

**UNIVERSIDAD DE BARCELONA**

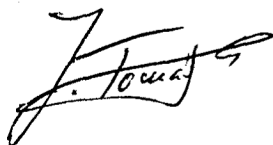
**FACULTAD DE BIOLOGIA**

**MECANISMOS MOLECULARES DE LA PATOGENICIDAD**

**DE AEROMONAS HYDROPHILA**

V. B.  
El Director de la Tesis

Memoria presentada por  
**Susana Merino Montero**  
para optar al grado de  
Doctor en Biología.



**Dr. Joan Tomás Magaña**

Barcelona, Septiembre 1990

### 3.3.C.- SENSIBILIDAD A LOS BACTERIOFAGOS.

Al determinar la sensibilidad a los bacteriófagos 18, 69, 145, Aeh-1 y PM3 a 37°C y a los fagos PM1 y PM2 a 20°C de cepas de serogrupo O11, mediante siembra en masa de  $10^8$  células bacterianas y  $10^9$  p.f.u. de cada uno de los bacteriófagos, se observó que todas las cepas del citado serogrupo eran resistentes a los bacteriófagos 18, 69, 145, PM1, PM2 y Aeh-1 y únicamente, alguna de ellas era sensible al bacteriófago PM3 a 37°C.

En cuanto a la sensibilidad de los mutantes isogénicos para estructuras superficiales, se observó que aquellos mutantes que habían perdido la estructura proteínica denominada lámina-S (O<sup>+</sup>:S<sup>-</sup> y O<sup>-</sup>:S<sup>-</sup>), se convertían en sensibles a los bacteriófagos PM2 y Aeh-1 a 37°C. Aquellos que perdían el antígeno O del LPS pero no la lámina-S, presentaban sensibilidad a los mismos bacteriófagos que la cepa salvaje de la que procedían y finalmente, los mutantes que únicamente habían perdido el flagelo, pero su LPS y lámina-S seguían intactas, se convertían en resistentes solamente al bacteriófago PM3.

**TABLA 37: Sensibilidad a los bacteriófagos de algunas cepas de Aeromonas hydrophila serogrupo O11.**

Cepas	Bacteriófagos						
	37°C					20°C	
	18	69	145	Aeh-1	PM3	PM1	PM2
TF7 (O <sup>+</sup> :S <sup>+</sup> )	-	-	-	-	+	-	-
LL1 "	-	-	-	-	+	-	-
ATCC9071 "	-	-	-	-	-	-	-
AH-205 "	-	-	-	-	-	-	-
AH-121 "	-	-	-	-	-	-	-
AH-45 (O <sup>+</sup> :S <sup>-</sup> )	-	-	-	+	+	-	+
AH-21 (O <sup>-</sup> :S <sup>+</sup> )	-	-	-	-	+	-	-
AH-24 (O <sup>-</sup> :S <sup>+</sup> )	-	-	-	+/-	+	-	+/-
AH-26 (O <sup>-</sup> :S <sup>-</sup> )	-	-	-	+	+	-	+
AH-28 (no mótil)	-	-	-	-	-	-	-

+: sensibilidad.  
-: resistencia.

Cabe indicar que A. salmonicida A-450 (O:lámina-A\*) y A-450-3 (O:lámina-S\*) son sensibles al bacteriófago PM2 cuyo receptor como se indica en esta memoria es el núcleo del LPS.

### 3.3.D.- CARACTERISTICAS SUPERFICIALES.

#### 3.3.D.1.- AUTOAGLUTINACION.

La autoaglutinación es una propiedad presente en algunas cepas bacterianas de Aeromonas hydrophila, que se ha relacionado con la virulencia (117).

Se ha observado que la cepa TF7 de serogrupo O11 al crecer estática en B.H.I. durante 24 h. a 37°C, da lugar a un precipitado por autoaglutinación, siendo por tanto SP<sup>+</sup>. Así mismo, la citada cepa bacteriana autoaglutina tras ser hervida durante una hora, por lo que se clasifica como PAB<sup>+</sup>.

Por otro lado, al realizar este mismo tipo de experimentos con los mutantes isogénicos para estructuras superficiales derivados de la cepa TF7 se apreció que: los mutantes con lámina-S y deficientes en antígeno O del LPS como AH-21 (O:S<sup>+</sup>) y AH-24 (O:S<sup>+</sup>) son SP<sup>+</sup> PAB<sup>+</sup>, los mutantes deficientes en lámina-S como el AH-45 (O:S<sup>-</sup>) y AH-26 (O:S<sup>-</sup>) son SP<sup>-</sup> PAB<sup>-</sup>, y los mutantes deficientes en flagelo como AH-28 son SP<sup>-</sup> PAB<sup>-</sup>. Todos estos datos, que se hallan reflejados en la tabla 38, parecen indicar que la carencia de lámina-S ó flagelo provocan alteraciones en la superficie bacteriana que implican la no formación de precipitado por autoaglutinación.

. Un dato relevante es que no todas las cepas salvajes de serogrupo O11 tiene la capacidad de autoaglutinar, lo cual parece indicar que no únicamente la lámina-S y el flagelo juegan un papel importante en este proceso, sino que deben existir otras estructuras implicadas en él, como podrían ser las fimbrias.

Todo ello, indica que la relación autoaglutinación-virulencia es unilateral y no bilateral ya que, todas las cepas que autoaglutinan son virulentas, pero no todas las cepas altamente virulentas autoaglutinan.

**TABLA 38: Autoaglutinación de la cepa TF7 y sus mutantes isogénicos.**

<b>Cepas bacterianas</b>	<b>SP</b>	<b>PAB</b>
TF7 (O <sup>+</sup> :S <sup>+</sup> )	+	+
AH-21 (O <sup>+</sup> :S <sup>+</sup> )	+	+
AH-24 (O <sup>+</sup> :S <sup>+</sup> )	+	+
AH-45 (O <sup>+</sup> :S <sup>-</sup> )	-	-
AH-26 (O <sup>+</sup> :S <sup>-</sup> )	-	-
AH-28 (no mótil)	-	-

### **3.3.D.2.- HIDROFOBICIDAD.**

El estudio de la superficie bacteriana de los mutantes isogénicos para estructuras superficiales de cepas de serogrupo O11, no es conclusiva mediante el test de adhesión de hidrocarburos. Esto se debe al fenómeno de autoaglutinación que presentan algunas cepas del citado serogrupo.

La autoaglutinación forma agregados de células que hacen que la medida de hidrofobicidad varíe. Además, esto se complica considerablemente si deben compararse las medidas de hidrofobicidad existentes entre la cepa parental, capaz de autoaglutinar y los mutantes isogénicos que no tienen capacidad de autoaglutinar.

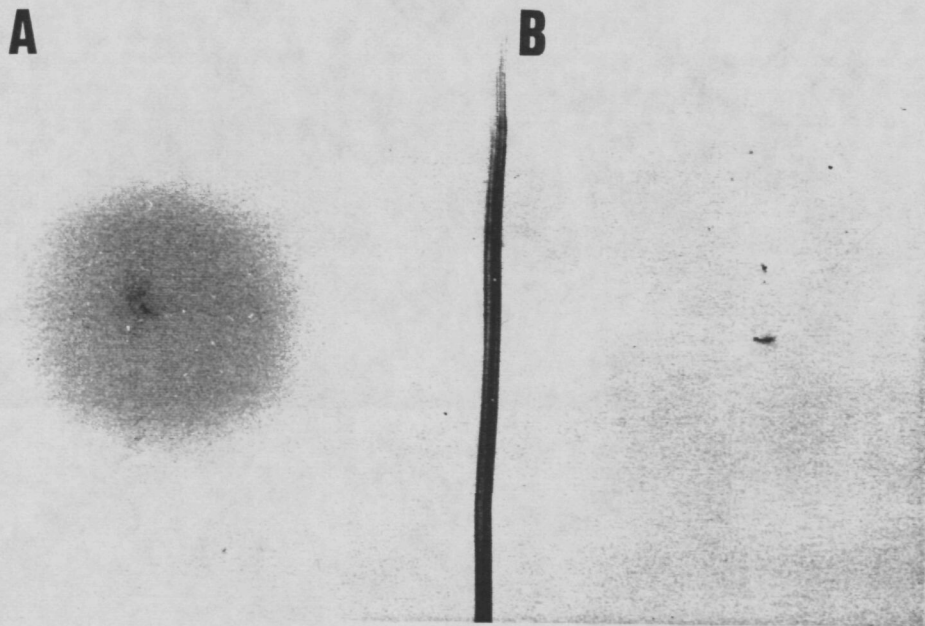


### **3.3.D.3.- MOTILIDAD.**

La motilidad es una propiedad presente en todas las Aeromonas mesófilas englobadas dentro del grupo de las Aeromonas móviles, como es el caso de las cepas pertenecientes al serogrupo O11.

Se ha observado mediante test de la gota y crecimiento en agar gelatina, que todas las cepas de serogrupo O11 son móviles y que los mutantes isogénicos para lámina-S y LPS, también lo son.

Unicamente los mutantes de flagelo (H<sup>v</sup>) como la cepa AH-28 y AH-55, obtenidos por resistencia al bacteriófago PM3, los cuales no tienen capacidad de autoaglutinar, no son móviles (Figura 21).



**FIGURA 21:** Crecimiento en placas semisólidas de TSB suplementadas con agar-agar al 0.3% y 8% de gelatina (98). A) Rápida expansión de la cepa TF7 al crecer en el medio anteriormente citado. B) Crecimiento puntual de la cepa AH-28 a causa de la carencia de flagelo.

### 3.3.E.- PRODUCCION DE TOXINAS.

Se estudió la capacidad de producir toxinas que poseen las Aeromonas móviles de serogrupo O11 y sus mutantes isogénicos respectivos, mediante análisis de sobrenadantes según el método descrito por Lallier (72). Con ello, se observó que las cepas de serogrupo O11 y los mutantes isogénicos para estructuras superficiales poseen la misma capacidad de síntesis de hemolisina, proteasas, factor dermonecrotico, amilasas, gelatinasas, enterotoxinas, etc.

Si comparamos la capacidad de secreción de este serogrupo con la de otros, observamos que por ser el grupo más virulento dentro de las Aeromonas móviles, presenta un nivel de secreción inferior al de otros serogrupos menos virulentos como podría ser el O34.

### 3.3.F.- SENSIBILIDAD A LOS ANTIBIOTICOS.

Al determinar la sensibilidad a algunos antibióticos de las cepas salvajes y los mutantes isogénicos para estructuras superficiales, observamos que todos eran sensibles a : Carbenicilina (20  $\mu\text{g/ml.}$ ), Ampicilina (40  $\mu\text{g/ml.}$ ) y SDS (1  $\text{mg/ml.}$ ); resistentes a : Tetraciclina (5  $\mu\text{g/ml.}$ ) y  $\text{K}_2\text{TeO}_3$  (0.25  $\mu\text{g/ml.}$ ); y únicamente existen diferencias entre la cepa salvaje y algunos mutantes para : Polimixina (20  $\mu\text{g/ml.}$ ), Streptomina (30  $\mu\text{g/ml.}$ ), Novobiocina (60  $\mu\text{g/ml.}$ ), Neomicina (10  $\mu\text{g/ml.}$ ), Acido nalidíxico (0.5  $\mu\text{g/ml.}$ ) y EDTA (1  $\text{mg/ml.}$ ).

Básicamente, las diferencias más importantes en lo que respecta a la sensibilidad de los antibióticos residen en los mutantes con deficiencias conjuntas en el LPS y la lámina-S ( $\text{O:S}$  y  $\text{O:S}^{**}$ ). En consecuencia, parece ser que estas dos estructuras superficiales poseen un efecto inhibiendo físicamente la difusión de estos antibióticos.

En la tabla 39, únicamente se hallan computados los resultados obtenidos en la cepa TF7 y en sus mutantes isogénicos, pues para cualquier otra cepa los resultados eran idéntico.

**TABLA 39: Resumen de la sensibilidad a los antibióticos de la cepa TF7 de Aeromonas hydrophila serogrupo O11 y de sus mutantes para estructuras superficiales.**

Antibiótico	TF7	AH-21	AH-24	AH-26	AH-45	AH-28
Tetraciclina (5 µg/ml.)	NC	NC	NC	NC	NC	NC
Polimixina (20 µg/ml.)	C	C	C	C	C	C
Carbamicilina (20 µg/ml.)	C	C	C	C	C	C
Streptomicina (30 µg/ml.)	C	C	NC	NC	C	C
Neomicina (10 µg/ml.)	C	C	NC	NC	C	C
Ac. nalidíxico (0.5 µg/ml.)	C	C	NC	NC	C	C
Ampicilina (40 µg/ml.)	C	C	C	C	C	C
Novabiocina (60 µg/ml)	C	NC	NC	NC	C	C
SDS (1 mg/ml.)	C	C	C	C	C	C
EDTA (1 mg/ml.)	C	C	NC	NC	C	C
K <sub>2</sub> TeO <sub>3</sub> (0.25 µg/ml.)	NC	NC	NC	NC	NC	NC

NC: Sensibilidad al antibiótico.

