefore recommend keeping the original nomenclature for the strains used in different studies in order to avoid this problem. The ERIC-PCR dendrogram showed two main clusters, the first containing *A. popoffii* isolates (outgroup), and the second, *A. jandaei* isolates (Figure 1). The latter was

split into two subclusters, the first containing strains from Spain, and the second those from other geographical areas, mainly from the USA. Isolates showed a tendency to cluster according to their geographical origin as described for other *Aeromonas* species using the same technique (Soler et al., 2003).

The percentage of distribution of the virulence genes was calculated by considering identical isolates as only one strain, therefore only 26 strains were considered.

The first step for bacterial infection is colonization. Swarming motility, due to the lateral flagella, has been thought to be an adaptation to life on surfaces, and its expression has been associated with better adherence and colonization (Gavín et al., 2002). Mutants for the genes *lafA1*, *lafA2*, *fliU* or *lafT*, which encode for lateral flagella, decreased the adherence level of *Aeromonas* to human epithelial cells and the capacity to form biofilms (Gavín et al., 2002). When the presence of genes involved in the synthesis of the lateral flagella were studied by dot blot in 20 strains belonging to the species *A. hydrophila*, *A. veronii* and *A. caviae*, all the strains were found to possess those genes using three different probes (*lafB-C*, *lafX-S*, and *lafT-U*) (Gavín et al., 2002); in contrast Kirov et al. (2002) found only 49% of 84 *Aeromonas* isolates belonging to the species *A. hydrophila*, *A. bestiarum*, *A. salmonicida*, *A. caviae* and *A. veronii* were positive when using a probe for the *lafA* gene. Only the *A. jandaei* type strain was investigated by the latter author and found to possess the *lafA* gene. In the present study, twelve isolates were negative for the presence of the *lafA* gene by PCR but positive by Dot-blot hybridization, and were therefore considered positive (Table 3). Since no homology with other genes was detected by BLAST analysis with the *lafA* gene, we considered that the negative amplifications by PCR was due to a primer mismatch on the primer binding sites, as occurred with GCAT when it was investigated by PCR or colony blot (Chacón et al., 2002). Two PCR fragments of the *lafA* gene were sequenced (AY228331, strain CECT 4228^T and AY228330, strain A919). After a CLUSTAL W analysis, 73% of homology was obtained among them. Control strains were Dot-blot and PCR negative (Table 3), indicating the specificity of the primers designed for the genus

Aeromonas. The *lafA* gene was found widely distributed among all the isolates independent of their origin, since 16 (61.5%) presented the gene (Table 3). These findings are not surprising since the advantages of possessing lateral flagella are important in both environments, for colonization and adherence in clinical isolates, and for biofilm formation in environmental isolates.

The primers designed here were unable to amplify the *ast* and aerolysin/hemolysin genes on strains of other genera (Table 3), which demonstrates the specificity of the primers designed for the genus *Aeromonas*. In the case of *ast* and aerolysin/hemolysin genes, PCR and Dot-blot gave the same result (Table 3). When investigating the presence of the *alt* gene only the PCR method was applied, since this gene presents a high homology with other *Aeromonas* lipase gene sequences (i.e. 94% similarity with *plA*; 90% with *lipH3*; 85% with *plC*; 84% with *lip*). An important number of control strains from other genera gave a PCR fragment of identical size to that expected for the *alt* gene. However, after sequencing, those PCR products were found to be a hypothetical protein, with no known function, that did not resemble the *alt* gene (data not shown). Our results showed that only one clinical isolate of *A. jandaei* (strain 17E, from a child with diarrhoea) presented the *ast* gene. In addition, this strain possessed simultaneously the *alt* and *lafA* genes (Table 4). A statistical association between the presence of the *ast* and *alt* genes in *Aeromonas* strains isolated from patients with diarrhoea was described (Albert et al., 2000), and it was postulated that both genes would act synergistically to induce severe diarrhoea. Moreover, double deletion mutants for the *ast* and *alt* genes lead to a marked fluid secretion reduction in a ligated ileal loop assay on a mouse model (Sha et al., 2002). However, we found most human diarrhoeal isolates (11 isolates from a total of 12; 91.6%) without this association. Single deletion mutants for the *alt* gene lead to a fluid secretion reduction of 48% (Sha et al., 2002). However, the presence of the *alt* gene alone did not show any significant differences between diarrhoeal and control children (Albert et al., 2000). In our study only one diarrhoeal isolate presented this gene alone (Table 4).

Aerolysin presents a 79-93% homology with the *act* gene at the aminoacid level (Chopra et al., 1993), which results in differential neutralization of Act with Act- and aerolysin-specific monoclonal antibodies (Chopra et al., 1991), which could be due to a differential folding of the molecules. This homology is up to 96% at the DNA level, making impossible the design of PCR primers able to amplify each gene independently. For these reasons we talk here about aerolysin/hemolysin instead of the *act* gene. The role of both genes in *Aeromonas* pathogenicity has already been demonstrated (Chakraborty et al., 1987; Sha et al., 2002). In our study the aerolysin/hemolysin gene was present in 42.3% of the *A. jandaei* isolates. This results are clearly different from those obtained in previous studies on isolates of the same species, i.e. 0% by Kingombe et al. (1999) and 83.3% by Chacón et al. (2003), although those authors used a limited number of strains. In the present study, the *A. jandaei* type strain presented the aerolysin/hemolysin gene as stated by Chacón et al. (2003) and in contrast to results from Kingombe et al. (1999). Our results showed that this gene was more frequent in animal (66.6%) and human clinical (44.4%) isolates than in environmental ones (20%). The presence of the aerolysin/hemolysin gene was found associated with the *lafA* gene in 50% human extra-intestinal, 33.4% human intestinal and 33.3% of the animal isolates.

Triple deletion mutants for *alt*, *ast* and *act* genes lead to a 100% reduction in fluid secretion in a mouse model (Sha et al., 2002). In the present study none of the *A. jandaei* isolates presented the three mentioned genes simultaneously. Only 40% (2/5) of the environmental isolates presented any of the four studied virulence genes versus 72.2% (13/18) of the clinical ones (Table 4).

In conclusion, the *lafA* gene was found to be the most widely distributed among the strains (61.5%), followed by the aerolysin/hemolysin gene (42.3%), the *alt* (11.5%) and the *ast* (3.8%) genes. Simultaneous presence of the *lafA* and the aerolysin/hemolysin genes was observed in 34.7% of the isolates regardless of their origin, while association between the *ast* and *alt* genes was only found in one of the human clinical isolates. Finally, we do not

recommend re-labelling isolates received from different authors, and we encourage the use of ERIC-PCR as a typing technique for *Aeromonas* isolates.

Acknowledgements

This work has been supported by the grants: FIS 99/0944 from the Spanish Ministry of Health, Fundació Ciència i Salut and a fellowship from the Universitat Rovira i Virgili. We would like to thank the Colección Española de Cultivos Tipo (CECT), Dr. P.E. Granum, Dr. J.M. Janda and Dr. C. Esteve for kindly providing isolates.

References

- Abrami, L., Fivaz, M. and van der Goot F.G. (2000) Adventures of a pore-forming toxin at the target cell surface. *Trends Microbiol.* 8, 168-72.
- Albert, M.J., Ansaruzzaman, M., Talukder, K.A., Chopra, A.K., Kuhn, I., Rahman, M., Fauque, A.S.G., Islam, M.S., Sack, R.B. and Mollby, R. (2000) Prevalence of enterotoxin genes in *Aeromonas* ssp. isolated from children with diarrhea, healthy controls, and the environment. *J. Clin. Microbiol.* 38, 3785-3790.
- Borrell, N., Acinas, S.G., Figueras, M.J. and Martínez-Murcia, A. (1997) Identification of *Aeromonas* clinical isolates by restriction fragment length polymorphism of PCR-amplified 16S rRNA genes. *J. Clin. Microbiol.* 35, 1671-1674.
- Buckley, J.T. and Howard, S.P. (1999) The cytotoxic enterotoxin of *Aeromonas hydrophila* is aerolysin. *Infect. Immun.* 67,466-467.
- Carnahan, A., Fanning, G.R. and Joseph, S.W. (1991) *Aeromonas jandaei* (formerly genospecies DNA group 9 *A. sobria*), a new sucrose-negative species isolated from clinical specimens. *J. Clin. Microbiol.* 29, 560-564.

- Carson, J., Wagner, T., Wilson, T. and Donachie, L. (2001) Minuturized tests for computer-assisted identification of motile *Aeromonas* species with an improved probability matrix. *J. Appl. Microbiol.* 90, 190-200.
- Chacón, M.R., Castro-Escarpulli, G., Soler, L., Guarro, J. and Figueras, M.J. (2002). A DNA probe specific for *Aeromonas* colonies. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 44, 221-225.
- Chacón, M.R., Figueras, M.J., Castro-Escarpulli, G., Soler, L. and Guarro, J. (2003) Distribution of virulence genes in clinical and environmental isolates of *Aeromonas* spp. *Antonie van Leeuwenhoek*. (in press).
- Chakraborty, T., Huhle, B., Hof, H., Bergbauer, H. and Woebel, W. (1987) Marker-exchange mutagenesis of the aerolysin determinant in *Aeromonas hydrophila* demonstrates the role of aerolysin in *A. hydrophila*-associated systemic infections. *Infect. Immun.* 55, 2274-2280.
- Chopra, A.K. and Houston, C.W. (1999) Enterotoxins in *Aeromonas* associated gastroenteritis. *Microb. Infect.* 1, 1129-1137.
- Chopra, A.K., Houston, C.W., Genaux, C.T., Dixon, J.D. and Kurosky, A. (1986) Evidence for production of an enterotoxin and cholera toxin cross-reactive factor by *Aeromonas hydrophila*. *J. Clin. Microbiol.* 24, 661-664.
- Chopra, A.K., Houston, C.W. and Kurosky, A. (1991). Genetic variation in related cytolytic toxins produced by different species of *Aeromonas*. *FEMS Microbiol. Lett.* 62, 231-237.
- Chopra, A.K., Houston, C.W., Peterson, J.W. and Jin, G.F. (1993) Cloning, expression, and sequence analysis of a cytolytic enterotoxin gene from *Aeromonas hydrophila*. *Can. J. Microbiol.* 39, 513-523.
- Chopra, A.K., Pham, R. and Houston, C.W. (1994) Cloning and expression of putative cytotoxic enterotoxin-encoding genes from *Aeromonas hydrophila*. *Gene* 139, 87-91.
- Chopra, A.K., Peterson, J.W., Xu, X.J., Coppenhaver, D.H. and Houston, C.W. (1996) Molecular and biochemical characterization of a heat-labile cytotoxic enterotoxin from *Aeromonas hydrophila*. *Microb. Pathog.* 21, 357-377.

Chopra, A.K., Xu, X., Ribardo, D., Gonzalez, M., Kuhl, K., Peterson, J.W. and Houston, C.W. (2000) The cytotoxic enterotoxin of *Aeromonas hydrophila* induces proinflammatory cytokine production and activates arachidonic acid metabolism in macrophages. *Infect. Immun.* 68, 2808-2818.

Ferguson, M.R., Xu, X.J., Houston, C.W., Peterson, J.W., Coppenhaver, D.H., Popov, V.L. and Chopra, A.K. (1997) Hyperproduction, purification and mechanism of action of the cytotoxic enterotoxin produced by *Aeromonas hydrophila*. *Infect. Immun.* 65, 4299-4308.

Figueras, M.J., Guarro, J. and Martínez-Murcia, A.J. (2000a) Clinically relevant *Aeromonas* species. *Clin. Infect. Dis.* 30, 988-989.

Figueras, M.J., Soler, L., Chacón, M.R., Guarro, J. and Martínez-Murcia, A.J. (2000b) Extended method for discrimination of *Aeromonas* spp. by 16S rDNA-RFLP. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 50, 2069-2073.

Gavin, R., Rabaan, A.A., Merino, S., Tomás, J.M., Gryllos, I. and Shaw, J.G. (2002) Lateral flagella of *Aeromonas* species are essential for epithelial cell adherence and biofilm formation. *Mol. Microbiol.* 43, 383-397.

González-Serrano, C.J., Santos, J.A., García-López, M.J. and Otero, A. (2002) Virulence markers in *Aeromonas hydrophila* and *Aeromonas veronii* biovar *sobria* isolates from freshwater fish and from a diarrhoea case. *J. Appl. Microbiol.* 93, 414-419.

Granum, P.E., O'Sullivan, K., Tomas, J.M. and Ormen, O. (1998) Possible virulence factors of *Aeromonas* spp. from food and water. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 21, 131-137.

Janda, J.M. (2001) *Aeromonas* and *Plesiomonas* p. 1237-1270. *In* M. Sussman (ed.), *Molecular Medical Microbiology*. Academic Press, San Diego, USA.

Janda, J.M. and Abbott, S.L. (1998) Evolving concepts regarding the genus *Aeromonas*: an expanding panorama of species, disease presentations, and unanswered questions. *Clin. Infect. Dis.* 27, 332-344.

Joseph, S.W., Carnahan, A.M., Brayton, P.R., Fanning, G.R., Almazan, R., Drabick, C., Trudo, E.W., JR. and Colwell, R.R. (1991) *Aeromonas jandaei* and *Aeromonas veronii* dual infection of a human wound following aquatic exposure. J. Clin. Microbiol. 19, 565-569.

Kingombe, C.I.B., Huys, G., Tonolla, M., Albert, M.J., Swings, J., Peduzzi, R. and Jemmi, T. (1999) PCR detection, characterization, and distribution of virulence genes in *Aeromonas* spp. Appl. Environm. Microbiol. 65, 5293-5302.

Kirov, S.M., Tassell, B.C., Semmler, A.B.T., O'Donovan, L.A., Rabaan, A.A. and Shaw, J.G. (2002) Lateral flagella and swarming motility in *Aeromonas* species. J. Bacteriol. 184, 547-555.

Overman T.L. and Janda, J.M. (1999) Antimicrobial susceptibility patterns of *Aeromonas jandaei*, *A. schubertii*, *A. trota*, and *A. veronii* biotype *veronii*. J. Clin. Microbiol. 37, 706-708.

Pidiyar,V., Kaznowski, A., Narayan, N.B., Patote, M. and Shouche, Y.S. (2002). *Aeromonas culicicola* sp. nov., from the midgut of *Culex quinquefasciatus*. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 52, 1723-1728.

Rose, J.M., Houston, C.W., Coppenhaver, D.H., Dixon, J.D. and Kurosky, A. (1989) Purification and chemical characterization of a cholera toxin-cross-reactive cytolytic enterotoxin produced by a human isolate of *Aeromonas hydrophila*, Infect. Immun. 57, 1165-1169.

Sarma, P.S. (2002) *Aeromonas jandaei* cellulitis and bacteremia in a man with diabetes. Am. J. Med. 112, 325.

Sha, J., Kozlova, E.V. and Chopra, A.K. (2002) Role of various enterotoxins in *Aeromonas hydrophila*-induced gastroenteritis: generation of enterotoxin gene-deficient mutants and evaluation of their enterotoxin activity. Infect. Immun. 70, 1924-1935.

Soler, L., Figueras, M.J., Chacón, M.R., Guarro, J. and Martinez-Murcia, A.J. (2003) Comparison of three molecular techniques for typing *Aeromonas popoffii* isolates. Antonie van Leeuwenhoek. (In press).

Soler, L., Figueras, M.J., Chacón, M.R., Vila, J., Marco, F., Martínez-Murcia, A.J. and Guarro, J. (2002). Potential virulence and antimicrobial susceptibility of *Aeromonas popoffii* recovered from freshwater and seawater. FEMS Immun. Med. Microbiol. 32, 243-247

Valera, L. and Esteve, C. (2002) Phenotypic study by numerical taxonomy of strains belonging to the genus *Aeromonas*. J. Appl. Microbiol. 93, 77-95.

Vila, J., Marcos, M.A. and Jimenez De Anta, M.T. (1996). A comparative study of different PCR-based DNA fingerprinting techniques for typing of the *Acinetobacter calcoaceticus*-*A. baumannii* complex. J. Med. Microbiol. 44, 482-489.

Table 1. Strains used in the present study.

<i>A. jandaei</i> strains	Other collection designations	Origin
433c		Feces. 54 year-old man. SPAIN
400c		Feces. Child with simultaneous infections with <i>A. caviae</i> and <i>C. jejuni</i> . SPAIN
141c		Feces. Man with fever and diarrhoea. SPAIN
371c		Feces. 71 year-old man. SPAIN
578c		Feces. Traveller's diarrhoea. SPAIN
441c		Feces. Child with simultaneously infection with <i>C. jejuni</i> . SPAIN
574c		Bile. Clinical sample. SPAIN
764		Seawater. Badalona. SPAIN
799		River mouth. Seawater. La Platjola. SPAIN
392		River mouth. Muga river mouth. SPAIN
566c		Feces. > 65 year-old man. SPAIN
613		River water. Ter River. SPAIN
344		Freshwater. Banyoles Lake. SPAIN
343c		Feces. Clinical sample. SPAIN
MDL-90A-5119		Wound. Clinical sample. Provided by Dr. J.M Janda.
AER 206		Feces. < 1year-old female with gastroenteritis. New York. USA (Carnahan et al., 1991) Provided by Dr. J.M. Janda.
CECT4231		Prawn. Hawaii. Isolated from a prawn. Honolulu (Carnahan et al., 1991). Provided by CECT.
1E	AS167; CECT4231; ATCC49572	Prawn. Hawaii. Isolated from a prawn. Honolulu (Carnahan et al., 1991). Provided by Dr. C. Esteve
CECT 4228 ^T		Feces. Male with diarrhoea and dehydration. Oregon. USA (Carnahan et al., 1991). Provided by CECT.
3E	CECT4228 ^T ; ATCC49568 ^T	Feces. Male with diarrhoea and dehydration. Oregon. USA (Carnahan et al., 1991). Provided by Dr. C. Esteve.
AER 14		Blood. 71-year-old male with adult-onset diabetes mellitus and multiple myeloma. New York. USA. (Carnahan et al., 1991) PProvided by Dr. J.M. Janda.
46E	AS14 (AER14); CECT4838; ATCC49569	Blood. 71-year-old male with adult-onset diabetes mellitus and multiple myeloma. New York. USA. (Carnahan et al., 1991) Provided by Dr. C. Esteve.
A179		Feces. Switzerland. Provided by Dr. C.I.B. Kingombe.
18E	A179; CECT4815; LMG13064	Feces. Switzerland. Provided by Dr. C. Esteve.
15E	A92; CECT4818; CDC2417-86	Rainbow trout. Kidney. Provided by Dr. C. Esteve
AER235		Blood. 96-year-old male with an acute myelogenous leukemia. New York. USA. (Carnahan et al., 1991). Provided by Dr. J.M. Janda.
CECT4229	WR11/4658	Wound below left eye. 10 year-old male with an injury under the lacrimal sac. Maryland. USA. (Carnahan et al., 1991, Joseph et al., 1991) Provided by CECT.
AH31b		Crab. Norway. (Granum et al., 1998)
A919		Feces. USA. Provided by Dr. C.I.B. Kingombe
NMRI-6		Leg wound. Soft tissue of the leg. USA navy diver with a simultaneous infection with <i>A. hydrophila</i> . Infection secondary to a puncture wound sustained during diver training in the Anacostia River (near Washington DC). (Carnahan et al., 1991) Provided by Dr. J.M. Janda.

Table 1

<i>A. jandaei</i> strains	Other collection designations	Origin
110E	NMRI-6; CECT4901; ATCC49571	Leg wound. Soft tissue of the leg. US navy diver with a simultaneous infection by <i>A. hydrophila</i> and <i>A. jandaei</i> . Infection secondary to a puncture wound sustained during diver training in the Anacostia River (near Washington DC). (Carnahan et al., 1991) Provided by Dr C. Esteve.
17E	CDC1530-81; CECT4813	Feces. Children. Georgia. USA (Carnahan et al., 1991). Provided by Dr. C. Esteve.

Control strains	Origin
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC25668	Human exudate
<i>Escherichia coli</i> O:157H7 CECT 4076	Enterohemorrhagic
<i>E. coli</i> O:128K67 CECT742	Enteropathogenic
<i>E. coli</i> O:25 H42 CECT685	Entero toxigenic
<i>E.coli</i> O:158 K:-H34 CECT744	Feces
<i>Vibrio parahaemolyticus</i> CECT 612	Sea water
<i>V. parahaemolyticus</i> CECT 613	Marine plankton
<i>V. parahaemolyticus</i> CECT 611	Sea water
<i>V. parahaemolyticus</i> CECT 588	Mussels
<i>Salmonella typhimurium</i> ATCC 14028	Septicemic liver from bovine

ATCC, American Type Culture Collection Rockville, USA; CECT, Colección Española de Cultivos Tipo, Universidad de Valencia, Valencia, Spain; CDC, Centers for Disease Control, United States Public Health Service, Atlanta, USA; LMG, Culture Collection of the Laboratorium voor Microbiologie Gent, Universiteit Gent, Ghent, Belgium; E, Dr. C. Esteve collection.

Table 3. Distribution of virulence factors among *A. jandaei* isolates

<i>A. jandaei</i> isolates	PCR (Dot-blot)			PCR
	<i>ast</i>	<i>lafA</i>	aerolysin/hemolysin	<i>alt</i>
Clinical isolates				
433c	- (-)	- (-)	- (-)	-
400c	- (-)	- (-)	- (-)	-
141c	- (-)	- (+)	+ (+)	-
371c	- (-)	- (-)	- (-)	-
578c	- (-)	- (-)	- (-)	-
441c	- (-)	- (-)	- (-)	+
566c	- (-)	- (-)	+ (+)	-
343c	- (-)	- (+)	+ (+)	-
CECT4228 ^T	- (-)	+ (+)	+ (+)	-
AER 206	- (-)	+ (+)	- (-)	-
17E	+ (+)	+ (+)	- (-)	+
A919	- (-)	+ (+)	+ (+)	-
574c	- (-)	- (+)	+ (+)	-
MDL-90A-5119	- (-)	+ (+)	- (-)	-
AS14 (AER14)	- (-)	- (+)	- (-)	-
AER235	- (-)	- (+)	+ (+)	-
CECT4229	- (-)	- (-)	- (-)	-
NMRI-6	- (-)	+ (+)	+ (+)	-
	1/18 (5.5%)	11/18 (61.1%)	8/18 (44.4%)	2/18 (11.1%)
Environmental isolates				
764	- (-)	- (-)	- (-)	-
799	- (-)	- (+)	+ (+)	-
392	- (-)	- (-)	- (-)	-
613	- (-)	- (-)	- (-)	-
344	- (-)	+ (+)	- (-)	-
	0/5 (0%)	2/5 (40%)	1/5 (20%)	0/5 (0%)
Animal isolates				
CECT4231 (AS167)	- (-)	- (+)	+ (+)	-
15E	- (-)	- (+)	+ (+)	+
AH31b	- (-)	+ (+)	- (-)	-
	0/3 (0%)	3/3 (100%)	2/3 (66.6%)	1/3 (33.3%)
TOTAL	1/26 (3.8%)	16/26 (61.5%)	11/26 (42.3%)	3/26 (11.5%)
Control strains				
<i>Salmonella typhimurium</i> ATCC 14028	- (-)	- (-)	- (-)	-
<i>Escherichia coli</i> O:157 H7 CECT4076	- (-)	- (-)	- (-)	+
<i>E. coli</i> O:25 H42 CECT 685	- (-)	- (-)	- (-)	+
<i>E. coli</i> O:128 K67 CECT 742	- (-)	- (-)	- (-)	+
<i>E. coli</i> O:158 K:H34 CECT 744	- (-)	- (-)	- (-)	+
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> CECT 118	- (-)	- (-)	- (-)	-
<i>Vibrio parahaemolyticus</i> CECT 588	- (-)	- (-)	- (-)	+
<i>V. parahaemolyticus</i> CECT 611	- (-)	- (-)	- (-)	+
<i>V. parahaemolyticus</i> CECT 612	- (-)	- (-)	- (-)	+
<i>V. parahaemolyticus</i> CECT 613	- (-)	- (-)	- (-)	+

Table 2. Selected sequences and primers designed for the detection of *Aeromonas* spp. virulence genes

Gene	Selected primers	Primer site location		Amplified Fragment size in bp (gene)	Sequence accession number	Organism (strain)	Reference
<i>ast</i>	ast-F: 5'-ATCGTCAGCGACAGCTTCTT-3' ast-R: 5'-CTCATCCCTTGGCTTGTTGT-3'	2411-2430	2895-2914	504 (<i>ast</i>)	AF419157	<i>A. hydrophila</i> (SSU)	Sha et al., 2002
<i>alt</i>	alt-F : 5'-AAAGCGTCTGACAGCGAAGT-3' alt-R : 5'-AGCGCATAGGCGTTCTCTT-3'	163-172	464-482	320 (<i>alt</i>)	L77573	<i>A. hydrophila</i> (SSU)	Chopra et al., 1996
aerolysin/hemolysin *	aer-F: 5'-CCTATGGCCTGAGCGAGAAG-3' aer-R: 5'-CCAGTTCCAGTCCCACCACT-3'	1295-1314	1706-1725	431 (<i>aerA</i>)	M16495	<i>A. hydrophila</i> (Ah65)	Howard et al. 1987
		1188-1207	1598-1619		X65044	<i>A. hydrophila</i> (28SA)	Hirono et al. 1992
		905-924	1316-1335		X65045	<i>A. hydrophila</i> (AH1)	Hirono et al. 1992
		1189-1208	1621-1640		X65043	<i>A. hydrophila</i> (28SA)	Hirono et al. 1992
		1647-1666	2058-2077		M84709	<i>A. hydrophila</i> (SSU)	Chopra et al. 1993
		971-990	1382-1401		U40711	<i>A. caviae</i> (A1833)	Wang et al. 1996
		1160-1179	1571-1590		AF064068	<i>A. trota</i> (ATCC49659)	Khan et al. 1998
		1625-1644	2036-2055		Y00559	<i>A. sobria</i> (AB3)	Husslein et al. 1988
<i>lafA</i>	lafA-F: 5'-CCAACTT(T/C)GC(C/T)TC(T/C)(C/A)TGACC-3' lafA-R: 5'-TCTTGGTCAT(G/A)TTGGTGCT(C/T)-3'	1103-1123	1514-1533	743 (<i>lafA1</i>) 736 (<i>lafA2</i>)	X65046	<i>A. sobria</i> (33)	Hirono et al. 1992
		1105-1124	1516-1535		X65048	<i>A. salmonicida</i> (17-2)	Hirono and Aoki 1993
		826-845	1548-1569		AF348135	<i>A. caviae</i> (Sch3)	Kirov et al., 2002
		1840-1859	2579-2598				

*aerolysin/hemolysin primers have been published by Soler et al. (2002) and Chacon et al. (2003).

Table 4. Combinations of the virulence genes found on the *A. jandaei* isolates.

Origin	number of isolates	<i>lafA</i>	aerolysin/hemolysin	<i>alt</i>	<i>lafA</i> + aerolysin/hemolysin	<i>ast</i> + <i>lafA</i> + <i>alt</i>	<i>lafA</i> + aerolysin/hemolysin + <i>alt</i>	none
Human intestinal	12	1 (8.3%)	1 (8.3%)	1 (8.3%)	4 (33.4%)	1 (8.3%)		4 (33.4%)
Human extra-intestinal	6	2 (33.3%)			3 (50%)			1 (16.7%)
Environment	5	1 (20%)			1 (20%)			3 (60%)
Animal	3	1 (33.3%)			1 (33.3%)		1 (33.3%)	
TOTAL	26	5 (19.3%)	1 (3.8%)	1 (3.8%)	9 (34.7%)	1 (3.8%)	1 (3.8%)	8 (30.8%)

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Origen y aislamiento de las cepas

Las cepas utilizadas en los diferentes estudios se encuentran detalladas en los Anexos 1-13.

3.1.1. Cepas clínicas

Las cepas clínicas utilizadas en el presente estudio fueron facilitadas por los siguientes hospitales: Hospital Son Dureta (Palma de Mallorca); Hospital San Juan (Reus); Hospital Valle de Hebron (Barcelona); Hospital San Pablo (Barcelona); Hospital Clínico (Barcelona); Fundación Jiménez Díaz (Madrid); Hospital de la Princesa (Madrid). La metodología empleada para el aislamiento e identificación bioquímica de las cepas fue la detallada por Borrell (1998).

También se utilizaron cepas clínicas facilitadas por el Dr. J.M. Janda de la *Division of Communicable Disease Control, California Department of Health Services* (Berkeley, Estados Unidos), la Dra. G. Castro-Escarpulli del *Departamento de Bacteriología Médica, Escuela Nacional de Ciencias Biológicas* (México DF), la Dra. C. Esteve del *Departamento de Microbiología y Ecología de la Universidad de Valencia* (Burjasot, España) y el Dr. C.I. Kingombe del *Department of Microbiology and Immunology, Faculty of Medicine, University of Ottawa* (Ontario, Canada).

3.1.2. Cepas ambientales

Las cepas de alimentos, aguas potables y aguas de baño utilizadas en el presente estudio fueron tomadas del estudio Borrell y cols. (1998). Sin embargo durante el presente estudio se aislaron 176 nuevas cepas de *Aeromonas* de aguas de baño empleando la metodología descrita por Borrell (1998).

También se utilizaron cepas ambientales facilitadas por la Dra. A. Demarta del *Instituto Cantonale Batteriosierologico, Laboratory of Microbial Ecology, University of Geneva* (Lugano, Suiza), la Dra. A. Kozińska del *Department of Fish Disease, National Veterinary Research Institute* (Putawy, Polonia), el Dr. B. Austin del *Department of Biological Sciences, Heriot-Watt University, Riccarton* (Edinburgh, Reino Unido), la Dra. G. Castro-Escarpulli del *Departamento de Bacteriología Médica, Escuela Nacional de Ciencias Biológicas* (México DF) y el Dr. P.E. Granum del *Department of Pharmacology, Microbiology and Food Hygiene, Norwegian College of Veterinary Medicine* (Oslo, Noruega).

3.1.3. Cepas de colección y de referencia

En el presente estudio se han utilizado también cepas tipo y de referencia procedentes de diferentes colecciones de cultivos tipo: CECT, ATCC, CCUG, CDC, CIP, NCIMB, LMG, DMSZ y JCM. Éstas cepas se encuentran detalladas en el Anexo 1.

3.1.4. Cepas pertenecientes a otros géneros

Para los estudios 4.1.1.3, 4.4.1 y 4.4.3 se utilizaron como cepas control las que se detallan en el Anexo 2.

3.2. Resiembra y conservación de cepas

Las colonias aisladas a partir de los medios selectivos, así como las cepas recibidas de los diferentes hospitales, fueron sembradas en TSA (Difco; Barcelona, España) e incubadas durante 24 h a 30°C, tal como recomiendan Toranzo y cols. (1986). Éstas cepas fueron conservadas en diferentes condiciones, con el fin de tenerlas disponibles para el trabajo diario de laboratorio, y para asegurar su supervivencia a largo plazo. Los métodos de conservación fueron elegidos siguiendo las recomendaciones del *Manual of Methods for General Bacteriology* (Gherna, 1981).

3.2.1. Conservación a corto plazo

Las cepas se inocularon por picadura en el siguiente medio de conservación; en g/l: Proteosa peptona, 10 g; NaCl, 8.5 g; Agar, 5 g; Extracto de levadura, 0.3 g.

Con esta metodología las cepas se conservaron a temperatura ambiente por un periodo de tiempo de entre 6 meses y 1 año.

3.2.2. Conservación a largo plazo

Ultra-congelación

Las cepas se inocularon en viales que contenían TSB (Difco) con un 15% de glicerol. Éstos viales se incubaron a 30°C durante 24 h, para asegurar un mínimo de 10⁸ células viables por ml, y posteriormente se congelaron a -80°C.

Liofilización

Las cepas se inocularon en TSA en siembra masiva y se incubaron durante 24 h a 30°C para asegurar un mínimo de 10^8 células viables por ml. Se recogió todo el cultivo con un asa de siembra y se mezcló en 3 ml de leche desnatada al 10% (crioprotector) previamente esterilizada a 1 atmósfera de presión durante 15 min. Se dispensaron 0.5 ml de la mezcla en viales de vidrio estéril de 1.5 ml y a continuación se congelaron a -45°C durante 1 h dentro del propio liofilizador (Advantage 2.0 Series; Virtis Company Gardiner NY, Estados Unidos). La sublimación se consiguió cuando el condensador llegó a la temperatura de -45°C, seguidamente se hizo un vacío de 200 mTorr y se programó el siguiente ciclo de liofilización: -30°C 240 min, -10°C 240 min, +10°C 300 min, +30°C 300 min.

Una vez finalizado el proceso, se sellaron los viales en condiciones de vacío. El éxito del proceso de liofilización, se determinó comprobando la viabilidad del cultivo de una de las muestras elegida al azar.

3.3. Pruebas bioquímicas utilizadas para la identificación de las cepas a nivel de especie

3.3.1. Cepas clínicas

Las cepas clínicas fueron identificadas en los diferentes hospitales de procedencia mediante los sistemas comercializados: API 20E y Vitek (Biomérieux, France). Para verificar que estas cepas pertenecían al género *Aeromonas*, una vez en nuestro laboratorio fueron sometidas a las siguientes pruebas bioquímicas: producción de ácido de la glucosa (TSI) (+), producción de ácido del inositol (-), resistencia al factor vibriostático (O/129) (+) y crecimiento en TSB con 0% (+) y 6% (-) de NaCl.

Las cepas detalladas en el Anexo 3 fueron reidentificadas en el estudio 4.1.1.2 con los sistemas automatizados Dade-MicroScan Walk-Away (BD Diagnostic Systems, NJ, USA) y BBL Crystal Enteric/NonFermenter (BBL Microbiology Systems, Cockeysville, Md) siguiendo las instrucciones de los fabricantes.

3.3.2. Cepas pertenecientes al complejo fenotípico “*A. hydrophila*”

Para el estudio 4.1.2.1, se utilizaron 116 cepas que se detallan en el Anexo 4 y las siguientes 15 pruebas bioquímicas para su identificación: utilización del DL-lactato (Janda y cols., 1996), elastasa (Hasan y cols., 1992) y utilización del ácido urocánico (Hänninen, 1994), hidrólisis de la esculina, producción de ácido de la ramnosa, sorbitol, lactosa, D-sacarosa, salicina, oxidación del gluconato, citrato, movilidad, indol, lisina descarboxilasa, y utilización del la N-acetil-D-glucosamina. Las pruebas bioquímicas mencionadas fueron incubadas a 30°C en todas las cepas con la excepción de la cepas pertenecientes a *A. salmonicida* subsp. *salmonicida*, *A. salmonicida* subsp. *masoucida*, *A. salmonicida* subsp. *achromogenes*, *A. salmonicida* subsp. *smithia* y cepas de *A. salmonicida* ‘atípicas’ que se incubaron a 20°C-22°C. Todas las respuestas se evaluaron cada 24 h durante tres días, a excepción de la producción de elastasa que se evaluó hasta el quinto día, y la oxidación del gluconato, que se evaluó a las 48 h. Todas las pruebas se realizaron por duplicado.