C: Resistencia al antibiótico.

### **3.3.G.- ESTUDIO DE LA ACCION DEL SUERO NO INMUNE SOBRE CEPAS DE SEROGRUPO O11.**

#### **3.3.G.1.- RESISTENCIA DE LAS CEPAS A LA ACCION BACTERICIDA DEL SUERO NO INMUNE.**

A partir de la cepa TF7 de Aeromonas hydrophila serogrupo O11 (O<sup>+</sup>:S<sup>+</sup>) que presenta un lipopolisacárido completo de serogrupo O11 y una estructura proteínica denominada lámina-S, se obtuvo un conjunto de mutantes isogénicos para las estructuras superficiales (lámina-S y LPS), tal y como se muestra en la tabla 40, que nos permitiese estudiar la acción bactericida del suero no inmune.

Al estudiar la acción del suero se observó que únicamente los mutantes de la cepa TF7 deficientes en la estructura denominada lámina-S y en antígeno O del LPS (O<sup>-</sup>:S<sup>-</sup>), como el AH-26, eran sensibles al suero no inmune (Gráfica 9) en las condiciones empleadas.

Debo indicar, que las cepa parental (O<sup>+</sup>:S<sup>+</sup>) y los mutantes deficientes únicamente en lámina-S (O<sup>+</sup>:S<sup>-</sup>), como el AH-45, no son sólo resistentes a la acción bactericida del suero sino que siguen creciendo a lo largo de toda la incubación. Por otro lado, los mutantes deficientes únicamente en antígeno O (O<sup>-</sup>:S<sup>+</sup> y O<sup>-</sup>:S<sup>+/+</sup>), como AH-21 y AH-24, experimentan un ligero descenso durante la primera hora de incubación en suero fresco no inmune, pero

rápidamente se recuperan e incluso crecen durante el resto de la incubación (Gráfica 9).

Debido a que la mezcla de incubación (PBS:suero, 1:4) hay una cantidad de nutrientes inferiores a los del medio original en el que se hallaban las cepas, se comprobó que las diferencias de viabilidad observadas se debían a factores bactericidas del suero y no a factores nutricionales. Con este fin, se descomplementó el suero por calentamiento a 56°C durante 30 min. o por tratamiento con EDTA y se estudió la supervivencia de las cepas sensibles (O:S<sup>-</sup>), en el citado suero. Al llevar a cabo este experimento, se observó la ausencia total de mortalidad en estos mutantes, tal y como se muestra en la tabla 41. De estos resultados se desprende que la sensibilidad anteriormente citada es causada por el poder bactericida del complemento existente en el suero no inmune, tanto de conejo como humano, y no a factores nutricionales.

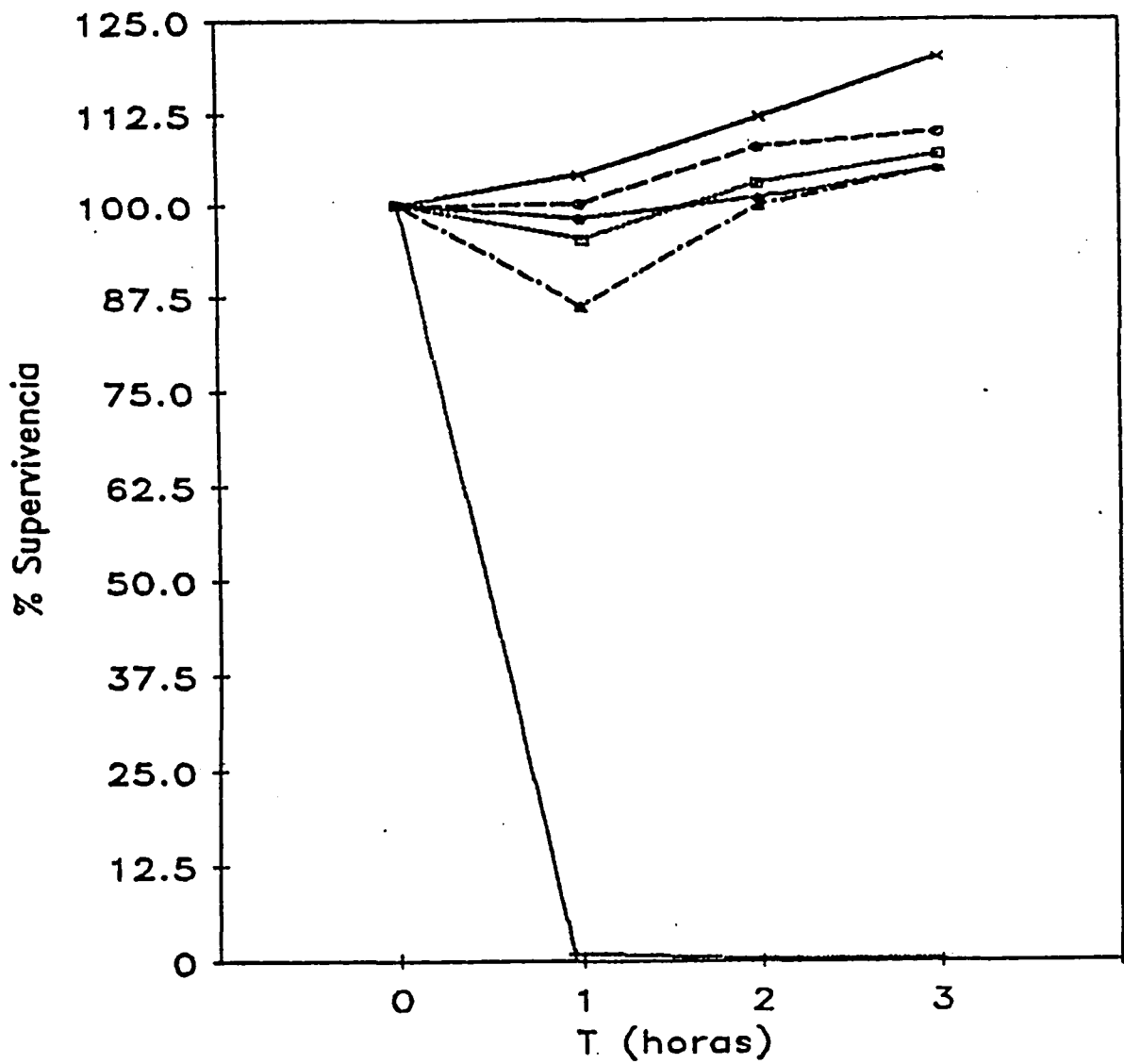
Tras haber mantenido los mutantes sensibles al suero (O:S<sup>-</sup>) de *Aeromonas hydrophila*, en contacto durante 3 h. con suero fresco no inmune sin descomplementar, se obtuvieron supervivientes que se purificaron mediante estría en placa. Posteriormente, se analizó la resistencia al suero de estas cepas (Tabla 41) y se comprobó la selección de poblaciones resistentes, como las del mutante AH-27 (Gráfica 9).

**TABLA 40: Cepas de Aeromonas hydrophila serogrupo O11 utilizadas para llevar a cabo los estudios de resistencia a la acción bactericida del suero no inmune.**

Cepas	Características	Origen	Suero
TF7	O <sup>+</sup> :S <sup>+</sup>	R. Lallier, Canada	Resistente
AH-45	O <sup>+</sup> :S <sup>-</sup>	Derivada de TF7	Resistente
AH-21	O <sup>-</sup> :S <sup>+</sup>	Derivada de TF7	Resistente
AH-24	O <sup>-</sup> :S <sup>+</sup>	Derivada de TF7	Resistente
AH-25	O <sup>-</sup> :S <sup>-</sup>	Derivada de TF7	Sensible
AH-26	O <sup>-</sup> :S <sup>-</sup>	Derivada de TF7	Sensible
AH-27	O <sup>-</sup> :S <sup>-</sup>	Derivada de AH-26	Resistente
AH-100	O <sup>-</sup> :S <sup>-</sup>	Derivada de AH-25	Resistente



**GRAFICA 9: Supervivencia de la cepa TF7 de *A. hydrophila* serogrupo O11 y sus mutantes isogénicos derivados, ante la acción del suero fresco no inmune.**



- |         |         |
|---------|---------|
| x TF7   | Δ AH-24 |
| ○ AH-45 | + AH-26 |
| □ AH-21 | • AH-27 |

**TABLA 41: Supervivencia de la cepa TF7 de *A. hydrophila* serogrupo O11 y sus mutantes isogénicos al ponerse en contacto con suero normal y suero descomplementado <sup>\*)</sup>.**

Cepas	% de supervivientes en:					
	Suero normal			Suero descomplementado		
	1 h.	2 h.	3 h.	1 h.	2 h.	3 h.
TF7	104	112	120	103	118	125
AH-45	100	108	110	102	110	116
AH-21	95	103	107	104	105	109
AH-24	86	100	105	102	106	110
AH-25	0.8	<0.1	<0.1	102	105	108
AH-100	99	104	107	104	107	112
AH-26	0.7	<0.1	<0.1	101	103	109
AH-27	98	101	105	102	107	110

<sup>\*)</sup> El suero normal no inmune se descomplementa por tratamiento con calor a 56°C durante 30 min. o bien, por tratamiento con EDTA durante 1 h. a 37°C.

Una vez comprobada la resistencia al suero no inmune de estos mutantes, se estudiaron sus características superficiales.

En primer lugar, se analizó su LPS mediante gel SDS-PAGE y tinción con nitrato de plata. Esto, reveló que presentaban un LPS corto (sin antígeno O), de menor movilidad electroforética que el de las cepas sensibles al suero (O:S) de las que proceden (Figura 22).

En segundo lugar, se estudió la composición química del LPS de estos mutantes resistentes y se observó que presentaban un descenso en la cantidad de KDO, L-heptosas y mannosas, un aumento en el nivel de glucosa y aparecía galactosa (Gráfica 10). Todo ello con respecto a las cepas sensibles al suero de las que proceden. Esta aparición de galactosa en el LPS podría provocar un cambio estructural que confería protección a la bacteria ante la acción del complemento presente en suero no inmune.

En tercer lugar, se determinó si los citados mutantes suero resistentes (AH-27 y AH-100) presentaban la estructura superficial proteínica denominada lámina-S, presente en las cepas salvajes de serogrupo O11. Con este fin, se purificaron las membranas externas de cada uno de los mutantes resistentes y se realizó un "Western-blotting", revelado con antisuero anti-lámina-S de la cepa TF7 de A. hydrophila. Esto, puso de manifiesto la ausencia de lámina-S en los citados mutantes (Figura 18).

Finalmente, mediante geles SDS-PAGE teñidos con Coomassie blue, se estudió su patrón de proteínas de membrana externa y se observó que era idéntico al de las cepas sensibles al suero (AH-25 y AH-26) de las que derivan.

Todos estos datos indican que las cepas resistentes al suero, obtenidas espontáneamente a partir de cepas sensibles, únicamente difieren de las cepas que derivan en la movilidad electroforética de su LPS en SDS-PAGE y en la composición química del mismo. En consecuencia, al igual que ocurre con las cepas de serogrupo O34, existe una relación estrecha entre la composición química y estructuras del LPS y la resistencia a la acción bactericida del suero.