También se valoró el crecimiento y producción de pigmento a 4°C, 20-22°C, 30°C, 37°C y 44.5°C en TSA (Austin y cols., 1998), tomándose lecturas cada 24 h durante 5 días para la prueba de crecimiento, y durante 7 días para la producción de pigmento.

3.3.3. Cepas aisladas de carpa común (*Cyprinus carpio* L.)

Para el estudio Kozińska y cols. (2002) (4.4.5) se utilizaron los sistemas de identificación comercializados API 20E y API Zym utilizando las 36 cepas incluidas en el Anexo 5. Las siguientes pruebas bioquímicas se realizaron por métodos clásicos: producción de ácido de la salicina, celobiosa, xilosa, trealosa, maltosa, fructosa y rafinosa; producción de elastasa; β -hemólisis; crecimiento a 4°C, 37°C y 42°C; autoaglutinación; aglutinación después de herbir; y resistencia a la cefalotina.

3.3.4. Cepas aisladas de pescado congelado

Para el estudio Castro-Escarpulli y cols. (2003) (4.4.4) se seleccionaron, para identificar las 82 cepas detalladas en el Anexo 6, las pruebas bioquímicas más discriminativas del protocolo de Altwegg (1999) y los protocolos propuestos por Altwegg y Lüthy-Hottestein (1991) y Huys y cols. (1996a). Éstas fueron: hidrólisis de la esculina; producción de ácido de la glucosa, L-arabinosa, lactosa, sacarosa, salicina,

m-inositol, D-manitol; indol; arginina dehidrolasa y ornitina descarboxilasa; voges-proskauer y β -hemólisis (Tabla 3.1).

Tabla 3.1. Pruebas bioquímicas seleccionadas de Altwegg (1999) para la identificación de las cepas de *Aeromonas* aisladas de pescado congelado.

Especies	Pruebas bioquímicas									
	GAS	L/O/A	BEA	VP	A/M/S	LAC	SALI	HEMO	INO	IND
<i>A. hydrophila</i>	+	+/-/+	+	+	+/+/+	-	+	+	-	+
<i>A. bestiarum</i>	NR	NR	NR	NR	NR	-	-	NR	-	NR
<i>A. salmonicida</i>	NR	NR	NR	NR	NR	+	+	NR	-	NR
<i>A. caviae</i>	-	-/-/+	+	-	+/+/+	+	+	-	-	+
<i>A. veronii</i> bt sobria	+	+/-/+	-	+	-/+/+	-	-	+	-	+
<i>A. veronii</i> bt veronii	+	+/+/-	+	+	-/+/+	-	+	+	-	+
<i>A. jandaei</i>	+	+/-/+	-	+	-/+/-	NR	-	+	-	+
<i>A. schubertii</i>	-	+/-/+	-	-	-/-/-	-	-	V	-	-
<i>A. trota</i>	+	+/-/+	-	-	-/+/-	NR	-	V	-	+

GAS, producción de gas a partir de glucosa; L/O/A, lisina descarboxilasa/ornitina descarboxilasa/arginina dehidrolasa; BEA, hidrólisis de la bilis-esculina; VP, Test de Voges Proskauer; A/M/S, fermentación de la arabinosa/manitol/sacarosa; LAC, fermentación de la lactosa; SALI, fermentación de la salicina; HEMO, β -hemólisis en sangre de cordero. INO, fermentación del inositol; IND, indol; NR, no realizado; V, variable.

En los estudios Vila y cols. (2002) (4.2.1), Castro-Escarpulli y cols. (2003) (4.4.4), Kozińska y cols. (2002) (4.4.5) y Vila y cols. (2003) (4.2.2) se diferenciaron los dos biotipos de *A. veronii* (*A. veronii* bt sobria y *A. veronii* bt veronii) utilizando las pruebas bioquímicas de la hidrólisis de la esculina, ornitina descarboxilasa y arginina dehidrolasa, según las respuestas detalladas en la Tabla 3.1.

3.4. Identificación genética (RFLP del gen 16S rRNA)

Todas las cepas de *Aeromonas* aisladas en nuestro laboratorio, las recibidas de los hospitales, de otros autores y de las colecciones, fueron identificadas a nivel de especie en base al análisis de los patrones de RFLP del gen 16S rRNA propuesto por Borrell y cols. (1997) que fue ampliado posteriormente por Figueras y cols. (2000c) (estudio 4.1.1.1). Para ello las cepas seleccionadas se sembraron en TSA y se incubaron a 30°C durante 24 h. El DNA genómico se extrajo utilizando la matriz de

purificación InstaGENE (Bio-Rad Laboratories Inc., Barcelona, España) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La amplificación del gen 16S rRNA se llevó a cabo en el termociclador Gene-AMP (PCR System Perkin Elmer 2400) utilizando la metodología de *Hot Start PCR* (Burke, 1996). La amplificación se realizó en un volumen final de 50 µl que contenía 1 µg de DNA genómico, 1 X tampón (20 mM Tris-HCl pH8.4, 50 mM KCl), 0.3 µM de cebador Anti1, 0.3 µM de cebador S, 1.8 mM MgCl₂, 0.3 mM dNTP's y 2.5 U *Taq* polimerasa (Invitrogen; Barcelona, España). Las condiciones para cada ciclo de reacción programada fueron: 96°C, 5 min (desnaturalización); seguida de 35 ciclos de 94°C, 1 min (desnaturalización), 56°C, 1 min (hibridación); 72°C, 1.30 min (extensión). Finalmente se efectuó una última polimerización durante 5 min a 72°C. La secuencia de los cebadores para la amplificación del gen 16S rRNA de *Aeromonas* y su localización según su posición en *Escherichia coli* es la siguiente:

Anti 1	5' AGA GTT TGA TCA TGG CTC AG 3'	8-27
S	5' GGT TAC CTT GTT ACG ACT T 3'	1509-1491

Una fracción de 5 µl del producto resultante de la amplificación fue analizado por electroforesis en geles de agarosa al 1% (Sambrook y cols., 1989) para verificar su amplificación. En paralelo a la muestra a analizar se corrió 7 µl (100 ng/µl) del marcador de peso molecular AmpliSize™ de 50 a 2000 pb (Bio-Rad Laboratories Inc). El fragmento esperado de amplificación del gen 16S rRNA era de 1502 pb. A continuación se hizo una limpieza del producto amplificado empleando el sistema *Concert Rapid PCR* (Gibco BRL, Barcelona, España) de acuerdo con las indicaciones del fabricante.

Para la identificación de las especies, los productos de PCR se digirieron con las enzimas *AluI-MboI*, para ello se adicionaron 12 µl del amplificado, 50 mM Tris-HCl (pH 8.0), 10 mM MgCl₂, 10 U de la enzima *AluI* y 10 U de la enzima *MboI* (Gibco BRL). La mezcla se incubó a 37°C durante toda la noche y se analizó por electroforesis en geles de poliacrilamida al 17% (Sambrook y cols., 1989). Éste primer paso permitió la identificación de 10 de las especies del género en base a patrones especie específicos. Las especies *A. encheleia*, *A. salmonicida*, *A. bestiarum*, *A. popoffii* y *Aeromonas* sp. (GH11) no pudieron ser identificadas con este primer paso debido a que presentaban el mismo patrón (Borrell y cols., 1997). Para la identificación de estas

especies se analizaron las secuencias del gen 16S rRNA de las mismas, previamente publicadas por Martínez-Murcia y cols. (1992a, 1992b), Martínez-Murcia (1999) y Demarta y cols. (1999), utilizando los programas DIGEST y RESTRY del paquete informático PC/GENE (IntelliGenetics) y OMIGA (Oxford Molecular), con la finalidad de encontrar enzimas de restricción capaces de diferenciarlas. Se seleccionaron 5 enzimas (*NarI*, *HaeIII*, *AlwNI*, *PstI* o *SfaNI*) capaces de diferenciar en diferentes pasos cada una de estas especies (*A. encheleia*, *A. popoffii*, *Aeromonas* sp. (GH11), *A. bestiarum* y *A. salmonicida*), tal y como se describe en el estudio 4.1.1.1 (Figueras y cols., 2000c). Para la interpretación de los resultados, los patrones obtenidos de las digestiones fueron comparados con los patrones esperados por simulación informática (Tabla 3.2). Las bandas cuya diferencia en pb era inferior a 10 aparecían como una única banda en el gel de poliacrilamida.

En el Anexo 7 se detallan las cepas empleadas para la descripción del método (estudio 4.1.1.1). Esta metodología ha sido aplicada para la identificación de todas las cepas utilizadas en la presente tesis.

Tabla 3.2. Bandas esperadas, para 17 cepas tipo o de referencia de *Aeromonas*, tras la simulación informática de la digestión del gen 16S rRNA con las enzimas *AluI-MboI*.

Especie	Número de colección	Presencia de bandas (pb) en el patrón de RFLP																							
		346	242	228	211	207	204	195	188	180	174	172	165	158	157	138	118	78	69	66	54	47	42	40	33
<i>A. hydrophila</i>	CECT 839 ^T	X				X		X					X		X	X			X	X	X		X		X
<i>A. bestiarum</i>	CECT 4227 ^T	X				X		X							X	X	X		X	X	X	X	X		X
<i>A. salmonicida</i>	CECT 894 ^T	X				X		X							X	X	X		X	X	X	X	X		X
<i>A. caviae</i>	CECT 838 ^T					X		X	X	X			X	X	X				X	X	X				X
<i>A. media</i>	CECT 4232 ^T					X		X			X	X	X		X	X			X	X	X		X		X
<i>A. eucrenophila</i>	CECT 4224 ^T				X	X		X			X	X				X	X		X	X		X	X		X
<i>A. sobria</i>	CECT 4245 ^T					X		X			X	X				X	X		X	X		X	X		X
<i>A. veronii</i> bt sobria	CECT 4246					X		X			X			X	X	X		X	X	X	X	X	X	X	X
<i>A. jandaei</i>	CECT 4228 ^T					X		X	X					X	X	X		X	X	X	X	X	X	X	X
<i>A. veronii</i> bt veronii	CECT 4257 ^T					X		X			X			X	X	X		X	X	X	X	X	X	X	X
<i>A. sp</i> (GH11)	CECT 4253		X				X		X							X	X	X		X	X	X	X	X	
<i>A. schubertii</i>	CECT 4240 ^T			X		X		X		X		X			X			X	X	X		X		X	X
<i>A. sp</i> (Grupo 501)	CECT 5178			X		X		X		X				X				X						X	
<i>A. trota</i>	CECT 4255 ^T		X			X		X		X			X	X	X				X	X					X
<i>A. allosaccharophila</i>	CECT 4199 ^T					X		X			X	X			X	X	X		X	X	X	X	X		X
<i>A. encheleia</i>	CECT 4342 ^T		X				X		X							X	X	X		X	X	X	X	X	
<i>A. popoffii</i>	LMG17541 ^T		X				X		X							X	X	X		X	X	X	X	X	

3.5. Diseño de una sonda para la identificación del género

El fragmento amplificado del gen GCAT (237 pb) fue seleccionado para su utilización como sonda a nivel de género por encontrarse presente en el 98% de las cepas investigadas por PCR en el estudio de Chacón y cols. (2003) (4.4.1). Para ello el producto amplificado se marcó con digoxigenina mediante la técnica de *Random Priming* (Cebadores al azar) de acuerdo con las especificaciones del fabricante (Boehringer Mannheim, Barcelona, España).

3.5.1. Colony blot

Para el ensayo de la sonda por *colony blot*, se inocularon las bacterias a ensayar en 3 ml de TSB a 37°C y se incubaron durante 2 h en agitación. A continuación, utilizando un asa de picadura, se transfirió el inóculo punteando la superficie del medio de cultivo. Los medios de cultivo ensayados fueron: TSA, TSA con un 5% de sangre humana, TSA con un 5% de sangre de cordero, MacConkey Agar (Difco), SS (Difco), XLD (Difco) y Hecktoen enteric Agar (Difco). Las placas se incubaron a 37°C durante 18 h. Transcurrido este tiempo se tomó una réplica de las colonias mediante una membrana de nylon estéril (Boehringer Mannheim). A continuación, la membrana de nylon se colocó sobre un papel de filtro empapado con una solución de SDS al 10% durante 3 min. Seguidamente la membrana de nylon se colocó, durante 5 min a temperatura ambiente, sobre un papel de filtro empapado con una solución desnaturalizante (0.5 N NaOH, 1.5 M NaCl). Transcurrido este tiempo, se neutralizó la membrana de nylon sobre un papel filtro impregnado con una solución neutralizante (1.5 M NaCl. 0.5 M Tris-Cl pH 7.4) durante 5 min. A continuación se pasó la membrana de nylon a un papel empapado en 10 X SSC durante 5 min. Finalmente se fijó el DNA a la membrana de nylon de forma permanente, mediante la exposición de la misma a luz ultravioleta durante 3 min. Las membranas de nylon se enjuagaron con agua y se dejaron secar a temperatura ambiente.

La membrana de nylon se prehibridó con 5 ml de *Dig Easy Hyb* (Boehringer Mannheim) a 68°C en un horno de hibridación durante 30 min. La sonda marcada con digoxigenina fue sometida a ebullición durante 5 min, y colocada en hielo inmediatamente. Se eliminó la solución de prehibridación y se adicionó 5 ml de *Dig Easy Hyb* con 125 ng de la sonda marcada y se incubó durante toda la noche a 68°C. Finalizada la incubación, la membrana de nylon se lavó a temperatura ambiente sumergiéndola 2 X 15 min, en agitación con la solución (2 X SSC, 0.1% SDS),

realizándose a continuación otro lavado 2 X 15 min con una solución (0.5 X SSC, 0.1% SDS) y un último lavado con una solución (0.1 X SSC, 0.1% SDS) 2 X 15 min. Para la detección inmunológica de la reacción de hibridación, se incubó la membrana de nylon durante 5 min en agitación suave, en una solución de 0.1 M ácido maléico, 0.15 M NaCl a pH 7.5 a 20°C y 0.3% (v/v) Tween 20. A continuación se incubó 1 h en 150 ml de solución de bloqueo (Boehringer Mannheim) agitando suavemente y a temperatura ambiente. Seguidamente, se añadió a la membrana de nylon el anticuerpo anti-digoxigenina (dilución 1:5000) acoplado a fosfatasa alcalina en 20 ml de solución de bloqueo y se incubó 1 h a temperatura ambiente y en agitación suave. Finalizado este paso, se lavó la membrana de nylon dos veces con 0.1 M ácido maléico-0.15 M NaCl, pH 7.5 a 20°C durante 30 min y se neutralizó con 25 ml de solución 0.1 M Tris-HCl, 0.1 M NaCl pH 9.5 durante 5 min. Para revelar la reacción se sumergió la membrana en 25 ml de una solución recién preparada de 20 µl NBT en condiciones de oscuridad. A los 5 min se paró la reacción de color con 50 ml de H_2O . La membrana de nylon se dejó secar a temperatura ambiente. La aparición de manchas de color azul indicaba que se había producido la reacción de hibridación.

En el Anexo 8 se listan las cepas que se ensayaron por *colony blot* con la sonda específica del género *Aeromonas* (estudio 4.1.1.3).

3.6. Secuenciación de genes esenciales

3.6.1. Gen *rpoD* (factor σ^{70} de la RNA polimerasa)

Para la amplificación del gen *rpoD*, se extrajo el DNA de 70 cepas (Anexo 9) utilizando la matriz de purificación InstaGENE. La amplificación del gen se realizó mediante la técnica del *Touch Down PCR* combinada con la técnica del *Hot Start PCR* (Burke, 1996). La mezcla de PCR se hizo en un volumen final de 100 µl que contenía 1 µg de DNA genómico, 1 X tampón (20 mM Tris-HCl pH8.4, 50 mM KCl), 1 µM de cebador *rpoD70F* (5'ACG ACT GAC CCG GTA CGC ATG TAY ATG MGN GAR ATG GGN ACN GT^{3'}), 1 µM de cebador *rpoD70R* (5'ATA GAA ATA ACC AGA CGT AAG TTN GCY TCN ACC ATY TCY TTY TT^{3'}) (Yamamoto y cols., 2000), 3 mM MgCl_2 , 0.3 mM dNTPs y 2.5 U *Taq* polimerasa. Las condiciones para cada ciclo de reacción programada fueron: 95°C, 5 min (desnaturalización); seguida de 2 ciclos de 94°C, 1 min (desnaturalización), 63°C, 1 min (hibridación); 72°C, 1 min (extensión); 2 ciclos de

94°C, 1 min (desnaturalización), 61°C, 1 min (hibridación); 72°C, 1 min (extensión); 2 ciclos de 94°C, 1 min (desnaturalización), 59°C, 1 min (hibridación); 72°C, 1 min (extensión); y 30 ciclos de 94°C, 1 min (desnaturalización), 58°C, 1 min (hibridación); 72°C, 1 min (extensión). Todo el volumen de la reacción se analizó por electroforesis en un gel de agarosa al 0.8%. El producto de amplificación de 850 pb (tamaño esperado), fue recortado del gel de agarosa y posteriormente purificado mediante el GFX™ PCR DNA - Gel Band Purification Kit (Amersham Pharmacia Biotech; Barcelona, España) de acuerdo con las instrucciones del fabricante para su posterior secuenciación. Para la secuenciación de éste fragmento del gen *rpoD* se utilizaron 4 cebadores diferentes, 2 cebadores externos (*rpoDseqF*: 5'ACG ACT GAC CCG GTA CGC ATG TA^{3'}; *rpoDseqR*: 5'ATA GAA ATA ACC AGA CGT AAG TT^{3'}) y 2 cebadores internos (*rpoDseqF1*: 5'GTC AAT TCC GCC TGA TGC^{3'}; *rpoDseqR1*: 5'ATC ATC TCG CGC ATG TTG T^{3'}). La reacción de secuenciación se realizó en un volumen final de 10 µl que contenía 100-200 ng (4 µl) de producto de PCR purificado, 4 µl de ABI PRISM® BigDye™ Terminators vers. 2.0 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), 1 µl (3.2 pmol) de cebador y 1 µl de _{bd}H₂O. Las condiciones para cada ciclo de reacción programada fueron: 94°C, 5 min (desnaturalización); seguida de 25 ciclos de 96°C, 10 seg (desnaturalización); 50°C, 5 seg (hibridación); 60°C, 4 min (extensión). El producto de ésta reacción fue precipitado con etanol y analizado en el secuenciador automático ABI PRISM® 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) de acuerdo con las recomendaciones del fabricante.

3.6.2. Gen *gyrB* (subunidad B de la DNA girasa)

La secuenciación del gen *gyrB* fue realizada por Adela Yáñez en la Escuela Politécnica Superior de la Universidad Miguel Hernández de Alicante siguiendo el protocolo detallado a continuación:

Para la amplificación del gen *gyrB*, se extrajo el DNA de 70 cepas (Anexo 9) resuspendiendo, en un vórtex, una colonia en 50 µl de TE e incubando a 96°C durante 10 min. A continuación la mezcla se centrifugó 2 min a 12000 rpm y el sobrenadante fue transferido a un tubo nuevo. La mezcla de PCR se hizo en un volumen final de 50 µl que contenía 1 µl de DNA genómico, 1 X tampón (10 mM Tris-HCl pH9.0, 50 mM KCl, 0.1% Triton X-100), 20 pmol de cebador *gyrB3F* (5'TCC GGC GGT CTG CAC GGC GT^{3'}), 20 pmol de cebador *gyrB14R* (5'TTG TCC GGG TTG TAC TCG TC^{3'}) (Yáñez y cols., 2002), 1.5 mM MgCl₂, 0.2 mM dNTP's y 1 U *Taq* polimerasa. Las

condiciones para cada ciclo de reacción programada fueron de 35 ciclos de: 94°C, 30 seg (desnaturalización), 55°C, 30 seg (hibridación) y 72°C, 1 min (extensión). La reacción se analizó por electroforesis en un gel de agarosa al 1.2%. El producto de amplificación de 1100 pb (tamaño esperado), fue purificado mediante el Concert™ Rapid PCR Purification System (Life Technologies; Barcelona, España) de acuerdo con las instrucciones del fabricante para su posterior secuenciación. Para la secuenciación se utilizaron 5 cebadores diferentes, 2 cebadores externos (gyrB3F: 5'TCC GGC GGT CTG CAC GGC GT^{3'}; gyrB14R: 5'TTG TCC GGG TTG TAC TCG TC^{3'}) y 3 cebadores internos (gyrB7F: 5'GGG GTC TAC TGC TTC ACC AA^{3'}; gyrB9R: 5'ACC TTG ACG GAG ATA ACG GC^{3'}; gyrB9Rs: 5'CCT TGA CCG AAA TGA CCG CC^{3'}). La reacción de secuenciación se realizó utilizando el kit de secuenciación ThermoSequenase fluorescent labelled primer cycle con 7-deaza-dGTP (Amersham Pharmacia Biotech) y utilizando los cebadores marcados con Cy5'. La reacción fue analizada en el secuenciador automático ALFexpressII (Amersham Pharmacia Biotech) de acuerdo con las recomendaciones del fabricante.

Las secuencias de los genes *rpoD* y *gyrB* han sido analizadas en el estudio Soler y cols. (2003) (4.1.2.2).

3.6.3. Gen 16S rRNA

La amplificación del gen 16S rRNA completo (1502 pb) se realizó tal y como se ha especificado en el apartado 3.4. En las cepas tipo de *A. bestiarum* y *A. salmonicida* así como en 14 cepas que presentaban el patrón de RFLP del gen 16S rRNA de ambas especies se secuenció un fragmento de 560 pb del gen 16S rRNA que contenía las posiciones variables (1011 y 1018 pb) para *A. bestiarum* y *A. salmonicida* (Martinez-Murcia y cols., 1992a). Los cebadores utilizados para la secuenciación fueron los descritos por Martinez-Murcia y cols. (1999). La reacción de secuenciación se realizó utilizando el kit de secuenciación ThermoSequenase fluorescent labelled primer cycle con 7-deaza-dGTP (Amersham Pharmacia Biotech) y utilizando los cebadores marcados con Cy5'. La reacción fue analizada en el secuenciador automático ALFexpressII (Amersham Pharmacia Biotech) de acuerdo con las recomendaciones del fabricante.

En el Anexo 4 se detallan las cepas empleadas para el estudio Soler y cols. (2003) (4.1.2.1).

3.6.4. Análisis de las secuencias y construcción de los dendogramas

Las secuencias de los estudios 4.1.2.1 y 4.1.2.2 fueron ensambladas con el programa informático AutoAssembler alias vers. 1.40 (Applied Biosystems) y alineadas mediante el programa informático CLUSTAL W que se encuentra en la base de datos EMBL (www.ebi.ac.uk/clustalw) (Thompson y cols., 1994). En el estudio 4.1.2.2 los dendogramas se construyeron a partir de las secuencias alineadas utilizando el programa informático Mega2 (Molecular Evolutionary Genetics Análisis vers. 2.1). El análisis filogenético se realizó con el método de Neighbor-Joining (Saitou y Nei, 1987) utilizando el modelo de Kimura- 2 parameter (Kimura, 1980) y el test de *bootstrap* con 500 repeticiones (Felsenstein, 1985).

3.7. Técnicas de tipado

3.7.1. RFLP del 16S-23S ISR

La extracción del DNA se realizó a partir de las cepas detalladas en los Anexos 4 y 10 siguiendo la metodología especificada en el apartado 3.4. La amplificación del fragmento se realizó por la metodología de *Hot Start PCR* (Burke, 1996). La mezcla de amplificación se realizó en un volumen final de 50 µl que contenía 1 µg de DNA genómico, 1 X tampón (20 mM Tris-HCl pH8.4, 50 mM KCl), 0.3 µM de cebador 16S-14F, 0.3 µM de cebador 23S-1R, 1.8 mM MgCl₂, 0.3 mM dNTP's y 2.5 U *Taq* polimerasa. Las condiciones para cada ciclo de reacción programada fueron: 96°C, 5 min (desnaturalización); seguida de 35 ciclos de 94°C, 1 min (desnaturalización), 56°C, 1 min (hibridación); 72°C, 1.30 min (extensión). Finalmente se efectuó una última polimerización durante 5 min a 72°C.

La secuencia de los cebadores para la amplificación del espaciador intergénico 16S-23S de *Aeromonas* spp. y su posición según la secuencia de *E. coli* es la siguiente:

16S-14F	5' CTT GTA CAC ACC GCC CGT C 3'	1398-1407
23S-1R	5' GGG TTT CCC CAT TCG GAA A 3'	124-110

Una fracción de 5 µl del producto resultante de la amplificación fue analizado por electroforesis en geles de agarosa al 1% (Sambrook y cols., 1989) para verificar su

amplificación. Previamente a la digestión se procedió a la limpieza del producto amplificado 16S-23S ISR empleando el sistema *Concert Rapid PCR* (Gibco BRL).

Se realizaron diferentes tipos de digestiones:

1. Digestión doble con las enzimas *HinfI*-*CfoI* (estudios 4.1.2.1 y 4.3.1). Se digirieron 15 µl del amplificado en una mezcla que contenía 50 mM Tris-HCl (pH 8.0), 10 mM MgCl₂, 10 U de la enzima *HinfI* y 10U de la enzima *CfoI*. La mezcla se incubó durante toda la noche a 37°C.
2. Digestión doble con las enzimas *HinfI*-*TaqI* (estudios 4.1.2.1 y 4.3.1). Se digirieron 15 µl del amplificado en una mezcla que contenía 50 mM Tris-HCl (pH 8.0), 10 mM MgCl₂, 50 mM NaCl y 10 U de la enzima *HinfI*. La mezcla se incubó durante toda la noche a 37°C. A continuación se añadieron 10 U de la enzima *TaqI* y se incubó a 65°C durante 6 h.
3. Digestión con la enzima *AluI* (estudio 4.3.1). Se digirieron 15 µl del amplificado en una mezcla que contenía 50 mM Tris-HCl (pH 8.0), 10 mM MgCl₂, 10 U de la enzima *AluI*. La mezcla se incubó durante toda la noche a 37°C.

Todas las digestiones fueron analizadas por electroforesis en geles de agarosa metaphor (FMC BioProducts) al 4%, en los extremos de cada gel se incluyó el marcador de peso molecular V de 587 a 8 pb (Gibco BRL).

3.7.2. ERIC - PCR

La técnica del ERIC-PCR se realizó a partir de 100 ng de DNA genómico en un volumen final de 50 µl. La reacción de PCR contenía 1X tampón (20 mM Tris-HCl pH 8.4, 50 mM KCl), 1 µM de cebador ERIC-1 (5'ATG TAA GCT CCT GGG GAT TCA C3'), 1 µM de cebador ERIC-2 (5'AAG TAA GTG ACT GGG GGT3') (Vila y cols., 1996), 3 mM MgCl₂, 0.3 mM dNTP's y 2.5 U *Taq* polimerasa. Las condiciones para cada ciclo de reacción programada fueron: 94°C, 1 min (desnaturalización); 52°C, 1 min (hibridación); 65°C, 8 min (extensión); estas condiciones se repitieron en 30 ciclos y al finalizar se efectuó una última polimerización durante 16 min a 65°C.

Los productos de amplificación fueron sometidos a electroforesis en geles de poliacrilamida al 12%, en ambos extremos de cada gel se añadió el marcador de peso molecular AmpliSize™ de 50 a 2000 pb (Bio-Rad Laboratories Inc).

En el Anexo 10 y 11 se detallan las cepas empleadas en los estudios Soler y cols. (2003) (estudio 4.3.1) y estudio 4.4.3.

3.7.3. REP - PCR

La técnica del REP-PCR se llevó a cabo con 100 ng de DNA genómico en un volumen final de 50 µl. La reacción de PCR contenía 1 X tampón (20 mM Tris-HCl pH 8.4, 50 mM KCl), 1 µM de cebador REP-1 (5' III GCG CCG ICA TCA GGC^{3'}), 1 µM de cebador REP-2 (5' ACG TCT TAT CAG GCC TAC^{3'}) (Vila y cols., 1996), 3 mM MgCl₂, 0.3 mM dNTP's y 2.5 U *Taq* polimerasa. Las condiciones para cada ciclo de reacción programada fueron: 94°C, 1 min (desnaturalización); 40°C, 1 min (hibridación); 65°C, 8 min (extensión); estas condiciones se repitieron en 30 ciclos y al finalizar se efectuó una última polimerización durante 16 min a 65°C. Los productos de amplificación fueron sometidos a electroforesis en geles de poliacrilamida al 12%, en ambos extremos de cada gel se añadió el marcador de peso molecular AmpliSizeTM de 50 a 2000 pb (Bio-Rad Laboratories Inc).

En el Anexo 10 se detallan las cepas empleadas para el estudio Soler y cols., (2003) (4.3.1).

3.7.4. Análisis de geles y dendogramas

Todas las las imágenes de los geles obtenidas tras la la restricción del producto de PCR del gen 16S-23S y de los productos de PCR obtenidos utilizando cebadores de ERIC-PCR y REP-PCR, se guardaron como archivos TIFF y se procesaron mediante el paquete informático BioNumerics software, vers. 1.5 (Applied Maths, Kortrijk, Belgica). Los geles se normalizaron con los marcadores de peso molecular antes mencionados. Los niveles de similitud entre los patrones se calcularon utilizando el coeficiente de similitud Dice (S_D) y el análisis de similitud de las matrices se calculó utilizando el método UPGMA.

3.8. Sensibilidad a agentes antimicrobianos

Para el estudio de Vila y cols. (2002) (4.2.1) se ensayaron un total de 43 cepas de *Aeromonas* spp. aisladas de muestras de origen clínico (Anexo 3) utilizando los paneles Dade-MicroScan Combo Urine IS (BD Diagnostic Systems). Los paneles fueron inoculados siguiendo las instrucciones del fabricante e incubados toda la noche

en el sistema Walk-Away. Los antibióticos utilizados en cada panel se detallan en el estudio.

En el estudio 4.2.2. (Vila y cols., 2003) se ensayó la susceptibilidad antibiótica de un total de 18 cepas de *Aeromonas* spp. procedentes de diarrea del viajero (Anexo 12). El análisis se realizó utilizando el método de difusión en disco (BD Diagnostic Systems) (NCCLS 1999). Los antibióticos y concentraciones utilizadas se detallan en el estudio.

En el estudio 4.4.2 (Soler y cols., 2002) se determinó la susceptibilidad antibiótica de un total de 26 cepas de *A. popoffii* (Anexo 10) utilizando los paneles Dade-MicroScan Combo Urine IS (BD Diagnostic Systems). Los paneles fueron inoculados siguiendo las instrucciones del fabricante e incubados toda la noche en el sistema Walk-Away. Los antibióticos utilizados en cada panel se detallan en el estudio.

En el estudio 4.4.4 (Castro-Escarpulli y cols., 2003) se ensayó la susceptibilidad antibiótica de un total de 77 cepas de *Aeromonas* aisladas de pescado congelado destinado al consumo humano (Anexo 6). El análisis se realizó utilizando el método de la difusión en disco (BBL Microbiology Systems) (NCCLS 1999). Los antibióticos y concentraciones utilizados se detallan en el estudio.

3.9. Estudio de factores de virulencia

Las cepas de *Aeromonas* utilizadas en estos estudios se muestran en los Anexos 6, 10, 11 y 13.

3.9.1. Amplificación de los genes de virulencia

En los estudios de Soler y cols. (2002) (estudio 4.4.2) y de Chacón y cols. (2003) (estudio 4.4.1) se detallan las secuencias utilizadas para el diseño de cebadores para la detección de los factores de virulencia (aerolisina/hemolisina, serina proteasa, lipasas, DNasas y GCAT) así como los cebadores seleccionados y las condiciones para cada ciclo de reacción programada. En el estudio 4.4.3 se detallan las secuencias utilizadas y los cebadores seleccionados para el estudio de los factores de virulencia: enterotoxina citotónica (*ast*), enterotoxina citolítica (*alt*), y flagelo lateral (*lafA*). Para cada amplificación se añadió de 200 a 300 ng del DNA genómico, en un volumen final de 50 µl que contenía 20 mM Tris-HCl pH 8.4, 50 mM KCl, 0.1 µM de iniciador-F, 0.1 µM de iniciador-R, 1.8 mM MgCl₂, 0.3 mM dNTP's y 2.5 U de *Taq*

polimerasa. Los productos de amplificación se analizaron en un gel de agarosa al 1%. Éstas mismas condiciones fueron utilizadas para el estudio de Castro-Escarpulli y cols. (2003) (4.4.4).

3.9.2. Dot blot

Esta técnica se utilizó para la detección de los genes de virulencia *ast*, *lafA* y aerolisina/hemolisina en el estudio 4.4.3.

Para la detección de genes mediante la técnica del *dot blot* se colocaron 10 µg de DNA genómico de cada cepa a ensayar (Anexo 11) en una membrana de nylon, así como 1 µl del producto de PCR del gen a analizar (control positivo). A continuación, el DNA unido a la membrana de nylon se desnaturalizó colocando la membrana sobre un papel de filtro impregnado con una solución 0.5 M NaOH durante 5 min a temperatura ambiente, y a continuación se neutralizó traspasando la membrana de nylon a otro papel de filtro impregnado con una solución 0.5 M Tris-Cl (pH 7.6) durante 5 min. A continuación se pasó la membrana de nylon a un papel empapado en 10 X SSC durante 5 min. Finalmente se fijó el DNA a la membrana de nylon de forma permanente, mediante la exposición de la misma a luz ultravioleta durante 3 min. Las membranas de nylon se lavaron con agua destilada y se dejaron secar a temperatura ambiente.

Las sondas fueron marcadas con digoxigenina por PCR. Para ello se utilizaron las mismas condiciones y ciclos de reacción programada detallados en el apartado 3.9.1, pero añadiendo 0.5 nmol of Dig-11-dUTP (Roche Diagnostics, Barcelona, Spain) a la reacción. Para comprobar la eficacia del marcaje, se corrieron 10 µl del producto de PCR marcado y 10 µl del producto amplificado sin marcar, debiéndose observar una pequeña diferencia en el peso molecular de ambos productos.

La prehibridación e hibridación de la membrana de nylon se llevó a cabo con 5 ml de *Dig Easy Hyb* (Boehringer Mannheim) a 50°C. La detección inmunológica se realizó tal y como se detalla en el apartado 3.5.1.

3.9.3. Pruebas fenotípicas para la detección de factores de virulencia

En los estudios Soler y cols. (2002) (4.4.2), Chacón y cols. (2003) (4.4.1) y Castro-Escarpulli y cols. (2003) (4.4.4) la detección de las actividades fenotípicas asociadas a los factores de virulencia se realizó de la siguiente manera:

Actividad β -hemolítica: las cepas a ensayar se sembraron respectivamente en 5% agar sangre de cordero y 5% sangre humana y se incubaron durante 24 h a 20°C y 37°C (Smibert y Krieg. 1981; Gerhardt y cols., 1981). La aparición de un halo transparente alrededor de la colonia indicó actividad β -hemolítica.