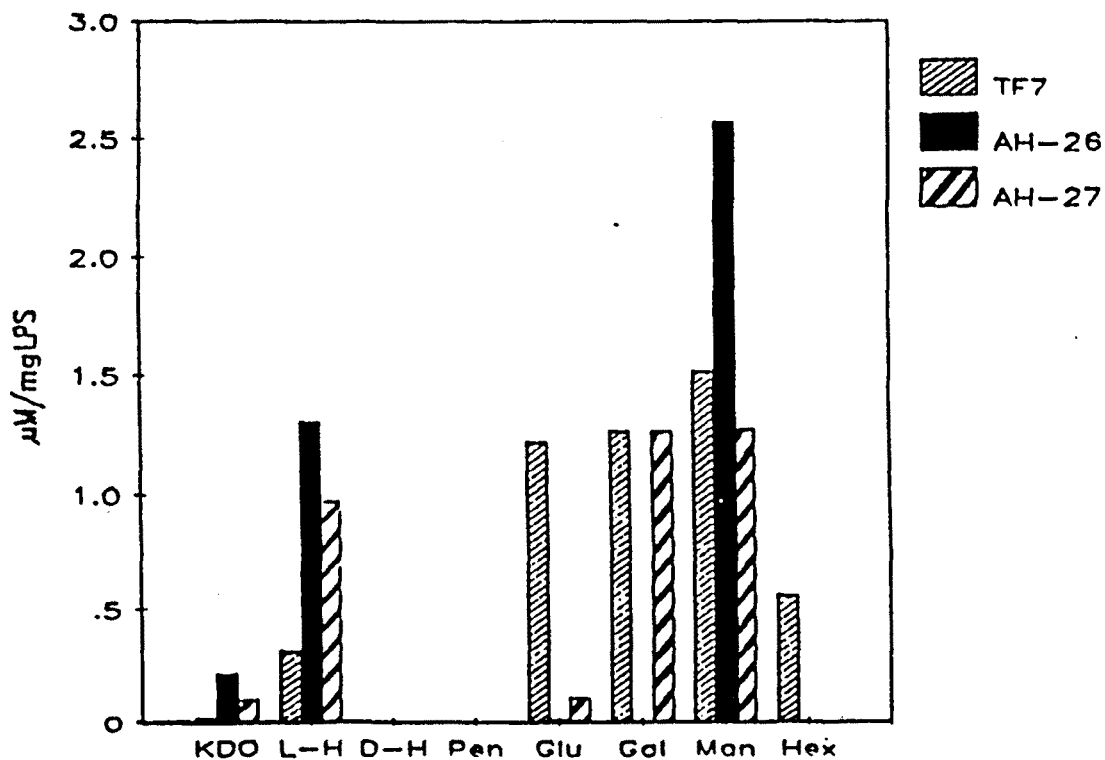
**FIGURA 22:** Gel SDS-PAGE del LPS de los mutantes obtenidos por resistencia al suero a partir de las cepas sensibles AH-25 y AH-26 de A. hydrophila serogrupo O11. Columna: 5, Mutante sensible AH-26; y 6, Mutante resistente al suero AH-27;

**TABLA 42:** Resumen de la composición química del LPS purificado de los mutantes sensibles al suero de la cepa TF7 (O:S<sup>-</sup>) y de sus respectivos derivados resistentes.

μmoles/mg. de LPS de:

LPS	KDO	L-Heptosa	D-Heptosa	Pentosa	Glucosa	Galactosa	Mannosa	Hexos
TF7	0.025	0.32	0	0	1.22	1.27	1.52	0.57
AH-26	0.22	1.31	0	0	0.02	0	2.57	0
AH-27	0.11	0.98	0	0	0.12	1.27	1.28	0
AH-25	0.21	1.29	0	0	0.01	0	2.55	0
AH-100	0.09	1.95	0	0	0.10	1.25	1.28	0

**GRAFICA 10:** Histograma comparativo de la composición del LPS purificado de las cepas AH-26 (O:S<sup>-</sup> sensible al suero) y de la cepa AH-27 (O:S<sup>-</sup> resistente al suero).



### 3.3.G.2.- VIA DE ACTUACION DEL COMPLEMENTO.

Cuando estudiamos la resistencia a la acción bactericida del suero, habíamos observado que únicamente las cepas de tipo O:S' derivadas de la cepa TF7 de A. hydrophila eran sensibles al ponerse en contacto con suero normal no inmune. Por el contrario, si se ponían en contacto con suero descomplementado (inhibida la vía clásica y la alternativa) por tratamiento con EDTA o por calor durante 30 min. a 56°C, se observaba la pérdida de actividad bactericida sobre estas mismas cepas.

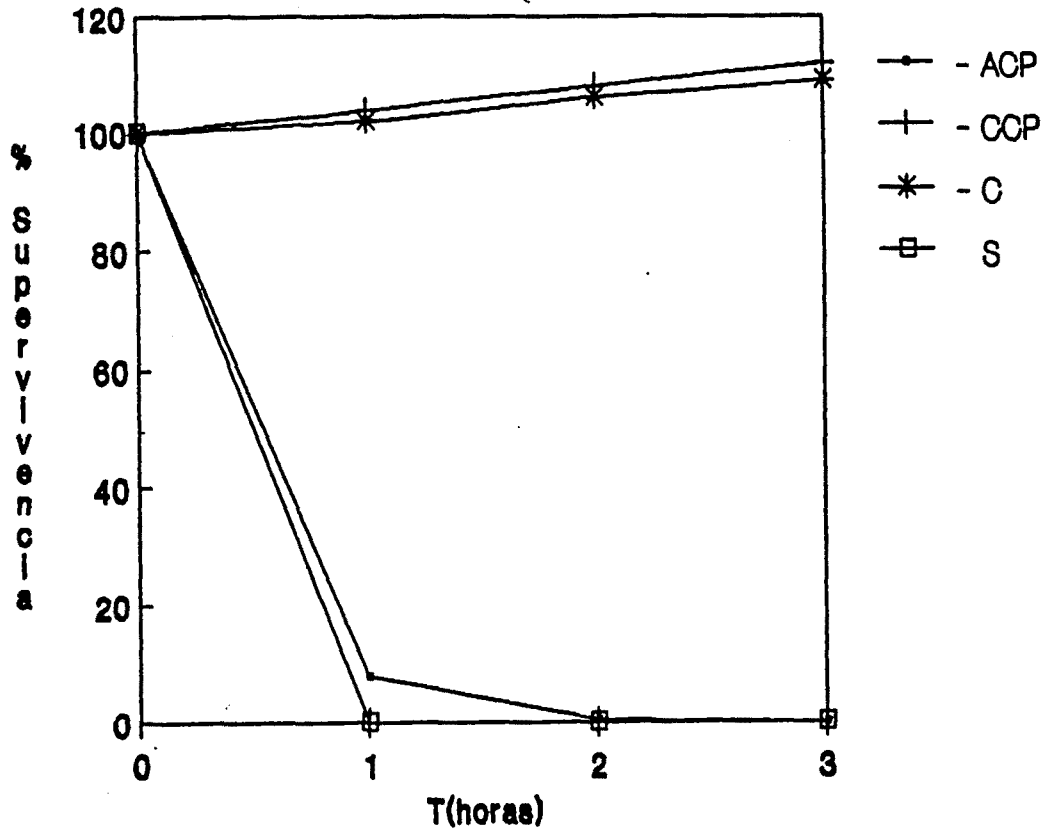
Esto, demuestra de forma clara que la actividad bactericida del suero no inmune en las cepas de serogrupo O11 se debe a la acción del complemento.

Tras determinar el agente causal de la actividad bactericida del suero no inmune, se determinó la vía de activación del mismo. Con este fin, se incubaron las cepas sensibles (O:S') por un lado con suero al que se le había inhibido la vía clásica del complemento (CCP) por tratamiento con  $Mg^{2+}$ -EDTA y por otro, con suero al que se le había inhibido la vía alternativa del complemento (ACP) por tratamiento con inulina o calentamiento a 50°C durante 20 min. Se observó que el suero deficiente en CCP perdía la actividad bactericida y por el contrario, el suero deficiente en ACP seguía presentando dicha actividad (Gráfica 11).

Para acabar de confirmar la vía de actuación del complemento, se incubaron las cepas sensibles (O:S) con suero no inmune deficiente en C1q (subunidad de la proteína C1 del complemento, clave para el inicio de la vía clásica). Al emplear este tipo de suero, observamos que las cepas sensibles a la acción del suero normal no inmune, se convertían en resistentes, pues eran capaces de crecer en él. Este hecho, sugiere que la vía de actuación del complemento sobre las cepas de serogrupo O 11, es la vía clásica.



**GRAFICA 11:** Cinética de muerte de la cepa sensible al suero AH-26 de A. hydrophila al ponerse en contacto con suero no inmune al que se le ha inhibido la CCP, la ACP y ambas vías.



### 3.3.G.3.- INHIBICION DE LA ACTIVIDAD BACTERICIDA DEL SUERO NO INMUNE.

Tras obtener un conjunto completo de mutantes isogénicos para las estructuras superficiales de la cepa TF7 de serogrupo O11, se determinó la estructura superficial responsable de la resistencia a la acción bactericida del suero no inmune. Con este fin, se purificó el LPS de los mutantes sensibles (AH-26 y AH-25) y resistentes (AH-45, AH-21, AH-24, AH-27 y AH-100) al suero y el de la cepa salvaje (TF7). Los citados LPS (100 µg/ml.), así como la lámina-S purificada de la cepa TF7 (100 µg/ml. de proteína) se incubaron con suero de conejo y humano a 37°C durante 1 h., para que se desencadenase la acción del complemento y posteriormente, el mencionado suero se puso en contacto con las cepas sensibles (AH-25 y AH-26) para determinar si alguna de las estructuras superficiales aisladas confería protección a los mutantes sensibles.

Gracias a esto, pudimos apreciar que la lámina-S no juega ningún papel en la resistencia a la acción bactericida del suero; a diferencia de lo que ocurre con la lámina-A, presente en las cepas virulentas de Aeromonas salmonicida; y que el LPS de las cepas resistentes protege a las cepas sensibles de la acción del complemento, tal y como se muestra en la tabla 43.

Una vez confirmada la responsabilidad del LPS en la activación del complemento, se determinó la región del mismo causante de dicha acción.

Para llevar a cabo este estudio, se fraccionó el LPS de las cepas O<sup>+</sup> (TF7 y AH-45) en función de su peso molecular (Figura 15) y las fracciones obtenidas se agruparon en dos "pool" : uno que contenía las fracciones de elevado peso molecular (HMW-LPS) y otro, que contenía las de bajo peso molecular (LMW-LPS). Luego, las fracciones agrupadas de este modo, así como el LPS de algunas cepas, tanto sensibles como resistentes, que se presentaban únicamente moléculas de bajo peso molecular (O<sup>-</sup>) se utilizaron para inactivar suero no inmne. Al realizar esto, se observó que las cepas de Aeromonas hydrohila serogrupo O11 sensibles al suero presentan un elevado porcentaje de supervivencia, sólomente si el suero ha sido preincubado con fracciones de bajo peso molecular o con LPS sin HMW-LPS de las cepas resistentes (Tabla 44).

Todos estos resultados indican que la región del antígeno O del LPS (HMW-LPS) y la lámina-S no activan el complemento y por el contrario, es la región del núcleo del LPS (LMW-LPS) la responsable de esta activación.

Este proceso de activación del complemento es similar al empleado por las cepas de Aeromonas salmonicida en lo que respecta al LPS, ya que en esta especie bacteriana también es el núcleo del LPS el responsable de la activación del suero, y es diferente en lo referente a la lámina-A, pues esta estructura superficial proteínica juega un papel importante en la protección a la acción bactericida del complemento.

**TABLA 43: Inhibición de la acción bactericida del suero sobre cepas de A. hydrophila de serogrupo O11 mediante LPS homólogos y heterólogos y lámina-S.**

% de supervivencia tras 60 minutos de incubación en

Cepas	Suero control	Suero con LPS de las cepas:					Suero con lámina-S de la cepa TF7
		TF7	AH-45	AH-21	AH-26	AH-27	
AH-25	<1	101.2	103.6	98.5	<1	99.8	<1
AH-26	<1	102.3	101.8	99.9	<1	97.4	<1

LPS= 100 µg/ml.

Lámina-S= 100 µg/ml de proteína.

**TABLA 44: Inhibición de la actividad bactericida del suero sobre cepas de A. hydrophila de serogrupo 0:11 con moléculas de elevado peso molecular (HMW-LPS) del LPS y de bajo peso molecular (LMW-LPS).**

% de supervivencia tras 60 min. de incubación con:

Cepas	Suero control	Suero con HMW-LPS de:		Suero con LMW-LPS de:			
		TF7	AH-45	TF7	AH-45	AH-26	AH-27
AH-25	<1	<1	<1	103.2	100.5	<1	99.3
AH-26	<1	<1	<1	101.5	102.7	<1	100.0

HMW-LPS o LMW-LPS = 100 µg/ml.

HMW-LPS ( fracciones 2-4) y LMW-LPS (fracciones 8-11).

### 3.3.G.4.- MEDIDA DE LA ACTIVIDAD ANTICOMPLEMENTARIA.

Los experimentos realizados hasta el momento parecían indicar que el papel principal de la protección, ante la actividad bactericida del suero, lo tenían las fracciones de bajo peso molecular (LMW-LPS) existentes en el núcleo del LPS de serogrupo O11 y no las fracciones de elevado peso molecular (HMW-LPS) del LPS o la lámina-S, presentes en las cepas salvajes de este serogrupo de Aeromonas móviles. En consecuencia, las LMW-LPS afectan al complemento.

La actividad anticomplementaria del LPS de serogrupo O11 se midió para determinar si el efecto inhibitorio de la actividad bactericida del suero se debía a la habilidad para activar y consumir el complemento existente en el suero. La actividad anticomplementaria del LPS de las cepas resistentes al suero depende de la dosis, al igual que ocurre con las moléculas de bajo peso molecular del LPS (LMW-LPS). El LPS de las cepas sensibles presenta una baja actividad anticomplementaria, al igual que ocurre con las moléculas de elevado peso molecular (HMW-LPS) y la lámina-S de las cepas salvajes de serogrupo O11.

Las estructuras superficiales con actividad anticomplementaria en cepas de Aeromonas móviles de serogrupo O11, son diferentes, a pesar de su similitud estructural, a las que se hallan en Aeromonas salmonicida, ya que en esta especie bacteriana presentan actividad anticomplementaria tanto las fracciones de bajo peso molecular (LMW-LPS), como la lámina-A.

### 3.3.H.- VALORACION DE LOS NIVELES DE PROTEINAS DEL COMPLEMENTO.

#### 3.3.H.1.- NIVELES DE C1q EXISTENTES EN SUERO NO INMUNE TRATADO CON CEPAS DE SEROGRUPO O11.

Tal y como han establecido los experimentos anteriores, son las LMW-LPS de serogrupo O11 de A. hydrophila las responsables de la activación del complemento a través de la vía clásica. Uno de los experimentos adicionales que corroboran este hecho es el descenso de los niveles de C1q presentes en el suero no inmune, al incubarse con  $10^8$  células ó 100 µg/ml. de LPS, tanto de las cepas sensibles como resistentes de este serogrupo.

Además, si ponemos en contacto el suero no inmune con LMW-LPS, HMW-LPS y lámina-S purificada, observamos que los niveles de C1q únicamente descienden con las LMW-LPS y por el contrario, la presencia de HMW-LPS y lámina-S no provoca ningún tipo de descenso, indicando en consecuencia que no activan la vía clásica del complemento.

Estos resultados se asemejan a los obtenidos con las fracciones de elevado y bajo peso molecular del LPS de Aeromonas salmonicida, ya que únicamente las LMW-LPS dan lugar a un descenso en los niveles de C1q del suero. Sin embargo, difieren en el comportamiento de la lámina-A, pues esta estructura proteínica superficial produce un descenso en los niveles de C1q existentes en el suero no inmune. Todo ello, indica que en A. salmonicida las LMW-LPS y la lámina-A activan la vía clásica del complemento.

### 3.3.H.2.- NIVELES DE C3b y C5b-9 DEPOSITADOS EN CEPAS DE SEROGRUPO O11 TRATADAS CON SUERO NO INMUNE.

Una vez determinada la vía de activación del complemento en este serogrupo, se estudiaron los niveles de C3b y C5b-9 depositados en la membrana de la cepa TF7 y alguno de sus mutantes, tanto sensibles como resistentes, al entrar en contacto con suero no inmune.

Al estudiar los niveles de C3b unido a membrana, observamos que la cepa salvaje TF7 (O<sup>+</sup>:S<sup>+</sup>) y los mutantes resistentes que carecían de antígeno O del LPS al suero (O<sup>+</sup>:S<sup>-</sup>, O<sup>+</sup>:S<sup>+</sup> y O<sup>-</sup>:S<sup>+</sup>) no ligaban C3b a sus membranas externas. Por el contrario, los mutantes resistentes al suero que poseían antígeno O del LPS (O<sup>+</sup>:S<sup>-</sup>) unían cierta cantidad de C3b a sus membranas y los mutantes sensibles al suero (O<sup>-</sup>:S<sup>-</sup>) presentaban gran cantidad de C3b unido sobre sus membranas. Todos estos resultados se muestran en la figura 23.

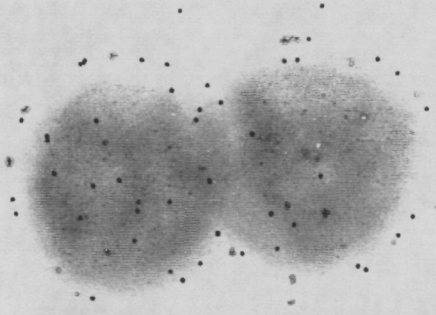
Tras determinar la unión de C3b, se estudió si las cepas capaces de unir este fragmento activo del sistema del complemento, también eran capaces de presentar en sus membranas C5b-9, el cual permite que el complemento lleve a cabo su cadena completo. Se observó que el mutante resistente AH-45 (O<sup>+</sup>:S<sup>-</sup>) no unía C5b-9 a sus membranas, de ahí que resistencia a la acción del complemento y los mutantes sensibles (O<sup>-</sup>:S<sup>-</sup>) si presentaban sobre sus membranas C5b-9, tal y como se muestra en la figura 24.

Probablemente, el que la cepa AH-45 una C3b pero no ligue a sus membranas C5b-9 se debe a que el C3b se une a zonas alejadas de la membrana externa, como podrían ser las cadenas polisacáridas del antígeno O del LPS, con lo cual no puede formarse el complejo C5b-9.

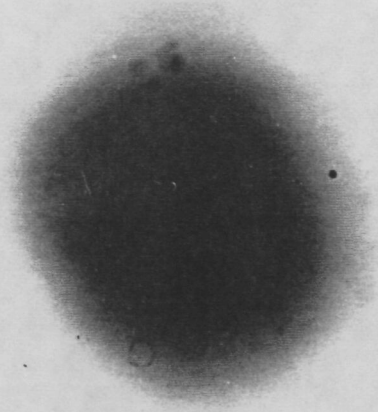
Todos estos datos se reflejan en la tabla 45 y confirman la resistencia a la acción del suero de la cepa TF7 y de los mutantes resistentes (O<sup>+</sup>:S<sup>-</sup>, O<sup>-</sup>:S<sup>+</sup>, O<sup>-</sup>:S<sup>+/+</sup> y O<sup>-</sup>:S<sup>-</sup>), así como la sensibilidad de la cepas sensibles al suero de tipo O<sup>-</sup>:S<sup>-</sup>, como la AH-25 y AH-26.



**A**



**B**

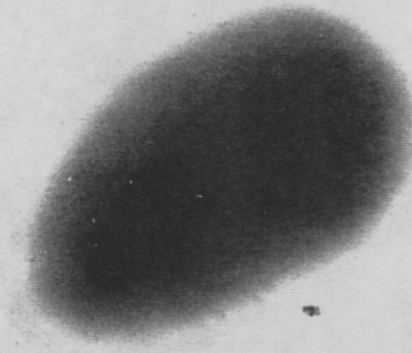


**FIGURA 23:** Determinación de la unión de C3b a la membrana externa de algunas cepas de *A. hydrophila* de serogrupo O11, mediante marcaje con anti-C3b ligado a proteína-A-oro de 20 nm. A) Mutante sensible AH-26 en el que se observa unión del C3b; y B) Mutante resistente a la acción del suero, AH-27, en el que no se observa unión.

**A**



**B**



**FIGURA 24: Determinación de la unión de C5b-9 a la membrana externa de algunas cepas de serogrupo O 11, mediante marcaje con anti-C5b-9 ligado a proteína-A-oro de 20 nm. A) Mutante sensible al suero, AH-26, en el que se observa una abundante unión de este complejo; y B) Mutante resistente AH-27, el que no se aprecia ningún tipo de unión.**

**TABLA 45:** Niveles de C3b y C5b-9 del complemento unidos a la membrana externa de diferentes cepas de serogrupo O11 de A. hydrophila, al incubarse en suero fresco inmune.

D.O. <sub>405</sub>	Cepas sensibles		Cepas resistentes				
	AH-25	AH-26	TF7	AH-21	AH-24	AH-45	AH-27
C3b	1.1	1.3	<0.1	<0.1	<0.1	0.7	<0.1
C5b-9	1.4	1.7	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1

### 3.3.I.- DOSIS LETAL<sub>50</sub>

Para estudiar el grado de virulencia de este serogrupo O11, así como para determinar si la pérdida de alguna estructura superficial del citado serogrupo provoca una disminución en el grado de virulencia, se obtuvieron las dosis letales <sub>50</sub> (D.L.<sub>50</sub>) tanto de la cepa salvaje TF7, como de sus mutantes isogénicos para estructuras superficiales.

Se determinó la D.L.<sub>50</sub> en ratón y en peces, de las cepas : TF7 (O<sup>+</sup>:S<sup>+</sup>), AH-21 (O<sup>-</sup>:S<sup>+</sup>), AH-24 (O<sup>-</sup>:S<sup>+/</sup>), AH-26 (O<sup>-</sup>:S<sup>-</sup>) y AH-27 (O<sup>-</sup>:S<sup>-</sup>) descritas anteriormente en la tabla 40. Con ello, se observó que la cepa TF7 crecida a 37°C poseía en ratón una D.L. <sub>50</sub> de 10<sup>6.5</sup> y en trucha de 10<sup>4.5</sup>, lo que indica que es dos logaritmos inferiores a la que poseen las cepas de serogrupo O34 y en consecuencia, mucho más virulentas.

Además, pudimos apreciar que todos los mutantes poseen aproximadamente la misma D.L.<sub>50</sub>, lo cual indica que las estructuras superficiales no son los principales implicados en la virulencia del serogrupo O11 de esta especie bacteriana.

#### 4.- DISCUSSION

Se han estudiado diferentes bacteriófagos de cepas de Aeromonas mesófilas, caracterizándose tanto el bacteriófago como los receptores del mismo. De este modo, se han aislado los bacteriófagos PM1, cuyo receptor es el antígeno O del LPS de las cepas de serotipo O34, el bacteriófago PM2, cuyo receptor es el núcleo del LPS tanto de cepas de A. hydrophila, A. sobria, y A. salmonicida; y el bacteriófago PM3, cuyo receptor es el flagelo monopolar de Aeromonas mesófilas de diferentes serotipos con respecto al antígeno O.

El bacteriófago PM1, presenta como receptor el antígeno O del LPS de las cepas O34, ya que el LPS completo de dichas cepas, al igual que el HMW-LPS, una fracción enriquecida en antígeno O, de dichas cepas es capaz de inactivar el bacteriófago mientras que el LMW-LPS, una fracción carente de antígeno O, es incapaz de hacerlo. Dicho bacteriófago es sumamente específico de las cepas de este serotipo como ocurre con los bacteriófagos cuyo receptor es el antígeno O del LPS (174). Dicho bacteriófago pertenece a la familia Myoviridae de acuerdo con Matthews (86) y al grupo A2 según Ackermann (1). Es un bacteriófago con doble cadena de DNA que presenta una cápside poliédrica y una placa basal con fibras en la cola. Dicho bacteriófago por su restringido espectro de huéspedes representa un marcador biológico accesible para la identificación de Aeromonas pertenecientes al serogrupo O34. Mutantes espontáneos resistentes a dicho bacteriófago carecen del antígeno O del LPS tal como se desprende de los geles de poliacrilamida y la composición química del LPS. Los mutantes resistentes al bacteriófago PM1 todavía presentan sensibilidad a bacteriófagos de Aeromonas cuyo receptor es el núcleo del LPS.

El bacteriófago PM2, presenta como receptor el núcleo del LPS y por consiguiente su espectro de huéspedes es muy amplio, como ocurre con todos los bacteriófagos cuyo receptor es el núcleo del LPS (76). Dicho bacteriófago se inactiva tanto con LPS completo como con el núcleo (LMW-LPS) de diferentes cepas de A. hydrophila, A. sobria y A. salmonicida, mientras que el HMW-LPS de dichas cepas es incapaz de inactivar dicho bacteriófago. El bacteriófago PM2 pertenece a la familia Myoviridae de acuerdo con Matthews (86) y al grupo A2 según Ackermann (1). Es un bacteriófago con doble cadena de DNA que presenta una cápside poliédrica y una placa basal con espinas. Dicho bacteriófago es capaz de formar calvas en A. salmonicida con lámina A mientras es incapaz de formar calvas en A. hydrophila o A. sobria con lámina S, marcando por tanto una primera diferencia fundamental entre la lámina A y la lámina S. Mutantes espontáneos resistentes al bacteriófago PM2 presentan alteraciones en el núcleo del LPS y por supuesto carecen de antígeno O, tal como se desprende de los análisis químicos del LPS y de la mayor movilidad electroforética del núcleo de su LPS en geles de poliacrilamida. Este hecho indica que presentan alteraciones en los oligosacáridos del núcleo del LPS. Los mutantes resistentes al bacteriófago PM2 son resistentes a todos los bacteriófagos de Aeromonas que han sido utilizados en este trabajo.