Actividad DNasa: las cepas a ensayar se sembraron en agar DNasa (Biolife, Barcelona, Spain) suplementado con 0.01% Azul de Toloudina (Sigma-Aldrich, Ltd., Madrid, España) (Waller y cols., 1985) o 0.005% verde de metilo (Sigma-Aldrich, Ltd.) y se incubaron durante 24 h a 37°C. En ambos casos la aparición de un halo de color rosa indicó actividad DNasa.

Actividad lipolítica: Esta actividad se evaluó utilizando tres métodos en el estudio 4.4.4. En el primero de ellos las cepas se sembraron en en placas de agar que contenían 0.5% tributirina (Panreac, Barcelona, Spain) emulsificada en 0.2% Triton X-100 (Sigma-Aldrich, Ltd) (Anguita y cols., 1993) y se incubaron durante 24 h a 37°C (único método utilizado en los estudios 4.4.1 y 4.4.2). En el segundo método, se añadieron 10 μ l del inóculo bacteriano a pocillos de 4 mm de diámetro cortados en en geles de agarosa 1% en PBS que contenían un 1% de L- α -Lecitina (Sigma-Aldrich, Ltd). La lectura se hizo después de la incubación a 37°C durante 48 h (Lee y Ellis, 1990). En ambos métodos la aparición de un halo transparente indicó actividad lipolítica. El último método ensayado consistió en sembrar 5 μ l de inóculo bacteriano a placas de agar-mantequilla con resarsurina, e incubarlas a 37°C durante 24 h. (Amador y cols., 1993). La aparición de colonias de color rosa indicó actividad lipolítica.

Actividad proteolítica: Para la detección de actividad específica de la serina proteasa las bacterias se hicieron crecer durante toda la noche a 30°C en tubos que contenían TSB (Difco). Transcurrido este tiempo, las bacterias se centrifugaron y se tomaron dos alícuotas de 100 μ l del sobrenadante que se añadieron a dos tubos que contenían 1 ml de azocaseína (Sigma-Aldrich Ltd.) al 0.25% (p/v) disuelta en 0.1 M citrato sódico (pH 6). El inhibidor de la serina proteasa PMSF se añadió sólo a uno de los tubos a una concentración final de 2 mM. Ambos tubos, con y sin inhibidor, se incubaron a 37°C durante 2 h. La actividad proteasa se detuvo precipitando las proteínas mediante la adición de 1.1 ml de ácido tricloroacético al 10% (p/v) en hielo durante 15 min. La proteínas precipitadas se eliminaron por centrifugación y el cambio de color producido por la actividad proteasa sobre la azocaseína se leyó a 366 nm absorvancia (Swift y cols., 1999). Las lecturas fueron consideradas positivas para la

serina proteasa cuando la diferencia de absorbancia entre el tubo control y el inhibido fue >10% (Austin y cols., 1998).

En el estudio Castro-Escarpulli y cols. (2003) (4.4.4) también se evaluaron las actividades caseinasa y gelatinasa. Para la detección de la actividad caseinasa se añadieron 10 µl del sobrenadante del inóculo bacteriano a agar Müller-Hilton que contenía 10% de leche desnatada (Difco), la aparición de un halo transparente indicó actividad caseinasa. Para la detección de la actividad gelatinasa se añadieron 10 µl del inóculo a pocillos de 4 mm de diámetro cortados en geles de agarosa al 1% en PBS que contenían gelatina al 3% y se incubaron a 22°C durante 20 h. Finalizada la incubación las placas se sumergieron en una solución saturada de sulfato de amonio a 70°C para precipitar la gelatina no hidrolizada (Gudmundsdóttir, 1996), la aparición de un halo transparente indicó actividad gelatinasa.

Captación de Rojo Congo: Se utilizaron placas de agar suplementadas con 50 µg/ml de rojo congo. Las cepas se sembraron en las placas y se incubaron durante 24 h a 37°C (Paniagua y cols., 1990). Las colonias de color naranja se consideraron positivas.

Ensayo de adherencia en células HEP-2: Éste ensayo se realizó tal y como describen Cravioto y cols. (1979) y Carrello y cols. (1988).

3.9.4. Ensayos de patogenicidad

Se utilizaron carpas comunes (*Cyprinus carpio* L.) de un peso medio de 150 g. Éstas fueron conservadas, manipuladas y alimentadas tal y como se detalla en el estudio 4.4.5 (Kozieńska y cols., 2002). Los peces fueron infectados por inyección subcutánea con un inóculo de 0.1 ml que contenía 10⁶ células bacterianas diluidas en PBS. Se infectaron 10 peces por cepa, y 10 peces más fueron inyectados con PBS (control). La morbilidad y mortalidad de los peces se monitorizó durante 7 días, considerándose las cepas:

1. *Altamente virulentas:* Más de 6 peces mostraban síntomas de enfermedad y 5-10 peces murieron.
2. *Virulentas:* Más de 6 peces mostraban síntomas de enfermedad y 1-4 peces murieron.
3. *Poco virulentas:* Más de 4 peces mostraban síntomas de enfermedad pero ninguno murió.

4. *No virulentas*: De 1 a 4 peces mostraban síntomas leves de enfermedad pero ninguno murió.

Las cepas utilizadas en el estudio 4.4.5 se detallan en el Anexo 5.

3.9.5. Análisis estadístico

En el estudio Chacón y cols. (2003) (4.4.1) se determinó si existían diferencias significativas ($p < 0.05$) en la presencia y/o ausencia de los factores de virulencia y de su actividad fenotípica asociada en aquellas especies en las que se disponía de cepas ambientales y clínicas. Los tests aplicados fueron el Chi-cuadrado de Pearson y el Estadístico exacto de Fisher del paquete informático *Statistical Package for Social Sciences* (SPSS vers. 9.0 Inc., Chicago, Estados Unidos). En el estudio 4.1.1.2, también se aplicó el Chi-cuadrado de Pearson para establecer si las diferencias de identificación obtenidas entre el BBL Crystal y el MicroScan eran significativas ($p < 0.05$).

3.10. Estudio del Sistema de Secreción Tipo III (TTSS)

3.10.1. Diseño de cebadores para genes conservados del TTSS

Para estudiar la posible presencia del TTSS en *Aeromonas* sp. se seleccionaron genes conservados de éste sistema en otras bacterias patógenas (Hueck, 1998), uno ubicado en una de las regiones extremas del tándem de genes que codifican para dicho sistema en otros microorganismos (*scfV*), dos ubicados en la parte central (*scfR* y *scfT*) y otros dos ubicados en la otra región extrema de dicho tándem de genes (*scfJ-L*). Las secuencias de estos genes depositadas en las bases de datos fueron alineadas mediante el programa CLUSTAL W y se seleccionaron las regiones homólogas para diseñar cebadores específicos para cada gen.

3.10.2. Amplificación por PCR de genes del TTSS en *Aeromonas* y secuenciación de los productos amplificados

El DNA genómico de 12 cepas de diferentes especies (Anexo 14), aisladas de muestras humanas de origen intestinal y extraintestinal, fue extraído siguiendo la metodología descrita en el apartado 3.4. Para cada amplificación se añadieron 3 µg de

DNA genómico en un volumen final de 100 µl que contenía 1 X tampón (20 mM Tris-HCl pH 8.4, 50 mM KCl), 0.1 µM de iniciador-F, 0.1 µM de iniciador-R, 1.8 mM MgCl₂, 0.2 mM dNTP's y 5 U de *Taq* polimerasa. Las condiciones para cada ciclo de reacción programada fueron: 95°C, 5 min (desnaturalización); seguida de 36 ciclos de 94°C, 1 min (desnaturalización), 50°C, 1 min (hibridación); 72°C, 1 min 10 seg (extensión); y una extensión final de 72°C, 7 min.

Todo el volumen de la reacción fue sometido a electroforesis en un gel de agarosa al 0.8%. El producto de la amplificación del tamaño esperado fue recortado del gel de agarosa y purificado con el GFXTM PCR DNA - Gel Band Purification Kit (Amersham Pharmacia Biotech) de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

De 100 a 200 ng de 20 a 30 productos de PCR purificados fueron secuenciados según las condiciones descritas en el apartado 3.6.1. Las secuencias obtenidas fueron ensambladas con el programa informático AutoAssembler alias vers. 1.40 (Applied Biosystems). Posteriormente fueron comparadas con todas las depositadas en la base de datos GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov) utilizando el programa BLAST tanto a nivel de DNA (blastn) como de proteína (tblastx). Aquellos productos de PCR que presentaban homología con genes del TTSS fueron utilizados como sondas en el cribado de las genotecas de *Aeromonas* que se construyeron como se describe a continuación.

3.10.3. Construcción de genoteca en cósmidos

Para seleccionar las cepas más adecuadas para la construcción de las genotecas se realizó un *dot blot* con 12 cepas clínicas de origen extraintestinal, incluyendo representantes de las tres especies más predominantes en clínica (*A. veronii*, *A. caviae* y *A. hydrophila*), utilizando como sonda los genes que presentaban homología con el TTSS. El *dot blot* se realizó tal y como se detalla en el apartado 3.9.2. Se eligió la cepa 283c (*A. veronii* bt sobria) aislada de hemocultivo para la construcción de la genoteca ya que presentó una intensa señal de hibridación con las sondas del TTSS. El DNA total de esta cepa fue parcialmente digerido con la enzima de restricción *Mbol* y se defosforiló. Para la defosforilación se añadió 0.1 U CIAP por cada 1-20 pmol de DNA en una mezcla de 10 mM Tris-HCl (pH 7.5), 10 mM MgCl₂ y se incubó a 37°C durante 30 min. A continuación se inactivó la CIAP ajustando la mezcla a una concentración 15 mM EDTA y se incubó durante 10 min a 68°C y se procedió a la extracción de la enzima con fenol-cloroformo. Finalmente el DNA se

ajustó a una concentración 0.3 M NaOAc (pH 5.5) y se precipitó con etanol, tras lo cual se resuspendió en TE a una concentración final de 1 µg/µl.

El vector utilizado para la construcción de la genoteca fue el *SuperCos 1 Cosmid Vector* de 7.9 Kb (Stratagene, California, USA). Este vector fue elegido por su capacidad de aceptar fragmentos de gran tamaño, compatibles con el tamaño del sistema de secreción tipo III (20-40 Kb). Este vector, se digirió con los enzimas *XbaI* y *BamHI* y se desfosforiló, tal y como se ha detallado anteriormente, para evitar su recircularización.

La ligación de los fragmentos de DNA de *Aeromonas* (cepa 283c) cortados con *MboI* al vector *SuperCos 1* se llevó a cabo en las siguientes condiciones: 2.5 µg de DNA de *Aeromonas* cortados con *MboI*, 1 µg del vector *SuperCos1*, 30 mM Tris-HCl (pH 7.8), 10 mM MgCl₂, 10 mM DTT, 1 mM ATP y 1-2 Weiss U de T4 DNA ligasa (Fermentas; Barcelona, España). La reacción se incubó a 8°C durante 48 h. El DNA de *Aeromonas* unido al cósmido se empaquetó en cápsides aisladas de bacteriófagos *Gigapack III XL-4* (Stratagene), siguiendo las instrucciones del fabricante. Paralelamente se hicieron competentes las células de *E. coli XL1-Blue MR* para su posterior infección con los bacteriófagos, incubándolas en medio LB suplementado con 10 mM MgSO₄ y 0.2% (p/v) de maltosa a 30°C en agitación (200 rpm) durante toda la noche. Las células fueron centrifugadas a 3000 rpm durante 10 min y se resuspendieron con 10 mM MgSO₄ hasta obtener una lectura de densidad óptica de 0.5 a 600 nm para conseguir una concentración de 4 x 10⁸ células competentes por cada 10¹⁰ fagos.

Con los fagos se infectaron la células competentes de *E. coli XL1-Blue MR*. El éxito de la genoteca se evaluó determinando el número de colonias (ufc/ml) de *E. coli XL1 Blue MR* en medio Luria Bertani Agar (LB) (Difco) suplementado con 50 mg/l de ampicilina (Sigma-Aldrich Ltd). Suponiendo que *Aeromonas* tiene un genoma total de 4.5 Mb, el número de colonias de *E. coli* que deberíamos obtener después de infectar con el fago sería de un mínimo 100, ya que éstos cósmidos pueden aceptar entre 30 y 40 Kb.

3.10.4. Cribado de la genoteca

Aproximadamente 2500 ufc de la genoteca resultante se sembraron con un asa de Digrafski en membranas de nylon (Roche Diagnostics) que se colocaron en placas de Petri de 15 cm de diámetro que contenían LB-ampicilina (50µg/ml) y se incubaron

durante 24 h a 37°C. Transcurrido este tiempo se tomó una réplica con una segunda membrana de nylon. Ambas membranas de nylon (original y réplica) fueron incubadas durante 4 h a 37°C en placas de LB-ampicilina (50µg/ml). Posteriormente la membrana de nylon original fue conservada a 4°C y la membrana de nylon réplica fue sometida al siguiente procedimiento: se colocó encima de un papel filtro empapado con 10% SDS durante 5 min, a continuación se desnaturalizó el DNA colocando la membrana de nylon sobre un papel filtro empapado con 0.5M NaOH durante 5 min y se neutralizó sobre papeles filtro empapados con 1M Tris-HCl (pH7.6) durante 5 min y 5 min más en 1M Tris-HCl (pH 7.6) y 1.5M NaCl. Finalizados estos procesos, la membrana de nylon fue sumergida en una solución de 1M Tris-HCl (pH 7.6) y 1.5M NaCl. Finalmente el DNA fue fijado a la membrana de nylon con luz ultravioleta durante 3 min. Las membranas de nylon se lavaron con agua bidestilada, se secaron y se guardaron hasta su utilización.

Los productos de PCR resultantes de la amplificación de los genes *sctV* (700 pb) y *sctJ-L* (1500 pb) con DNA de *Aeromonas* fueron marcados con digoxigenina por PCR tal y como se detalla en el apartado 3.9.2. La pre-hibridación e hibridación con la sonda se realizó a 50°C. La detección inmunológica se realizó tal y como se detalla en el apartado 3.5.1. Los clones que dieron señal positiva en el cribado fueron recuperados de la placa original y sembrados en placas de LB-ampicilina (50µg/ml) que se incubaron 24h a 37°C. Posteriormente estos clones se conservaron individualmente a -80°C en medio LB-ampicilina (50µg/ml) con un 15% de glicerol hasta su posterior análisis.

3.10.5. Extracción de los cósmidos

Para la extracción del DNA de los cósmidos positivos se inoculó una colonia positiva en un tubo de ensayo que contenía 5 ml de LB-ampicilina (50 µg/ml) y se incubó a 37°C en agitación (200 rpm) durante toda la noche. A continuación 50 µl del procedentes del cultivo obtenido se inocularon en 25 ml de LB-ampicilina (50 µg/ml) y volvieron a ser incubados en las mismas condiciones que el cultivo original. Posteriormente el tubo fue cetrifugado durante 15 min a 2500 rpm a 4°C y se desechó el sobrenadante. Las células bacterianas se resuspendieron en 1 ml de solución GTE (50 mM glucosa; 10 mM EDTA, pH 8.0; 25 mM Tris-HCl, pH 8.0) y se incubaron durante 5 min a temperatura ambiente. Seguidamente se añadieron 2 ml de solución de lisis recién preparada (0.2 N NaOH; 1% SDS) y se mezcló invirtiendo el tubo varias

veces. La mezcla se incubó en hielo durante 5 min. El DNA cromosómico y las proteínas fueron precipitadas añadiendo 1.5 ml de una solución 5M acetato potásico y 1.5% ácido acético glacial, quedando a una concentración de 3 M potasio 5 M acetato (pH 4.8) e incubando la mezcla en hielo durante 5 min. Se centrifugó la mezcla durante 5 min a 3000 rpm a 4°C y se recuperó el sobrenadante que se transfirió a otro tubo al que se le añadió una solución fenol-cloroformo (v/v) y se centrifugó 10 min a 3000 rpm a temperatura ambiente, recuperándose la fase acuosa. Finalmente el cósmido fue precipitado añadiendo 0.6 v de isopropanol a 4°C a la fase acuosa e incubando la reacción a temperatura ambiente durante 15 min tras lo cual se centrifugó 10 min a 3000 rpm y se desechó el sobrenadante. El DNA precipitado se lavó dos veces con 2.5 ml de etanol al 70% a 4°C centrifugando durante 15 min a 3000 rpm a temperatura ambiente. Finalmente el DNA se secó a temperatura ambiente y se resuspendió en 100 µl de TE (1M Tris, 0.5 mM EDTA; pH 8.0) con 0.02 mg/ml de RNase A, incubándose durante 30 min a 37°C.

3.10.6. Caracterización de los cósmidos

Para la liberación del inserto de los cósmidos positivos, se procedió a la digestión del cósmido con las enzimas *EcoRI* y *HindIII*. El producto de la digestión fue separado en un gel de agarosa al 1% junto al marcador de peso molecular 1 Kb DNA ladder (Takara, Barcelona) y se transfirió por capilaridad mediante la técnica de *Southern Blot* (Southern, 1992) a membranas de nylon. La hibridación con la sonda (*sctV* y *sctJ-L*) marcada con digoxigeneina se realizó a 50°C y posteriormente se procedió a la detección inmunológica tal y como se ha especificado anteriormente.

Los clones que dieron una señal positiva en el *Southern Blot* se volvieron a digerir con las enzimas mencionadas y se corrieron en un gel al 1% de agarosa. Las bandas que hibridaron con las sondas *sctV* (una banda de 12 Kb) o *sctJ-L* (una banda de 14 Kb) fueron recuperadas con el *QIAquick Gel Extraction Kit* (Qiagen; Crawley, Reino Unido) siguiendo las instrucciones del fabricante para su posterior subclonación y caracterización por secuenciación.

Subclonación en pBR322

Los fragmentos aislados fueron subclonados en el plásmido pBR322. Para ello, 3 µg de pBR322 fueron digeridos con 15 U de *BamHI*, 20 mM Tris-HCl (pH 8.5), 10 mM MgCl₂, 1 mM DTT y 100 mM KCl incubándose a 37°C durante toda la noche.

Posteriormente los extremos fueron rellenados (*blunt-ends*) según el siguiente protocolo: se añadieron 3 µg de pBR322 digerido con *Bam*HI en una mezcla de 0.1 mM dNTPs, 67 mM Tris-HCl (pH 8.8), 6.6 mM MgCl₂, 1 mM DTT, 16.8 mM (NH₄)₂SO₄ y 5 U de T4 DNA polimerasa (Fermentas). La mezcla se incubó 15 min a temperatura ambiente y la reacción se detuvo sometiendo la mezcla a 70°C durante 10 min. A continuación se eliminó la T4 DNA polimerasa mediante una extracción con fenol-cloroformo (Sambrook y cols., 1989) y el DNA fue desfosforilado con CIAP (Fermentas) añadiendo 3 µg de pBR322 linearizado en una mezcla de 10 mM Tris-HCl (pH 7.5), 10 mM MgCl₂ y 1 U CIAP. La reacción se llevó a cabo a 37°C durante 15 min y a continuación se añadió 1 U más de CIAP y se incubó a 55°C durante 45 min. Finalmente la reacción se inactivó a 85°C durante 15 min y se procedió otra vez a la extracción de la enzima con fenol-cloroformo, tras lo cual el pBR322 linearizado fue resuspendido a una concentración final de 60 ng/µl.

En paralelo, las bandas de 12 Kb y 14 Kb ya purificadas (tal como se ha especificado en el apartado anterior) también fueron sometidas al rellenado de sus extremos (*blunt-ends*), tal como ya se ha mencionado.

Los fragmentos de nuestro inserto fueron ligados con el plásmido pBR322 según las proporciones vector:inserto de 1:1, 1:3 y 3:1, y en cada reacción de ligación se añadió la cantidad de vector e inserto, según la proporción molar obtenida por la fórmula que se especifica a continuación, a una mezcla que contenía 30 mM Tris-HCl (pH 7.8), 10 mM MgCl₂, 10 mM DTT, 1 mM ATP y 1-2 *Weiss* U de T4 DNA ligasa, y que se incubó a 4°C durante toda la noche.

$$\frac{\text{ng de vector} \times \text{tamaño del inserto en Kb}}{\text{tamaño del vector en Kb}} \times \text{ratio molar de} \frac{\text{inserto}}{\text{vector}} = \text{ng de inserto}$$

Paralelamente a la ligación las células de *E. coli XL1-Blue MR* fueron incubadas a 37°C en agitación (200 rpm) durante 4 h en medio LB hasta que se obtuvo una lectura de densidad óptica de 0.5 a 600 nm. Para hacer competentes estas células, se centrifugaron a 3000 rpm durante 10 min a 4°C y se resuspendieron en 1/2 vol de 0.1 M CaCl₂ frío, a continuación se incubaron en hielo durante 30 min, y se volvieron a centrifugar. Finalmente se resuspendieron en 1/10 vol de 0.1 M CaCl₂ frío, haciéndose alicuotas de 100 µl que se conservaron a -80°C con un 15% de glicerol para su posterior utilización.

La transformación de las células con el pBR322 se realizó mezclando el producto de la ligación con 100 µl de células competentes, ésta mezcla se incubó 30 min en hielo y posteriormente se sometió a un choque térmico de 42°C durante 90 seg y a continuación se colocó en hielo 5 min, y se añadieron 400 µl de LB. Finalmente la mezcla se incubó durante 1 h a 37°C y se sembró en placas de LB-ampicilina (50 µg/ml) que fueron incubadas a 37°C durante toda la noche. Transcurrido este tiempo los clones obtenidos se resembraron en paralelo en placas de LB-ampicilina (50 µg/ml) y LB-tetraciclina (5 µg/ml) considerándose positivos aquellos clones capaces de crecer sólo en LB-ampicilina (50 µg/ml) después de una incubación a 37°C durante 24 h.

Extracción del DNA del pBR322

Para la extracción del pBR322 de las células se utilizó la metodología de la *mini-prep*, que consistió en hacer crecer una colonia en tubos que contenían 5 ml de LB-ampicilina a 37°C en fuerte agitación durante un máximo de 12 h. A continuación todo el volumen fue centrifugado durante 2 min a 12000 rpm y se retiró el sobrenadante. El precipitado se resuspendió en 200 µl de una solución 50 mM glucosa, 10 mM EDTA (pH 8.0), 25 mM Tris-HCl (pH 8.0). A continuación se añadieron 400 µl de una solución de 0.2 N NaOH, 1% SDS y se mezcló invirtiendo el tubo, tras lo cual se incubó 5 min en hielo. Pasado este tiempo se añadieron 300 µl de una solución de 5M acetato potásico y 1.5% ácido acético glacial, quedando a una concentración de 3 M potasio 5 M acetato (pH 4.8) y se centrifugó a 12000 rpm durante 5 min a 4°C. Se recuperó el sobrenadante y se hizo una extracción fenol-cloroformo tras lo cual el DNA del plásmido se precipitó con etanol. Finalmente el DNA del plásmido se resuspendió en 50 µl de TE (1M Tris, 0.5 mM EDTA; pH 8.0) para su posterior secuenciación.

Secuenciación de los plásmidos

Para la secuenciación del inserto subclonado en el pBR322 se utilizaron los cebadores pBR322BamHI-F (5' CAC TAT CGA CTA CGC GAT CA^{3'}) y pBR322BamHI-R (5' ATG CGT CCG GCG TAG A^{3'}). Aproximadamente 500 ng del DNA del plásmido se desnaturalizaron durante 10 min a 90°C y transcurrido este tiempo se añadieron a una mezcla que contenía 3.2 pmol del cebador (forward o reverse), 4 µl de ABI PRISM® BigDye™ Terminators vers. 2.0 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) y 1 µl de agua bidestilada. Las condiciones para cada ciclo de reacción programada

fueron: 25 ciclos de 96°C, 10 seg (desnaturalización); 55°C, 5 seg (hibridación); 60°C, 4 min (extensión).

3.10.7. Análisis e interpretación de las secuencias

Las secuencias obtenidas fueron comparadas con todas las depositadas en la base de datos GenBank tanto a nivel de DNA (blastn) como de proteína (tblastx). Una vez comprobado que nuestro inserto se correspondía a un gen homólogo a los ya descritos del TTSS de *Aeromonas*, se procedió al diseño de otro cebador capaz de leer a continuación de nuestra secuencia y así sucesivamente (*genomic “walking”*). Las diferentes secuencias fueron ensambladas con el programa informático AutoAssembler alias vers. 1.40 (Applied Biosystems) y las secuencias resultantes se fueron comparando sucesivamente con todas las depositadas en las bases de datos.

3.10.8. Distribución del TTSS en *Aeromonas* spp

Para determinar la distribución por *dot blot* de los genes que codifican para el TTSS (*ascF-G* y *ascV*) y del gen *aexT* que codifica para una toxina que es secretada por éste sistema en cepas de *Aeromonas* spp. de origen clínico se utilizaron las siguientes sondas:

1. Fragmento de 900 pb de los genes *ascF-G*, cuyo conocimiento en *Aeromonas* es fruto de los resultados obtenidos en el presente trabajo. Este fragmento fue amplificado utilizando los siguientes cebadores: *ascFG-For*: 5'ATG AGG TCA TCT GCT CGC GC^{3'}; *ascFG-Rev*: 5' GGA GCA CAA CCA TGG CTG AT^{3'}.
2. Fragmento de 710 pb del gen *ascV*, cuyo conocimiento es fruto de los resultados obtenidos en el presente trabajo, aunque en paralelo ha sido publicado por Burr y cols. (2002). Este fragmento fue amplificado utilizando los siguientes cebadores: *ascV-For*: 5'ATG GAC GGC GCC ATG AAG TT^{3'} y *ascV-Rev*: 5'TAT TCG CCT TCA CCC ATC CC^{3'}.
3. Fragmento de 552 pb del gen *aexT*, gen que codifica para la toxina AexT que es secretada vía TTSS (Braun y cols., 2002). Este fragmento fue amplificado utilizando los siguientes cebadores: *aexT-For*: 5'GGC GCT TGG GCT CTA CAC^{3'} y *aexT-Rev*: 5'GAG CCC GCG CAT CTT CAG^{3'}.

Los *dot blot* se realizaron en 84 cepas de las tres especies más predominantes en clínica (*A. veronii*, *A. caviae* y *A. hydrophila*), y la metodología del *dot blot* empleada fue la que se detalla en el apartado 3.9.2. En el anexo 14 se detallan las cepas empleadas para este estudio (4.5.1).

3.11. Anexos

Anexo 1. Listado de cepas tipo y de referencia

Especie	GH	Cepa utilizada	Referencia en otras colecciones	Origen	Identificación por 16S rDNA-RFLP
<i>A. hydrophila</i>	1	CECT 839 ^T	ATCC 7966 ^T , NCIMB 9240 ^T , DSMZ 30187 ^T , Popoff 543	Leche	<i>A. hydrophila</i>
<i>A. bestiarum</i>	2	CECT 4227 ^T	CIP 74.30 ^T , ATCC 51108 ^T , NCIMB 1134 ^T	Pez enfermo (<i>Salmo gairdneri</i>)	<i>A. bestiarum</i>
<i>A. bestiarum</i>		LMG 13662	A295	Heces humanas	<i>A. bestiarum</i> / <i>A. salmonicida</i>
<i>A. bestiarum</i>		LMG 13448	A169	Heces humanas	<i>A. salmonicida</i>
<i>A. hydrophila</i>	3	LMG 13451	CECT 5173, Popoff 316	Agua dulce	<i>A. salmonicida</i>
<i>A. salmonicida</i> subsp. <i>salmonicida</i>		CECT 894 ^T	ATCC 33658 ^T , NCIMB 1102 ^T	Pez (<i>Atlantic salmon</i>)	<i>A. salmonicida</i>
<i>A. salmonicida</i> subsp. <i>salmonicida</i>		CECT 4235	ATCC 14174, NCIMB 833, Véron 29	Pez enfermo (<i>Salvelinus fontinalis</i>)	<i>A. salmonicida</i>
<i>A. salmonicida</i> subsp. <i>salmonicida</i>		CECT 4236	JCM 8200, NCIMB 1104, cepa 2994/59	Pez	<i>A. salmonicida</i>
<i>A. salmonicida</i> subsp. <i>salmonicida</i>		CECT 4237	JCM 8199, NCIMB 1103, Smith 2	Pez (<i>Salmo trutta</i>)	<i>A. salmonicida</i>
<i>A. salmonicida</i> subsp. <i>achromogenes</i>		CECT 895	ATCC 33659, NCIMB 1110	Pez (<i>Salmo trutta</i>)	<i>A. bestiarum</i>
<i>A. salmonicida</i> subsp. <i>achromogenes</i>		CECT 4238	ATCC 19261, ATCC 23310, NCIMB 1109	Pez enfermo (<i>Salmo trutta</i>)	<i>A. bestiarum</i>
<i>A. salmonicida</i> subsp. <i>achromogenes</i>		CECT 4239	NCIMB 2112; cepa A654/76	Pez (<i>Phoxinus phoxinus</i>)	<i>A. bestiarum</i>
<i>A. salmonicida</i> subsp. <i>masoucida</i>		CECT 896	ATCC 27103, NCIMB 2020	Pez enfermo (<i>Oncorhynchus masou</i>)	<i>A. bestiarum</i>
<i>A. salmonicida</i> subsp. <i>smitia</i>		NCIMB 13210	CECT 5179, ATCC 49393	Úlcera (<i>Rutilus rutilus</i>)	<i>A. bestiarum</i>
<i>A. salmonicida</i> subsp. <i>pectinoytica</i>		34 MEL ^T	DMS 12609 ^T	Agua de Río	<i>A. bestiarum</i> / <i>A. salmonicida</i>
<i>A. salmonicida</i> subsp. <i>pectinoytica</i>		85 MEL		Agua de Río	<i>A. bestiarum</i> / <i>A. salmonicida</i>
<i>A. salmonicida</i> subsp. <i>pectinoytica</i>		93 MEL		Agua de Río	<i>A. bestiarum</i> / <i>A. salmonicida</i>
<i>A. caviae</i>	4	CECT 838 ^T	ATCC 15468 ^T , DSMZ 30190 ^T , Popoff 545	Cobaya	<i>A. caviae</i>
<i>A. caviae</i>		CECT 4221	ATCC 15467, LMG 3755, Popoff 544	Emulsión de aceite	<i>A. caviae</i>
<i>A. media</i>	5	CECT 4232 ^T	ATCC 33907 ^T , NCIMB 2237 ^T	Agua piscifactoria	<i>A. media</i>
<i>A. media</i>		CECT 4234	ATCC 35950	Agua piscifactoria	<i>A. media</i>
<i>A. eucrenophila</i>	6	CECT 4224 ^T	ATCC 23309 ^T , NCIMB 74 ^T , Popoff 546	Ascitis en un pez	<i>A. eucrenophila</i>
<i>A. eucrenophila</i>		CECT 4827	CCUG 30341, LMG 13057, Popoff 546	Ascitis en un pez	<i>A. eucrenophila</i>
<i>A. eucrenophila</i>		CECT 4825	CCUG 30347, LMG 13691, CEPA 23/II	Agua de pozo	<i>A. encheleia</i>
<i>A. eucrenophila</i>		CECT 4826	CCUG 30345, LMG 13061, cepa BPE113	Agua de infiltración	<i>A. eucrenophila</i>

Anexo 1. Continuación

Especie	GH	Cepa utilizada	Referencia en otras colecciones	Origen	Identificación por 16S rDNA-RFLP
<i>A. eucrenophila</i>		CECT 4853	CCUG 30342, NCIMB 73, LMG 13058	Ascitis en un pez (<i>Cyprinus carpio</i>)	<i>A. eucrenophila</i>
<i>A. eucrenophila</i>		CECT 4854	CCUG 30343, LMG 13687, cepa K 2232/1	Agua de pozo	<i>A. eucrenophila</i>
<i>A. eucrenophila</i>		CECT 4855	CCUG 30344, LMG 13060, cepa 37/20b	Agua de pozo	<i>A. eucrenophila</i>
<i>A. sobria</i>	7	CECT 4245 ^T	ATCC 43979 ^T , NCIMB 12065 ^T , Popoff 208	Pez (<i>Cyprinus carpio</i>)	<i>A. sobria</i>
<i>A. sobria</i>		CECT 4248	Popoff 204	Pez	<i>A. sobria</i>
<i>A. sobria</i>		CECT 4249	JCM 2138, Popoff207	Pez	<i>A. sobria</i>
<i>A. sobria</i>		CECT 4251	CCM 2142, Popoff 215	Pez	<i>A. sobria</i>
<i>A. veronii</i> bt sobria	8	CECT 4246	ATCC 9071, NCIMB 37, Popoff 311	Rana infectada	<i>A. veronii</i>
<i>A. veronii</i> bt sobria		CECT 4250	JCM 2140, Popoff 209	Pez	<i>A. veronii</i>
<i>A. veronii</i> bt sobria		LMG 13074	CDC 337, CCUG 30363	Heces humanas	<i>A. sobria</i>
<i>A. veronii</i> bt sobria		LMG 13068	CCUG 30357	Heces humanas	<i>A. veronii</i>
<i>A. veronii</i> bt sobria		LMG 13694		Desconocido	<i>A. veronii</i>
<i>A. veronii</i> bt sobria		LMG 13695		Heces humanas	<i>A. sobria</i>
<i>A. veronii</i> bt sobria		LMG 13071	CCUG 30360	Heces humanas	<i>A. sobria</i>
<i>A. veronii</i> bt sobria		LMG 13073	CCUG 30362	Heces humanas	<i>A. sobria</i>
<i>A. jandaei</i>	9	CECT 4228 ^T	ATCC 49568 ^T , LMG 12221 ^T	Heces humanas	<i>A. jandaei</i>
<i>A. jandaei</i>		CECT 4229	ATCC 49570, LMG 13077, cepa WRII/4658	Herida humana	<i>A. jandaei</i>
<i>A. jandaei</i>		CECT 4231	ATCC 49572, LMG 13078, cepa AS-167	Gamba	<i>A. jandaei</i>
<i>A. jandaei</i>		CECT 4335	Esteve TW-9	Agua piscifactoria	<i>A. veronii</i>
<i>A. jandaei</i>		CECT 4339	Esteve SO-337	Higado de un pez sano	<i>A. veronii</i>
<i>A. veronii</i> bt veronii	10	CECT 4257 ^T	ATCC 35624 ^T , NCIMB 13015 ^T , LMG 9075 ^T	Espujo humano	<i>A. veronii</i>
<i>A. veronii</i> bt veronii		LMG 16334	ATCC 35625, CDC 1170-83	Herida humana	<i>A. veronii</i>
<i>A. veronii</i> bt veronii		CECT 4338	Esteve E-30	Anguila enferma (<i>European eel</i>)	<i>A. veronii</i>
<i>A. ichtiosmia</i>		CECT 4486 ^T	ATCC 49804 ^T , DSMZ 6393 ^T , LMG 12645 ^T	Agua superficial	<i>A. veronii</i>
<i>Aeromonas</i> sp	11	CECT 4253	ATCC 35941, CDC 1306-83, LMG 13075	Herida humana	<i>Aeromonas</i> sp HG11
<i>A. schubertii</i>	12	CECT 4240 ^T	ATCC 43700 ^T , CDC 2446-81 ^T , LMG 9074 ^T	Abceso cutáneo	<i>A. veronii</i>
<i>A. schubertii</i>		CECT 4243	ATCC 43945, CDC 2508-86	Herida humana	<i>A. veronii</i>
<i>A. schubertii</i>		CECT 4244	ATCC 43947, CDC 0463-83	Líquido pleural humano	<i>A. veronii</i>
<i>Aeromonas</i> sp (Enteric group 501)	13	CECT 5178	CDC 2555-87, ATCC700064	Herida humana	<i>Aeromonas</i> sp (Enteric group 501)
<i>Aeromonas</i> sp (Enteric group 501)		CECT 4254	ATCC 43946, CDC 2478-85	Herida humana	<i>Aeromonas</i> sp (Enteric group 501)
<i>A. trota</i>	14	CECT 4255 ^T	ATCC 49657 ^T , LMG 12223 ^T , cepa AH2	Heces humanas	<i>A. trota</i>
<i>A. enteropelogenes</i>		CECT 4487 ^T	ATCC 49803 ^T , LMG 12646 ^T , DSMZ 6394 ^T	Heces humanas	<i>A. trota</i>
<i>A. allosaccharophila</i>	15	CECT 4199 ^T	ATCC 51208 ^T , LMG 14059 ^T , Esteve 289 ^T	Anguila enferma (<i>Anguilla anguilla</i>)	<i>A. allosaccharophila</i>
<i>A. allosaccharophila</i>		CECT 4200	LMG 14058, Esteve 290	Anguila enferma (<i>Anguilla anguilla</i>)	<i>A. allosaccharophila</i>
<i>A. allosaccharophila</i>		CECT 4220	ATCC 35942, LMG 14021, CDC 0715-84	Heces humanas	<i>A. allosaccharophila</i>