El bacteriófago PM3, presenta como receptor el flagelo monopolar de diferentes serotipos de A. hydrophila tanto con lámina S como sin lámina. Mutantes resistentes a dicho bacteriófago, presentan alteraciones en el flagelo o la motilidad de dichas cepas bacterianas. Dicho bacteriófago es inactivado por células enteras de Aeromonas mesófilas

en condiciones de motilidad (producción de flagelos), mientras que no es inactivado por células enteras de Aeromonas mesófilas en condiciones de no producción de flagelos (inmovilidad). Dicho bacteriófago es inactivado por preparaciones de flagelos purificados que en geles de poliacrilamida dan lugar a una única banda proteica. El bacteriófago PM3 presenta doble cadena de DNA y pertenece a la clase B de acuerdo con Bradley (16) y al grupo B1 según Ackermann (1). Dicho bacteriófago es el primer bacteriófago descrito cuyo receptor es el flagelo en una especie distinta de las Enterobacterias.

Estos bacteriófagos han permitido la agrupación de diferentes cepas de Aeromonas mesófilas que luego han correspondido a serogrupos distintos. Así, por ejemplo las cepas sensibles al bacteriófago PM1 pertenecen todas al serogrupo O34. Dicho serogrupo presenta las siguientes características:

Sus cepas presentan un perfil de proteínas de membrana externa tremendamente homogéneo, a diferencia de lo que ocurre habitualmente en cepas de A. hydrophila (91).

Además presentan un LPS heterogéneo, que ha sido caracterizado químicamente por primera vez en esta tesis. Dicho LPS presenta KDO, L-heptosas, glucosa y hexaminas; y carece de D-heptosas, galactosa, rhamnosa y pentosas. De acuerdo con estas características se encuadra dentro del tipo 2 según Shaw y Hodder (136) de los tipos de núcleo del LPS de Aeromonas mesófilas.



Estas cepas del serotipo O34 presentan la característica de ser más virulentas a 20°C que a 37°C. Tal como se especifica en los resultados, este fenómeno es debido a la producción de antígeno O del LPS a 20°C y a la práctica ausencia del antígeno O del LPS a 37°C. Este hecho queda de manifiesto tanto por la sensibilidad al bacteriófago PM1 ( las cepas son sensibles a 20°C pero no a 37°C), como por la sensibilidad a los bacteriófagos 18, 24, 69, 145 (cuyo receptor es el núcleo del LPS) a los que las cepas presentan sensibilidad a 37°C pero no a 20°C por un efecto de inaccesibilidad del receptor por protección del antígeno O del LPS. Además, mediante la utilización de anticuerpos específicos para el antígeno O del LPS (anticuerpos específicos para el LPS de tipo O34 absorbidos por mutantes carentes del antígeno O), queda demostrado mediante la utilización de diferentes técnicas inmunológicas la producción en células enteras crecidas a 20°C del antígeno O, y la práctica ausencia del mismo en células enteras crecidas a 37°C. Este hecho puede correlacionarse con una mayor secreción de diferentes exoenzimas a 20°C (presencia de antígeno O) que a 37°C.

Las dosis letales 50 de dichas cepas a 20°C son menos elevadas que a 37°C, lo cual pone de manifiesto que la virulencia bacteriana, medida por dosis letales tanto en ratón como en pez es mayor a 20°C que a 37°C.

Los mutantes resistentes al bacteriófago PM1 carecen del antígeno O del LPS, y presentan una menor virulencia ( mayor D.L. <sub>50</sub>) a 37°C como a 20°C, implicando por tanto al antígeno O del LPS en la virulencia de dichas cepas.

Las cepas de Aeromonas mesófilas pertenecientes a dicho serotipo son resistentes a la actividad bactericida del suero. Los mutantes carentes del antígeno O del LPS (mutantes espontáneos resistentes al bacteriófago PM1), son sensibles a la actividad bactericida del suero, y su sensibilidad es dependiente del tipo de núcleo del LPS que presentan. Cuanto menor es el núcleo del LPS más sensibilidad al suero presentan. De este modo los mutantes resistentes al bacteriófago PM2 son mas sensibles a la actividad bactericida del suero que los mutantes resistentes al bacteriófago PM1.

Los mutantes isogénicos obtenidos por resistencia al suero de las cepas sensibles presentan alteraciones en el núcleo del LPS pero no recuperan el antígeno O del mismo. Esto hace pensar que dichas cepas, Aeromonas mesófilas de serotipo O34, manifiestan la resistencia a la actividad complementaria del suero por los oligosacáridos que conforman el núcleo del LPS.

Las cepas de Aeromonas mesófilas pertenecientes al serotipo O34 son sensibles a la actividad bactericida del suero por la vía clásica, tal como se desprende de los experimentos realizados con suero no inmune en cepas sensibles al suero y la posterior inactivación del mismo.

La razón de la no sensibilidad al complemento del suero no inmune, tanto en las cepas salvajes como en los mutantes isogénicos resistentes a la actividad bactericida del suero, se debe, no a un efecto de no activación del complemento sino a un efecto de evitar el acoplamiento de C3b a la membrana de dichas cepas. Las cepas sensibles a la actividad

bactericida del suero son capaces de activar el complemento, y al mismo tiempo son capaces de interactuar con C3b, con lo cual son capaces de formar los complejos C5b-9 sobre la membrana que acaban por formar poros que lisan dichas células.

Las cepas pertenecientes al serotipo O34 de Aeromonas mesófilas se encuentran ampliamente diseminadas en la naturaleza. Dichas cepas son frecuentes tanto en aguas de ríos y mares, inclusive en zonas oligotróficas, como en cepas que se producen a nivel de aislamientos clínicos en casos de gastroenteritis.

Uno de los serotipos más importantes dentro de las Aeromonas mesófilas a causa de su elevado grado de virulencia en animales homeotermos como poiquilotermos, así como en la especie humana, es el denominado serotipo O:11. Este serotipo, presenta en su superficie bacteriana dos antígenos mayoritarios:

1.- Un LPS homogéneo, caracterizado por presentar una doble banda de elevado peso molecular (HMW-LPS) en SDS-PAGE, similar a la existente en las cepas virulentas de Aeromonas salmonicida, aunque de menor movilidad electroforética (29). El citado LPS se ha caracterizado químicamente en esta tesis, observándose la presencia de KDO y L-heptosas en el núcleo del LPS y de glucosa, galactosa, manosa y hexosaminas en el antígeno O del LPS. Este antígeno O del LPS difiere (a pesar de su similitud en SDS-PAGE) a nivel químico del presente en las cepas de A. salmonicida, pues el de esta última especie bacteriana contiene rhamnosa, en lugar de manosa (138).

2.- Una lámina proteínica extraperiférica a la célula, denominada lámina S, formada por una proteína denominada proteína S (52 Kd.) (30, 31). Dicha lámina posee una estructura tetragonal y recubre, prácticamente la totalidad de la superficie celular, haciendo que el LPS existente en esta especie bacteriana de Aeromonas mesófilas quede totalmente recubierto y por tanto, quede poco accesible a cualquier agente externo, como podrían ser antibacterianos anticuerpos o bien bacteriófagos. Esta poca accesibilidad del LPS en las cepas de serotipo O11 hace difícil encontrar marcadores biológicos (bacteriófagos) para el mismo.

La citada lámina S presenta similitudes y diferencias con la lámina A presente en las cepas de A. salmonicida. La lámina A es una estructura proteínica que recubre la superficie de las cepas de esta especie bacteriana (157). Posee una estructura tetragonal con poros de mayor tamaño a los existentes en la lámina S de las cepas de Aeromonas mesófilas de serotipo O11, este hecho hace que su LPS sea más accesible a agentes externos como anticuerpos y bacteriófagos. Una prueba evidente, es que bacteriófagos de amplio espectro de huéspedes dentro del género Aeromonas, cuyo receptor es el núcleo del LPS, como el bacteriófago PM2, son capaces de interactuar con el LPS de cepas salvajes de A. salmonicida (O<sup>+</sup>:A<sup>+</sup>) y no con cepas salvajes de Aeromonas mesófilas de serotipo O11 (O<sup>+</sup>:S<sup>+</sup>).

La presencia de una estructura superficial proteínica como la lámina S, que recubre la totalidad de la célula bacteriana hace que sea difícil hallar bacteriófagos capaces de interactuar con ella y llegar hasta la membrana externa de la célula bacteriana, pues

deberían poseer proteinasas capaces de degradarla, lo cual podría ser peligroso para el propio bacteriófago, y además dificulta el contacto de los bacteriófagos con el LPS, a causa de sus pequeños poros.

Además de los antígenos superficiales mayoritarios anteriormente citados, también existe otra estructura superficial antigénica. Dicha estructura, es el flagelo monopolar existente en todas las cepas de Aeromonas mesófilas de serotipo O11.

El que las cepas de serotipo O11 no presentasen bacteriófagos específicos para el LPS y la lámina S, hizo que la obtención de mutantes para estas estructuras superficiales debiese realizarse mediante mutagénesis con D.E.S. Con este sistema, se consiguieron obtener mutantes isogénicos a partir de cepas de Aeromonas mesófilas de serotipo O11 carentes en LPS, lámina S o ambas estructuras superficiales. Además, por resistencia al bacteriófago PM3, cuyo receptor es el flagelo monopolar de estas cepas, se consiguieron obtener mutantes sin flagelo, que presentaban el resto de sus estructuras superficiales intactas.

Todas las Aeromonas mesófilas de serogrupo O11 al igual que las cepas de A. salmonicida poseen la propiedad de la autoaglutinación (61). Se ha observado que en las cepas de serotipo O11 esta propiedad se halla ligada fundamentalmente a la presencia de lámina S y de flagelo, pues mutantes lámina S que presentan LPS completo y flagelo monopolar; y mutantes obtenidos por resistencia al bacteriófago PM3, los cuales mantienen intacto su LPS y lámina S pero no poseen flagelo monopolar son incapaces de

autoaglutinar. Sin embargo, los mutantes sin antígeno O del LPS (HMW-LPS), que presentan lámina S y flagelo continúan presentando la capacidad de autoaglutinar.

Se ha observado que los mutantes que carecen de lámina S y presentan un LPS completo, son sensibles a bacteriófagos de amplio espectro de huéspedes en el género Aeromonas, cuyo receptor es el núcleo, como el bacteriófago PM2. El citado bacteriófago es incapaz de interactuar con el núcleo de Aeromonas salvajes de serotipo O11 a causa de la existencia de la estructura superficial denominada lámina S, en cambio la pérdida de esta estructura superficial proteínica hace posible su interacción con el LPS y en consecuencia la cepa se transforma en sensible al citado bacteriófago. Este hecho, demuestra claramente que la accesibilidad del LPS en las cepas que han perdido la lámina S es mucho mayor.

Un punto importante es que las cepas que carecen de la estructura denominada lámina S, pero presentan un LPS completo, no han perdido la capacidad de sintetizar la proteína S constitutiva de la lámina S. Lo que ocurre en este tipo de mutantes es que tiene capacidad de síntesis de la proteína, pero por alguna razón no son capaces de estructurarla en forma de lámina S. Este fenómeno es idéntico al que tiene lugar en los mutantes lámina A de Aeromonas salmonicida

Algo similar ocurre, aunque no con la lámina S sino con el LPS, en los mutantes sensibles a la acción bactericida del suero que no presentan ni lámina S ni antígeno O del LPS, pues estos son capaces de sintetizar el antígeno O del LPS, lo que ocurre es que no

pueden anclarlo a su superficie, probablemente por la alteración que manifiestan en los oligosacáridos del núcleo del LPS (el núcleo del LPS de estos mutantes presenta una mayor movilidad electroforética relativa en geles de poliacrilamida).

Las cepas de Aeromonas mesófilas pertenecientes a este serotipo son resistentes a la acción bactericida del suero y únicamente las cepas carentes en antígeno O del LPS y en lámina S, son sensibles a dicha acción. Además, mediante estudios de inactivación de la actividad bactericida del suero con diferentes estructuras superficiales se ha podido observar que la lámina S y el antígeno O del LPS (HMW-LPS) no desempeñan ningún papel en la resistencia a la acción bactericida del suero, sino que es el núcleo del LPS (LMW-LPS) el responsable de dicha acción. Este mecanismo de resistencia a la acción bactericida del suero no inmune difiere al empleado por las cepas de Aeromonas salmonicida en lo que respecta a la lámina, ya que la lámina A de esta última especie bacteriana desempeña un papel importante en la resistencia a dicha acción; y se asemeja en lo referente al LPS, pues también en ellas es el núcleo del LPS el responsable de dicha acción.

La sensibilidad al suero de los mutantes isogénicos para las cepas de Aeromonas mesófilas depende en consecuencia del tipo de núcleo existente, así cuanto menor sea el número de oligosacáridos del núcleo del LPS mayor será la sensibilidad al suero. Este dato bien confirmado por el hecho de que los mutantes resistentes al suero obtenidos espontáneamente a partir de mutantes sensibles, únicamente difieren en que el núcleo del LPS presenta diferencias cuantitativas y cualitativas en sus oligosacáridos, lo cual se observa claramente en SDS-PAGE pues el núcleo de las cepas resistentes presentan una

menor movilidad electroforética. Esta diferencia en cuanto al núcleo del LPS de los mutantes sensibles y resistentes se refleja también en su composición química, en la cual se destaca la existencia de galactosa en el LPS de las cepas resistentes a la acción del suero y carencia de la misma en cepas sensibles.

Las cepas de Aeromonas mesófilas de serogrupo O11 son sensibles a la acción bactericida del suero por la vía clásica, tal y como se desprende de los experimentos realizados con suero no inmune en cepas sensibles al suero y la posterior inactivación del mismo.

La no sensibilidad a la acción del complemento de las cepas salvajes y de los mutantes resistentes que presentan lámina S se debe a que en sus membranas no se deposita C3b, por el contrario la resistencia de los mutantes que presentan un LPS completo y carecen de lámina S se debe a que el C3b, que se deposita en su superficie lo hace demasiado alejado de la membrana externa, como pueden ser las cadenas polisacáridicas del antígeno O del LPS, con lo cual no puede formarse el complejo C5b-9 y producir la lisis de la célula.

Las dosis letales 50 de todas las cepas estudiadas del serogrupo O11 son dos logaritmos inferiores a las existentes en las cepas del serotipo O34 de Aeromonas mesófilas (mayor virulencia) y además son muy similares en cualquiera de los mutantes isogénicos obtenidos para las diferentes estructuras superficiales. El hecho de que sus dosis letales sean muy similares parece indicar que tal vez las estructuras superficiales no sean, en las



Aeromonas mesófilas de serotipo O11, el elemento clave de su virulencia sino que existan otros factores más importantes implicados en dicha acción.

## 5.- CONCLUSIONES

1. Se han aislado y caracterizado diferentes bacteriófagos de Aeromonas mesófilas, obteniendo bacteriófagos cuyo receptor es el antígeno O del LPS de cepas del serotipo O34, bacteriófagos cuyo receptor es el núcleo del LPS de cepas del serotipo O34 y O11 (así como de A. salmonicida), y un bacteriófago cuyo receptor es el flagelo monopolar presente en las cepas de Aeromonas mesófilas.
2. Se han caracterizado los receptores de bacteriófagos de Aeromonas mesófilas previamente descritos por otros autores.
3. Mediante la utilización de dichos bacteriófagos se han conseguido aislar mutantes espontáneos resistentes a los mismos que presentan alteraciones en diferentes moléculas de la superficie bacteriana. Estos mutantes son isogénicos de la cepa salvaje y permiten la comparación en diferentes aspectos de la patogenicidad entre las cepas salvajes y dichos mutantes.
4. Cuando no ha sido posible la obtención de mutantes isogénicos mediante la utilización de bacteriófagos, dichos mutantes se han obtenido por mutagénesis con un agente alquilante y contraselección con anticuerpos específicos frente a la estructura superficial bacteriana que se pretendía alterar, comprobando luego que dichos mutantes presentaban alteraciones únicamente en la estructura seleccionada.

5. Se ha caracterizado biológicamente y químicamente por primera vez el LPS de las cepas de Aeromonas mesófilas pertenecientes al serotipo O34.
6. Se ha caracterizado biológicamente y químicamente por primera vez el LPS de las cepas de Aeromonas mesófilas pertenecientes al serotipo O11.
7. Se ha determinado que la vía clásica del complemento es la responsable en el caso de Aeromonas pertenecientes al serotipo O34 y O11 de la activación del complemento y por consiguiente de la actividad bactericida del suero.
8. El determinante a nivel de las estructuras superficiales de la resistencia a la actividad bactericida del suero en Aeromonas pertenecientes a los serotipos O34 y O11, son los oligosacáridos del núcleo del LPS, tal como se demuestra mediante los experimentos referentes a la actividad bactericida del suero y la composición química del LPS de mutantes isogénicos resistentes a dicha actividad obtenidos a partir de cepas sensibles.
9. Se ha demostrado que el LPS de todas las Aeromonas mesófilas es capaz de activar el complemento, y que la razón de ser sensibles o resistentes a la actividad bactericida del suero se debe a la fijación o no de C3b pegado a la membrana, y la consiguiente formación de los complejos C5b-9.

10. El antígeno O del LPS de las cepas de Aeromonas mesófilas pertenecientes al serotipo O34 es un factor de patogenicidad en dichas cepas.
  
11. La obtención de mutantes O<sup>+</sup>:S<sup>-</sup> de cepas de Aeromonas mesófilas del serotipo O11 ha permitido establecer in vivo la ausencia de relación entre la presencia de lámina S y la patogenicidad en dichas cepas, a diferencia de lo que ocurre con lámina A de A. salmonicida.

## **6.- BIBLIOGRAFIA**

1. Ackermann H. W., C. Dauguet, W. D. Paterson, M. Popoff, M. A. Rouf, and J. F. Vien. (1985). Aeromonas bacteriophages: reexamination and classification. *Ann. Microbiol. (Inst. Pasteur)*. 136 E: 175-199.
2. Adams M. H. (1958). Bacteriophages InterScience Publishers.
3. Adams, M. H. (1959). Bacteriophage. Interscience Publishers. Inc.
4. Al-karadaghi, D. N. Wang, and S. Houmöller. (1988). Three-dimensional structure of the crystalline surface layer from Aeromonas hydrophila. *J. Ultrastructure and Molecular Structure Research*. 101: 92-97.
5. Allen R. J., and G. K. Scott. (1980). The effect of purified lipopolisaccharide on the bactericidal reaction of human complement. *J. Gen. Microbiol.* 117: 65-72.
6. Ames G. F. L., E. N. Supdich and H. Nikaido. (1974). Protein composition of the outer-membrane of Salmonella typhimurium: effect of lipopolysaccharide mutations . *J. Bacteriol.* 117: 406-416.
7. Atkinson J. P., and M. M. Frank. (1980). Complement. 219-271. In. C. W. Parker. (ed). *Clin. Immunol.*. The W. B. Saunders Co., Philadelphia.
8. Bayer M. E., and H. Thurow. (1977). Polysaccharide capsule of Escherichia coli: Microscopy study of its size, structure and sites of synthesis. *J. Bacteriol.* 130: 911-936.
9. Benedí V. J., J. Jofre, and J. M. Tomás. (1986). Klebsiella pneumoniae C3 lipopolysaccharide mutants obtained by resistance to bacteriophage FC3-9. *Anal. Ins. Pasteur/Microbiol.* 137b: 29-36.
10. Benedí V. J., B. Ciurana, and J. M. Tomás. (1988). A high molecular weight lipopolysaccharide-specific bacteriophage for Klebsiella pneumoniae C3. *Can. J. Microbiol.* 34:918-921.
11. Berman, Enquist and Suilhavy. (1982). Advanced bacterial genetics. Cold Spring Harbor Laboratory.
12. Bhakdi S., and J. Tranum-Jensen. (1978). Molecular nature of the complement lesion. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 75: 5655-5659.
13. Bhakdi S. (1980). On the molecular nature of the complement lesions. *Behring Inst. Mitt.* 65: 1-15.
14. Bootsma R., N. N. Fijan, and J. Blommaert. (1977). Isolation and preliminary identification of the causative agent of carp erythrodermatitis. *Veterinarski Archiv. Zagreb.* 47:291-302.

15. Bradley D. E. (1966). The fluorescent staining of bacteriophage nucleic acids. *J. Gen. Microbiol.* 44:383-391.
16. Bradley D. E. (1967). Ultrastructure of bacteriophages and bacteriocins. *Bacteriol. Rev.* 31: 230-314.
17. Buchner H. (1885). Uber die bakterientotende wirkung des zell-freien blutserums. *Zentralbl. Bakteriol. Parasitenkd. Hyg. Abt. 1 Orig.* 5: 817-823.
18. Cec G. L., and C. K. Scott. (1980). Analysis of components of *E. coli* MC308225 and of a serum resistant mutant. *Infect. Immun.* 28: 387-392.
19. Chart H., and T. J. Trust. (1983). Acquisition of iron by *Aeromonas salmonicida*. *J. Bacteriol.* 156 (2): 758-764.
20. Christie W. W. (1973). Lipids analysis. Pergamon Press. Oxford. 85-102.
21. Ciurana B., and J. M. Tomás. (1987). Role of lipopolysaccharide and complement in susceptibility of *Klebsiella pneumoniae* to non-immune serum. *Infect. and Immun.* 55. 2741-2716.
22. Clas F. G. Schmidt, and M. Loos. (1985). The role of the classical pathway for the bactericidal effect of normal sera against Gram-negative bacteria. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 121: 19-72
23. Clowes R. C., and W. Hayes. (1968). Experiments in microbial genetics. Blackwell Scientific Publications. Oxford. Edinburgh.
24. Cooper N. R., and Morrison D. C. (1978). Binding and activation of the first component of human complement by the lipid A region of lipopolyccharides. *J. Immunol.* 120: 1862-1869.
25. Costerton J. W., and T. J. Marrie. (1983). In: Role of the bacterial envelope in the survival of bacteria in infection. *Med. Microbiol.* (C. S. F. Easmon, J. Jeljaszewicz, M. R. W. Brown y P. A. Lambert, eds.) vol.3. Academic Press. London 63-86.
26. De Figueiredo J., and J. A. Plumb. (1977). Virulence of different isolated of *Aeromonas hydrophila* in channelcatfish. *Aquaculture.* 11: 349-354.
27. De Pamphilis M. L. (1971). Purification of intact flagella from *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* 105: 376-383.
28. Dean A. G., Y. C. Ching, R. G. Williams, and L. B. Harden. (1972). Test of enterotoxin using infant mice: application in a study of diarrhoea in children in Honolulu. *J. Infect. Dis.* 125: 407-411.



29. Dooley J. S. G., R. Lallier, D. H. Shaw and T. J. Trust. (1985). Electrophoretic and immunochemical analyses of the lipopolysaccharides from various strains of Aeromonas hydrophila. *J. Bacteriol.* 164 (1): 263-269.
30. Dooley J. S. G., and T. J. Trust. (1988). Surface protein composition of Aeromonas hydrophila strains virulent for fish: Identification of a surface array protein. *J. Bacteriol.* 170 (2): 499-506.
31. Dooley J. S. G., W. D. McCubbin, C. M. Kay, and T. J. Trust. (1988). Isolation and biochemical characterization of the S-layer protein from a pathogenic Aeromonas hydrophila strain. *J. Bacteriol.* 170 (6): 2631-1638.
32. Ebosbach P., and J. Weiss. (1983). A reevaluation of the roles of the O<sub>2</sub> dependent and O<sub>2</sub> independent microbiocidal systems of phagocytes. *Rev. Infect. Dis.* 5: 843-853.
33. Eddy B.P. (1960). Cephalotrichous, fermentative, Gram-negative bacteria: the genus Aeromonas. *J. Appl. Bacteriol.* 23: 216-149.
34. Eddy B. P. (1962). Further studies or Aeromonas. I. Additional strains and supplementary biochemical tests. *J. Appl. Bacteriol.* 25: 137-146.
35. Edward M. S., D. L. Kasper, H. S. Jennings, C. J. Baker, and A. Nicholson-Weller. (1982). Capsular sialic acid prevents activation of the alternative complement pathway by type III group B streptococci. *J. Immunol.* 128: 1278-1283.
36. Edwards M. S., A. Nicholson-Weller, C. J. Baker, and D. L. Kasper. (1980). The role of specific antibody in alternative complement pathway mediated opsonophagocytosis of type III group B streptococci. *J. Exp. Med.* 151: 1275-1287.
37. Eiding D., E. Bello, and A. Mates. (1977). The heterocytotoxicity of human serum. I. Activation of the alternative complement pathway by heterologous target cells. *Cell. Immunol.* 29: 174-186.
38. Elliot D. G., and Jr. Shotts. (1980). A etiology of an ulceration disease in goldfish, Carassius auratus (L.): experimental induction of the disease. *J. Fish Dis.* 3:145-151.
39. Engvall E., and P. Perlmann. (1971). Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Quantitative assay of immunoglobulin G. *Immun. Chem.* 8: 871-874.
40. Esch G. W., and Hazen T. C. (1978). Thermal ecology and stress: a case history for red-sore disease in large-mouth bass (Micropterus salmoides). In energy and environmental stress in aquatic systems. Dep. Energy. Symp. Ser. n. CONF-771114 ed. J. H. Thorpe, J. W. Gibbons. Springfield. Va. Nat. Tech. Inf. Serv.