Anexo 1. Continuación

Especie	GH	Cepa utilizada	Referencia en otras colecciones	Origen	Identificación por 16S rDNA-RFLP
<i>A. encheleia</i>	16	CECT 4342 ^T	ATCC 51929 ^T , LMG 16330 ^T	Anguila sana (<i>Anguilla anguilla</i>)	<i>A. encheleia</i>
<i>A. encheleia</i>		CECT 4340	ATCC 51931, Esteve S177	Anguila sana (<i>Anguilla anguilla</i>)	<i>A. encheleia</i>
<i>A. encheleia</i>		CECT 4341	ATCC 51930, Esteve S176	Anguila sana (<i>Anguilla anguilla</i>)	<i>A. encheleia</i>
<i>A. encheleia</i>		CECT 4343	LMG 16331, Esteve S191	Anguila sana (<i>Anguilla anguilla</i>)	<i>A. encheleia</i>
<i>A. encheleia</i>		CECT 5025	LMG 16403	Agua de pozo	<i>A. encheleia</i>
<i>A. encheleia</i>		CECT 5026	LMG 16405	Agua de pozo	<i>A. sobria</i>
<i>A. encheleia</i>		CECT 5027	LMG 16406	Agua de pozo	<i>A. sobria</i>
<i>A. encheleia</i>		CECT 5028	LMG 17060	Agua de planta potabilizadora	<i>A. encheleia</i>
<i>A. encheleia</i>		CECT 5029	LMG 17064	Agua de embalse	<i>A. sobria</i>
<i>A. popoffii</i>	17	LMG 17541 ^T	CECT 4995 ^T , ATCC BAA-243 ^T , CCM 4708 ^T , CIP 105493 ^T , NCIMB 13618 ^T	Agua de planta potabilizadora	<i>A. popoffii</i>
<i>A. popoffii</i>		LMG 17542		Agua de planta potabilizadora	<i>A. popoffii</i>
<i>A. popoffii</i>		LMG 17543		Agua de planta potabilizadora	<i>A. popoffii</i>
<i>A. popoffii</i>		LMG 17544		Agua de planta potabilizadora	<i>A. popoffii</i>
<i>A. popoffii</i>		LMG 17545		Agua de planta potabilizadora	<i>A. popoffii</i>
<i>A. popoffii</i>		LMG 17546		Agua de planta potabilizadora	<i>A. popoffii</i>
<i>A. popoffii</i>		LMG 17547		Agua de planta potabilizadora	<i>A. popoffii</i>

Anexo 2. Cepas de otros géneros bacterianos

Especie	Cepa utilizada	Referencia en otras colecciones	Origen
<i>Salmonella typhimurium</i>	CECT 443	ATCC 13311, CCUG 11732, CIP 58.58, DSMZ 5569, JCM 1652, LMG 10396	Brote alimentario
<i>Serratia marcescens</i>	CECT 846	ATCC 13880, CCUG 1647, CDC 318-60, CIP 103235, DSMZ 30121, JCM 1239, LMG 2792, NCIMB 9155	Agua de estanque
<i>Citrobacter freundii</i>	CECT 401 ^T	ATCC 8090 ^T , CCUG 418 ^T , CIP 57.32 ^T , DSMZ 30039 ^T , LMG 3246 ^T , NCIMB 11490 ^T	Desconocido
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	CECT 143 ^T	ATCC 13883 ^T , CCUG 225 ^T , CDC 298-53 ^T , CIP 82.91 ^T , DSMZ 30104 ^T , JCM 1662 ^T , LMG 2095 ^T , NCIMB 13281 ^T	Desconocido
<i>Shigella sonnei</i>	CECT 4631	ATCC 25931, CCUG 32351, CDC 1120-66, CIP 104223, LMG 10473	Heces humanas
<i>S. sonnei</i>	CECT 413		Heces humanas
<i>S. sonnei</i>	CECT 457	ATCC 11060	Heces humanas
<i>S. flexneri</i>	CECT 585	CCUG 9566	Disenteria
<i>Escherichia coli</i> O:157 H7	CECT 4076	CCUG 20570	Colitis hemorrágica humana
<i>E. coli</i> O:25 H42	CECT 685		Desconocido
<i>E. coli</i> O:128 K67	CECT 742	CCUG 11427	Desconocido
<i>E. coli</i> O:158 K:H34	CECT 744		Heces humanas
<i>Yersinia enterocolitica</i>	CECT 754	CIP 81.42, DSMZ 9499	Heces humanas
<i>Y. enterocolitica</i>	CECT 4315 ^T	ATCC 9610 ^T , CIP 80.27 ^T , DSMZ 4780 ^T , JCM 7577 ^T	Herida en la cara
<i>Enterobacter aerogenes</i>	CECT 684 ^T	ATCC 13048 ^T , CCUG 1429 ^T , CDC 819-56 ^T , CIP 60.86 ^T , DSMZ 30053 ^T , JCM 1235 ^T , LMG 2968 ^T , NCIMB 10102 ^T	Espuito
<i>Edwardsiella tarda</i>	CECT 886	ATCC 15977, NCIMB 2034	Pez
<i>Vibrio cholerae</i> NO:O1	CECT 557		Agua de río
<i>V. cholerae</i> NO:O1	CECT 653		Agua de Bangladesh
<i>V. parahaemolyticus</i>	CECT 511 ^T	ATCC 17802 ^T , CCUG 15657 ^T , CDC 9062-79 ^T , CIP 75.2 ^T , DSMZ 10027 ^T , LMG 2850 ^T , NCIMB 1902 ^T	Brote alimentario
<i>V. parahaemolyticus</i>	CECT 588	CCUG 4991	Mejillones
<i>V. parahaemolyticus</i>	CECT 611		Agua de mar
<i>V. parahaemolyticus</i>	CECT 612	CCUG 38426	Agua de mar
<i>V. parahaemolyticus</i>	CECT 613		Pláncton marino
<i>V. vulnificus</i>	CECT 529 ^T	ATCC 27562 ^T , CCUG 16394 ^T , CDC 9107-79 ^T , CIP 75.4 ^T , DSMZ 10143 ^T , JCM 3725 ^T , LMG 7898 ^T , NCIMB 2046 ^T	Sangre humana
<i>V. vulnificus</i>	CECT 4602		Anguila enferma (<i>Anguilla anguilla</i>)
<i>V. vulnificus</i>	CECT 4606	CCUG 38431	Anguila sana (<i>Anguilla anguilla</i>)
<i>V. vulnificus</i>	CECT 4608		Agua de piscifactoría
<i>V. vulnificus</i>	CECT 897	ATCC 33147, ATCC 33147, CCRC 13846, CCUG 38429, CIP 103196, NCIMB 2136	Anguila enferma (<i>Anguilla anguilla</i>)
<i>V. fluvialis</i>	ATCC 33810 ^T		Heces humanas
<i>V. fluvialis</i>	ATCC 33812		Heces humanas
<i>V. fluvialis</i>	ATCC 33811		Desconocido
<i>V. furnissii</i>	CECT 4203 ^T	ATCC 35016 ^T , CDC B3215 ^T , CIP 102972 ^T , LMG 7910 ^T	Heces humanas
<i>V. furnissii</i>	ATCC 33841		Heces de cerdo
<i>V. furnissii</i>	ATCC 33813		Agua de río
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	CECT 118	ATCC 25668, CCUG 1423, CIP 103837, DSMZ 46358, NCIMB 13063	Exudado humano

Anexo 2. Continuación			
Especie	Cepa utilizada	Referencia en otras colecciones	Origen
<i>P. aeruginosa</i>	CECT 4122	ATCC 15692, CIP 104116, NCIMB 10548	Herida humana
<i>P. aeruginosa</i>	CECT 110	ATCC 10145, CCUG 551; CIP 100720, DSMZ 50071, JCM 5962, LMG 1242, NCIMB 8295	Exudado humano
<i>Plesiomonas shigelloides</i>	CECT 4262 ^T	ATCC 14029 ^T , CCUG 410 ^T , CDC 3085-55 ^T , CIP 63.5 ^T , DSMZ 8224 ^T , LMG 4242 ^T , NCIMB 9242 ^T	Heces de perro
<i>Pl. shigelloides</i>	CECT 4352		Anguila sana (<i>Anguilla anguilla</i>)
<i>Pl. shigelloides</i>	CECT 597		Heces humanas
<i>Clostridium perfringens</i>	CECT 376 ^T	ATCC 13124 ^T , CCM 5744 ^T , CCRC 10913 ^T , CCUG 1795 ^T , CIP 103409 ^T , DSMZ 756 ^T , JCM 1290 ^T , LMG 11264 ^T , NCIMB 6125 ^T	Bovino
<i>C. perfringens</i>	CECT 563	ATCC 14809	Rissoles
<i>C. perfringens</i>	CECT 486	ATCC 12917, CCUG 18370	Ternera hervida
<i>C. septicum</i>	CECT 965 ^T	ATCC 12464 ^T , CCUG 4855 ^T , CIP 61.10 ^T , DSMZ 7534 ^T , JCM 8144 ^T , NCIMB 547 ^T	Desconocido
<i>Streptococcus pyogenes</i>	CECT 985 ^T	ATCC 12344 ^T , CCUG 4207 ^T , CCUG 12701 ^T , CIP 56.4 ^T , DSMZ 20565 ^T , JCM 5674 ^T , NCIMB 11841 ^T	Piel de un paciente con escarlatina
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 12600		Líquido pleural
<i>Listeria monocytogenes</i>	CECT 935	ATCC 13932, CIP 59.53	Líquido espinal

Anexo 3. Cepas clínicas de *Aeromonas* spp utilizadas en el ensayo del método de BBL^R *Crystal*, MicroScan y ensayo de antibióticos (Estudios 4.1.1.2 y 4.2.1)

Cepa	Origen	Hospital de origen (ciudad)	Identificación por 16S rDNA-RFLP
63C*	heces	Valle Hebrón (Barcelona)	<i>A. hydrophila</i>
103C*	heces	Valle Hebrón (Barcelona)	<i>A. hydrophila</i>
127C*	heces	Valle Hebrón (Barcelona)	<i>A. hydrophila</i>
184C*	heces	Valle Hebrón (Barcelona)	<i>A. hydrophila</i>
191C*	líquido articular	Sant Pau (Barcelona)	<i>A. hydrophila</i>
194C*	líquido articular	Sant Pau (Barcelona)	<i>A. hydrophila</i>
217C*	heces	La Concha (Madrid)	<i>A. hydrophila</i>
218C*	heces	La Concha (Madrid)	<i>A. hydrophila</i>
221C*	exudado herida	La Concha (Madrid)	<i>A. hydrophila</i>
250C*	heces	Sant Joan (Reus)	<i>A. hydrophila</i>
220C	exudado herida	La Concha (Madrid)	<i>A. salmonicida</i>
19C*	sangre	Son Dureta (Palma de Mallorca)	<i>A. caviae</i>
22C*	sangre	Son Dureta (Palma de Mallorca)	<i>A. caviae</i>
25C*	abceso	Son Dureta (Palma de Mallorca)	<i>A. caviae</i>
102C*	heces	Valle Hebrón (Barcelona)	<i>A. caviae</i>
104C*	heces	Valle Hebrón (Barcelona)	<i>A. caviae</i>
131C*	heces	Valle Hebrón (Barcelona)	<i>A. caviae</i>
132C*	heces	Valle Hebrón (Barcelona)	<i>A. caviae</i>
140C*	heces	Valle Hebrón (Barcelona)	<i>A. caviae</i>
145C*	heces	Valle Hebrón (Barcelona)	<i>A. caviae</i>
148C*	heces	Valle Hebrón (Barcelona)	<i>A. caviae</i>
160C*	heces	Valle Hebrón (Barcelona)	<i>A. caviae</i>
162C*	heces	Valle Hebrón (Barcelona)	<i>A. caviae</i>
219C*	celulitis	La Concha (Madrid)	<i>A. caviae</i>
224C*	sangre	La Concha (Madrid)	<i>A. caviae</i>
262C*	heces	Valle Hebrón (Barcelona)	<i>A. caviae</i>
270C*	heces	Valle Hebrón (Barcelona)	<i>A. caviae</i>
274C*	heces	Valle Hebrón (Barcelona)	<i>A. caviae</i>
277C*	heces	Valle Hebrón (Barcelona)	<i>A. caviae</i>
286C*	heces	Valle Hebrón (Barcelona)	<i>A. caviae</i>
89C	heces	Valle Hebrón (Barcelona)	<i>A. media</i>
98C	heces	Valle Hebrón (Barcelona)	<i>A. media</i>
211C	heces	Clínic (Barcelona)	<i>A. media</i>
258C	heces	Valle Hebrón (Barcelona)	<i>A. media</i>
20C*	ulcera	Son Dureta (Palma de Mallorca)	<i>A. veronii</i>
112C*	heces	Valle Hebrón (Barcelona)	<i>A. veronii</i>
114C*	heces	Valle Hebrón (Barcelona)	<i>A. veronii</i>
115C*	heces	Valle Hebrón (Barcelona)	<i>A. veronii</i>
125C*	heces	Valle Hebrón (Barcelona)	<i>A. veronii</i>
146C*	heces	Valle Hebrón (Barcelona)	<i>A. veronii</i>
171C*	heces	Valle Hebrón (Barcelona)	<i>A. veronii</i>
176C*	heces	Valle Hebrón (Barcelona)	<i>A. veronii</i>
264C*	heces	Valle Hebrón (Barcelona)	<i>A. veronii</i>
271C*	heces	Valle Hebrón (Barcelona)	<i>A. veronii</i>
278C*	heces	Sant Joan (Reus)	<i>A. veronii</i>
281C*	heces	Sant Joan (Reus)	<i>A. veronii</i>
283C*	heces	Sant Joan (Reus)	<i>A. veronii</i>
285C*	sangre	Sant Joan (Reus)	<i>A. veronii</i>
141C	heces	Valle Hebrón (Barcelona)	<i>A. jandaei</i>
225C	sangre	La Concha (Madrid)	<i>A. jandaei</i>

*cepas utilizadas en el estudio de antibióticos (4.2.1)

Anexo 4. Cepas pertenecientes al complejo fenotípico “*A. hydrophila*” (estudio 4.1.2.1).

Cepa	Origen	País	Identificación por 16S rDNA-RFLP
413*	Agua de la desembocadura de La Muga	España	<i>A. hydrophila</i>
614*	Agua del río Ter	España	<i>A. hydrophila</i>
112p	Agua potable. Cisterna 499	España	<i>A. hydrophila</i>
139p*	Agua potable. Pozo 719	España	<i>A. hydrophila</i>
142p	Agua de la red de distribución 812	España	<i>A. hydrophila</i>
145f	Mejillón 1633	España	<i>A. hydrophila</i>
146f	Mejillón 1633	España	<i>A. hydrophila</i>
63c	Heces	España	<i>A. hydrophila</i>
103c	Heces	España	<i>A. hydrophila</i>
127c*	Heces	España	<i>A. hydrophila</i>
184c	Heces	España	<i>A. hydrophila</i>
191c*	Líquido articular	España	<i>A. hydrophila</i>
194c*	Líquido articular	España	<i>A. hydrophila</i>
250c*	Heces	España	<i>A. hydrophila</i>
251c*	Heces	España	<i>A. hydrophila</i>
292c*	Heces	España	<i>A. hydrophila</i>
293c*	Heces	España	<i>A. hydrophila</i>
303c*	Heces	España	<i>A. hydrophila</i>
81f*	Mejillón	España	<i>A. bestiarum</i>
108f	Mejillón 1298	España	<i>A. bestiarum</i>
A936 ^{b*}	Desconocido	Suiza	<i>A. bestiarum</i>
A937 ^{b*}	Desconocido	Suiza	<i>A. bestiarum</i>
F530B ^{a*}	Alrededor del hogar	Suiza	<i>A. bestiarum</i>
F713L ^{a*}	Alrededor del hogar	Suiza	<i>A. bestiarum</i>
P1W-98 ^{c*}	Ulcera en un pez	Polonia	<i>A. bestiarum</i>
21*	Agua del Torrente de Merles	España	<i>A. salmonicida</i>
27*	Agua de la playa de Gavà	España	<i>A. salmonicida</i>
68*	Agua del lago de Bañolas	España	<i>A. salmonicida</i>
105*	Agua de la playa de Torredembarra	España	<i>A. salmonicida</i>
130*	Agua de la playa de La Platjola	España	<i>A. salmonicida</i>
122*	Agua del Canal Olímpico	España	<i>A. salmonicida</i>
156*	Agua del embalse de Sant Antoni	España	<i>A. salmonicida</i>
161*	Agua del embalse de Camarasa	España	<i>A. salmonicida</i>
440*	Agua del lago de Bañolas	España	<i>A. salmonicida</i>
552*	Agua del río Llobregat	España	<i>A. salmonicida</i>
93f	Pastel 1066	España	<i>A. salmonicida</i>
102f*	Pastel 1066	España	<i>A. salmonicida</i>
106f*	Pastel 1289	España	<i>A. salmonicida</i>
115f	Mejillón 1299	España	<i>A. salmonicida</i>
150p	Agua de la mina 1602	España	<i>A. salmonicida</i>
LMG 17548	Agua de planta potabilizadora	España	<i>A. salmonicida</i>
896T	Agua de cisterna, Tomadero.	España	<i>A. salmonicida</i>
220c*	Exudado de herida	España	<i>A. salmonicida</i>
22**	Agua del torrente de Merles	España	<i>A. bestiarum</i> / <i>A. salmonicida</i>
26*	Agua de la playa de Gavà	España	<i>A. bestiarum</i> / <i>A. salmonicida</i>
37**	Agua de la playa de Grau de Cadaqués	España	<i>A. bestiarum</i> / <i>A. salmonicida</i>
40*	Agua del río Noguera Pallaresa	España	<i>A. bestiarum</i> / <i>A. salmonicida</i>
41*	Agua del río Noguera Pallaresa	España	<i>A. bestiarum</i> / <i>A. salmonicida</i>
48*	Agua del embalse de Camarasa	España	<i>A. bestiarum</i> / <i>A. salmonicida</i>
58*	Agua del embalse de Sant Antoni	España	<i>A. bestiarum</i> / <i>A. salmonicida</i>
465*	Agua de la playa del Masnou	España	<i>A. bestiarum</i> / <i>A. salmonicida</i>
113p*	Agua potable. Cisterna 499	España	<i>A. bestiarum</i> / <i>A. salmonicida</i>
116p**	Agua potable. Pozo 501	España	<i>A. bestiarum</i> / <i>A. salmonicida</i>
117p**	Agua potable. Pozo 501	España	<i>A. bestiarum</i> / <i>A. salmonicida</i>
118p**	Agua potable. Pozo 501	España	<i>A. bestiarum</i> / <i>A. salmonicida</i>
119p*	Agua potable. Pozo 542	España	<i>A. bestiarum</i> / <i>A. salmonicida</i>
120p*	Agua potable. Pozo 542	España	<i>A. bestiarum</i> / <i>A. salmonicida</i>
123p	Agua potable. Fuente 648	España	<i>A. bestiarum</i> / <i>A. salmonicida</i>
140p	Agua de la red de distribución 812	España	<i>A. bestiarum</i> / <i>A. salmonicida</i>
101f*	Pastel 1066	España	<i>A. bestiarum</i> / <i>A. salmonicida</i>
107f*	Mejillón 1298	España	<i>A. bestiarum</i> / <i>A. salmonicida</i>
117f**	Mejillón 1299	España	<i>A. bestiarum</i> / <i>A. salmonicida</i>

Anexo 4. Continuación

Cepa	Origen	País	Identificación por 16S rDNA-RFLP
130f*	Mejillón 1399	España	<i>A. bestiarum</i> / <i>A. salmonicida</i>
1419T	Huevos	España	<i>A. bestiarum</i> / <i>A. salmonicida</i>
852T*	Ensalada	España	<i>A. bestiarum</i> / <i>A. salmonicida</i>
J4N-98**	Riñón de pez enfermo	Polonia	<i>A. bestiarum</i> / <i>A. salmonicida</i>
A7*	Ambiente	Alemania	<i>A. bestiarum</i> / <i>A. salmonicida</i>
361c*	Abceso	España	<i>A. bestiarum</i> / <i>A. salmonicida</i>
A99*	Heces	Suiza	<i>A. bestiarum</i> / <i>A. salmonicida</i>
32	Agua de la playa de La Gola. St. Pere Pescador	España	<i>A. popoffii</i>
137	Agua de embalse	España	<i>A. popoffii</i>
159*	Agua del río Segre	España	<i>A. popoffii</i>
203	Agua de la playa del Masnou	España	<i>A. popoffii</i>
210	Agua de la desembocadura del Llobregat	España	<i>A. popoffii</i>
254*	Agua del río Noguera Pallaresa	España	<i>A. popoffii</i>
274*	Agua del río Noguera Pallaresa	España	<i>A. popoffii</i>
366*	Agua del torrente de Merles	España	<i>A. popoffii</i>
370*	Agua del embalse de Baells	España	<i>A. popoffii</i>
594*	Agua del torrente de Merles	España	<i>A. popoffii</i>
638*	Agua del río Fluvià	España	<i>A. popoffii</i>
LMG 17542*	Agua de planta potabilizadora, DeBlankaart	Bélgica	<i>A. popoffii</i>
LMG 17543*	Agua de planta potabilizadora (Snellegem)	Bélgica	<i>A. popoffii</i>
LMG 17544	Agua de planta potabilizadora (Eeklo)	Bélgica	<i>A. popoffii</i>
LMG 17545*	Agua de planta potabilizadora (Snellegem)	Bélgica	<i>A. popoffii</i>
LMG 17546*	Agua de planta de agua potable (Undy Station)	Escocia	<i>A. popoffii</i>
LMG 17547*	Agua de planta potabilizadora (Turiff)	Escocia	<i>A. popoffii</i>
F548B ^a *	Agua potable (Vinagello)	Suiza	<i>A. popoffii</i>
F533E ^a	Agua potable (Pregassona)	Suiza	<i>A. popoffii</i>
F548C ^a	Agua potable (Vinagello)	Suiza	<i>A. popoffii</i>
F600B ^a	Agua potable (Vinagello)	Suiza	<i>A. popoffii</i>
F600C ^a	Agua potable (Vinagello)	Suiza	<i>A. popoffii</i>
F539A ^a	Agua potable (Vinagello)	Suiza	<i>A. popoffii</i>
F479E ^a *	Agua de fuente (Vezio)	Suiza	<i>A. popoffii</i>
F498B ^a *	Agua de grifo (Cadro)	Suiza	<i>A. popoffii</i>

Cepas tipo y de referencia:

Cepa	Identificación original	Origen	Identificación por 16S rDNA-RFLP
CECT 839 ^T = Popoff543*	<i>A. hydrophila</i> (HG1)	Leche	<i>A. hydrophila</i>
CECT 4227 ^T = Popoff218**	<i>A. bestiarum</i> (HG2)	Pez	<i>A. bestiarum</i>
LMG 13448*	<i>A. bestiarum</i> (HG2)	Heces	<i>A. salmonicida</i>
LMG 13662**	<i>A. bestiarum</i> (HG2)	Heces	<i>A. bestiarum</i> / <i>A. salmonicida</i>
LMG 13451 = Popoff316*	" <i>A. hydrophila</i> " (HG3)	Heces	<i>A. salmonicida</i>
CECT 894 ^T **	<i>A. salmonicida</i> subsp. <i>salmonicida</i> (HG3)	Pez	<i>A. salmonicida</i>
CECT 4235	<i>A. salmonicida</i> subsp. <i>salmonicida</i> (HG3)	Pez enfermo	<i>A. salmonicida</i>
CECT 4236	<i>A. salmonicida</i> subsp. <i>salmonicida</i> (HG3)	Pez	<i>A. salmonicida</i>
CECT 4237*	<i>A. salmonicida</i> subsp. <i>salmonicida</i> (HG3)	Pez	<i>A. salmonicida</i>
CECT 895*	<i>A. salmonicida</i> subsp. <i>achromogenes</i> (HG3)	Pez	<i>A. bestiarum</i>
CECT 4238*	<i>A. salmonicida</i> subsp. <i>achromogenes</i> (HG3)	Pez	<i>A. bestiarum</i>
CECT 4239	<i>A. salmonicida</i> subsp. <i>achromogenes</i> (HG3)	Pez	<i>A. bestiarum</i>
CECT 896*	<i>A. salmonicida</i> subsp. <i>masoucida</i> (HG3)	Pez enfermo	<i>A. bestiarum</i>

Anexo 4. Continuación

Cepa	Identificación original	Origen	Identificación por 16S rDNA-RFLP
NCIMB 13210*	<i>A. salmonicida</i> subsp. <i>smithia</i> (HG3)	Pez	<i>A. bestiarum</i>
34 MEL ^{e*}	<i>A. salmonicida</i> subsp. <i>pectinolytica</i>	Agua de río	<i>A. bestiarum</i> / <i>A. salmonicida</i>
85 MEL ^{e*}	<i>A. salmonicida</i> subsp. <i>pectinolytica</i>	Agua de río	<i>A. bestiarum</i> / <i>A. salmonicida</i>
93 MEL ^{e*}	<i>A. salmonicida</i> subsp. <i>pectinolytica</i>	Agua de río	<i>A. bestiarum</i> / <i>A. salmonicida</i>
AS222 ^d	Atypical <i>A. salmonicida</i>	Pez	<i>A. bestiarum</i> / <i>A. salmonicida</i>
AS203 ^d	Atypical <i>A. salmonicida</i>	Pez	<i>A. bestiarum</i>
AS24 ^d	Atypical <i>A. salmonicida</i>	Pez	<i>A. bestiarum</i>
AS4 ^d	Atypical <i>A. salmonicida</i>	Pez	<i>A. bestiarum</i>
AS167 ^d	Atypical <i>A. salmonicida</i>	Pez	<i>A. bestiarum</i>
LMG 17541 ^T	<i>A. popoffii</i>	Agua de planta potabilizadora (Oelegen); Bélgica	<i>A. popoffii</i>

^aCepas de la Dra. Demarta; ^bCepas del Dr. Kingombe; ^cCepas de la Dra. Kozińska; ^dCepas del Dr. Austin; ^eCepas del Dr. Janda.

*Cepas utilizadas para la secuenciación del gen 16S rRNA. *Cepas utilizadas para el análisis de los RFLP del espaciador intergénico 16S-23S.

Anexo 5. Cepas de *Aeromonas* aisladas de carpa común (*Cyprinus carpio* L.) (estudio 4.4.5).

Cepa ♦	Origen	Identificación por 16S rDNA-RFLP
J4N-98	Riñón de pez enfermo	<i>A. bestiarum</i>
P1W-98	Úlcera en la piel	<i>A. bestiarum</i>
P1S-98	Piel de pez enfermo	<i>A. bestiarum</i>
14S-93	Piel de pez enfermo	<i>A. bestiarum</i> *
15S-93	Piel de pez enfermo	<i>A. bestiarum</i> *
R6N-98	Riñón de pez enfermo	<i>A. salmonicida</i> *
1S-91	Úlcera en la piel	<i>A. salmonicida</i>
32-93	Agua potable	<i>A. salmonicida</i>
10E-91	Úlcera en la piel	<i>A. salmonicida</i>
6N-91	Riñón de pez enfermo	<i>A. salmonicida</i>
A14-99	Riñón de pez enfermo	<i>A. salmonicida</i>
A16-99	Riñón de pez enfermo	<i>A. salmonicida</i> *
A12-99	Riñón de pez enfermo	<i>A. salmonicida</i> *
A9-99	Riñón de pez enfermo	<i>A. salmonicida</i> *
A11-99	Riñón de pez sano	<i>A. salmonicida</i> *
A15-99	Riñón de pez enfermo	<i>A. salmonicida</i>
1S-95	Piel de pez enfermo	<i>A. salmonicida</i>
A5-99	Riñón de pez sano	<i>A. salmonicida</i> *
4S-93	Piel de pez enfermo	<i>A. sobria</i>
A8-99	Riñón de pez enfermo	<i>A. sobria</i>
A2-99	Riñón de pez sano	<i>A. sobria</i>
A10-99	Riñón de pez enfermo	<i>A. sobria</i>
A1-99	Riñón de pez sano	<i>A. sobria</i>
A6-99	Riñón de pez enfermo	<i>A. sobria</i>
A3-99	Riñón de pez sano	<i>A. veronii</i>
S3W-98	Úlcera en la piel	<i>A. veronii</i>
Rej 1-98	Úlcera en la piel	<i>A. veronii</i>
S2W-98	Úlcera en la piel	<i>A. veronii</i>
S4W-98	Úlcera en la piel	<i>A. veronii</i>
5S-93	Piel de pez enfermo	<i>A. veronii</i>
16S-93	Úlcera en la piel	<i>A. veronii</i>
10S-93	Piel de pez enfermo	<i>A. veronii</i>
20E-93	Úlcera en la piel	<i>A. veronii</i>
Rej3-98	Úlcera en la piel	<i>A. veronii</i>
W1-97	Agua potable	<i>A. veronii</i>
A7-99	Riñón de pez enfermo	<i>A. encheleia</i>
A4-99	Riñón de pez sano	<i>A. encheleia</i>

*Cepas que a raíz de estudios posteriores (4.1.2.1) se han identificado como *A. bestiarum* / *A. salmonicida*.

♦ Cepas de la Dra. Kozińska

Anexo 6. Cepas de *Aeromonas* sp. aisladas de pescado congelado destinado al consumo humano en México (estudio 4.4.4).

Cepa ♦	Identificación fenotípica	Identificación por 16S rDNA-RFLP
101	<i>A. veronii</i> bt sobria	<i>A. salmonicida</i>
102	<i>A. veronii</i> bt sobria	<i>A. salmonicida</i>
103	<i>A. veronii</i> bt sobria	<i>A. bestiarum</i> *
104	<i>A. veronii</i> bt sobria	<i>A. bestiarum</i> *
105	<i>A. veronii</i> bt sobria	<i>A. salmonicida</i>
106	<i>A. veronii</i> bt sobria	<i>A. salmonicida</i>
107	<i>A. veronii</i> bt sobria	<i>A. salmonicida</i>
108	<i>A. veronii</i> bt sobria	<i>A. salmonicida</i>
109	<i>A. veronii</i> bt sobria	<i>A. bestiarum</i> *
110	<i>A. veronii</i> bt sobria	<i>A. veronii</i>
111	<i>A. veronii</i> bt sobria	<i>A. veronii</i>
202	<i>A. caviae</i>	<i>A. salmonicida</i>
204	<i>A. caviae</i>	<i>A. bestiarum</i> *
206	<i>A. caviae</i>	<i>A. salmonicida</i>
207	<i>A. caviae</i>	<i>A. salmonicida</i>
208	<i>A. caviae</i>	<i>A. salmonicida</i>
209	<i>A. caviae</i>	<i>A. salmonicida</i>
210	<i>A. caviae</i>	<i>A. bestiarum</i>
211	<i>A. caviae</i>	<i>A. salmonicida</i>
212	<i>A. caviae</i>	<i>A. salmonicida</i>
213	<i>A. caviae</i>	<i>A. salmonicida</i>
214	<i>A. caviae</i>	<i>A. salmonicida</i>
301	<i>A. eucrenophila</i>	<i>A. salmonicida</i>
302	<i>A. eucrenophila</i>	<i>A. encheleia</i>
304	<i>A. eucrenophila</i>	<i>A. salmonicida</i>
305	<i>A. eucrenophila</i>	<i>A. salmonicida</i>
306	<i>A. eucrenophila</i>	<i>A. salmonicida</i>
307	<i>A. eucrenophila</i>	<i>A. hydrophila</i>
308	<i>A. eucrenophila</i>	<i>A. encheleia</i>
309	<i>A. eucrenophila</i>	<i>A. encheleia</i>
310	<i>A. eucrenophila</i>	<i>A. salmonicida</i>
311	<i>A. eucrenophila</i>	<i>A. salmonicida</i>
312	<i>A. eucrenophila</i>	<i>A. salmonicida</i>
401	<i>A. salmonicida</i>	<i>A. bestiarum</i> *
402	<i>A. salmonicida</i>	<i>A. salmonicida</i>
403	<i>A. salmonicida</i>	<i>A. salmonicida</i>
404	<i>A. salmonicida</i>	<i>A. salmonicida</i>
405	<i>A. salmonicida</i>	<i>A. salmonicida</i>
406	<i>A. salmonicida</i>	<i>A. salmonicida</i>
407	<i>A. salmonicida</i>	<i>A. salmonicida</i>
408	<i>A. salmonicida</i>	<i>A. salmonicida</i>
410	<i>A. salmonicida</i>	<i>A. salmonicida</i>
411	<i>A. salmonicida</i>	<i>A. salmonicida</i>
412	<i>A. salmonicida</i>	<i>A. salmonicida</i>
413	<i>A. salmonicida</i>	<i>A. veronii</i>
414	<i>A. salmonicida</i>	<i>A. salmonicida</i>
415	<i>A. salmonicida</i>	<i>A. salmonicida</i>
416	<i>A. salmonicida</i>	<i>A. salmonicida</i>
417	<i>A. salmonicida</i>	<i>A. salmonicida</i>
418	<i>A. salmonicida</i>	<i>A. salmonicida</i>
419	<i>A. salmonicida</i>	<i>A. salmonicida</i>
420	<i>A. salmonicida</i>	<i>A. bestiarum</i> *
422	<i>A. salmonicida</i>	<i>A. salmonicida</i>
423	<i>A. salmonicida</i>	<i>A. bestiarum</i> *
424	<i>A. salmonicida</i>	<i>A. bestiarum</i> *
425	<i>A. salmonicida</i>	<i>A. salmonicida</i>
426	<i>A. salmonicida</i>	<i>A. bestiarum</i>
427	<i>A. salmonicida</i>	<i>A. salmonicida</i>
428	<i>A. salmonicida</i>	<i>A. bestiarum</i> *
429	<i>A. salmonicida</i>	<i>A. bestiarum</i> *
501	<i>A. hydrophila</i>	<i>A. salmonicida</i>
502	<i>A. hydrophila</i>	<i>A. salmonicida</i>

Anexo 6. Continuación

Cepa	Identificación fenotípica	Identificación por 16S rDNA-RFLP
503	<i>A. hydrophila</i>	<i>A. bestiarum</i> *
504	<i>A. hydrophila</i>	<i>A. bestiarum</i> *
505	<i>A. hydrophila</i>	<i>A. bestiarum</i>
506	<i>A. hydrophila</i>	<i>A. salmonicida</i>
507	<i>A. hydrophila</i>	<i>A. veronii</i>
508	<i>A. hydrophila</i>	<i>A. salmonicida</i>
509	<i>A. hydrophila</i>	<i>A. salmonicida</i>
510	<i>A. hydrophila</i>	<i>A. salmonicida</i>
511	<i>A. hydrophila</i>	<i>A. salmonicida</i>
512	<i>A. hydrophila</i>	<i>A. salmonicida</i>
513	<i>A. hydrophila</i>	<i>A. salmonicida</i>
514	<i>A. hydrophila</i>	<i>A. salmonicida</i>
515	<i>A. hydrophila</i>	<i>A. hydrophila</i>
516	<i>A. hydrophila</i>	<i>A. salmonicida</i>
517	<i>A. hydrophila</i>	<i>A. bestiarum</i>

*Cepas que a raíz de estudios posteriores (4.1.2.1) se han identificado como *A. bestiarum* / *A. salmonicida*. ♦Cepas de la Dra. Castro-Escarpulli.

Anexo 7. Cepas utilizadas para la ampliación del protocolo de identificación basado en los RFLP del gen 16S rRNA (estudio 4.1.1.1.)

Especies	Cepas	Origen
<i>A. bestiarum</i>	ATCC5 1108 ^T , CECT 5200, CECT 5201, CECT 5202, CECT 5203, CECT 895, CECT 896, CECT 5179, CECT 4239 LMG 13662 CECT5219 CECT 5222, CECT 5223 CECT 5224, CECT 5226, CECT 5228, CECT 5236 CECT 5248, CECT 5211 CECT 5213, CECT 5212 CECT 5214, CECT 5215, CECT5239, CECT5242, CECT 5205, CECT 5217, CECT 5247, CECT 5206	Pez Heces Pastel Mejillón Agua potable Agua de mar Agua de río Agua de embalse
<i>A. salmonicida</i>	ATCC 33658 ^T , CECT 4236, CECT 4237 LMG13448 LMG 18998 LMG 19037, CECT 5221, CECT 5218 CECT 5225, CECT 5227 CECT 5229, CECT 5232, CECT 5238, CECT 5230, LMG 19036 CECT 5209, CECT 5220, CECT 5234 CECT 5231 CECT 5249	Pez Heces Exudado de herida Pastel Mejillón Agua potable Agua de mar Agua de embalse Agua de río
<i>A. popoffii</i>	LMG17541 ^T , LMG17542, LMG17543, LMG17544, LMG17545, LMG17546, LMG17547 CECT 5235, CECT 5246, CECT 5245, CECT 5250 CECT 5240, CECT 5243, CECT 5244, CECT 5251 CECT 5210	Agua potable Agua de embalse Agua de río Agua de mar
<i>A. encheleia</i>	CECT4340, CECT4341, CECT 4342 ^T , CECT4343	Pez
<i>Aeromonas</i> Grupo 501	ATCC 43946	Herida
<i>Aeromonas</i> sp (HG11)	ATCC 35941	Sutura de herida
<i>A. veronii</i> bt sobria	LMG 13068, LMG 13071, LMG 13073, LMG 13074, LMG 13695 LMG 13694	Heces Desconocido

Anexo 8. Cepas utilizadas para el diseño de la sonda de género (estudio 4.1.1.3).

Especie	Cepa	Origen
<i>A. hydrophila</i>	ATCC 7966 ^T	Leche
<i>A. bestiarum</i>	ATCC 51108 ^T	Pez
<i>A. salmonicida</i>	ATCC 33658 ^T	Pez
<i>A. caviae</i>	ATCC 15468 ^T	Cobaya
<i>A. media</i>	ATCC 33907 ^T	Pez
<i>A. eucrenophila</i>	ATCC 23309 ^T	Pez
<i>A. sobria</i>	ATCC 43979 ^T	Pez
<i>A. veronii</i>	ATCC 35624 ^T	Esputo
<i>A. jandaei</i>	ATCC 49568 ^T	Heces
<i>Aeromonas</i> GH11	ATCC 35941	Sutura
<i>A. schubertii</i>	ATCC 43700 ^T	Abceso
<i>A. trota</i>	ATCC 49657 ^T	Heces
<i>A. encheleia</i>	ATCC 51929 ^T	Pez
<i>A. allosaccharophila</i>	ATCC 51208 ^T	Pez
<i>A. popoffii</i>	LMG 17541 ^T	Agua de planta de potabilizadora
<i>Aeromonas</i> Group 501	CECT 5178 ^T	Desconocido
<i>Vibrio fluvialis</i>	ATCC 33809 ^T	Heces
<i>V. vulnificus</i>	ATCC 27562 ^T	Sangre
<i>V. vulnificus</i>	ATCC 33147	Pez enfermo
<i>V. vulnificus</i>	CECT 4608	Agua
<i>V. vulnificus</i>	CECT 4606	Agua
<i>V. vulnificus</i>	CECT 4602	Agua
<i>V. cholerae</i> NO:01	CECT 557	Agua de río
<i>V. cholerae</i> NO:01	CECT 653	Agua
<i>V. parahaemolyticus</i>	ATCC 17802 ^T	Brote alimentario
<i>V. parahaemolyticus</i>	CECT 612	Agua de mar
<i>V. parahaemolyticus</i>	CECT 613	Pláncton marino
<i>V. parahaemolyticus</i>	CECT 611	Agua de mar
<i>V. parahaemolyticus</i>	CECT 588	Mejillón
<i>Escherichia coli</i> O:157:H7	CECT 4076	Colitis enterohemorrágica humana
<i>E. coli</i> O:128: K68 (B)	CECT 742	Desconocido
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC 25668	Aislado clínico humano
<i>Salmonella thyphimurium</i>	ATCC 13311	Brote alimentario
<i>Shigella flexneri</i>	CECT 585	Disenteria
<i>Plesiomonas shigelloides</i>	CECT 4262 ^T	Heces
<i>Yersinia enterocolitica</i>	CECT 754	Heces

Anexo 9. Cepas utilizadas para el estudio filogenético del género *Aeromonas* utilizando los genes estructurales *gyrB* y *rpoD* (4.1.2.2).

Cepa	Identificación por 16S rDNA-RFLP	Número de acceso para el gen <i>gyrB</i>	Número de acceso para el gen <i>rpoD</i>
CECT 839 ^T	<i>A. hydrophila</i>	AY101778	AY169325
63c	<i>A. hydrophila</i>	AY101789	AY169366
830	<i>A. hydrophila</i>	AY237561	AY169364
874	<i>A. hydrophila</i>	AY237562	AY169365
140P	<i>A. hydrophila</i>	AY237560	AY169356
CECT 4227 ^T	<i>A. bestiarum</i>	AY101774	AY169326
108F	<i>A. bestiarum</i>	AY237575	AY169360
P1W-98 ^b	<i>A. bestiarum</i>	AY237563	AY185588
CECT 896	<i>A. bestiarum</i>	AY101790	AY169330
CECT 895	<i>A. bestiarum</i>	AY101784	AY169329
CECT 894 ^T	<i>A. salmonicida</i>	AY101773	AY169327
CECT 4237	<i>A. salmonicida</i>	AY237567	AY169332
CECT 5173	<i>A. salmonicida</i>	AY101810	AY169328
220c	<i>A. salmonicida</i>	AY101816	AY169358
130	<i>A. salmonicida</i>	AY237573	AY169355
156	<i>A. salmonicida</i>	AY237570	AY169361
LMG 13448	<i>A. salmonicida</i>	AY101822	AY185580
440	<i>A. salmonicida</i>	AY237572	AY169334
101F	<i>A. bestiarum</i> / <i>A. salmonicida</i>	AY101788	AY169357
A7 ^c	<i>A. bestiarum</i> / <i>A. salmonicida</i>	AY101815	AY169335
22	<i>A. bestiarum</i> / <i>A. salmonicida</i>	AY237576	AY169363
26	<i>A. bestiarum</i> / <i>A. salmonicida</i>	AY237578	AY169368
37	<i>A. bestiarum</i> / <i>A. salmonicida</i>	AY101819	AY169350
40	<i>A. bestiarum</i> / <i>A. salmonicida</i>	AY237564	AY185593
361c	<i>A. bestiarum</i> / <i>A. salmonicida</i>	AY237574	AY169353
116P	<i>A. bestiarum</i> / <i>A. salmonicida</i>	AY237566	AY185592
117P	<i>A. bestiarum</i> / <i>A. salmonicida</i>	AY237565	AY185591
119P	<i>A. bestiarum</i> / <i>A. salmonicida</i>	AY237568	AY169351
120P	<i>A. bestiarum</i> / <i>A. salmonicida</i>	AY237569	AY169359
107F	<i>A. bestiarum</i> / <i>A. salmonicida</i>	AY237577	AY169362
34 MEL ^a	<i>A. bestiarum</i> / <i>A. salmonicida</i>	AY101785	AY169324
LMG 13662	<i>A. bestiarum</i> / <i>A. salmonicida</i>	AY101786	AY185590
A99 ^c	<i>A. bestiarum</i> / <i>A. salmonicida</i>	AY237571	AY169352
CECT 838 ^T	<i>A. caviae</i>	AY101783	AY169337
CECT 4221	<i>A. caviae</i>	AY101794	AY185587
665c	<i>A. caviae</i>	AY237579	AY249199
CECT 4232 ^T	<i>A. media</i>	AY101782	AY169338
CECT 4234	<i>A. media</i>	AY101824	AY249191
741	<i>A. media</i>	AY299321	AY249192
CECT 4224 ^T	<i>A. eucrenophila</i>	AY101776	AY169339
CECT 4827	<i>A. eucrenophila</i>	AY101820	AY249193
CECT 4245 ^T	<i>A. sobria</i>	AY101781	AY169340
350	<i>A. sobria</i>	AY101807	AY249195
CECT 4228 ^T	<i>A. jandaei</i>	AY101780	AY169341
344	<i>A. jandaei</i>	AY101796	AY249196
CECT 4246	<i>A. veronii</i>	AY101775	AY169333
CECT 4486 ^T	<i>A. veronii</i>	AY101795	AY169342
LMG 16334	<i>A. veronii</i>	AY101787	AY169354

Anexo 9. Continuación

Cepa	Identificación por 16S rDNA-RFLP	Número de acceso para el gen <i>gyrB</i>	Número de acceso para el gen <i>rpoD</i>
CECT 4253	<i>Aeromonas</i> sp. (HG11)	AY101779	AY169343
CECT 4856	<i>Aeromonas</i> sp. (HG11)	AY101808	AY249197
CECT 4240 ^T	<i>A. shubertii</i>	AY101772	AY169336
CECT 4254	<i>Aeromonas</i> sp.	AY101806	AY169345
CECT 4255 ^T	<i>A. trota</i>	AY101800	AY169344
CECT 4935	<i>A. trota</i>	AY101805	AY249198
CECT 4199 ^T	<i>A. allosaccharophila</i>	AY101777	AY169348
CECT 4220	<i>A. allosaccharophila</i>	AY101812	AY185585
CECT 4200	<i>A. allosaccharophila</i>	AY101823	AY185586
CECT 4342 ^T	<i>A. encheleia</i>	AY101799	AY169346
CECT 4341	<i>A. encheleia</i>	AY101804	AY249194
LMG 17541 ^T	<i>A. popoffii</i>	AY101801	AY169347
LMG 17543	<i>A. popoffii</i>	AY101803	AY169367
LMG 17544	<i>A. popoffii</i>	AY101821	AY169349
LMG 17545	<i>A. popoffii</i>	AY237583	AY185582
LMG 17546	<i>A. popoffii</i>	AY237584	AY185583
MTCC 3249	<i>A. culicicola</i>	AF175891	AY127871
239	<i>A. sp</i>	AY237580	AY308843
480	<i>A. sp</i>	AY237581	AY308844
57	<i>A. sp</i>	AY237582	AY308845
280	<i>A. sp</i>	AY299324	AY308846
610	<i>A. sp</i>	AY101814	AY308847

^aCepa del Dr. Janda; ^bCepas de la Dra. Kozińska; ^cCepas del Dr. Kingombe. ND, No depositadas.

Anexo 10. Cepas utilizadas para el ensayo de técnicas de tipado molecular (estudio 4.3.1) y para el estudio de los factores de virulencia y resistencia a antibióticos de *A. popoffii* (estudio 4.4.2).

Especie	Cepa	Origen	Localidad
<i>A. popoffii</i>	LMG 17541 ^T	Agua de planta potabilizadora	Oelegem, Bélgica
<i>A. popoffii</i>	LMG 17542	Agua de planta potabilizadora	DeBlankaart, Bélgica
<i>A. popoffii</i>	LMG 17543	Agua de planta potabilizadora	Snellegem, Bélgica
<i>A. popoffii</i>	LMG 17544	Agua de planta potabilizadora	Eeklo, Bélgica
<i>A. popoffii</i>	LMG 17545	Agua de planta potabilizadora	Snellegem, Bélgica
<i>A. popoffii</i>	LMG 17546	Agua de planta potabilizadora	Undy Station, Escocia
<i>A. popoffii</i>	LMG 17547	Agua de planta potabilizadora	Turiff, Escocia
<i>A. popoffii</i>	F533E ^a	Agua potable	Pregassona, Suiza
<i>A. popoffii</i>	F548B ^a	Agua potable	Vinagello, Suiza
<i>A. popoffii</i>	F548C ^a	Agua potable	Vinagello, Suiza
<i>A. popoffii</i>	F600B ^a	Agua potable	Vinagello, Suiza
<i>A. popoffii</i>	F600C ^a	Agua potable	Vinagello, Suiza
<i>A. popoffii</i>	F539A ^a	Agua potable	Vinagello, Suiza
<i>A. popoffii</i>	F479E ^a	Agua potable	Vezio, Suiza
<i>A. popoffii</i>	F498B ^a	Agua potable	Cadro, Suiza
<i>A. popoffii</i>	32	Agua de desembocadura de río	Río Fluvia, España
<i>A. popoffii</i>	137	Agua de embalse	Baells, España
<i>A. popoffii</i>	159	Agua de río	Río Segre, España
<i>A. popoffii</i>	203	Agua de mar	Masnou-Barcelona, España
<i>A. popoffii</i>	210	Agua de desembocadura de río	Río Llobregat, España
<i>A. popoffii</i>	254	Agua de río	Río Noguera Pallaresa, España
<i>A. popoffii</i>	274	Agua de río	Río Noguera Pallaresa, España
<i>A. popoffii</i>	366	Agua de torrente	Torrente de Merles, España
<i>A. popoffii</i>	370	Agua de embalse	Baells, España
<i>A. popoffii</i>	594	Agua de torrente	Torrente de Merles, España
<i>A. popoffii</i>	638	Agua de río	Río Fluviá, España
<i>A. hydrophila</i>	CECT 839 ^T	Leche	
<i>A. bestiarum</i>	CECT 4227 ^T	Pez enfermo	
<i>A. salmonicida</i> subsp. <i>salmonicida</i>	CECT 894 ^T	Pez	

^aCepas de la Dra. Demarta

II. INTERÉS Y OBJETIVOS

El género *Aeromonas* está constituido por bacterias Gram-negativas aisladas frecuentemente en el agua, alimentos, en heces de pacientes con cuadros diarreicos y en infecciones extraintestinales. Además, algunas de las especies del género también son patógenas de peces. La taxonomía de *Aeromonas* es compleja, el género consta de 15 especies, sin embargo algunas de ellas no están bien delimitadas, lo que dificulta su identificación. Durante las últimas décadas el interés en el estudio de las distintas especies de *Aeromonas* como microorganismos patógenos ha ido creciendo gradualmente, como lo demuestran las numerosas publicaciones y simposios monográficos que en los últimos años se vienen celebrando en diversos países. Son por tanto numerosos los investigadores, en campos muy diversos de la microbiología, que han de enfrentarse a la difícil labor de identificar dichas bacterias. La mayoría de laboratorios clínicos utilizan para la identificación de las especies métodos miniaturizados semiautomáticos (API20E, Vitek GNI, BBL Crystal, MicroScan) u otras pruebas bioquímicas descritas en manuales de microbiología poco actualizados. Estos métodos bioquímicos conducen a identificaciones erróneas no sólo de las especies sino también del género, ya que la mayoría de cepas se identifican como *Aeromonas hydrophila* o como *Vibrio* spp. Uno de los objetivos de esta tesis consiste en ampliar el método molecular basado en el análisis de los RFLP del gen 16S rRNA, para que permita la identificación de todas las especies del género. La correcta identificación de las especies que integran el complejo fenotípico “*A. hydrophila*” (formado por las especies *A. hydrophila*, *A. bestiarum*, *A. salmonicida* y *A. popoffii*) constituye uno de los problemas fundamentales de la taxonomía del género. Como se ha mencionado en la introducción, el porcentaje de hibridación DNA-DNA entre las especies *A. bestiarum* y *A. salmonicida* es muy elevado y roza los límites establecidos para considerarlas especies distintas. A pesar de ello son consideradas especies válidas. También se ha considerado importante, dado que *A. hydrophila* es una de las tres especies más frecuentemente aisladas en muestras clínicas de origen humano, que *A. salmonicida* es un importante patógeno de peces, y que *A. popoffii* es una especie de reciente descripción, investigar las características bioquímicas y las relaciones filogenéticas entre estas especies.

Los patrones de resistencia de las especies de *Aeromonas* a los agentes antimicrobianos ha sido investigada en diversas ocasiones, no obstante la mayoría de estudios incluyen cepas identificadas bioquímicamente por lo que se desconoce si las especies identificadas genéticamente, presentan o no un patrón de resistencia

específico. Además, en la actualidad, debido a la elevada facilidad para realizar viajes internacionales, la movilidad de personas entre los diferentes países y continentes ha aumentado vertiginosamente, situación que ha conllevado un incremento de la diarrea del viajero. Hasta la fecha en nuestro país no existen estudios que aporten datos sobre la incidencia de *Aeromonas* en este tipo de infección intestinal, y en todo caso cual podría ser la terapia antimicrobiana más efectiva. Establecer la incidencia de estos microorganismos en este tipo de infección y conocer su patrón de sensibilidad a los agentes antimicrobianos, es otro de los objetivos concretos de esta tesis.

El hecho de que *Aeromonas* sea considerada como un potencial patógeno humano ha generado un especial interés en poder conocer la incidencia de las diferentes especies en aguas y alimentos, ambos considerados como posibles vías de contagio, y su posible relación con la infección humana. Para ello es importante disponer de métodos moleculares de tipado fiables. Uno de los objetivos concretos de esta tesis ha sido la evaluación comparativa de diversas técnicas rápidas y sencillas de tipado molecular para establecer cual de ellas puede ser la más eficaz. Se ha postulado que los peces pueden desempeñar un papel importante en el establecimiento de la infección humana, ya que *Aeromonas* es un reconocido patógeno de dichos animales. Es por tanto de interés poder conocer tanto la incidencia de las diferentes especies de *Aeromonas* en el pescado destinado al consumo humano como las características virulentas de las cepas implicadas en la patología de peces. Ambos aspectos son abordados en esta tesis. También es de resaltar la importante pérdida económica que las infecciones en peces pueden representar para las piscifactorías destinadas al cultivo de dichos peces.

La virulencia de *Aeromonas*, como en la mayoría de microorganismos patógenos, es compleja y multifactorial. Hasta la fecha se han descrito numerosos factores de virulencia (aerolisina/hemolisina, GCAT, lipasas extracelulares, DNasas y serina proteasa) en *Aeromonas*. No existen estudios que intenten determinar la distribución de estos factores de virulencia simultáneamente en un número representativo de cepas de todas las especies del género, utilizando cepas bien caracterizadas genéticamente. Además hasta la fecha los estudios existentes se han centrado principalmente en establecer la prevalencia de uno de ellos, la aerolisina. Por lo tanto, se desconoce si los otros factores de virulencia mencionados predominan en las cepas de *Aeromonas* de origen clínico o en determinadas especies, así como si se hallan solos o asociados. El determinar estos aspectos constituye otro de los objetivos

del presente trabajo. En especial se ha considerado de interés el investigar la presencia de los factores de virulencia mencionados en *A. popoffii*, por tratarse de una especie de reciente descripción poco conocida y aislada en aguas de potencial consumo humano. También se han investigado los genes que codifican para el flagelo lateral, los cuales se han asociado a la capacidad invasora de las cepas de *Aeromonas*, y los genes *alt* y *ast* que codifican para enterotoxinas citotónicas. Muy recientemente se ha demostrado que la presencia simultánea de los dos últimos genes en las cepas aisladas de heces condiciona la gravedad del cuadro diarreico. Otros autores han demostrado que cepas mutantes para los genes *alt*, *ast* y aerolisina son capaces de reducir drásticamente la secreción de fluidos en un modelo animal de asa ligada en rata y ratón. Es por este motivo, que se ha considerado importante estudiar la presencia simultánea de los genes *lafA* (flagelo lateral), *alt*, *ast* y aerolisina en cepas de *A. jandaei*. Esta especie fue seleccionada porque a pesar de que se aísla con cierta frecuencia en muestras clínicas (tanto de origen intestinal como extraintestinal), su potencial virulento ha sido poco estudiado.

A pesar de que se conoce que determinados genes pueden jugar un papel importante en la virulencia de *Aeromonas*, el mecanismo de patogenicidad de éstas bacterias, tal y como se ha comentado, es más complejo. Recientemente se ha descrito, en una cepa de *A. salmonicida* patógena de peces, una toxina denominada Aext que se secreta por el sistema de secreción tipo III (TTSS), así como varios genes que integran este sistema. La función del TTSS es hacer llegar directamente al citoplasma de la célula huésped toxinas que inducen su apoptosis. Este sistema ha sido descrito en bacterias enteropatógenas tales como *Escherichia coli*, *Yersinia* spp., *Salmonella* spp., por lo que consideramos interesante investigar su presencia en cepas de las especies de *Aeromonas* de más relevancia en clínica.

En la presente tesis pretendemos contribuir al esclarecimiento de los aspectos mencionados anteriormente a través de los siguientes objetivos concretos:

1. Ampliar el protocolo de identificación basado en los RFLP del gen 16S rRNA seleccionando y ensayando nuevas endonucleasas que permitan identificar de forma rápida y fiable todas las especies de *Aeromonas*, incluyendo las de más reciente descripción.

2. Evaluar comparativamente la eficacia de los métodos bioquímicos miniaturizados BBL Crystal y MicroScan para la identificación de las especies de *Aeromonas*, comparando sus resultados con los obtenidos por la técnica de los RFLP del gen 16S rRNA.
3. Diseñar una sonda específica para la identificación de las colonias de *Aeromonas* en cultivos primarios.
4. Intentar esclarecer la taxonomía de las especies del complejo fenotípico “*A. hydrophila*” y en especial de *A. bestiarum*, *A. salmonicida* y *A. popoffii* mediante métodos fenotípicos y moleculares.
5. Determinar la sensibilidad a los agentes antimicrobianos de cepas de *Aeromonas* de origen clínico, ambiental y aisladas de peces.
6. Estudiar retrospectivamente, en colaboración con la Unidad de Medicina Tropical del Hospital Clínico de Barcelona, la incidencia de las distintas especies de *Aeromonas* en la diarrea del viajero.
7. Evaluar comparativamente diversos métodos de tipado molecular (ERIC-PCR, REP-PCR y 16S-23S ISR-RFLP) para determinar cual de ellos es el más discriminativo y poder investigar la variabilidad genética intraespecífica en *Aeromonas*.
8. Determinar la distribución de genes que codifican para factores de virulencia tales como aerolisina/hemolisina, lipasas, serina proteasa, DNasas, flagelo lateral y enterotoxinas citotónicas en cepas de *Aeromonas* de origen clínico y ambiental.
9. Establecer la incidencia de las diferentes especies de *Aeromonas* en muestras de pescado destinado al consumo humano y determinar las características fenotípicas y virulentas de las cepas aisladas.

10. Establecer si el sistema de secreción tipo III (TTSS), asociado al potencial virulento de microorganismos patógenos, está presente en cepas clínicas de *Aeromonas* spp.

Characterisation of *Aeromonas* spp. isolated from frozen fish intended for human consumption in Mexico

G. Castro-Escarpulli^{a,b}, M.J. Figueras^{b,*}, G. Aguilera-Arreola^a, L. Soler^b,
E. Fernández-Rendón^a, G.O. Aparicio^a, J. Guarro^b, M.R. Chacón^b

^aDepartamento de Microbiología, Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, Instituto Politécnico Nacional,
11340 México Distrito Federal, Mexico

^bUnitat de Microbiologia, Departament de Ciències Mèdiques Bàsiques, Facultat de Medicina i Ciències de la Salut,
Universitat Rovira i Virgili, San Llorenç 21, 43201 Reus, Spain

Received 1 May 2002; received in revised form 23 July 2002; accepted 18 August 2002

Abstract

A total of 82 strains of presumptive *Aeromonas* spp. were identified biochemically and genetically (16S rDNA-RFLP). The strains were isolated from 250 samples of frozen fish (Tilapia, *Oreochromis niloticus niloticus*) purchased in local markets in Mexico City. In the present study, we detected the presence of several genes encoding for putative virulence factors and phenotypic activities that may play an important role in bacterial infection. In addition, we studied the antimicrobial patterns of those strains. Molecular identification demonstrated that the prevalent species in frozen fish were *Aeromonas salmonicida* (67.5%) and *Aeromonas bestiarum* (20.9%), accounting for 88.3% of the isolates, while the other strains belonged to the species *Aeromonas veronii* (5.2%), *Aeromonas encheleia* (3.9%) and *Aeromonas hydrophila* (2.6%). Detection by polymerase chain reaction (PCR) of genes encoding putative virulence factors common in *Aeromonas*, such as aerolysin/hemolysin, lipases including the glycerophospholipid-cholesterol acyltransferase (GCAT), serine protease and DNases, revealed that they were all common in these strains. Our results showed that first generation quinolones and second and third generation cephalosporins were the drugs with the best antimicrobial effect against *Aeromonas* spp.

In Mexico, there have been few studies on *Aeromonas* and its putative virulence factors. The present work therefore highlights an important incidence of *Aeromonas* spp., with virulence potential and antimicrobial resistance, isolated from frozen fish intended for human consumption in Mexico City.

© 2002 Elsevier Science B.V. All rights reserved.

Keywords: *Aeromonas*; Mexico; Frozen fish; Virulence factors; Antimicrobial patterns; 16S rRNA-RFLP

1. Introduction

Aeromonas is an environmental microorganism autochthonous of aquatic environments that can be

sporadically transmitted to humans (Austin and Adams, 1996; Borrell et al., 1998; Janda and Abbott, 1998). Food of animal origin, seafood and vegetables have been considered an important vehicle of *Aeromonas* spp. infections (Altwegg et al., 1991; Kirov 1993; Mattick and Donovan, 1998). Gastroenteritis is the most prevalent human infection caused by *Aeromonas* spp., although other severe illnesses, such as

* Corresponding author. Tel.: +34-977759321; fax: +34-977759322.

E-mail address: mjfs@fmc.urv.es (M.J. Figueras).

systemic infections, are less frequent (Janda and Abbott, 1998) and normally associated with immunosuppressed patients (Ko et al., 2000). In addition, these microorganisms are also considered important fish pathogens (Austin and Adams, 1996). A number of putative virulence factors (aerolysin/hemolysin, proteases, lipases, DNases) that may play an important role in the development of disease, either in humans or in fish, have been described in several species of the genus (Howard et al., 1996; Pemberton et al., 1997; Santos et al., 1999; Soler et al., 2002). *Aeromonas* spp. are able to survive and multiply at low temperatures in a variety of food products stored between -2 and 10 °C such as beef, roast beef and pork (Krovacek et al., 1992; Mano et al., 2000), and can produce virulence factors even at these low temperatures (Mateos et al., 1993; Merino et al., 1995). Although the number of food-borne outbreaks caused by *Aeromonas* spp. have been quite limited so far (Altwegg et al., 1991; Krovacek et al., 1992; Mattick and Donovan, 1998), the presence of *Aeromonas* spp. in the food chain should not be ignored. Despite the number of surveys on the incidence of *Aeromonas* spp. in food products, there have been few studies on frozen fish. In addition, these studies have used strains which have been inaccurately identified when using traditional biochemical techniques (González et al., 2001), leading to unreliable results (Neyts et al., 2000).

The main objective of this study was to genetically re-identify previously biochemically identified *Aeromonas* spp. isolated from frozen fish intended for human consumption. The species prevalence, putative virulence and antimicrobial susceptibility patterns of the strains isolated were also studied.

2. Materials and methods

2.1. Bacterial strains and growing conditions

Eighty-two strains of presumptive *Aeromonas* spp. were isolated from 250 frozen fresh water fish (*Tilapia*, *Oreochromis niloticus niloticus*) purchased in local markets in Mexico City. Twenty-five grams of fish flesh were weighed aseptically and homogenized for 2 min in stomacher bags containing 225 ml of alkaline peptone water. After 18 h of incubation at 37

°C, an aliquot of the enrichment was inoculated in blood agar containing 30 mg/l ampicillin and incubated for 24 h at 28 °C. Five presumptive *Aeromonas* colonies were selected for further identification but only one isolate representing a species was considered from each sample for incidence calculation. Stock cultures of each strain were maintained for short periods at room temperature on blood agar base slants and for longer storage they were either frozen at -70 °C in 20% (w/v) glycerol–Todd–Hewitt broth (Oxoid, Madrid, Spain) or lyophilised in 7.5% horse glucose serum as a cryoprotector.

2.2. Phenotypic identification

Before each test, all the cultures were grown on tryptose soya agar (TSA) (Oxoid) at 37 °C for 18 h. Strains were first identified as *Aeromonas* spp. at the Medical Bacteriology Laboratory of the National Polytechnic Institute of Mexico City, using the Vitek AutoMicrobic System (Vitek ASM, bioMérieux Vitek, France) and growth 6% sodium chloride was used to discriminate *Aeromonas* from *Vibrio fluvialis* when Vitek was unable to do so. All *Aeromonas* spp. were re-identified biochemically to species level by using 14 tests chosen from those described by Altwegg (1999) and were: indole, gas from glucose, arginine dihydrolase, lysine decarboxylase and ornithine decarboxylase by the Moeller's method, esculin hydrolysis, Voges–Proskauer test, acid production from L-arabinose, lactose, sucrose, salicin, *m*-inositol, D-manitol and the β -hemolysine. To identify the biovars of *Aeromonas veronii*, the following tests were used: arginine dihydrolase, ornithine decarboxylase, acid from salicin and esculin hydrolysis.

2.3. Molecular identification

All strains were re-identified on the basis of the restriction fragment length polymorphism patterns (RFLP) obtained from the 16S rDNA following the method described by Borrell et al. (1997) and Figueras et al. (2000).

2.4. Phenotypic determination of virulence factors

Five colonies of those grown on TSA were suspended in 3 ml of Mueller–Hinton broth (Oxoid). The

density of this suspension was adjusted to 0.5 of the McFarland standard (1.5×10^8 cells ml^{-1}). We added 5 or 10 μl of this suspension to several media or substrates for the phenotypic determination of virulence factors. All strains were tested in duplicate, and when results were different, a third experiment was carried out to resolve the discrepancies.

2.4.1. Hemolytic activity

The strains were tested for β -hemolytic activity on agar base (Oxoid) supplemented with 5% sheep erythrocytes. Five microliters of each suspension was streaked onto the plates and incubated at 22 and 37 °C for 24 h. The presence of a clear colourless zone surrounding the colonies indicated β -hemolytic activity (Gerhardt et al., 1981).

2.4.2. Proteolytic activity

Casein hydrolysis was tested on Mueller–Hinton agar (Oxoid) containing 10% (w/v) skimmed milk (Difco, Barcelona, Spain) by streaking 10 μl of each suspension onto the plates and incubating at 37 °C for 24 h. The presence of a transparent zone around the colonies indicated caseinase activity. Gelatinase was assayed by a radial diffusion method, as described by Gudmundsdóttir (1996), using 3% gelatine (Oxoid) in 1% agarose gel. Ten microliters of each suspension was placed in 4-mm-diameter wells cut into an agarose gel and incubated at 22 °C for 20 h. Then, the plates were immersed in a saturated ammonium sulphate solution at 70 °C to precipitate unhydrolysed gelatine. The presence of a transparent zone around the colonies indicated gelatinase activity.

2.4.3. Lipolytic activity

Lipase activity was determined by three different methods: (i) 10 μl of each suspension was placed into wells cut into 1% (w/v) agarose in phosphate buffer saline containing 1% L- α -lecithin (Sigma, Barcelona, Spain) and incubated at 37 °C for 48 h (Lee and Ellis, 1990); (ii) 10 μl of each suspension was streaked onto plates containing 0.5% tributyrin (Panreac, Barcelona, Spain) emulsified with 0.2% Triton X-100 and incubated at 37 °C for 24 h (Anguita et al., 1993). In both methods, the presence of a transparent zone around the colonies indicated lipase activity; (iii) 5 μl of the suspension was streaked onto resazurine–butter agar and incubated at 37 °C for 24 h; the presence of pink

colonies indicated lipase activity (Amador-López et al., 1993).

2.4.4. Nuclease activity

Extracellular nucleases (DNases) were determined on DNase agar plates (Difco) with 0.005% methyl green. Five microliters of each suspension was streaked onto the plates and incubated at 37 °C for 24 h. A pink halo around the colonies indicated nuclease activity.

2.4.5. Congo red dye uptake

The ability to take up Congo red dye was determined on agar plates supplemented with 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ of Congo red dye. Five microliters of each suspension was streaked onto the plates and incubated at 37 °C for 24 h. Orange colonies were considered positive, different intensities in the dye uptake were expressed as + and ++ (Paniagua et al., 1990).