41. Ewing W. H., R. Hugh, and J. C. Johnson. (1961). Studies on the Aeromonas group. U.S. Department of Health, Education and Welfare. Communicable Disease Center Atlanta. Georgia.
42. Fairbanks G., T. L. Sleck, and D. W. Wallach. (1971). Electrophoretic analysis of the major polypeptides of the human erythrocyte membrane. Biochem. 10: 2606-2617.
43. Fearson D. T., and K. F. Austen. (1980). The alternative pathway of complement a system for host resistance to microbial infection. N. Engl. J. Med. 303: 259-263.
44. Filip C., G. Fletcher, J. L. Wulff, and C. F. Earhart. (1973). Solubilization of the cytoplasmic membrane of Escherichia coli by the ionic detergent sodium lauryl sarcocinate. J. Bacteriol. 115: 717-722.
45. Fine D. P., S. R. Marney, D. G. Colley, J. S. Sergent, and R. M. Desprez. (1972). C3 shunt activation in human serum chelated with EGTA. J. Immunol. 109: 807-809.
46. Folch J., M. Lees, and G.H. Sloane-Stanley. (1957). A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. J. Biol. Chem. 226: 497-509.
47. Freij B. J. (1984). Aeromonas: biology of the organism and diseases of children. Pediatr. Infect. Dis. 3: 164-175.
48. Fuller D. W., K. S. Pilcher, and J. L. Fryer. (1977). A leukocytolytic factor isolation from cultures of Aeromonas salmonicida. J. Fish. Res. Board of Canada. 34: 1118-1125.
49. Gerhardt P., R. G. E. Murray, R. N. Costilow, E. Nester, W. A. Wood, N. Krieg, and G. Brigg. (1981). Manual of methods for general Bacteriology. A.S.M.
50. Gordon D. L., and M. K. Hostetter. (1986). Complement and host defence against microorganism. Pathology. 18: 365-375.
51. Gotze O., and H. J. Muller-Eberhad. (1971). The C3 activator system: an alternative pathway of complement activation. J. Exp. Med. 134: (Suppl.): 90-108.
52. Gracey M., V. Burke, and J. Robinson. (1982). Aeromonas associated gastroenteritis. Lancet 11: 1304-1306.
53. Griffiths E. (1974). Metabolically controlled killing of Pasteurella septica by antibody and complement. Biophys. Acta, 362: 598-602.

54. Hancock R. E. W. and H. Nikaido. (1978). Outer membranes of Gram-negative bacteria. XIX Isolation from Pseudomonas aeruginosa PAO1 and use in reconstitution and definition of the permeability barrier. *J. Bacteriol.* 136: 381-390.
55. Hanson R. S., and Philips J. A. (1981). *Manual of Methods for general bacteriology*. American Society for Microbiology. Washington D.C.
56. Heidelberger M., and G. Otto. (1961). Prescia. Rutgers, University Press. Development of the one-hit teory of immune hemolysis. Manfred M. Mayer en immunochemical approches to problems in microbiology: A Symposium held at the institute of microbiology. Rutgers. University September 6-8. (1960).
57. Horwitz M. A., and S. C. Silverstein. (1980). Influence of the Escherichia coli capsula on complement fixation and on phagocytosis and killing by phagocytes. *J. Clin. Invest.* 65: 82-94.
58. Inoue K., A. Y. Takomizawa, T. Amanna. (1974). Chemical studies on damages of phospholipids from damaged bacteria. *Bikem. J.* 17: 127-139.
59. Jam K., G. Schmidt, B. Wallenfels, and E. Freund-Mölbart (1971). Isolation and characterization of Escherichia coli strains belonging to sero-group O8. *J. Gen. Microbiol.* 67: 289-297.
60. Janda J. M., R. B. Clark, and R. Brende. (1985). Virulence of *Aeromonas* species a assessed through mouse lethality studies. *Curr. Microbiol.* 12: 163-168.
61. Janda J. M., L. S. Oshiro, L. S. Abbott, and P. S. Duffey. (1987). Virulence markers of mesophilic phenomenon with mouse pathogenicity and the presence of peripheral cell- associated layer. *Infect. Immun.* 55: 3070-3077.
62. Jessop H. L., and P. A. Lambert. (1986). The role of surface polysaccharide in determining the resistance of Serratia marcescens to serum killing. *J. Gen. Microbiol.* 132: 2505-2514.
63. Joiner K. A., C. H. Hammer, E. J. Brown, R. J. Cole, and M. M. Frank. (1982). Studies on the mechanism of bacterial resistance to complement-mediated killing. I. Terminal complement components are deposited and release from Salmonella minnesota S218 without causing bacterial death. *J. Exp. Med.* 155: 97-808.
64. Joiner K. A., C. H. Hammer, J. Brown, and M. M. Frank. (1982). Studies on the mechanism of bactericidal resistance to complement-mediated killing II C8 and C9 release C5b67 from the surface of Salmonella minnesota S218 because the terminal complex does not insert into the bacterial outer membrane. *J. Exp. Med.* 155: 809-819.
65. Joiner K. A., E. J. Brown, and M. M. Frank. (1984). Complement and bacteria. *Ann. Rev. Immunol.* 2: 461-491.

66. Karkhanis Y. D., J. Y. Zeltner, J. J. Jackson, and D. J. Carlo. (1978). A new and improved microassay to determine 2-keto- 3-deoxyoctonate lipopolysaccharide of gram-negative bacteria. *Analyt. Biochem.* 85: 595-601.
67. Klontz G. W., and Anderson D. P. (1968). *Bull. Off. Int. Epizoot.* 69: 1149-1157.
68. Korhonen T. K., E. A. Dawes and P. H. Mäkelä. (1985). Enterobacterial surface antigens. Methods for molecular characterization. Elsevier. FEMS Symposium n<sup>o</sup> 25.
69. Kropinski M. B., V. Lewis, and D. Berry. (1987). Effect of growth temperature on the lipids, outer membrane proteins and lipopolysaccharides of Pseudomonas aeruginosa PAO. *J. Bacteriol.* 169 (5): 1960-1966.
70. Kuo J. S. C., V. W. Doelling, J. F. Grakline, and D. W. McCoy. (1985). Evidence for covalent attachment of phospholipid to the capsular polysaccharide of Haemophilus influenzae type B. *J. Bacteriol.* 163: 769-773.
71. Laemli U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of bacteriophage T4. *Nature (London)*. 227: 680-685.
72. Lallier, F. B., and G. Lalonde. (1984). Difference in the extracellular products of two strains of Aeromonas hydrophila virulent and weakly virulent for fish. *Can. J. Microbiol.* 30: 900-904.
73. Lee C. Fraser B.A., Boykins R.A., and Li J.P. (1987). Effect of culture conditions on the structure of Streptococcus pneumoniae type 19A (57) capsular polysaccharide. *Infect. Immun.* 55: 1819-1823.
74. Lindberg A. A., and T. Holmet. (1969). Influence of O side chains on the attachment of the helix O-1 bacteriophage to Salmonella bacteria. *J. Bacteriol.* 99: 513-519.
75. Lindberg A. A. (1971). Bacteriophage attachment and inactivation in relation to chemical composition of salmonella lipopolysaccharides. Thesis. Karohinska Institutet Stockholm. Sweden. 47 pp.
76. Lindberg A. A. (1973). Bacteriophage receptor. *Ann. Rev. Microbiol.* 27: 205-241.
77. Lindberg A. A. (1977). Bacterial surface carbohydrates and bacteriophage adsorption. En "surface carbohydrates of the prokariotic cell". Ed. I.W. Sutherland. Cap. 8, pg. 290-349. Academic Press.
78. Lowry O. H., N. J. Rosebrough, A. L. Farr, and R. J. Randall. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193:265-275.
79. Lüderitz O., O. Westphal, A. M. Staub, and H. Nikaido (1971). Microbial toxins IV.

- 145-233. New York: Academic Press.
80. Luria S. E., J. E. Darnell, D. Baltimore, and A. Campbell. (1978). *General virology*. 3<sup>o</sup> ed. J. Wiley and Sons.
  81. MacIntyre S., T. J. Trust, and J. T. Buckley. (1979). Distribution of glycerol phospholipid cholesterol acyltransferase in selected bacterial species. *J. Bacteriol.* 139: 132-136.
  82. Maniatis T., Fritsch E. S., and J. Sambrook. (1982). *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory. Cold Spring Harbor, N.Y.
  83. Mann C. B., E. E. Ishiguro, W. W. Kay and T. J. Trust. (1982). Role of surface components in serum resistance of virulent *Aeromonas salmonicida*. *Infect. Immun.* 36: 1069-1075.
  84. Marcus L. C. (1971). Infection diseases of reptiles. *J. Ann. Med. Assoc.* 159: 1629-1631.
  85. Markwell M. A. K., S. M. Haas, L. L. Bieber, and N. E. Tolbert. (1978). A modification of the lowry procedure to simplify protein determination in membrane and lipoprotein samples. *Anal. Biochem.* 87: 206-210.
  86. Matthews R. E. F. (1980). Classification et nomenclature des virus. Troisième rapport du comité international de taxonomie des virus. Paris. Masson.
  87. Mayer M. M. (1984). Complement: historical perspectives and some current tissue. *Complement.* 1: 2-26.
  88. McCarthy D. H. (1975). Fish furunculosis. *J. Inst. Fish. Management.* 6: 13-18.
  89. McCarthy D. H. (1975). The bacteriology and taxonomy of *Aeromonas liquefaciens*. Technical Report Series, Fish Diseases Laboratory, Ministry of Agriculture, Weymouth, Dorset, U.K..
  90. McCraw B. M. (1952). Furunculosis of fish. U.S. Department of the Interior, Fish and Wildlife Service, Special Scientific Report. Fisheries N<sup>o</sup> 84.
  91. Merino S., V. J. Benedí, and J. M. Tomás. (1989). *Aeromonas hydrophila* strains with moderate virulence. *Microbios.* 59: 165-173.
  92. Merino S., S. Camprubí, and J. M. Tomás. (1990). Isolation and characterization of bacteriophage PM3 from *Aeromonas hydrophila* the bacterial receptor for which is the monopolar flagellum. *FEMS Microbiol. Lett.* 69: 277-282.

93. Merino S., S. Camprubí, and J. M. Tomás. (1990). Isolation and characterization of bacteriophage PM2 from Aeromonas hydrophila. *FEMS Microbiol. Lett.* **68**: 239-244.
94. Merino S., S. Camprubi, and J. M. Tomas. (1990). Identification of the cell surface receptor for bacteriophage 18 from Aeromonas hydrophila. *Res. Microbiol.* **141**: 173-180.
95. Meynell E. W. (1961). A phage, ØX, which attacks motile bacteria. *J. Gen. Microbiol.* **25**: 253-290.
96. Miles A. A., and S. S. Misra. (1983). The stimulation of the bactericidal power of blood. *J. Hyg.* **38**: 732-749.
97. Miller J. (1972). *Experiments in molecular genetics*. Cold Spring Harbor Laboratory.
98. Mishra S., G. Balakrish Nair, Rupak K. Bhadra, S.N. Sikder, and S.C. Pal. (1987). Comparison of selectivemedia for primary isolation of Aeromonas species from humanand animals feces. *J. Clin. Microbiol.* **25** (11): 2040-2043.
99. Mittal K. R., G. Lalonde, D. Leblanc, G. Olivier, and R. Lallier. (1980). Aeromonas hydrophila in rainbow-trout: relation between virulence and surface characteristics. *Can. J. Microbiol.* **26**: 1501-1503.
100. Morrison D. C., and L. F. Kline. (1977). Activation of the classical and properdin pathways of complement by bacterial lipopolysaccharides. *J. Immunol.* **118**: 362-368.
101. Morrison y Kline. (1977). Activation of the classical and properdine pathways of complement by bacterial lipopolysaccharide. *J. Immunol.* **118**: 362-368.
102. Munn C. B., E. E. Ishiguro, W. W. Kay, and T. J. Trust. (1982). Role of surface components in serum resistance of virulent Aeromonas salmonicida. *Infect. Immun.* **36** (3): 1069-1075.
103. Murray Stewart, T. J. Beveridge, and T. J. Trust. (1986). Two patterns in the Aeromonas salmonicida A-layer may reflect a structural transformation that alters permeability. *J. Bacteriol.* **166** (1): 120-127.
104. Neilson A. H. (1978). The occurence of Aeromonas in activated sludge: isolation of Aeromonas sobria and its possible confusion with Escherichia coli. *J. Appl. Bacteriol.* **44**: 259-264.
105. Neilands J. B.. (1979). The ionic function of bacteriophage receptor. *TIBS.* 115-118.
106. Nieto J. M., J. M. Tomás, and A. Juarez. (1987). Secretion of an Aeromonas hydrophila aerolysin by a mutant strain of Escherichia coli. *FEMS Microbiol. Lett.* **48**: 413-417.