2.4.6. HEP-2 cell adherence assay

The HEP-2 cell adherence assay was performed as described by Cravioto et al. (1979) and Carrello et al. (1988). All strains were tested in duplicate. The following strains were included as positive controls: *Escherichia coli* E1550 (aggregative adherence AA), *E. coli* E23 (localise adherence AL), *E. coli* E4976 (diffuse adherence AD), *Aeromonas veronii* bv. sobria BC 88 and *Aeromonas caviae* CA25 (aggregative adherence) (Brown et al., 1997; Kirov et al., 2000).

2.5. Genetic detection of virulence genes

The presence of genes encoding for aerolysin/hemolysin, extracellular lipases (*lip*, *lipH3*, *pla*, *plc* and the GCAT); serine protease and DNase was determined by polymerase chain reaction (PCR) using primers and conditions already published (Soler et al., 2002).

2.6. Antimicrobial susceptibility

The resistance of all strains to different antimicrobial agents was determined by the disk diffusion method (Becton Dickinson, Microbiology Systems, MD, USA) as described (NCCLS, 1999). The antibiotics and concentration ranges tested were as follows: amikacin (30 μg), nalidixic acid (30 μg),

Table 1

Comparison of the biochemical and genetic identification (16S rDNA-RFLP) of 82 presumptive *Aeromonas* spp. isolated from frozen fish

Genetic identification	Biochemical identification				
	<i>A. hydrophila</i> , <i>n</i> = 17	<i>A. salmonicida</i> , <i>n</i> = 29	<i>A. caviae</i> , <i>n</i> = 14	<i>A. veronii</i> bv. <i>sobria</i> , <i>n</i> = 11	<i>A. eucrenophila</i> , <i>n</i> = 11
<i>A. hydrophila</i> , <i>n</i> = 2	1				1
<i>A. salmonicida</i> , <i>n</i> = 52	11	19	9	6	7
<i>A. veronii</i> bv. <i>sobria</i> , ^a <i>n</i> = 4	1	1		2	
<i>A. bestiarum</i> , <i>n</i> = 16	4	7	2	3	
<i>A. encheleia</i> , <i>n</i> = 3					3
Other genera, <i>n</i> = 5		2	3		

^a Strains identified by 16S rDNA-RFLP as *A. veronii* were further identified biochemically to determine the biotypes.

ampicillin (10 µg), carbenicillin (100 µg), cephalothin (30 µg), cefotaxime (30 µg), cefuroxime (30 µg), ciprofloxacin (5 µg), clindamycin (2 µg), chloramphenicol (30 µg), erythromycin (15 µg), streptomycin (10 µg), gentamicin (10 µg), imipenem (10 µg), kanamycin (30 µg), neomycin (30 µg), nitrofurantoin (100 µg), penicillin (10 U), piperacillin (100 µg), polymyxin B (300 U), rifampicin (5 µg), tetracycline (30 µg) and trimethoprim–sulfamethoxazol (25 µg). The resistance breakpoints were those defined by the National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS, 1999) for Gram-negative bacteria. *E. coli* (ATCC 25922), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), *Aeromonas hydrophila* (ATCC 7966^T), *Aeromonas sobria* (ATCC 42979^T) and *A. caviae* (ATCC 15468^T) were used as controls.

3. Results

The 82 strains were identified by Vitek as: *A. hydrophila* (46), *A. caviae* (25) and *A. veronii* (11). The same strains were reidentified by 14 biochemical

tests chosen from those described by [Altwegg \(1999\)](#) and the distribution of species was the following: 17 *A. hydrophila*, 29 *Aeromonas salmonicida*, 14 *A. caviae*, 11 *A. veronii* bv. *sobria* and 11 *Aeromonas eucrenophila* (Table 1). After genetic identification, the distribution of species obtained was: 52 *A. salmonicida*, 16 *Aeromonas bestiarum*, 4 *A. veronii* bv. *sobria*, 2 *A. hydrophila*, 3 *Aeromonas encheleia* and five strains had RFLP patterns of other genera (Table 1).

Results of the detection by PCR of the selected genes encoding putative virulence factors and their related phenotypic activity are shown in Table 2. The glycerophospholipid-cholesterol acyltransferase (GCAT) gene was present in all the strains. The genes for aerolysin/hemolysin, lipases, serine protease, and DNase were present in 96%, 97%, 96%, and 90% of the strains, respectively. All strains showed lipase activity with the three methods employed. However, protease activity was different when evaluated with the caseinase test (61%) than with gelatinase (96%). All strains were positive for uptake of Congo red, although with a different intensity, as 45.1% of them produced orange colonies and 54.9%

Table 2

Incidence of virulence genes and phenotypic expression (%) in *Aeromonas* spp. isolated from frozen fish

Identification 16S rDNA-RFLP	Aerolysin/ hemolysin genes	β-Hemolysis sheep blood		GCAT genes	Lipases <i>lip</i> , <i>lipH3</i> , <i>pla</i> , <i>plc</i> genes	Lipase test ^a	Serine protease genes	Caseinase test	Gelatinase test	DNase genes	DNase test
		22 °C	37 °C								
<i>A. hydrophila</i> , <i>n</i> = 2	100	100	100	100	100	100	100	50	100	100	100
<i>A. bestiarum</i> , <i>n</i> = 16	87	93	93	100	100	100	100	87	100	93	100
<i>A. salmonicida</i> , <i>n</i> = 52	98	94	94	100	98	100	100	50	98	84	100
<i>A. veronii</i> bv. <i>sobria</i> , <i>n</i> = 4	100	100	100	100	75	100	50	100	100	75	100
<i>A. encheleia</i> , <i>n</i> = 3	100	0	0	100	100	100	100	66	66	100	100
All the strains	96	90	90	100	97	100	96	61	96	90	100

^a Equal response was found with the three methods (1% L-α-lecithin, 0.5% tributyrin and resazurine–butter agar).

Table 3
Percentage antimicrobial resistance of *Aeromonas* spp. isolated from frozen fish

Antibiotic	<i>A. hydrophila</i> , n = 2	<i>A. salmonicida</i> , n = 52	<i>A. bestiarum</i> , n = 16	<i>A. veronii</i> bv. sobria, n = 4	<i>A. encheleia</i> , n = 3	Resistant strains (%)
Ampicillin	100	100	100	100	100	100
Penicillin	100	100	100	100	100	100
Piperacillin	0	15.3	25	75	0	19.4
Carbenicillin	100	100	100	100	100	100
Imipenem	50	3.8	19	50	0	10.3
Cephalothin	100	100	100	100	100	100
Cefotaxime	0	0	0	0	0	0
Cefuroxime	0	0	0	0	0	0
Amikacin	0	23	31	25	0	23
Streptomycin	100	71	69	100	100	75.3
Gentamicin	0	69	38	75	0	58.4
Kanamycin	0	34.5	19	25	0	28.5
Erythromycin	50	57.6	44	25	100	54.5
Nalidixic acid	0	0	0	0	0	0
Ciprofloxacin	0	50	25	50	0	41.5
Clindamycin	100	100	100	100	100	100
Chloramphenicol	0	7.6	18.7	0	0	9
Neomycin	0	46	44	0	0	40.2
Nitrofurantoin	0	0	0	0	0	0
Polymyxin B	100	86.4	81	75	100	85.7
Rifampicin	100	48	75	50	100	57.1
Tetracycline	0	57.6	56	50	67	44.1
Trimethoprim–sulfamethoxazol	50	46	63	25	67	49.3

reddish orange colonies. All strains showed clear adherence to HEP-2 cells in a typically aggregative pattern (AA).

The resistance patterns obtained with the 77 *Aeromonas* strains against 23 antibiotics are shown in Table 3. All strains showed 100% of resistance to ampicillin, carbenicillin, cephalothin, clindamycin, and penicillin. In addition, the highest resistances encountered were 85.7% to polymyxin B, 75.3% to streptomycin, 58.4% to gentamicin, 57.1% to rifampicin, 54.5% to erythromycin, while the rest were under 50%. In contrast, all the strains were susceptible to nalidixic acid, cefotaxime, cefuroxime and nitrofurantoin.

4. Discussion

Molecular identification by the 16S rDNA-RFLP method (Borrell et al., 1997; Figueras et al., 2000) demonstrated that the most prevalent species in frozen fish were *A. salmonicida* (67.5%) and *A. bestiarum* (20.8%), accounting for 88.3% of the isolates, while

the other strains belonged to the species *A. veronii* (5.2%), *A. encheleia* (3.9%) and *A. hydrophila* (2.6%). Hänninen et al. (1997) also reported *A. salmonicida* and *A. bestiarum* as the most prevalent species in fish.

There were discrepancies on the identification results from the 14 tests selected from those proposed by Altwegg (1999) when compared with those obtained with the genetic method because none of the *A. caviae* strains identified corresponded to this species. In fact, of the 82 strain, only 77 belonged to *Aeromonas* spp. and only 28.5% of strains were correctly identified biochemically (1/2 strains of *A. hydrophila*, 2/4 *A. veronii* and 19/52 *A. salmonicida*). These data highlight the discrepancies between biochemical and molecular methods, although the former methods are very inaccurate, as stated by other authors (Borrell et al., 1997).

A. salmonicida has been classically considered a fish pathogen able to develop furunculosis in salmonids, eels, rainbow trout and trout (Austin and Austin, 1993; Austin and Adams, 1996; Sørum et al., 2000; Garduño et al., 2000), but it has also been isolated from other varieties of healthy fish (Frerichs et al.,

1992; Wiklund and Dalsgaard, 1998). This species includes psychrophilic nonmotile bacteria as well as mesophilic bacteria (Janda et al., 1996). All *A. salmonicida* strains investigated were isolated at 37 °C and 79% of them were motile (data not shown). Other species such as *A. hydrophila*, *A. veronii* bv. *sobria*, *A. bestiarum* and *Aeromonas jandaei* have been described in other studies (González et al., 2001). The isolates used in this study were obtained from apparently healthy fresh water fish sold frozen in markets in Mexico D.F. It has been suggested that the fish either harbours the pathogen at the time of capture or become infected during transport (Wiklund and Dalsgaard, 1998). The possibility of spoilage by *Aeromonas* was confirmed by González et al. (2001) in iced wild freshwater fish. Studies on apparently healthy fish have shown that *A. hydrophila* and *A. sobria* are the most frequently isolated species (Santos et al., 1988) in contrast to our findings. The explanation for this disagreement could be that many studies rely on biochemical identification schemes which are not as accurate as genetic identification systems (Borrell et al., 1997; Figueras et al. 2000). Since most studies on *Aeromonas* in fish use these phenotypic techniques, data available on the prevalence of the species are not useful for comparison (Neyts et al., 2000).

The enteropathogenicity of *Aeromonas* spp. has been attributed to the production of exoenzymes, exotoxins and adhesins, although the importance and exact mechanism of each factor associated to the virulence has not been well established (Pemberton et al., 1997). Our results showed that the genes encoding aerolysin/hemolysin, serine protease, extracellular lipases (*lip*, *lipH3*, *pla*, *plc* and GCAT) and extracellular nucleases in strains of frozen fish were highly prevalent, and in addition, practically all the strains showed phenotypic activity. The species *A. bestiarum* and *A. salmonicida* had a high occurrence of aerolysin/hemolysin genes, and the strains were also found to be β -hemolytic. The presence of the mentioned genes in these species has already been reported by other authors (Kingombe et al. 1999; Chacón et al., submitted for publication). The three strains of *A. encheleia* tested did not show β -hemolytic activity but were PCR positive for aerolysin/hemolysin gene; these data is in agreement with those obtained by Chacón et al. (submitted for publication).

The lipases are considered important for bacterial nutrition (Pemberton et al., 1997), although they also have a role in virulence since insertion mutants for the lipase gene *plc* reduces the lethal dose (LD₅₀) in mice and fish (Merino et al., 1999). In the present study, the *A. veronii* bv. *sobria* was the species with the least presence of lipase genes (75%). Lipolytic activity evaluated either with resazurine–butter medium, α -lecithin and tributyrin test showed an equal response for all strains. Thereafter, we recommend the latter method because it is easier to perform and to interpret.

The proteolytic activity of *A. hydrophila* has been correlated with its ability to induce pathology in fish (Austin and Adams, 1996). In the present study, the proteolytic activity of the isolates was evaluated by determining caseinase and gelatinase production. We found similar percentage of serine protease genes (97%) and gelatinase activity (96%), although only 61% of the strains produced caseinase. The caseinase test seemed to be the least useful for evaluating protease activity and subsequently we recommended the use of gelatinase instead.

The DNase genes were detected in 83% of the strains, although DNase activity was observed in all the strains tested. This may indicate that there may be other DNase genes not targeted by our primers that may be responsible for the activity.

The virulence of several enteropathogenic bacteria such as *Yersinia enterocolitica* (Farmer et al., 1992), *Edwardsiella tarda* (Ling et al., 2000), *Vibrio cholerae* (Nataro and Kaper, 1998), enteroinvasive *E. coli* and *Shigella flexneri* (Rico-Martinez, 1995; Nataro and Kaper, 1998) has been correlated with the ability of the isolates to take up Congo red dye. Ishiguro et al. (1985) suggested that this test may also be a good virulence marker of *A. salmonicida*, although this has been questioned by other authors (Ellis et al., 1988). All strains studied showed the ability for binding Congo red in agreement with data reported by other authors in *Aeromonas* (Statner and George, 1987; Palumbo et al., 1989; Paniagua et al., 1990). It has been suggested that siderophores produced by *Aeromonas* spp. could be responsible for the uptake of Congo red (Santos et al., 1999).

In our study, all strains, independent of the species, showed an aggregative type of adherence to HEp-2 cells, in agreement with that described for *A. caviae* (Thornley et al., 1994). It has been reported that this

phenomenon could be due to the presence of type IV pilus adhesins (Thornley et al., 1994; Kirov et al., 2000). A diffused and localised type of adherence on HEp-2 cells was reported for *A. hydrophila* (Bartkova and Ciznar, 1994).

Most strains were 100% resistant to β -lactam antibiotics, with the exception of imipenem (10.3%), piperacillin (19.4%) and second and third generation cephalosporins (cefuroxime and cefotaxime). The strains also showed 100% sensitivity to first generation quinolones (nalidixic acid) and nitrofurantoin. In general, our results are consistent with data reported by other authors for clinical strains (Morita et al., 1994; Ko et al., 1996). Dalsgaard et al. (1994) found that strains of *A. salmonicida* isolated from different geographical areas were 100% susceptible to ampicillin, cephalotin, chloramphenicol, neomycin, polymyxin B and rifampicin. We found that strains of *A. salmonicida* showed a different degree of resistance to these antibiotics, ranging from 7.6% to 100%. It is worth mentioning that susceptibility to ampicillin described by these authors is not common in *Aeromonas*, with the exception of *Aeromonas trota* (Carahan et al., 1991). Strains of *Aeromonas* isolated from rivers (Goñi-Urriza et al., 2000) showed 59% resistance against nalidixic acid while we encountered no resistance at all (0%). In addition, these authors found 14% resistance to tetracycline and 1% to gentamicin against 44% and 53.4%, respectively, in our strains. A 100% sensitivity to amikacin, ciprofloxacin, chloramphenicol, gentamicin, imipenem and kanamycin was found in a study that included a broad number of clinical and environmental strains (Kämpfer et al., 1999), in contrast to the resistance to ciprofloxacin and gentamicin found here. Also in a previous study analyzing 43 clinical strains of *A. hydrophila*, *A. caviae* and *A. veronii*, between 93% and 100% of them were susceptible to gentamicin and 100% of them to ciprofloxacin (Vila et al., 2002) against 58.4% and 41.5% found in our strains, respectively. Our results show that the first generation quinolones, second and third generation cephalosporins are the drugs with the best antimicrobial effect against *Aeromonas* spp., in agreement with data reported by other authors (Motyl et al., 1985; Ko et al., 1996; Kämpfer et al., 1999; Vila et al., 2002). Therefore, these drugs could be the treatment of choice for extraintestinal infections, and also for

patients with chronic diarrhoea caused by *Aeromonas* spp. including *A. salmonicida* and *A. bestiarum*. These species, although normally considered environmental, have also been involved in human clinical infections (Figueras et al., 1999), although their antimicrobial pattern in genetically identified strains was unknown.

The present work highlights an important incidence of *Aeromonas* spp. in frozen fish intended for human consumption in Mexico City. The high presence of virulence factors and antimicrobial resistance detected in these strains should not be underestimated. In conclusion, frozen fish, such as the one studied here which is consumed raw, may be an important reservoir for *Aeromonas* spp., and be of public health significance.

Acknowledgements

This work has been supported by: CGPI 200468 and CGPI 990290 from the Instituto Politécnico Nacional, Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, México; FIS 99/0944 and FIS 96/0579 from Spanish Ministry of Health; from CIRIT (SGR 1999/00103) and from the Fundació Ciència i Salut. We would like to thank: Graciela Margarita Lugo from the Veterinary Microbiology Laboratory, Escuela Nacional de Ciencias Biológicas (México); Dr. S. Kirov from University of Tasmania Clinical School (Australia); Dr. M. Janda from the Department of Health Service Berkeley (California) and Colección Española de Cultivos Tipo (CECT) for kindly providing isolates.

References

- Altwegg, M., 1999. *Aeromonas* and *Plesiomonas*. In: Murray, P.R., Baron, E.J., Tenover, F.C., Tenover, R.H. (Eds.), Manual of Clinical Microbiology, 7a ed. American Society for Microbiology, Washington, DC, pp. 507–516.
- Altwegg, M., Martinetti Lucchini, G., Lüthy-Hottenstein, J., Rohrbach, M., 1991. *Aeromonas*-associated gastroenteritis after consumption of contaminated shrimp. Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. 10, 44–45.
- Amador-López, R., Fernández-Redón, E., Rodríguez-Montaña, R., 1993. Manual de Laboratorio de Microbiología Sanitaria, 2a ed. Escuela Nacional de Ciencias Biológicas. Instituto Politécnico Nacional, México, DF.
- Anguita, J., Rodríguez-Aparicio, L.B., Naharro, G., 1993. Puri-

- fication, gene cloning, amino acid sequence analysis, and expression of an extracellular lipase from an *Aeromonas hydrophila* human isolate. *Appl. Environ. Microbiol.* 59, 2411–2417.
- Austin, B., Adams, C., 1996. Fish pathogens. In: Austin, B., Altwegg, M., Gosling, P.J., Joseph, S. (Eds.), *The Genus Aeromonas*. Wiley, Chichester, pp. 198–243.
- Austin, B., Austin, D.A., 1993. *Aeromonadaceae* representatives *Aeromonas salmonicida*. In: Austin, B., Austin, A. (Eds.), *Bacterial Fish Diseases: Disease in Farmed and Wild Fish*. Ellis Horwood, Chichester, pp. 86–170.
- Bartkova, G., Ciznar, I., 1994. Adherence pattern of non-piliated *Aeromonas hydrophila* strains to tissue culture. *Microbios* 77, 47–55.
- Borrell, N., Acinas, S.G., Figueras, M.J., Martínez-Murcia, A.J., 1997. Identification of *Aeromonas* clinical isolates by restriction fragment length polymorphism of PCR-amplified 16S rRNA gene. *J. Clin. Microbiol.* 35, 1671–1674.
- Borrell, N., Figueras, M.J., Guarro, J., 1998. Phenotypic identification of *Aeromonas* genomospecies from clinical and environmental sources. *Can. J. Microbiol.* 40, 103–108.
- Brown, R.L., Sanderson, K., Kirov, S.M., 1997. Plasmids and *Aeromonas* virulence. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 17, 217–223.
- Carnahan, A.M., Behram, S., Joseph, S.W., 1991. Aerokey II: a flexible key for identifying clinical *Aeromonas* species. *J. Clin. Microbiol.* 29, 2843–2849.
- Carrello, A., Silburn, K.A., Budden, J.R., Chang, B.J., 1988. Adhesion of clinical and environmental *Aeromonas* isolates to HEp-2 cells. *J. Med. Microbiol.* 26, 19–27.
- Chacón, M.R., Figueras, M.J., Castro-Escarpulli, G., Soler, L., Guarro, J., 2003. Distribution of virulence genes in clinical and environmental isolates of *Aeromonas* spp. *Antonie van Leeuwenhoek* (submitted for publication).
- Cravioto, A., Gross, R.J., Scotland, S.M., Rowe, B., 1979. An adhesive factor found in strains of *Escherichia coli* belonging to the traditional infantile enteropathogenic serotypes. *Curr. Microbiol.* 3, 95–99.
- Dalsgaard, I., Nielsen, B., Larsen, J.L., 1994. Characterization of *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida*: a comparative study of strains of different geographic origin. *J. Appl. Bacteriol.* 77, 21–30.
- Ellis, A.E., Burrows, A.S., Stapleton, K.J., 1988. Lack of relationship between virulence of *Aeromonas salmonicida* and the putative virulence factors. A-layer extracellular proteases and extracellular haemolysins. *J. Fish Dis.* 11, 309–323.
- Farmer, J.J., Carter, G.P., Miller, V.L., Falkow, S., Wachsmuth, I.K., 1992. Pyrazinamidase, CR-MOX agar, salicin fermentation–esculin hydrolysis, and D-xylose fermentation for identifying pathogenic serotypes of *Yersinia enterocolitica*. *J. Clin. Microbiol.* 30, 2589–2594.
- Figueras, M.J., Soler, L., Martínez-Murcia, A., Guarro, J., 1999. *Aeromonas bestiarum* and *A. salmonicida*, two closely related species of clinical significance. Sixth International *Aeromonas/Plesiomonas* Symposium, Chicago, USA. p. 17. Abstr. P2.
- Figueras, M.J., Soler, L., Chacón, M.R., Guarro, J., Martínez-Murcia, A.J., 2000. Extended method for discrimination of *Aeromonas* spp. by 16S rDNA-RFLP analysis. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 50, 2069–2073.
- Frerichs, G.N., Millar, S.D., McManus, C., 1992. Atypical *Aeromonas salmonicida* isolated from healthy wrasse (*Ctenolabrus rupestris*). *Bull. Eur. Assoc. Fish Pathol.* 12, 48–49.
- Garduño, R.A., Moore, A.R., Oliver, G., Lizama, A.L., Garduño, E., Kay, W.W., 2000. Host cell invasion and intracellular residence by *Aeromonas salmonicida*: role of the S-layer. *Can. J. Microbiol.* 46, 660–668.
- Gerhardt, P., Murray, R.G.E., Castilow, R.N., Nester, E.W., Wood, W.A., Krieg, N.R., Phillips, G.B., 1981. *Manual of Methods for General Bacteriology*. American Society for Microbiology, Washington, DC.
- Goñi-Urriza, M., Pineau, L., Capdepuy, M., Roques, C., Caumette, P., Quentin, C., 2000. Antimicrobial resistance of mesophilic *Aeromonas* spp. isolated from two European rivers. *J. Antimicrob. Chemother.* 46, 297–301.
- González, C.J., Santos, J.A., García-López, M.L., González, N., Otero, A., 2001. Mesophilic *Aeromonas* in wild and aquacultured freshwater fish. *J. Food Prot.* 64, 687–691.
- Gudmundsdóttir, B.K., 1996. Comparison of extracellular proteases produced by *Aeromonas salmonicida* strains, isolated from various fish species. *J. Appl. Bacteriol.* 80, 105–113.
- Hänninen, M.L., Oivanen, P., Hirvelä-Koski, V., 1997. *Aeromonas* species in fish, fish eggs, shrimp and freshwater. *Int. J. Food Microbiol.* 34, 17–26.
- Howard, S.P., MacIntyre, S., Buckley, J.T., 1996. Toxins. In: Austin, B., Altwegg, M., Gosling, P.J., Joseph, S. (Eds.), *The Genus Aeromonas*. Wiley, Chichester, pp. 267–281.
- Ishiguro, E.E., Ainsworth, T., Trust, T.J., Kay, W.W., 1985. Congo red agar, a differential medium for *Aeromonas salmonicida*, detects the presence of the cell surface protein array involved in virulence. *J. Bacteriol.* 164, 1233–1237.
- Janda, J.M., Abbott, S.L., 1998. Evolving concepts regarding the Genus *Aeromonas*: an expanding panorama of species, disease presentations, and unanswered questions. *Clin. Infect. Dis.* 27, 332–344.
- Janda, J.M., Abbott, S.L., Khashe, S., Kellogg, G.H., Shimada, T., 1996. Further studies on biochemical characteristics and serologic properties of the genus *Aeromonas*. *J. Clin. Microbiol.* 34, 1930–1933.
- Kämpfer, P., Christmann, C., Swings, J., Huys, G., 1999. In vitro susceptibilities of *Aeromonas* genomic species to 69 antimicrobial agents. *Syst. Appl. Microbiol.* 22, 662–669.
- Kingombe, C.I., Huys, G., Tonolla, M., Albert, M.J., Swings, J., Peduzzi, R., Jemmi, T., 1999. PCR detection, characterization and distribution of virulence genes in *Aeromonas* spp. *Appl. Environ. Microbiol.* 65, 5293–5302.
- Kirov, S.M., 1993. The public health significance of *Aeromonas* spp. in foods. *Int. J. Food Microbiol.* 20, 179–198.
- Kirov, S.M., Barnett, T.C., Pepe, C.M., Strom, M.S., Albert, M.J., 2000. Investigation of the role of type IV *Aeromonas pilus* (Tap) in the pathogenesis of *Aeromonas* gastrointestinal infection. *Infect. Immun.* 68, 4040–4048.
- Ko, W.C., Yu, K.W., Liu, C.H.Y., Huang, C.H.T., Leu, H.S., Chuang, Y.C.H., 1996. Increasing antibiotic resistance in clinical isolates

- of *Aeromonas* strains in Taiwan. Antimicrob. Agents Chemother. 40, 1260–1262.
- Ko, W.C., Lee, H.C., Chuang, Y.C., Liu, C.C., Wu, J.J., 2000. Clinical features and therapeutic implications of 104 episodes of monomicrobial *Aeromonas* bacteraemia. J. Infect. 40, 267–273.
- Krovacek, K., Faris, A., Baloda, S.B., Peterz, M., Lindberg, T., Mansson, I., 1992. Prevalence and characterization of *Aeromonas* spp. isolated from foods in Uppsala, Sweden. Food Microbiol. 9, 29–36.
- Lee, K.K., Ellis, A.E., 1990. Glycerophospholipid cholesterol acyltransferase complexed with lipopolysaccharide (LPS) is a major lethal exotoxin and cytotoxin of *Aeromonas salmonicida*: LPS stabilizes and enhances toxicity of the enzyme. J. Bacteriol. 172, 5382–5393.
- Ling, M.H.S., Wang, X.H., Xie, I., Lim, T.M., Leung, K.Y., 2000. Use of green fluorescent protein (GFP) to study the invasion pathways of *Edwardsiella tarda* in vivo and in vitro fish models. Microbiology 146, 7–19.
- Mano, S.B., Ordoez, J.A., García de Fernando, G.D., 2000. Growth/survival of natural flora and *Aeromonas hydrophila* on refrigerated uncooked pork and turkey packaged in modified atmospheres. Food Microbiol. 17, 657–669.
- Mateos, D., Anguita, J., Naharro, G., Paniagua, C., 1993. Influence of growth temperature on the production of extracellular virulence factors and pathogenicity of environmental and human strains of *Aeromonas hydrophila*. J. Appl. Bacteriol. 74, 111–118.
- Mattick, K.L., Donovan, T.J., 1998. The risk to public health of *Aeromonas* in ready-to-eat salad products. Commun. Dis. Public Health 1, 263–266.
- Merino, S., Rubires, X., Knochel, S., Tomás, J.M., 1995. Emerging pathogens: *Aeromonas* spp. Int. J. Food Microbiol. 28, 157–168.
- Merino, S., Aguilar, A., Nogueras, M.M., Regue, M., Swift, S., Tomás, J.M., 1999. Cloning, sequencing, and role in virulence of two phospholipases (A1 and C) from mesophilic *Aeromonas* sp. serogroup O:34. Infect. Immun. 67, 4008–4013.
- Morita, K., Watanabe, N., Kurata, S., Kanamori, M., 1994. β -Lactam resistance of motile *Aeromonas* isolates from clinical and environmental sources. Antimicrob. Agents Chemother. 38, 353–355.
- Motyl, M.R., Makinle, G., Janda, J.M., 1985. In vitro susceptibilities of *Aeromonas hydrophila*, *Aeromonas sobria* and *Aeromonas caviae* to 22 antimicrobial agents. J. Antimicrob. Chemother. 28, 151–153.
- Nataro, J.P., Kaper, J.B., 1998. Diarrheagenic *Escherichia coli*. Clin. Microbiol. Rev. 11, 142–201.
- National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS), 1999. Performance standards for antimicrobial disk and dilution susceptibility test for bacteria isolated from animals. Approved Standard M-31-T National Committee for Clinical Laboratory Standards, Wayne, PA.
- Neyts, K., Huys, G., Uyttendaele, M., Swings, J., Debevere, J., 2000. Incidence and identification of mesophilic *Aeromonas* spp. from retail foods. Lett. Appl. Microbiol. 31, 359–363.
- Palumbo, A.S., Bencivengo, M.M., Del Corral, F., Williams, A.C., Buchanan, R.L., 1989. Characterization of the *Aeromonas hydrophila* Group isolated from retail foods of animal origin. J. Clin. Microbiol. 27, 854–859.
- Paniagua, C., Rivero, O., Anguita, J., Naharro, G., 1990. Pathogenicity factors and virulence for rainbow trout (*Salmo gairdneri*) of motile *Aeromonas* spp. isolates from river. J. Clin. Microbiol. 28, 350–355.
- Pemberton, J.M., Kidd, S.P., Schmidt, R., 1997. Secreted enzymes of *Aeromonas*. FEMS Microbiol. Lett. 152, 1–10.
- Rico-Martinez, M.G., 1995. Molecular biology in the pathogenesis of *Shigella* sp. and enteroinvasive *Escherichia coli*. Rev. Latinoam. Microbiol. 37, 367–385.
- Santos, Y., Toranzo, A.E., Barja, J.L., Nieto, T.P., Villa, T.G., 1988. Virulence properties and enterotoxin production of *Aeromonas* strains isolated from fish. Infect. Immun. 56, 3285–3293.
- Santos, J.A., Gonzalez, C.J., Otero, A., García-López, M.L., 1999. Hemolytic activity and siderophore production in different *Aeromonas* species isolated from fish. Appl. Environ. Microbiol. 65, 5612–5614.
- Soler, L., Figueras, M.J., Chacón, M.R., Vila, J., Marco, F., Martínez-Murcia, A., Guarro, J., 2002. Potential virulence and antimicrobial susceptibility of *Aeromonas popoffii* recovered from freshwater and seawater. FEMS Immunol. Med. Microbiol. 32, 243–247.
- Sørum, H., Holstad, G., Lunder, T., Hastein, T., 2000. Grouping by plasmid profiles of atypical *Aeromonas salmonicida* isolated from fish with special reference to salmonid fish. Dis. Aquat. Org. 41, 159–171.
- Statner, B., George, W., 1987. Congo red uptake by motile *Aeromonas* species. J. Clin. Microbiol. 25, 876–878.
- Thornley, J.P., Eley, A., Shaw, J.G., 1994. *Aeromonas caviae* exhibits aggregative adherence to HEp-2 cells. J. Clin. Microbiol. 32, 2631–2632.
- Vila, J., Marco, F., Soler, L., Chacón, M.R., Figueras, M.J., 2002. In vitro antimicrobial susceptibility of clinical isolates of *Aeromonas caviae*, *Aeromonas hydrophila* and *Aeromonas veronii* biotype *sobria*. J. Antimicrob. Chemother. 49, 525–529.
- Wiklund, T., Dalsgaard, I., 1998. Occurrence and significance of atypical *Aeromonas salmonicida* in non-salmonid and salmonid fish species: a review. Dis. Aquat. Org. 32, 49–69.

IV. RESULTADOS

4.1. TAXONOMÍA

4.1.1. Identificación por métodos bioquímicos y moleculares

Objetivo concreto:

1. Ampliar el protocolo de identificación basado en los RFLP del gen 16S rRNA seleccionando y ensayando nuevas endonucleasas que permitan identificar de forma rápida y fiable todas las especies de *Aeromonas*, incluyendo las de más reciente descripción.

Artículo:

- 4.1.1.1. FIGUERAS M.J., SOLER L., CHACÓN M.R., GUARRO J. y MARTÍNEZ-MURCIA A.J. (2000c). Extended method for discrimination of *Aeromonas* spp by 16S rDNA-RFLP. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 50: 2069-2073.

Resumen:

El protocolo de RFLP del gen 16S rRNA propuesto en 1997 por Borrell y cols. para identificar las especies del género *Aeromonas* permitía identificar todas las especies del género a excepción de *A. bestiarum*, *A. salmonicida* y *A. popoffii*, esta última publicada también en 1997. Para ampliar éste protocolo y hacer posible la identificación de éstas tres especies, se simuló informáticamente la digestión de las secuencias del gen 16S rRNA de sus cepas tipo con diversas endonucleasas y se analizaron los patrones de restricción con el objeto de seleccionar aquellas endonucleasas capaces de producir patrones especie-específicas para estas especies. Inicialmente se seleccionaron las endonucleasas *NarI*, *SfaNI*, *PstI*, *HaeIII* y *AlwNI* para evaluarlas experimentalmente en 30 cepas de *A. bestiarum*, 20 cepas de *A. salmonicida* y 16 cepas de *A. popoffii*, obteniéndose para todas el patrón esperado. Las especies *A. bestiarum* y *A. salmonicida* se separaron utilizando las endonucleasas *NarI* y *SfaNI* o *PstI*, mientras que para separar la especie *A. popoffii* se utilizaron las endonucleasas *NarI*, *HaeIII* y *AlwNI*, proponiéndose por lo tanto, ésta ampliación del

protocolo de Borrell y cols. (1997) para la identificación de todas las especies del género.

Objetivo concreto:

2. *Evaluar comparativamente la eficacia de los métodos bioquímicos miniaturizados BBL Crystal y MicroScan para la identificación de las especies de Aeromonas, comparando sus resultados con los obtenidos por la técnica de los RFLP del gen 16S rRNA.*

Artículo:

- 4.1.1.2. SOLER L., MARCO F., VILA J., CHACÓN M.R., GUARRO J. y FIGUERAS M.J. Evaluation of two miniaturized systems, MicroScan W/A and BBL Crystal E/NF, for the identification of clinical isolates of *Aeromonas* spp. (En preparación).

Resumen:

Se han evaluado dos sistemas de identificación bacteriana (BBL Crystal E/NF y MicroScan W/A) comúnmente utilizados en clínica para la identificación de *Aeromonas* spp. Ésta evaluación se realizó con 22 cepas tipo y de referencia que incluían todas las especies del género y 52 cepas clínicas pertenecientes a las especies *A. hydrophila*, *A. bestiarum*, *A. salmonicida*, *A. caviae*, *A. media*, *A. veronii* y *A. jandaei*, todas ellas previamente identificadas con la técnica de los RFLP del gen 16S rRNA. Se demostró que el sistema MicroScan W/A sólo era capaz de identificar correctamente a nivel de especie el 19.3% de las cepas y el sistema BBL Crystal el 26.9%. Además, el BBL Crystal y el MicroScan, respectivamente, identificaron incorrectamente el 71.4% y el 85.7% de las cepas como *A. hydrophila*. También es importante destacar que el MicroScan y el BBL Crystal confundieron respectivamente el 21.6% y el 8.1% de las cepas de *Aeromonas* con otros géneros, y en especial con el género *Vibrio*. El MicroScan confundió un 10.8% de las cepas con *Vibrio fluvialis*, y el BBL Crystal el 2.7% de estas con *Vibrio cholerae*.

Objetivo concreto:

3. *Diseñar una sonda específica para la identificación de las colonias de Aeromonas en cultivos primarios.*

Artículo:

- 4.1.1.3. CHACÓN M.R., CASTRO-ESCARPULLI G., SOLER L., GUARRO J. y FIGUERAS M.J. (2002). A DNA probe specific for *Aeromonas* colonies. *Diagnostic Microbiology and Infectious Diseases*, 44: 221-225.

Resumen:

Se ha diseñado una sonda de DNA específica para el género *Aeromonas* basada en un fragmento de 237 pb del gen que codifica para la glicerofosfolípido-colesterol aciltransferasa. Esta sonda, marcada con digoxigenina, se ensayó inicialmente en 13 cepas de *Vibrio* spp. y en tres cepas de *Aeromonas* mediante la técnica del *colony blot* a distintas temperaturas (56°C, 58°C, 60°C, 62°C y 65°C). Con este experimento se pretendía establecer la temperatura óptima de hibridación, ya que hasta los 58°C se obtenía señal positiva para la mayoría de cepas de *Vibrio*, aunque dos cepas produjeron señal hasta los 60°C y una hasta los 62°C. La temperatura de 65°C fue por lo tanto la elegida como más específica. Estas condiciones se ensayaron frente a 16 cepas tipo y de referencia de *Aeromonas* sp. y 20 cepas tipo y de referencia de los géneros *Vibrio*, *Escherichia*, *Pseudomonas*, *Salmonella*, *Shigella*, *Plesiomonas* y *Yersinia*, y se comprobó que la sonda sólo hibridaba con las especies del género *Aeromonas* pero no con cepas de otras bacterias enteropatógenas. Estos resultados eran coincidentes en cualquiera de los medios de cultivo ensayados (MacConkey, SS, agar sangre y Hecktoen).

4.1.2. Estudio de especies taxonómicamente complejas

Objetivos concretos:

4. Intentar esclarecer la taxonomía de las especies del complejo fenotípico "*A. hydrophila*" y en especial de *A. bestiarum*, *A. salmonicida* y *A. popoffii* mediante métodos fenotípicos y moleculares.

Artículo:

- 4.1.2.1. SOLER L., YÁNEZ M.A., CHACÓN M.R., GUARRO J., MARTÍNEZ-MURCIA A. J. y FIGUERAS M. J. (2003). A molecular and phenotypic approach to the taxonomy of the "*Aeromonas hydrophila*" complex. *Journal of Applied Microbiology* (Sometido).

Resumen:

El complejo fenotípico "*A. hydrophila*" incluye a las especies *A. hydrophila* (HG1), *A. bestiarum* (HG2), *A. salmonicida* (HG3) y *A. popoffii*. La especie *A. bestiarum* se describió en 1996 (Ali y cols., 1996) a pesar del elevado porcentaje de hibridación DNA-DNA que esta presenta respecto a las especies *A. hydrophila* y *A. salmonicida* (78% y 71% a 60°C, 65% y 62% a 75°C respectivamente). Además *A. bestiarum* presenta una secuencia del gen 16S idéntica a la de las secuencias de *A. salmonicida* subsp. *masoucida* y *A. salmonicida* subsp. *achromogenes* (Martínez-Murcia y cols., 1992a).

En el presente estudio se analizaron 116 cepas pertenecientes a las cuatro especies que integran el complejo fenotípico "*A. hydrophila*". El resultado de la identificación de las cepas mediante los patrones de RFLP del gen 16S rRNA puso de manifiesto que sólo un 40% de las cepas analizadas de las especies *A. bestiarum* y *A.*

salmonicida presentaban el patrón típico esperado (2 bandas de 1005 pb y 497 pb para *A. bestiarum* y 1 banda de 1502 pb para *A. salmonicida*), mientras que el 60% restante presentaban un patrón que incluía las bandas esperadas de las dos especies simultáneamente (1502 pb, 1005 pb y 497 pb). La secuenciación de un fragmento de 560 pb que contiene las posiciones variables (1011 y 1018 pb) del gen 16S rRNA para ambas especies, ratificó estos resultados, observándose que dichas cepas compartían operones ribosómicos por lo que fueron identificadas como *A. bestiarum/A. salmonicida*.

Se investigó la relación filogenética de las cepas mediante el análisis de los patrones obtenidos con la técnica del 16S-23S ISR-RFLP. El dendograma obtenido puso de manifiesto la existencia de dos grandes grupos, el primero contenía las cepas pertenecientes a la especie *A. popoffii*, y el segundo se subdividía en dos grupos, uno con las cepas de la especie *A. hydrophila*, y otro con las cepas identificadas genéticamente como *A. bestiarum*, *A. bestiarum/A. salmonicida* y *A. salmonicida*.

La caracterización bioquímica de las cepas con 17 pruebas bioquímicas, indicó que la utilización del DL-lactato era capaz de diferenciar *A. popoffii* de *A. bestiarum* y *A. salmonicida*, pero no de *A. hydrophila*, y que ninguna de las pruebas bioquímicas era capaz de separar inequívocamente *A. bestiarum* de *A. salmonicida*. Tampoco la temperatura definida para estas dos últimas especies permitió separarlas, ya que la mayoría de cepas estudiadas crecían indistintamente a $21\pm 1^{\circ}\text{C}$ y a 30°C . La hidrólisis de la esculina también era una prueba útil para diferenciar a *A. popoffii* del resto de especies del complejo fenotípico "*A. hydrophila*". Además se comprobó que la producción de pigmento marrón, el indol, la movilidad, así como ninguna de las pruebas bioquímicas recomendadas, eran características útiles para la diferenciación de las subespecies de *A. salmonicida*.

Artículo:

- 4.1.2.2. SOLER L., YAÑEZ A., CHACÓN M.R., AGUILERA-ARREOLA M.G., CATALAN V., FIGUERAS M.J. y MARTÍNEZ-MURCIA A.J. Phylogenetic analysis of the genus *Aeromonas* based on two housekeeping genes. (En preparación).

Resumen:

Actualmente el *Ad-hoc committee* requiere que para la definición de nuevas especies bacterianas se analicen, a parte del comportamiento bioquímico, el porcentaje de hibridación DNA-DNA, la secuenciación del gen 16S rRNA y las secuencias de cinco genes que codifiquen para funciones esenciales. Es por este motivo que se estudiaron los genes *gyrB* y *rpoD* para investigar las relaciones filogenéticas del género *Aeromonas* y en especial de *A. bestiarum* y *A. salmonicida*, ya que ninguno de los métodos utilizados permitió concluir si estas especies correspondían o no a un único taxón.

Para ello se secuenció un fragmento de ca. 820 pb del gen *rpoD* y ca. 1100 pb del gen *gyrB* (que representan respectivamente el 45.7% y el 45.8% de estos genes completos), en un total de 74 cepas, incluidas las cepas tipo, pertenecientes a todas las especies del género, y entre ellas, 7 cepas que en base a los RFLP del gen 16S rRNA habían sido identificadas como *A. bestiarum*, 8 que habían sido identificadas como *A. salmonicida* y 15 cepas que habían sido identificadas como *A. bestiarum/A. salmonicida*. El análisis filogenético, de las cepas tipo de todas las especies del género con el gen *rpoD*, concordó para la mayoría de especies con el obtenido con los genes 16S rRNA y *gyrB*. Cuando se analizaron las especies *A. bestiarum* y *A. salmonicida* se evidenció, que en base al gen *rpoD*, se formaban dos grupos bien diferenciados filogenéticamente. Un primer grupo englobaba la mayoría de cepas de *A. salmonicida*, las cepas de referencia de sus subespecies y un grupo de 15 cepas identificadas por la técnica de los RFLP del gen 16S rRNA mayoritariamente como *A. bestiarum/A. salmonicida* (n=13), una como *A. bestiarum* y otra como *A. salmonicida*. El segundo grupo incluía la cepa tipo de la especie *A. bestiarum* junto con dos de las cepas

incluidas en la descripción de esta especie y 4 cepas identificadas, dos como *A. bestiarum* y dos como *A. bestiarum/A. salmonicida*. Esta misma estructura se mantenía en el dendograma *gyrB* y en el dendograma combinado con ambos genes. Al intentar establecer si estas agrupaciones de *A. bestiarum* y *A. salmonicida* guardaban alguna relación con el comportamiento bioquímico de las cepas incluidas en cada uno de estos grupos, se comprobó que las cepas pertenecientes al grupo que incluía todas las cepas de referencia para *A. salmonicida* eran mayoritariamente negativas a la ramnosa (86.4%) y positivas para el sorbitol (63.6%), mientras que las cepas que se incluían en el grupo de *A. bestiarum* presentaban un comportamiento inverso (85.7% positivas a la ramnosa y 100% negativas al sorbitol).

4.2. SENSIBILIDAD A LOS AGENTES ANTIMICROBIANOS

Objetivo concreto:

5. *Determinar la sensibilidad a los agentes antimicrobianos de cepas de Aeromonas de origen clínico, ambiental y aisladas de peces.*

Artículo:

4.2.1. VILA J., MARCO F., SOLER L., CHACÓN M.R. y FIGUERAS M.J. (2002). In vitro antimicrobial susceptibility of clinical isolates of *Aeromonas caviae*, *Aeromonas hydrophila* and *Aeromonas veronii* biotype sobria. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 49: 701-702.

Resumen:

Se determinó la respuesta frente a 24 agentes antimicrobianos, utilizando el método comercial Dade-MicroScan con los paneles Combo Urine IS (Dade Behring), en 23 cepas de *Aeromonas* de origen intestinal y extraintestinal pertenecientes a las especies de mayor incidencia en clínica (*A. hydrophila*, *A. caviae* y *A. veronii*). Todas las cepas fueron resistentes a la ampicilina, observándose además que la piperacilina era más activa que la ticarcilina. Cuando se analizó la respuesta a las cefalosporinas, se observó que todas presentaban una buena actividad frente a las cepas ensayadas a excepción de la cefazolina, la cual fue más activa frente a *A. veronii* (79%) que frente a *A. caviae* (53%) y *A. hydrophila* (40%). En cuanto a los aminoglucósidos, la gentamicina y la amikacina fueron más activas que la tobramicina. Respecto a la respuesta a las quinolonas, se puso de manifiesto que todas las cepas ensayadas eran sensibles al ofloxacino y ciprofloxacino, sin embargo el 26% de las cepas de *A. caviae*, el 20% de las de *A. hydrophila* y el 88% de las de *A. veronii* eran resistentes al ácido nalidíxico y al ácido pipemídico.

Objetivo concreto:

6. *Estudiar retrospectivamente, en colaboración con la Unidad de Medicina Tropical del Hospital Clínico de Barcelona, la incidencia de las distintas especies de Aeromonas en la diarrea del viajero.*

Artículo:

- 4.2.2. VILA J., RUIZ J., GALLARDO F., VARGAS M., SOLER L., FIGUERAS M.J. y GASCON J. (2003). *Aeromonas* spp. and traveler's diarrhea: Clinical features and antimicrobial resistance. *Emerging Infectious Diseases*, 9: 552-555.

Resumen:

El análisis retrospectivo de los datos clínicos de 863 pacientes que presentaban diarrea del viajero (atendidos en la Unidad de Medicina Tropical del Hospital Clínico de Barcelona durante el periodo Enero de 1999 – Diciembre de 2001) indicó que poseían como síntomas comunes: presencia de diarrea acuosa y persistente, fiebre y calambres abdominales. También se evidenció que en 18 de los pacientes (2%), *Aeromonas* era el agente causante de la diarrea. Las 18 cepas correspondientes a estos pacientes, una vez identificadas genéticamente, se correspondieron a: *A. veronii* bt sobria (50%), *A. caviae* (38.8%), *A. jandaei* (5.6%) y *A. hydrophila* (5.6%). En tres de estos casos *Aeromonas* se aisló junto con otros enteropatógenos tales como *Shigella sonnei*, *Giardia lamblia* y *Salmonella typhimurium*. Además se observó que no existían diferencias entre el continente visitado (África, América o Asia) y la distribución de especies de *Aeromonas*, aunque en los pacientes que habían visitado la India se aisló una mayor diversidad de especies (*A. veronii* bt sobria, *A. caviae*, *A. jandaei* y *A. hydrophila*).

Para dar respuesta al objetivo anterior (objetivo 5) se investigó la respuesta de estas cepas frente a siete agentes antimicrobianos. Se observó que todas las cepas eran resistentes a la ampicilina pero sensibles a la cefotaxima, ciprofloxacino y ácido nalidixico. El 71% de las de *A. caviae* y el 66% de las cepas de *A. veronii* bt sobria fueron sensibles al cloramfenicol, mientras que respectivamente un 71% y un 55% de

las cepas de estas especies lo fueron a la tetraciclina. Un elevado número de cepas de estas especies fueron sensibles al trimetoprim-sulfametoxazol (100% de *A. caviae* y 77% de *A. veronii* bt sobria).

4.3.TÉCNICAS DE TIPADO MOLECULAR

Objetivo concreto:

7. *Evaluar comparativamente diversos métodos de tipado molecular (ERIC-PCR, REP-PCR y 16S-23S ISR-RFLP) para determinar cual de ellos es el más discriminativo y poder investigar la variabilidad genética intraespecífica en Aeromonas.*

Artículo:

- 4.3.1. SOLER L., FIGUERAS M.J., CHACÓN M.R., GUARRO J. y MARTINEZ-MURCIA A.J. (2003). Comparison of three molecular methods for typing *Aeromonas popoffii* isolates. *Antonie van Leeuwenhoek*, 83: 341-349.

Resumen:

Se evaluaron comparativamente tres técnicas de tipado molecular (16S-23S ISR-RFLP, ERIC y REP) en 26 cepas (todas las cepas de la especie descritas hasta la fecha) de la especie *A. popoffii* procedentes de cuatro orígenes geográficos (España, Bélgica, Escocia y Suiza).

Los resultados pusieron de manifiesto que tanto el REP como el 16S-23S ISR-RFLP producían patrones comunes para cepas no relacionadas, mientras que el ERIC era la técnica más discriminativa, ya que generaba patrones cepa-específicos para todas estas cepas. Cuando las tres técnicas se analizaron conjuntamente (dos a dos, o las tres a la vez), se observó que los resultados mejoraban considerablemente, ya que las cepas no relacionadas aparecían como distintas. Con la combinación del ERIC y el REP las cepas mostraban una tendencia a agruparse según su origen geográfico, resultado que se veía reforzado con la adición del 16S-23S ISR-RFLP. El análisis individual o conjunto de los resultados obtenidos demostró que los 6 aislamientos procedentes de una misma localidad de Suiza pertenecían únicamente a 1 cepa.

En este trabajo también se valoró la reproducibilidad de cada una de las técnicas. La mayor reproducibilidad (valor *r*) obtenida fue de 0.92-0.96 para el ERIC y 0.90-0.95 para el REP cuando la extracción del DNA y la PCR eran realizadas en el mismo experimento y la electroforesis en el mismo gel.

4.4. DISTRIBUCIÓN DE FACTORES DE VIRULENCIA

Objetivo concreto:

8. *Determinar la distribución de genes que codifican para factores de virulencia tales como aerolisina/hemolisina, lipasas, serina proteasa, DNasas, flagelo lateral y enterotoxinas citotónicas en cepas de Aeromonas de origen clínico y ambiental.*

Artículo:

- 4.4.1. CHACÓN M.R., FIGUERAS M.J., CASTRO-ESCARPULLI G., SOLER L. y GUARRO J. (2003). Distribution of virulence genes in clinical and environmental isolates of *Aeromonas* spp. *Antonie van Leeuwenhoek* (En prensa).

Resumen:

Se investigó la distribución por PCR de los genes que codifican para la aerolisina/hemolisina, lipasas, serina proteasa y DNasas y la actividad fenotípica asociada a cada gen en un total de 234 cepas de origen clínico y ambiental, que representan a todas las especies del género. Los genes que codifican para la aerolisina/hemolisina fueron detectados en el 72.6% de las cepas estudiadas, y se encontraron significativamente más presentes en las cepas de origen clínico que en las de origen ambiental ($p \leq 0.056$). La actividad fenotípica asociada a la aerolisina/hemolisina se determinó evaluando la β -hemólisis en agar sangre humana y sangre de carnero. Las cepas clínicas fueron significativamente más β -hemolíticas en sangre de carnero que en sangre humana ($p \leq 0.004$). Los genes que codifican para la GCAT y la serina proteasa se detectaron, respectivamente, en el 98% y 75% de las cepas ensayadas, así mismo las cepas de origen ambiental presentaron una mayor actividad serina proteasa (prueba de la azocaseína) que las cepas clínicas ($p < 0.044$). Es importante destacar que todas las cepas β -hemolíticas presentaron conjuntamente los genes que codifican para la aerolisina/hemolisina y serina proteasa. El 95% de las cepas presentaron los genes que codifican para las lipasas y actividad lipolítica. Finalmente, los genes que codifican para las DNasas se encontraron significativamente más presentes ($p < 0.001$) en cepas de *Aeromonas* de origen clínico

(88%) que ambiental (95%), aunque esta diferencia no se observó al ensayar la actividad DNasa.

Artículo:

- 4.4.2. SOLER L., FIGUERAS M.J., CHACÓN M.R., VILA J., MARCO F., MARTÍNEZ-MURCIA A.J. y GUARRO J. (2002). Potential virulence and antimicrobial susceptibility of *Aeromonas popoffii* recovered from freshwater and seawater. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, 32: 243-247.

Resumen:

A. popoffii es una de las especies de más reciente descripción de la cual apenas existen datos. Por este motivo se investigó la incidencia y distribución de *A. popoffii* en muestras de agua de distintos orígenes. También se estudió la resistencia a los diferentes agentes antimicrobianos y su potencial virulento en las 11 cepas aisladas en nuestro laboratorio y las 15 aisladas por otros autores.

La especie *A. popoffii* representó un 8% de las cepas aisladas en aguas dulces y un 6.8% de las de agua de mar, siendo la primera vez que dicha especie se aisló en este último hábitat.

Los ensayos de sensibilidad, de los 26 aislados de *A. popoffii* a los 26 agentes antimicrobianos ensayados, indicó que los más efectivos para esta especie son las cefalosporinas de tercera generación y las quinolonas.

El potencial virulento de *A. popoffii*, se determinó investigando los mismos genes y actividades fenotípicas que en el estudio anterior (4.4.1). Los resultados indicaron que todas las cepas poseían los genes que codifican para las DNasas, GCAT y lipasas, y además todas las cepas presentaron actividad DNasa y lipasa. Los genes que codifican para la aerolisina/hemolisina se encontraron presentes el 92% de las cepas de *A. popoffii*. La actividad β -hemolítica varió entre el 15 y el 73% dependiendo del tipo de sangre (humana o carnero) y la temperatura de incubación utilizada, por ejemplo, ninguna de las cepas de *A. popoffii* mostró actividad β -hemolítica cuando ésta fue ensayada a 37°C en agar sangre de cordero, pero el 73% de las cepas presentaron actividad β -hemolítica cuando se utilizó agar sangre humana a 20°C. El 96% de las cepas presentaron el gen que codifica para la serina proteasa, y el 69% presentaron actividad serina proteasa.

Los seis aislamientos de esta especie que tras el análisis del ERIC demostraron ser derivados del mismo clon (estudio 4.3.1) presentaron el mismo patrón de sensibilidad, siendo así mismo coincidentes los genes de virulencia detectados en estos aislamientos.

Artículo:

4.4.3. SOLER L., CHACÓN M.R., AGUILERA-ARREOLA G., JANDA J.M., ESTEVE C., GUARRO J. y FIGUERAS M.J. Presence of virulence markers on clinical and environmental isolates of *Aeromonas jandaei*. (En preparación).

Resumen:

En este trabajo se investigó la distribución de los genes que codifican para la enterotoxina termolábil (*alt*), enterotoxina termoestable (*ast*), aerolisina/hemolisina y flagelo lateral (*lafA*) en 32 cepas de *A. jandaei* mediante las técnicas de PCR y *dot blot*. Se seleccionó esta especie porque representó el 2.6% de las cepas de *Aeromonas* spp. aisladas a partir de heces y el 5.6% de las aisladas a partir de muestras extraintestinales, y ha sido poco estudiada hasta la fecha. Se ha estudiado también la proximidad genética de estas cepas mediante la técnica del ERIC, ya que éstas procedían de distintos orígenes (clínico, ambiental y animal), y zonas geográficas (14 de ellas habían sido aisladas en nuestro laboratorio y 18 habían sido recibidas de colecciones personales e internacionales de distintos países). El dendograma obtenido de éste estudio mostró que las cepas tendían a agruparse por su origen geográfico, y se observó que 6 de las cepas recibidas de los diferentes autores se agrupaban como iguales.

Los genes mencionados fueron estudiados mediante las técnicas de PCR y *dot blot*, a excepción del gen *alt* que tras comprobarse que presentaba una elevada homología a nivel de nucleótidos con otros genes que codifican para lipasas en *Aeromonas* (ej.: 94% de similitud con el gen *pla*; 90% con el *lipH3*; 85% con el *plc*; 84% con el *lip*) sólo fue estudiado por PCR. Ninguna de las cepas estudiadas presentó simultáneamente los cuatro genes estudiados, y únicamente una cepa presentó simultáneamente los genes *alt* y *ast*, y una cepa presentó los genes aerolisina/hemolisina y *alt*. Así mismo un 34.7% de las cepas, independientemente de su origen, presentaron simultáneamente los genes *lafA* y aerolisina/hemolisina. El gen *alt* sólo fue detectado en el 11.5% de las cepas estudiadas. Cuando se estudió la presencia del gen *lafA*, 12 cepas fueron negativas para la presencia de éste gen cuando se utilizó la técnica de la PCR, pero positivas por *dot blot*, siendo por lo tanto consideradas positivas, con lo cual el gen *lafA* estuvo presente en el 61.5% de las

cepas estudiadas. Los resultados obtenidos por PCR y *dot blot* para los genes que codifican para la aerolisina/hemolisina y el gen *ast* fueron idénticos, y correspondieron respectivamente al 42.3% y 3.8% de las cepas. Sólo el 40% de las cepas de origen ambiental presentaron alguno de los genes estudiados, frente a un 72.2% de las cepas clínicas.

Objetivo concreto:

9. *Establecer la incidencia de las diferentes especies de Aeromonas en muestras de pescado destinado al consumo humano y determinar las características fenotípicas y virulentas de las cepas aisladas.*

Artículo:

- 4.4.4. CASTRO-ESCARPULLI G., FIGUERAS M.J., AGUILERA-ARREOLA G., SOLER L., FERNÁNDEZ-RENDÓN E., APARICIO G.O., GUARRO J. y CHACÓN M.R. (2003). Characterisation of *Aeromonas* spp. isolated from frozen fish intended for human consumption in Mexico. *International Journal of Food Microbiology*, 84: 41-49.

Resumen:

En este estudio se aislaron 82 cepas, identificadas bioquímicamente como pertenecientes al género *Aeromonas*, procedentes de 250 muestras de pescado congelado (*Tilapia*, *Oreochromis niloticus niloticus*) adquiridas en mercados locales de México D.F. Todas estas cepas fueron identificadas bioquímica y genéticamente con la técnica del 16S rDNA-RFLP. La distribución de especies en base a la identificación bioquímica fue: 35.4% *A. salmonicida*, 20.7% *A. hydrophila*, 17.1% *A. caviae*, 13.4% *A. veronii* bt sobria y 13.4% *A. eucrenophila*. La identificación genética evidenció que 5 de las cepas identificadas como *Aeromonas* en base a los métodos bioquímicos no pertenecían a este género. La distribución de especies en base a las 77 cepas de *Aeromonas* identificadas genéticamente fue: 67.5% a *A. salmonicida*, 20.9% a *A. bestiarum*, 5.2% a *A. veronii*, 3.9% a *A. encheleia* y 2.6% a *A. hydrophila*. Únicamente 22 cepas (28.6%) se identificaron correctamente con los métodos bioquímicos.

Para dar respuesta al objetivo 5 se realizaron estudios de sensibilidad a 23 agentes antimicrobianos observando que todas las cepas eran resistentes a la ampicilina, carbenicilina, cefalotina, clindamicina y penicilina. Así mismo el 85.7% de las cepas eran resistentes a la polimixina B, el 75.3% a la estreptomina, el 58.4% a la gentamicina, el 57.1% a la rifampicina y el 54.5% a la eritromicina. Además todas las

cepas fueron sensibles al ácido nalidíxico, cefotaxima, cefuroxima y nitrofurantoina, siendo por tanto las quinolonas y las cefalosporinas de segunda y tercera generación las que presentan una mejor actividad frente a estas cepas.

Para dar respuesta al objetivo 8, también se investigó por PCR la presencia de los genes de virulencia descritos anteriormente (aerolisina/hemolisina, GCAT, lipasas, serina proteasa y DNasas), observándose que todas las cepas presentaban el gen que codifica para la GCAT. Los genes que codifican para la aerolisina/hemolisina, lipasas, serina proteasa y DNasa estaban presentes en el 96%, 97%, 96% y 90% de las cepas respectivamente. En cuanto a la actividad fenotípica asociada a estos genes, se observó que todas las cepas presentaban la misma actividad lipasa con los tres métodos ensayados (1% L- α -lecitina, 0.5% tributirina y agar resarsurina-mantequilla). Sí se observaron diferencias en la actividad proteasa cuando esta se ensayó con el método de la caseína (61%), el de la gelatina (96%) o la azocaseína (96%), teniendo en cuenta que aunque los porcentajes globales para la azocaseína y la gelatina son idénticos, las cepas con respuesta positiva para un carácter no son las mismas que para el otro. Todas las cepas demostraron tener la capacidad de captar el rojo congo y presentaban adherencia agregativa en células HEp-2.

Artículo:

- 4.4.5. KOZIŃSKA A., FIGUERAS M.J., CHACON M.R. y SOLER L. (2002). Phenotypic characteristics and pathogenicity of *Aeromonas* genomospecies isolated from common carp (*Cyprinus carpio* L.). *Journal of Applied Microbiology*, 93: 1-8.

Resumen:

En este trabajo se investigaron 34 cepas de *Aeromonas* aisladas de carpas (*Cyprinus carpio* L.) sanas o enfermas, 2 cepas aisladas de los tanques de agua de la piscifactoría, y una cepa inicialmente identificada como *Chromobacterium violaceum*, todas ellas aisladas en Polonia durante un periodo de 10 años. La distribución de especies en base a la identificación bioquímica fue: 51.4% *A. sobria*, 37.8% *A. hydrophila*, 8.1% *Aeromonas* spp. y 2.7% *C. violaceum*. La identificación genética evidenció que la cepa identificada como *C. violaceum* en base a los métodos bioquímicos era en realidad *A. veronii*. La distribución de especies en base a las 37 cepas de *Aeromonas* identificadas genéticamente fue: 35.2% *A. salmonicida*, 29.7% *A. veronii*, 16.2% *A. sobria*, 13.5% *A. bestiarum* y 5.4% *A. encheleia*.

El ensayo *in vivo* del potencial virulento en carpas sanas se realizó con las 37 cepas aisladas y puso de manifiesto una respuesta distinta dependiendo de la especie. El mayor número de cepas virulentas pertenecieron a las especies *A. bestiarum* (4 de 5, 80%) y *A. salmonicida* (10 de 13, 76.9%). Los síntomas que provocaban en las carpas fueron septicemias, hemorragias, necrosis y úlceras. De las 11 cepas de *A. veronii* ensayadas, 1 resultó ser extremadamente virulenta, provocando lesiones internas y externas, acumulación de líquido ascítico en la cavidad peritoneal, hemorragias en el hígado y riñón con un 100% de mortalidad, 6 cepas produjeron la misma sintomatología que *A. bestiarum*, pero con acumulaciones de líquido ascítico en los tejidos subcutáneos y 4 no fueron virulentas. Sólo 1 de las 6 cepas de *A. sobria* ensayadas provocó lesiones cutáneas localizadas en un 30% de los peces, y el resto no fueron virulentas. Ninguna de las 2 cepas de *A. encheleia* ensayadas resultó virulenta.

4.5. MECANISMOS DE PATOGENICIDAD

Objetivos concretos:

10. *Establecer si el sistema de secreción tipo III (TTSS), asociado al potencial virulento de microorganismos patógenos, está presente en cepas clínicas de Aeromonas spp.*

Artículos:

- 4.3.2.1. CHACÓN M.R., SOLER L., GROISMAN E.A., GUARROJ. y FIGUERAS M.J.
First evidence of the existence of Type III secretion system in clinical strains of *Aeromonas* (En preparación).

Resumen:

Para demostrar la existencia del TTSS en cepas clínicas de *Aeromonas* se procedió en primer lugar al análisis de las secuencias de nucleótidos de los genes *sctV*, *sctR*, *sctT* y *sctJ-L* del TTSS (genes conservados en otros géneros bacterianos), para diseñar cebadores con diana en las regiones conservadas de dichos genes. Se seleccionaron estos genes por encontrarse ubicados en las regiones extremas y en la región central del tándem de genes que codifican para el TTSS en otras bacterias. En la Tabla 4.1 se detallan las características y los cebadores diseñados para estos genes.

Dichos cebadores se utilizaron, para un cribado preliminar, en un grupo de 12 cepas clínicas de origen extraintestinal pertenecientes a las especies *A. hydrophila*, *A. bestiarum*, *A. salmonicida* y *A. veronii*. De los cuatro genes investigados, sólo se consiguió amplificar los genes *sctV* y *sctJ-L*, en 7 cepas de las especies *A. veronii*, *A. caviae*, *A. bestiarum* y *A. salmonicida*. La identidad de estos genes fue corroborada tras la secuenciación de los fragmentos amplificados.

Tabla 4.1. Características de los genes conservados del TTSS estudiados y cebadores diseñados para su amplificación

Genes*	Tipo de proteína	→ Secuencias alineadas	% de homología	Cebadores diseñados Secuencia (5' 3')	Tamaño esperado del amplificado
<i>scfV</i>	Proteína de membrana interna	<i>Yersinia enterocolitica</i> AF074612 <i>Pseudomonas aeruginosa</i> AE004597	68	SctV-F: ATGGACGGCGCCATGAAGTT SctV-R: TATTCGCCTTACCCATCCC	710 pb
<i>scfR</i>	Proteína de membrana interna	<i>Shigella flexneri</i> AF386526 <i>Y. enterocolitica</i> AF336309 <i>Salmonella typhimurium</i> AE008761	46-54	SctR-F: TACGAAATGCACTTGGTTT SctR-R: TCACTTAGCGCATATGCAGGCA	327 pb
<i>scfT</i>	Proteína de membrana interna	<i>S. flexneri</i> AF386526 <i>S. typhimurium</i> (SPI-1) X73525	50	SctT-F: GGGGCAACGCTTAGTAGT SctT-R: GCATTTCATCTGCGGAGCAAA	314 pb
<i>sctJ-L</i>	Lipoproteína, debe unir las membranas interna y externa Proteína citoplasmática	<i>Y. enterocolitica</i> M74011 <i>P. aeruginosa</i> U56077	55	SctJ-F: ATGGGCGATGTGTCA CTGTCA SctL-R: TCAGGCGTCATCCTCCTCGC	1773 pb

*según la nomenclatura consensus designada por Hueck (1998).

Para localizar el fragmento del genoma de *Aeromonas* que contiene todos los genes del TTSS se construyó una genoteca en cósmidos a partir del DNA de la cepa de *A. veronii* 283c, aislada de un hemocultivo y que había resultado positiva para los genes anteriores en el cribado preliminar. El cribado de esta genoteca (utilizando como sonda el fragmento obtenido del gen *scfV*) permitió obtener un clon que contenía dicho gen. Este clon fue hibridado por *dot blot* con la sonda correspondiente al fragmento de los genes *sctJ-L*, los cuales se encuentran en la región opuesta del tándem, obteniéndose una hibridación positiva. Para poder secuenciar dicho clon, se subclonó un fragmento de aproximadamente 10 Kb en el plásmido pBR322. La parcial caracterización por secuenciación de éste subclon permitió identificar 4 genes no conocidos hasta la fecha en *Aeromonas*. Tras comparar las secuencias de nucleótidos de éstos genes con todas las secuencias de proteínas depositadas en la base de datos GenBank (blastx), se comprobó que éstos genes codificaban para proteínas homólogas a las YscF, YscG, YscL e YscJ de *Yersinia enterocolitica*. Con el fin de mantener la nomenclatura utilizada para designar los genes que codifican para el TTSS de *A. salmonicida*, designamos a dichos genes como: *ascF*, *ascG*, *ascJ* y *ascL*.

(la primera letra hace referencia al género *Aeromonas* y *sc* a secreción). Es importante destacar que los genes *ascJ* y *ascL* se corresponden a los previamente amplificados por PCR (*sctJ-L*). Dado que los genes *ascF* y *ascG* se encuentran codificados en tándem en el genoma de *Aeromonas* y que su secuencia ha sido ya completada, esta ha sido depositada a la base de datos GenBank bajo el número de accesión AY289195. La secuencia de los genes *ascJ* y *ascL* no ha sido depositada en las bases de datos, dado que todavía no ha sido completada.

La presencia de los genes *ascF-G* y *ascV*, genes que codifican para el TTSS, y el gen *aexT*, que codifica para una toxina secretada por dicho sistema en *A. salmonicida*, fue investigada mediante la técnica del *dot blot* en 84 cepas clínicas intestinales y extraintestinales de las especies *A. hydrophila*, *A. caviae* y *A. veronii*, y en dos cepas extraintestinales de *A. jandaei*. Dichos genes fueron detectados en todas las especies, aunque con distinta incidencia. Todas las cepas de origen extraintestinal de *A. veronii* presentaron los genes estudiados, frente a un 86% de las de *A. hydrophila*. En *A. caviae*, ninguna cepa de origen intestinal, y sólo el 14% de las cepas de origen extraintestinal presentaban los genes estudiados. Los genes que codifican para el TTSS se detectaron con menor frecuencia en las cepas de origen intestinal, ya que el 77% de las cepas de *A. hydrophila* intestinales presentaron los genes *ascF-G* y *ascV*, mientras que sólo el 66% presentaron el gen *aexT*. En el caso de *A. veronii*, el 69% de las cepas intestinales presentaron los genes *ascF-G* y *ascV*, el 63% presentó el gen *aexT*. Una de las cepas de *A. jandaei* (aislada de bilis), presentó todos los genes estudiados, mientras que la otra cepa (aislada de un hemocultivo), no presentó ninguno de estos genes.

First evidence of the existence of Type III secretion system in clinical strains of *Aeromonas*

M. R. Chacón¹, L. Soler¹, E. A. Groisman², J. Guarro¹ and M. J. Figueras^{1*}

¹Departamento de Ciencias Médicas Básicas, Facultad de Medicina y Ciencias de la Salud, Universidad Rovira i Virgili, San Lorenzo 21, 43201 Reus, Spain.² Department of Molecular Microbiology, Howard Hughes Medical Institute, Washington University School of Medicine, 660 S. Euclid, St. Louis, MO 63110, USA.

Running title: Type III secretion system in *Aeromonas* spp.

Keywords: *Aeromonas*, Type III secretion system

Corresponding author:

Maria José Figueras*

Departamento de Ciencias Médicas Básicas
Facultad de Medicina y Ciencias de la Salud
Universidad "Rovira i Virgili"
San Lorenzo, 21
43201 Reus (Spain) Phone: 34-977759321*
Fax: 34-977759322
E-mail: mjfs@fmcs.urv.es

First evidence of the existence of Type III secretion system in clinical strains of *Aeromonas*

ABSTRACT

Two genes (*ascF* and *ascG*) found in the Type III secretion system (TTSS) of diverse gram-negative pathogens are here described for the first time on a clinical isolate of *Aeromonas veronii*. The distribution of those genes and of the *ascV* and *aexT*, genes previously described in a fish pathogen strain of *A. salmonicida*, were investigated by dot blot in 84 clinical isolates of *A. hydrophila*, *A. veronii* and *A. caviae* revealing that over 86% of extraintestinal isolates of the former two species presented those genes.

Aeromonas spp. comprise mesophilic motile and psychrophilic nonmotile gram-negative bacteria. This micro-organism is found in both fresh and salt water and in virtually all foods and causes a wide variety of human infections, including septicemia, wound infections, meningitis, pneumonia and gastroenteritis (Figueras et al., 2000a; Janda, 2001). Out of the 15 reported species within the genus, three of them *A. veronii*, *A. caviae* and *A. hydrophila* represents more of the 85% of the clinical isolates (Janda and Abbott, 1998; Joseph and Carnahan, 2000).

It is well established that *Aeromonas* possess several virulence factors (Chopra and Houston, 1999; Janda 2001, Gavin et al., 2002; Chacon et al., 2003) for which its function in pathogenesis have been investigated (Wong et al. 1998; Xu et al., 1998; Vipond et al., 1998; Merino et al., 1999; Sha et al., 2002). However, it has been demonstrated that the pathogenic capacity of numerous gram-negative bacteria (*Escherichia coli*, *Salmonella enterica*, *Shigella flexneri*, *Yersinia* spp. and *Pseudomonas aeruginosa*) is due to large genomic regions called pathogenicity islands (PIs), that frequently include the cluster of genes that codify for the type III secretion systems (TTSS) (Groisman and Ochman, 2000; Winstanley and Hart, 2001). The TTSS plays an essential role in pathogenicity because facilitates the delivery of toxins directly into the host cells (Hueck, 1998; Muller et al., 2001, Winstanley and Hart, 2001; Ramamurthi and Schneewind, 2002).

The PIs have not yet been investigated in *Aeromonas*, however the existence of TTSS in one strain of the fish pathogen *A. salmonicida* subsp. *salmonicida* has recently been described (Burr et al., 2002; Braun et al. 2002). Burr et al. (2002) have identified 8 TTSS genes homologues to those already described in the TTSS of *Yersinia enterocolitica* and identified one toxin (Aext) secreted by this system. The inactivation by mutagenesis of one of the 8 genes, the *ascV*, rendered the strain no toxic on RTG-2 rainbow trout gonad cells, indicating that TTSS has an important role in the virulence of this pathogen (Burr et al., 2002).

Here we report two new genes *ascF* and *ascG* as part of the TTSS in a strain of *Aeromonas veronii* of extraintestinal origin. In addition, we have investigated the distribution of those 2 genes (*ascF-G*), of the gene *ascV* and of the one that codify for the toxin Aext on a group of 84 clinical strains belonging to the most frequently isolated clinical species (*A. veronii*, *A. caviae* and *A. hydrophila*).

A cosmid library was constructed with the SuperCos I Cosmid Vector Kit (Stratagene, California, USA) by using genomic DNA from a strain of *A. veronii* (283c), isolated from blood of a patient. An amplified product of 710 bp from this strain, corresponding to part of the *ascV* gene, was obtained using the following primers: *ascV*-Forward: 5' ATG GAC GGC GCC ATG AAG TT^{3'} and *ascV*-Reverse: 5' TAT TCG CCT TCA CCC ATC CC^{3'} and the PCR amplifications conditions already described (Chacón et al. 2003) but using an annealing temperature, adjusted to the primers, of 56°C. The library was screened using the *ascV* 710 bp fragment as a probe, which was labelled with digoxigenin by repeating the PCR reaction with 0.5 nmol of Dig-11-dUTP in the total reaction mixture, following procedures and standard protocols previously described (Sambrook et al., 1987; Chacón et al. 2002). From a clone which gave a positive signal, the cosmid DNA was isolated and digested with the enzymes *EcoRI* and *HindIII*. A 10 Kb hybridizing fragment with the *ascV* probe identified by Southern blot analysis (Southern, 1992) was subcloned into the plasmid vector pBR322 and a fragment of 1025 bp was sequenced on an ABI-PRISMTM 310 apparatus following manufacturer's instructions. Comparisons of DNA sequences and their corresponding amino acid sequences in the EMBL/GenBank were performed with BLAST analysis. The molecular mass (MW) and isoelectric point (pI) of the TTSS proteins were calculated with the ExPASy ProtParam Tool (<http://us.expasy.org>). The nucleotide sequences for the two reported genes in this communication (*ascF-G*) have been submitted to the GenBank database under the following accession number AY289105.

For the dot blot experiments we selected 84 *Aeromonas* of the species: *A. hydrophila* (n=25), *A. veronii* (n=25) and *A. caviae* (n=34), all identified by 16S rDNA-RFLP method (Borrell et al. 1997; Figueras et al., 2000b) with the following origins: stools of patients with diarrhoea (n=54), wounds and ulcers (n=4), cellulites (n=1), abscesses (n=2), urine (n=4), articulate liquid (n=2) and blood (n=15). Ten µg of DNA of each strain was dotted onto 3 different nylon membranes, which were hybridized and detected as previously described (Chacón et al., 2002) with digoxigenin-PCR labelled probes of: *ascV* gene (710 bp), *ascF-G* genes (a fragment of 900 bp generated with the primers *ascF-G* Forward: 5' ATG AGG TCA TCT GCT CGC GC^{3'} and *AscF-G* Reverse: 5' GGA GCA CAA CCA TGG CTG AT^{3'}), and with *aexT* gene (a 535 bp fragment obtained with the primers and conditions already described by Braun et al. 2002).

A BLASTX analysis of the 1025 bp Open Reading Frame sequence revealed the presence of 2 putative proteins named AscF and AscG, following the nomenclature used for the designation of the TTSS in *A. salmonicida* subsp. *salmonicida* (Burr et al., 2002). These proteins showed the best homologies to those described in the TTSS of *Yersinia enterocolitica*, *Protorhabdus luminescens* and *Pseudomonas aeruginosa* (Table 1). For AscF, *P. luminescens* LscF protein had the closest identity and similarity, 72 and 80% respectively, followed by PscF of *P. aeruginosa* and YscF of *Y. enterocolitica*. The three proteins exhibited strong homologies at the C-terminal region (Figure 1). The AscF protein has 85 aminoacids with a MW of 9.4 kDa and a theoretical pl of 5.63 (Table 2). The AscG protein presented lower identity and similarity among the above 3 mentioned closest micro-organism ranging from 51 to 56% of identity and 62-68% of similarity (Table 1). The AscG protein has 113 amionoacids with 12.5 kDa of MW and pl of 5.6. The characteristics of these proteins such pl and MW is very similar to their homologous suggesting that the role of those putative proteins in *Aeromonas* may be similar that in those micro-organisms. In *Y. pestis*, both proteins, YscG and YscF, have been postulated to have a role in secretion and regulation of high level of expression of low calcium response proteins (Plano and Straley, 1995). Recent data supports that in *Y. pestis*, the YscG is a Syc-like chaperone that directly binds to YscE, that is a cytoplasmatic component of the TTSS (Day et al., 2000).

TTSS is a virulent trait that correlate with bacterial pathogenicity and their presence can be used as a general indicator of virulence (Winstanley and Hart, 2000; Stuber et al., 2003). The detection by dot blot hybridisation experiments of 3 genes that are part of the TTSS in 84 isolates belonging to the 3 clinical *Aeromonas* most relevant

species is shown in Table 3. *Aeromonas caviae* intestinal isolates had no presence of TTSS genes and only 14% of the extraintestinal isolates were positive for the genes tested. The low incidence of the TTSS genes in strains of *A. caviae* is in concordance to the lowest virulence associated to this species in the literature (Granum y cols., 1998; Kingombe et al, 1999; Heuzenroeder et al., 1999; Wang et al., 2003). All extraintestinal isolates of *A. veronii* presented the genes tested versus 86% of *A. hydrophila* isolates. Intestinal strains of *A. hydrophila* and *A. veronii* were more variable showing less prevalence of the TTSS genes; while the *ascF-G* and *ascV* were present in similar percentages within the same species. This is not rare because these genes have been located in tandem on the genome (Hueck 1998).

One of the major goals in further characterising TTSS in *Aeromonas* is to identify potential secreted toxins by this system. Braun et al. (2002) have characterised an ADP-ribosylating protein (AexT) derived from *A. salmonicida* subsp. *salmonicida* which has a significant similarity to the ExoS and the related ExoT toxins secreted by TTSS in *Pseudomonas aeruginosa*. It has been demonstrated that AexT is secreted via the TTSS and that it has an important role in virulence. In the present study we have demonstrated that the gene that codify for this protein, the *aexT*, was present in clinical isolates of *Aeromonas* in similar proportion than the TTSS genes studied (Table 3). These data demonstrated, for the first time, the presence of TTSS associated genes in clinical isolates of *Aeromonas*. The evidence of the existence of TTSS in clinical strains of *Aeromonas* is important, since raises this micro-organism to the same category of other classical pathogens, i.e. *Y. enterocolitica*, *S. enterica*, *E. coli* and *S. flexneri*. Further characterisation of the TTSS in *Aeromonas* is now ongoing. The complete sequencing of the TTSS in *Aeromonas* will be important for the generation of mutants that can be tested on lethal dose experiments, this information will provide the real implication of TTSS in the virulence of *Aeromonas* and will help to find new toxins secreted by the TTSS. This information will be important to get a better understanding of the virulence mechanisms of this pathogen.

This work has been supported by a grant from Fundació Ciència i Salut and by a Ph.D fellowship from Universitat Rovira i Virgili. We would like to thank Drs R. Bartolome from the Valle Hebrón Hospital (Barcelona), J. Vila from the Hospital Clinic (Barcelona), J. Reina from Son Dureta Hospital (Mallorca), F. Soriano from La Fundación Jiménez Díaz (Madrid) and I. Pujol and F. Ballester from Sant Joan Hospital (Reus) for kindly providing isolates.

REFERENCES

- Borrell, N., Acinas, S.G., Figueras, M.J., and A.J. Martínez-Murcia.** 1997. Identification of *Aeromonas* clinical isolates by restriction fragment length polymorphism of PCR-amplified 16S rRNA gene. *J. Clin. Microbiol.* **35**:1671-1674
- Braun, M., Stuber, K., Schlatter, Y., Wahli, T., Kuhnert, P., and J. Frey.** 2002. Characterization of an ADP-ribosyltransferase toxin (Aext) from *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida*. *J. Bacteriol.* **184**:1851-1858.
- Burr, S., Stuber, K., Wahli, T., and J. Frey.** 2002. Evidence for a Type III secretion system in *Aeromonas salmonicida* subs. *salmonicida*. *J. Bacteriol.* **184**:5966-5970.
- Chacón, M.R., Castro-Escarpulli, G., Soler, L., Guarro, J., and M.J. Figueras.** 2002. A DNA probe specific for *Aeromonas* colonies. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* **3**: 221-225.
- Chacón, M.R., Figueras, M.J., Castro-Escarpulli, G., Soler, L., and J. Guarro.** 2003. Distribution of virulence genes in clinical and environmental strains of *Aeromonas* sp. *Antonie van Leeuwenhoek* (in press).
- Chopra, A.K., and C.W. Houston.** 1999. Enterotoxins in *Aeromonas*-associated gastroenteritis. *Microbes and Infect.* **1**:1129-1137.
- Day, J.B., Guller, I., and G.V. Plano.** 2000. *Yersinia pestis* YscG protein is a Syc-like chaperone that directly binds YscE. *Infect. Immun.* **68**:6466-6471.
- Figueras, M.J., Guarro, J., and A. Martínez-Murcia.** 2000a. Clinically relevant *Aeromonas* species. *Clin. Infect. Dis.* **30**: 988-989.
- Figueras, M.J., Soler, L., Chacón, M.R., Guarro, J., and A.J. Martínez-Murcia.** 2000b. Extended method for discrimination of *Aeromonas* spp. by 16S rDNA-RFLP. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **50**:2069-2073.

- Gavin, R., Rabaan, A.A., Merino, S., Tomás, J.M., Gryllos, I., and J.G. Shaw.** 2002. Lateral flagella of *Aeromonas* species are essential for epithelial cell adherence and biofilm formation. *Mol. Microbiol.* **43**: 383-397.
- Granum, P.E., O'sullivan, K., Tomás, J.M., and Ormen, O.** 1998. Possible virulence factors of *Aeromonas* spp. from food and water. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* **21**: 131-137.
- Groisman, E.A, and H. Ochman.** 2000. The path to *Salmonella*. *Asm News.* **66**: 21-27.
- Heuzenroeder, M.W., Wong, C.Y.F., and Flower, R.F.L.P.** 1999. Distribution of two hemolytic toxin genes in clinical and environmental isolates of *Aeromonas* spp.: correlation with virulence in a suckling mouse model. *FEMS Microbiol. Lett.* **174**: 131-136.
- Hueck C.** 1998. Type III secretion system in bacterial pathogens in animals and plants. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **62**:379-433.
- Janda, J.M, and S.L. Abbott.** 1998. Evolving concepts regarding the genus *Aeromonas*: an expanding panorama of species, disease presentations, and unanswered questions. *Clin. Infect. Dis.* **27**: 332-344.
- Janda, J.M.** 2001. *Aeromonas* and *Plesiomonas* p. 1237-1270. In M. Sussman (ed.), *Molecular Medical Microbiology*. Academic Press, San Diego, USA.
- Joseph, S.W., and A.M.Carnahan.** 2000. Update on the genus *Aeromonas*. *ASM News*, 66: 218-223.
- Kingombe, C.I.B., Huys, G., Tonolla, M., Albert, M.J., Swings, J., Peduzzi, R., and Jemmi, T.** 1999. PCR detection, characterization and distribution of virulence genes in *Aeromonas* spp. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**: 5293-5302.
- Merino, S., Aguilar, A., Noguerras, M.M., Regue, M., Swift, S., and J.M. Tomás.**1999.Cloning, sequencing, and role in virulence of two phospholipases (A1 and C) from mesophilic *Aeromonas* sp. serogroup O:34. *Infect. Immun.* **67**:4008-4013.
- Muller, S., Feldman, M.S., and G.R.Cornelis.** 2001. The type III system of gram-negative bacteria: a potential therapeutic target?. *Expert. Opin. Ther. Targets.* **5**:327-339.
- Plano, G.V., and S. Straley.** 1995. Mutations in *yscC*, *yscD*, and *yscG* prevent high – level expression and secretion of V antigen and Yops ins *Yersinia pestis*. *J. Bacteriol.* **177**:3843-3854.

- Ramamurthi KS, and O. Shneewind.** 2002. Type III protein secretion in *Yersinia* species. *Annu. Rev. Cell. Dev. Biol.* **18**:107-133.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., and T. Maniatis.** 1989. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd and Cold Spring Harbor, New York. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sha, J., Kozlova, E.V. and A.K. Chopra.** 2002. Role of various enterotoxins in *Aeromonas hydrophila*-induced gastroenteritis: generation of enterotoxin gene-deficient mutants and evaluation of their enterotoxin activity. *Infect. Immun.* **70**: 1924-1935.
- Southern, E.M.** 1992. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. 1975. *Biotechnol.* **24**: 122-139.
- Stuber, K., Frey, J., Burnens, A.P., and P. Kuhnert.** 2003. Detection of type III secretion genes as a general indicator of bacterial virulence. *Mol. Cell. Probes* **17**:25-32.
- Vipond, R., Bricknell, I.R., Durant, E., Bowden, T., Ellis, A.E, Smith, M., and S. MacIntyre.** 1998. Defined deletion mutants demonstrate that the major secreted toxins are not essential for the virulence of *Aeromonas salmonicida*. *Infect. Immun.* **66**:1990-1998.
- Wang, G., Clark, C.G., Liu, C., Pucknell, C., Munro, C.K., Kruk, T.M.A.C., Caldeira, R., Woodward, D.L., and Rodgers, F.G..** 2003. Detection and characterization of the hemolysin genes in *Aeromonas hydrophila* and *Aeromonas sobria* by multiplex PCR. *J. Clin. Microbiol.* **41**: 1048-1054.
- Winstanley, C., and C.A. Hart.** 2000. Presence of type II secretion genes in *Burkholderia pseudomallei* correlates with Ara⁻ phenotypes. *J. Clin. Microbiol.* **38**:883-885.
- Winstanley, C, and C.A. Hart.** 2001. Type III secretion systems and pathogenicity islands. *J. Med. Microbiol.* **50**:116-126.
- Wong, C.Y.F., Heuzenroeder, M.W., and R.L.P. Flower.** 1998. Inactivation of two haemolytic toxin genes in *Aeromonas hydrophila* attenuates virulence in a suckling mouse model. *Microbiology* **144**:291-298.
- Xu, X.J., Ferguson, M.R., Popov, V.I., Houston, C.W., Peterson, J.W., and A.K. Chopra.** 1998. Role of a cytotoxic enterotoxin in *Aeromonas*-mediated infections: Development of transposon and isogenic mutants. *Infect. Immun.* **66**: 3501-3509.

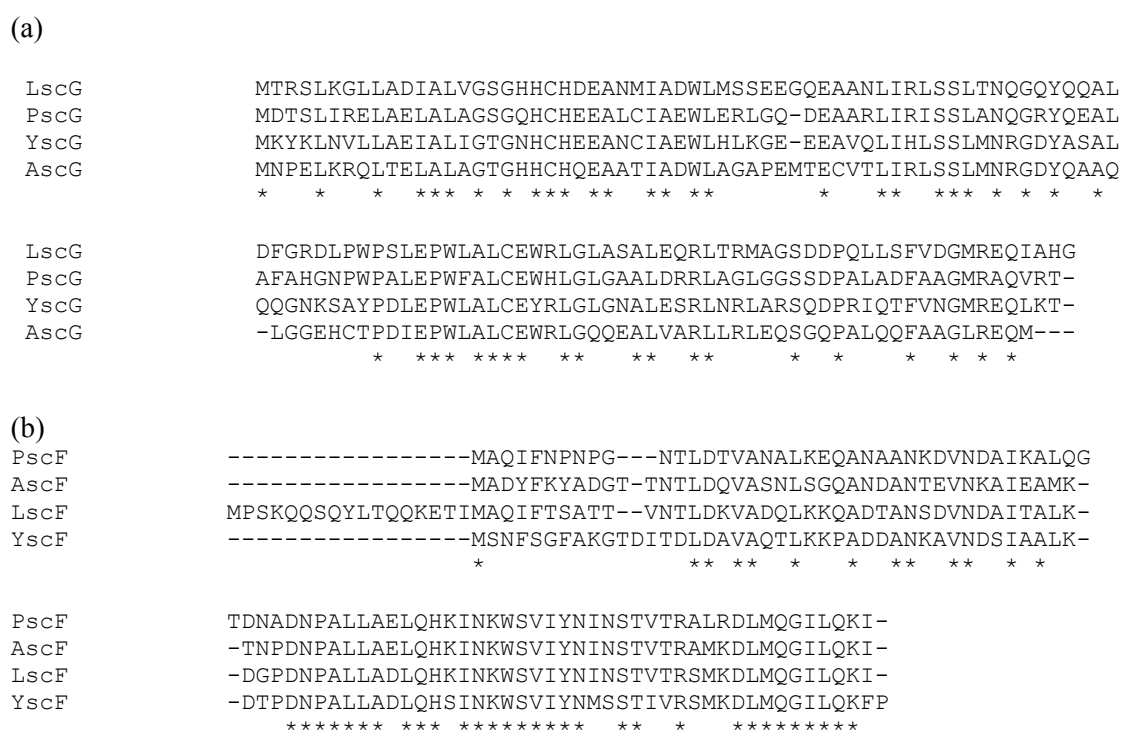


Figure 1. Protein sequence alignment of *Aeromonas veronii* AsG (a) and AscF (b) sequences with related proteins from *Yersinia enterocolitica*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Protorhabdus luminescens*. *Conserved aminoacid

Table 1. Comparison between predicted Type III *A. veronii* proteins with homologues from other miro-organisms

<i>A. veronii</i> protein	Homologue (micro-organism)	Predicted location/properties	% Identity	% Similarity
AscG	YscG (<i>Yersinia enterocolitica</i>)	Cytoplasmatic or peripheral membrane proteins /Syc-like chaperone (Day et al. 2000)	56	68
	LscG (<i>Protorhabdus luminescens</i>)	Unknown	53	62
	PscG (<i>Pseudomonas aeruginosa</i>)	Unknown	51	62
AscF	LscF(<i>Protorhabdus luminescens</i>)	Unknown	72	80
	PscF (<i>Pseudomonas aeruginosa</i>)	Unknown	70	78
	YscF(<i>Yersinia enterocolitica</i>)	Cytoplasmatic (Huek, 1997)/Unknown	62	76

Table 2. Properties of *A. veronii* proteins

A. veronii protein	No of residues	Isoelectric point	Molecular mass(kDa)
AscG	113	5.06	12.5
AscF	85	5.63	9.4

Table 3. Distribution of TTSS genes within *Aeromonas* species of clinical relevance

	No of strains and origin	Dot blot assay		
		<i>ascF-G</i>	<i>ascV</i>	<i>aexT</i>
<i>A. hydrophila</i>	18 intestinal	14 (77%)	14 (77%)	12 (66%)
	7 extraintestinal	6 (86%)	6 (86%)	6 (86%)
<i>A. veronii</i>	16 intestinal	11 (69%)	11 (69%)	10 (63%)
	9 extraintestinal	9 (100%)	9 (100%)	9 (100%)
<i>A. caviae</i>	20 intestinal	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
	14 extraintestinal	2 (14%)	2 (14%)	2 (14%)

Table 1. *Aeromonas* strains used in this study. The corresponding DNA homology group has been indicated in brackets.

Species	Strains no.*	Other designations*	16S rDNA	<i>gyrB</i> Gene Bank accession no.	<i>rpoD</i> Gene Bank accession no.
<i>A. hydrophila</i> (HG1)	CECT839 ^T	ATCC7966 ^T , DSMZ30187 ^T , Popoff543	<i>A. hydrophila</i>	AY101778	AY169325
<i>A. bestiarum</i> (HG2)	CECT 4227 ^T	ATCC51108 ^T ; CDC9533 ^T , LMG3751 ^T , Popoff218	<i>A. salmonicida</i> / <i>A. bestiarum</i>	AY101774	AY169326
	LMG13662	A295	<i>A. salmonicida</i> / <i>A. bestiarum</i>	AY101786	AY185590
	LMG13448	A169	<i>A. salmonicida</i> / <i>A. bestiarum</i>	AY101822	AY185580
<i>A. salmonicida</i> (HG3)	CECT894 ^T	ATCC33658 ^T , CIP103210 ^T , LMG3782 ^T	<i>A. salmonicida</i> / <i>A. bestiarum</i>	AY101773	AY169327
	CECT5173	Popoff316	<i>A. salmonicida</i> / <i>A. bestiarum</i>	AY101810	AY169328
	CECT4237	JCM8199, NCIMB1103	<i>A. salmonicida</i> / <i>A. bestiarum</i>	AY237567	AY169332
subsp. <i>mausocida</i> subsp. <i>achromogenes</i> subsp. <i>pectinolytica</i>	CECT896	ATCC27013, CIP103210, LMG3781	<i>A. salmonicida</i> / <i>A. bestiarum</i>	AY101790	AY169330
	CECT895	ATCC33659, LMG3781, NCIMB1110	<i>A. salmonicida</i> / <i>A. bestiarum</i>	AY101784	AY169329
	DSMZ12609	34MEL	<i>A. salmonicida</i> / <i>A. bestiarum</i>	AY101785	AY169324
<i>A. caviae</i> (HG4)	CECT838 ^T	ATCC15468 ^T , LMG3775 ^T , Popoff545	<i>A. caviae</i>	AY101783	AY169337
	CECT4221	ATCC15467, CIP7615, LMG3755, Popoff544	<i>A. caviae</i>	AY101794	AY185587
<i>A. media</i> (HG5)	CECT4232 ^T	ATCC33907 ^T , LMG9073 ^T , NCIMB2237 ^T	<i>A. media</i>	AY101782	AY169338
	CECT4234	ATCC35950	<i>A. media</i>	AY101824	AY249191
<i>A. eucrenophila</i> (HG6)	CECT4224 ^T	ATCC23309 ^T , LMG3774 ^T , NCIMB74 ^T , Popoff546	<i>A. eucrenophila</i>	AY101776	AY169339
	CECT4827	LMG13057, CDC9179, A914, CCUG30341	<i>A. eucrenophila</i>	AY101820	AY249193
<i>A. sobria</i> (HG7)	CECT4245 ^T	ATCC43979 ^T , CIP7433 ^T , LMG3783 ^T , Popoff208	<i>A. sobria</i>	AY101781	AY169640
<i>A. veronii</i> bg. <i>sobria</i> (HG8)	CECT4246	ATCC9071, NCIMB37, LMG3785	<i>A. veronii</i>	AY101775	AY169333
<i>A. jandaei</i> (HG9)	CECT4228 ^T	A1642 ^T , ATCC49568 ^T , LMG12221 ^T	<i>A. jandaei</i>	AY101780	AY169341
<i>A. veronii</i> bg. <i>veronii</i> (HG10)	CECT4257 ^T	A901 ^T , ATCC35624 ^T , LMG9075 ^T	<i>A. veronii</i>	AY101795	AY127862†
	CECT4260	ATCC35625, LMG16334	<i>A. veronii</i>	AY101787	AY169354
<i>Aeromonas</i> sp. (HG11)	CECT4253	A902, ATCC35941, NCIMB13014	<i>Aeromonas</i> sp. (HG11)	AY101779	AY169343
	CECT4856	A926, LMG13076, CCUG30365	<i>Aeromonas</i> sp. (HG11)	AY101808	AY249197
<i>A. schubertii</i> (HG12)	CECT 4240 ^T	ATCC43700 ^T , CDC2446-81 ^T , LMG9074 ^T	<i>A. schubertii</i>	AY101772	AY169336
<i>Aeromonas</i> sp. (HG13)	CECT4254	ATCC43946, CDC2478-85	<i>Aeromonas</i> sp.	AY101806	AY169345
<i>A. trota</i> (HG14)	CECT4255 ^T	A1646 ^T , ATCC49657 ^T , LMG12223 ^T	<i>A. trota</i>	AY101800	AY169344
	CECT4935	LMG13080, ATCC49659, AS370	<i>A. trota</i>	AY101805	AY249198
<i>A. allosaccharophila</i> (HG15)	CECT4199 ^T	ATCC51208 ^T , CCUG31218 ^T , S289, LMG14059 ^T	<i>A. allosaccharophila</i>	AY101777	AY169348
	CECT4220	ATCC35942, CDC0715-84, LMG14021	<i>A. allosaccharophila</i>	AY101812	AY185585
	CECT4200	S290, LMG14058	<i>A. allosaccharophila</i>	AY101823	AY185586
<i>A. encheleia</i> (HG16)	CECT4342 ^T	ATCC51929 ^T , S181, NCIMB13442 ^T	<i>A. encheleia</i>	AY101799	AY169346
	CECT4341	ATCC51930, S176, LMG16329	<i>A. encheleia</i>	AY101804	AY249194
<i>A. popoffii</i> (HG17)	CECT5176 ^T	LMG17541 ^T , IK-0-a-10-3	<i>A. popoffii</i>	AY101801	AY169347
	LMG 17543		<i>A. popoffii</i>	AY101803	AY169367
	LMG 17544		<i>A. popoffii</i>	AY101821	AY169349
	LMG17545		<i>A. popoffii</i>	AY237583	AY185582
	LMG17546		<i>A. popoffii</i>	AY237584	AY185583

Table 1. Continuation

Species	Strains no.*	Other designations*	16S rDNA	<i>gyrB</i> Gene Bank accession no.	<i>rpoD</i> Gene Bank accession no.
<i>A. culicicola</i>	MTCC3249 [†]			AF175891†	AY127871†
<i>Aeromonas</i> sp.	Isolate 140P		<i>A. hydrophila</i>	AY237560	AY169356
	Isolate 830		<i>A. hydrophila</i>	AY237561	AY169364
	Isolate 874		<i>A. hydrophila</i>	AY237562	AY169365
	Isolate 63c	CECT5216	<i>A. hydrophila</i>	AY101789	AY169366
	Isolate A7	LMG13452	<i>A. salmonicida</i> / <i>A. bestiarum</i>	AY101815	AY169335
	Isolate 101F	CECT5219	<i>A. salmonicida</i> / <i>A. bestiarum</i>	AY101788	AY169357
	Isolate 37		<i>A. salmonicida</i> / <i>A. bestiarum</i>	AY101819	AY169350
	Isolate 220c	LMG18998	<i>A. salmonicida</i> / <i>A. bestiarum</i>	AY101816	AY169358
	Isolate 119P		<i>A. salmonicida</i> / <i>A. bestiarum</i>	AY237568	AY169351
	Isolate 120P		<i>A. salmonicida</i> / <i>A. bestiarum</i>	AY237569	AY169359
	Isolate 156		<i>A. salmonicida</i> / <i>A. bestiarum</i>	AY237570	AY169361
	Isolate A99		<i>A. salmonicida</i> / <i>A. bestiarum</i>	AY237571	AY169352
	Isolate 440		<i>A. salmonicida</i> / <i>A. bestiarum</i>	AY237572	AY169334
	Isolate 130		<i>A. salmonicida</i> / <i>A. bestiarum</i>	AY237573	AY169355
	Isolate 361c		<i>A. salmonicida</i> / <i>A. bestiarum</i>	AY237574	AY169353
	Isolate 108F		<i>A. salmonicida</i> / <i>A. bestiarum</i>	AY237575	AY169360
	Isolate 22		<i>A. salmonicida</i> / <i>A. bestiarum</i>	AY237576	AY169363
	Isolate 107F		<i>A. salmonicida</i> / <i>A. bestiarum</i>	AY237577	AY169362
	Isolate 26		<i>A. salmonicida</i> / <i>A. bestiarum</i>	AY237578	AY169368
	Isolate P1W-98		<i>A. salmonicida</i> / <i>A. bestiarum</i>	AY237563	AY185588
	Isolate 40		<i>A. salmonicida</i> / <i>A. bestiarum</i>	AY237564	AY185593
	Isolate 117P		<i>A. salmonicida</i> / <i>A. bestiarum</i>	AY237565	AY185591
	Isolate 116P		<i>A. salmonicida</i> / <i>A. bestiarum</i>	AY237566	AY185592
	Isolate 665c		<i>A. caviae</i>	AY237579	AY249199
	Isolate 239		Newly described (not shown)	AY237580	AY308843
	Isolate 480		Newly described (not shown)	AY237581	AY308844
	Isolate 280		Newly described (not shown)	AY299324	AY308846
	Isolate 610		Newly described (not shown)	AY101814	AY308847
	Isolate 57		Newly described (not shown)	AY237582	AY308845
	Isolate 741		<i>A. media</i>	AY299321	AY249192
	Isolate 350		<i>A. sobria</i>	AY101807	AY249195
	Isolate 344		<i>A. jandaei</i>	AY101796	AY249196

*ATCC, American Type Culture Collection, Rockville, Md.; CCUG, Culture Collection of the University Göteborg, Göteborg, Sweden; CDC, Centers for Disease Control, United States Public Health Service, Atlanta, Ga.; CECT, Colección Española de Cultivos Tipo, Universidad de Valencia, Valencia, Spain; CIP, Collection bactérienne de l'Institut Pasteur, Paris, France; DSMZ, Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Braunschweig, Germany; LMG, Culture Collection of the Laboratorium voor Microbiologie Gent, Universiteit Gent, Ghent, Belgium; NCIMB, National Culture Collection of Industrial and Marine Bacteria Aberdeen, Scotland.

† Sequences obtained from the GenBank.

Table 2. Characteristics of primers used for PCR amplification and sequencing of *gyrB* and *rpoD* genes.

Target	Primer	Position ^a	Sequence (5'-3')	Reference
<i>gyrB</i>	gyrB 3F	334-354	TCCGGCGGTCTGCACGGCGT	Yañez <i>et al.</i> (2002)
	gyrB 9Rs	980-960	CCTTGACCGAAATGACCGCC	
	gyrB 7F	792-812	GGGGTCTACTGCTTCACCAA	
	gyrB 9R	979-959	ACCTTGACGGAGATAACGGC	
	gyrB 14R	1464-1444	TTGTCCGGGTTGTACTCGTC	
<i>rpoD</i>	rpoD 70F	280-323	ACGACTGACCCGGTACGCATGTAYATGMGNGARATGGGNACNGT	Yamamoto <i>et al.</i> (2000) ^b This work
	rpoD 70Fs	280-302	ACGACTGACCCGGTACGCATGTA	
	rpoD 70Fs1 ^b	740-757	GTCAATTCCGCCTGATGC	
	rpoD 70R	1139-1096	ATAGAAATAACCAGACGTAAGTTNGCYTCNACCATYTCYTTYTT	
	rpoD 70Rs	1117-1139	ATAGAAATAACCAGACGTAAGTT	
	rpoD 70Rs1 ^b	800-782	ATCATCTCGCGCATGTTGT	

^aPositions according to *E. coli* numbering. N, any nucleotide; R, A or G; S, C or G; Y, C or T; M, A or C.

Maria José Figueras Salvat Catedrática de Microbiología y **Matilde Rodríguez Chacón** Investigador, ambas de la Unidad de Microbiología del Departamento de Ciencias Médicas Básicas de la Facultad de Medicina y Ciencias de la Salud de la Universidad Rovira y Virgili.

CERTIFICAN:

Que la licenciada Lara Soler Falgàs ha realizado bajo su dirección la tesis doctoral titulada “IMPORTANCIA BIOSANITARIA DE *Aeromonas*: TAXONOMÍA Y EPIDEMIOLOGÍA”, y que esta es apta para poder ser presentada para la obtención del grado de Doctor.

Y para que así conste y tenga los efectos oportunos, se firma la presente en Reus, el 26 de mayo de 2003.

Dra. Maria J. Figueras Salvat

Dra. Matilde Rodríguez Chacón