107. Nikaido H., and M. Vaara. (1985). Molecular basis of bacterial outer membrane permeability. *Microbial. Rev.* 49: 1-32.
108. Nuttal G. (1988). Experimente uber die bakterienfeindliche einflusse des tierischen. *Korpers Z. Hyg. Infektionkr.* 4: 353-394.
109. Nyindo J., R. J. Seidler, W. E. Sandine, and P. R. Elliker. (1974). Preparation and storage of high-filter lactic Streptococcus bacteriophages. *Applied. Microbiol.* 27: 72-77.
110. Okino H., M. Isomura, S. Yagamuchi, Y. Magariyama, S. Kudo, and S.L. Aizawa. (1989). Release of flagellar filament-hook-rod complex by a Salmonella typhimurium mutant defective in the M ring of the basal body. *J. Bacteriol.* 171 (4):2075-2082.
111. Olivier G., R. Lallier, and S. Larivière. (1981). Toxigenic profile of Aeromonas hydrophila and Aeromonas sobria isolated from fish. *Can. J. Microbiol.* 26: 330-333.
112. Osborn M. J. (1966). Preparation of lipopolysaccharides from mutant strains of Salmonella. *Methods Enzimol.* 8: 161-164.
113. Paniagua C., O. Rivero, J. Anguita, and G. Naharro. (1990). Pathogenicity factors and virulence for Rainbow trout (Salmo gairdneri) of motile Aeromonas spp. isolated from a river. *J. Clin. Microbiol.* 28 (2): 350-355.
114. Pater P. V., P. M. V. Martin, E. L. Tan, C. A. Nairn, W. J. Peyzone, M. Goldner, and H. Smith. (1988). Protein changes associated with induced resistance of Neisseria gonorrhoeae in killing by human serum are relatively minor. *J. Gen. Microbiol.* 134: 499-509.
115. Paterson W. D., and J. L. Fryer. (1974). *J. Fish. Res. Board Can.* 31: 1743-1749.
116. Paterson W. D., D. Dovey, and D. Desautels. (1980). Isolation and identification of an atypical Aeromonas salmonicida strain causing epizootic lasses among Atlantic salmon. (Salmo salar) reared in a Nova Scotia hatchery. *Can. J. Fish. and Aquatic. Scien.* 37: 2236-2241.
117. Paula S. J., P.S. Dufley, S. L. Abbott, R.P. Kokka, L. S. Oshiro, J. M. Janda, T. Shimada, and R. Sakazaki. (1988). Surface properties of autoagglutinating mesophilic Aeromonas. *Infect. Immun.* 56 (10):
118. Perez G. I. P., and M. J. Blaser. (1985). Lipopolysaccharide characteristics of pathogenic Campylobacters. *Inf. Immun.* 47: 353-359.
119. Podack E. R., and J. Tschopp. (1984). Membrane attack by complement. *Mol. Immunol.* 21: 589-603.

120. Popoff M. (1969). Etude sur les Aeromonas salmonicida. I. Caractères biochimiques et antigéniques. *Rech. Vet.* 3: 49-57.
121. Popoff M., and M. Veron. (1976). A taxonomic study of the Aeromonas hydrophila, Aeromonas punctata group. *J. Gen. Microbiol.* 94: 11-22.
122. Popoff M., and M. Veron. (1981). Aeromonas sobria sp. nov. Invalidation of the publication of new names and new combinations previously effectively published outside the IJSB. List. N° 6. *Inst. J. Syst. Bacteriol.* 31: 215.
123. Ramm L. E., M. B. Wiitlow, and M. M. Mayer. (1982). Size of the transmembrane channels produced by complement proteins C5b-8. *J. Immunol.* 129: 1143-1146.
124. Randall-Hazelbauer L. and M. Schwartz. (1973). Isolation of the bacteriophage lambda receptor from Escherichia coli. *J. Bacteriol.* 116: 1436-1446.
125. Reed L. J., and H. Munchen. (1938). A simple method of estimating fifty percent end points. *Am. J. Hyg.* 27: 493-497.
126. Regué M. (1981). Estudios de algunos aspectos de la intereracción entre Klebsiella pneumoniae y fagos específicos e inespecíficos. Tesis Doctoral. Universidad de Barcelona.
127. Regué M., J. M. Tomás, R. Parés, and J. Jofre. (1981). Isolation and partial characterization of phages infecting Citrobacter intermedius C3. *Current. Microbiol.* 5: 151-154.
128. Reid K. B. M., and R. R. Porter. (1981). The proteolytic activation systems of complement. *Ann. Rev. Biochem.* 50: 433-464.
129. Reynolds B. L., U. A. Rother, and K. O. Rother. (1975). Interaction of complement components with a serum-resistant strain of Salmonella typhimurium *Infect. Immun.* 11: 944-948.
130. Reynolds B. L., and D. Rowleg. (1969). Sensitation of complement resistant bacterial strains. *Nature. (London).* 221: 1259-1261.
131. Robinson E. N., Jr. Z. A. McGee, J. Kaplan, M. E. Hammond, J. K. Larson, T. M. Buchanan, and G. K. Schooink. (1984). Ultrastructural localization of specific Gonococcal macromolecules with antibody-gold sphere immunological probes. *Infect. Immun.* 46: 361-366.
132. Robinson E. N., Jr. Z. A. McGee, and C. M. Clemens. (1987). Probing the surface of bacteria: use of gold sphere immunological probes. *Microb. Pathog.* 2: 159-169.
133. Rosenberg M., D. Gutnick, and E. Rosenberg. (1980). Adherence of bacteria to hydrocarbons: a simple method for measuring cell-surface hydrofobicity. *FEMS*



Microbiol. Lett. 9:29-33.

134. Ross A. J. (1962). Isolation of a pigment-producing strain of Aeromonas liquefaciens from silver salmon (Oncorhynchus kisutch). J. Bacteriol. 84: 590-591.
135. Rottem S., O. Markowitz, and S. Razin. (1978). Thermal regulation of the fatty acid composition of lipopolysaccharides and of Proteus mirabilis. Eur. J. Biochem. 85: 445-450.
136. Russell L. M., Gryz S.j., and R. K. Holmes. (1984). Genetic and biochemical evidence for a siderophore-dependent iron transport system in Corynebacterium diphtheriae. Infect. Immun. 45: 143-149.
137. Sakazaki R. and T. Shimada. (1984). O-serogrouping for mesophilic Aeromonas strains. J. Pn. J. Med. Sci. 37: 247-255.
138. Salton M. R. J., and J. M. Ghuyssen. (1959). The structure of di- and tetra-saccharides released from cell walls by lysozyme and streptomycetes F1 enzyme and the  $\beta(1-4)$  N-acetylhexosaminidase activity of these enzymes. Biochem. Biophys. Acta, 36: 552-554.
139. Shafer W. M., K. Joiner, L. F. Guyman, M. S. Cohen, and P. F. Sparling. (1984). Serum sensitivity of Neisseria gonorrhoeae: the role of lipopolysaccharide. J. Infect. Dis. 149: 175-183.
140. Shaw D. H., and H. J. Hodder. (1978). Lipopolysaccharides of motile aeromonads - core oligosaccharide analyses as an aid to taxonomic classification. Can. J. Microbiol. 24: 864-868.
141. Shaw D. H., Y. Z. Lee, M. J. Squires and O. Lüderitz. (1983). Structural studies on the O-antigen of Aeromonas salmonicida. Eur. J. Biochem. 131: 633-638.
142. Shieh H. S., and J. R. McLean. (1975). Purification and properties of an extracellular protease of Aeromonas salmonicida, the causative agent of furunculosis. Int. J. Biochem. 6: 653-656.
143. Shieh H. S., and B. H. Reddy. (1972). Arginine catabolism in the causative agent of furunculosis, Aeromonas salmonicida. Int. J. Biochem. 3: 705-708.
144. Shin M. L., W. A. Paznekas, and M. M. Mayer. (1978). On the mechanism of membrane damage by complement the effect of length and unsaturation of the acylchains in liposomal bilayers and the effect of cholesterol concentration in sheep erythrocytes and liposomal membranes. J. Immunol. 120: 1996-2002.
145. Smith I. W. (1963). The classification of Bacterium salmonicida. J. Gen. Microbiol. 33: 263-274.

146. Smith J. (1986). Protein surface layers of bacteria. In *Bacterial outer membranes as model systems*. Edited by M. Inouye. John Wiley and Sons. Chichester pp: 343-376.
147. Supelco Inc. 1299 Crans, Switzerland. (1977). Carbohydrate analysis by G.C. and T.L.C. *Bulletin* 774 A: 1-6.
148. Swchab G. E., and P. R. Reoves. (1986). Comparison of the bactericidal activity of different vertebrate sera. *J. Bacteriol.* 91: 106-112.
149. Taylor P. W., and Robinson M. K. (1980). Determinants that increase the serum resistance of Escherichia coli. *Infect. Immun.* 29: 278-180.
150. Taylor P. W., and H. P. Kroll. (1983). Killing of an encapsulated strain of Escherichia coli by human serum. *Infect. Immun.* 39: 122-131.
151. Taylor P. W. (1983). Bactericidal and bacteriolytic activity of serum against Gram-negative bacteria. *Microbiol. Rev.* 47: 46-83.
152. Titball R. W., and C. B. Munn. (1981). Evidence for two haemolytic activities from Aeromonas salmonicida. *FEMS Microbiol. Lett.* 12: 27-30.
153. Tomás J. M., and J. Jofre. (1985). Lipopolysaccharide- specific bacteriophage for Klebsiella pneumoniae. *J. Bacteriol.* 162: 1276-1279.
154. Tomás J. M., V. J. Benedí, B. Ciurana, and J. Jofre. (1986). Role of the capsule and the O-antigen in resistance of Klebsiella pneumoniae to serum bactericidal activity. *Infect. Immun.* 54: 85-89.
155. Tomás J. M., V. J. Benedí and J. Jofre. (1987). Identification of the cell-surface receptor for FC3-2, FC3-3 and FC3-6 bacteriophages of Klebsiella pneumoniae. *FEMS Microbiol. Lett.* 41: 223-228.
156. Towbin H., T. Staehelin, and J. Gordon. (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrilamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 76: 4350-4354.
157. Trust T. J., and R. A. H. Sparrow (1974). The bacterial flora in the alimentary tract of freshwater salmonid fishes. *Can. J. Microbiol.* 20: 1219-1228.
158. Trust T. J., S. P. Howard, J. B. Chamberlain, E. E. Ishiguro, and T. T. Buckley. (1980). Additional surface protein in autoaggregating strains of atypical Aeromonas salmonicida. *FEMS Microbiol. Lett.* 9: 35-38.
159. Trust T. J., Ishiguro E. E., and Atkinson H. M. (1980). Relationship between Haemophilus revealed by Aeromonas salmonicida bacteriophage. *FEMS Microbiol. Lett.* 9: 199-201.

160. Trust T. J., W. W. Kay, E. E. Ishiguro, J. T. Buckley, and J. T. Pearson. (1982). Properties of A protein a virulence factor on the surface of Aeromonas salmonicida. Dev. Comp. Immunol. 6: Supl. 1.
161. Trust T. J., E. E. Ishiguro, H. Chart, and W. W. Kay. (1983). Virulence properties of Aeromonas salmonicida. J. World Maricul. Soc. 14: 193-200.
162. Tsai C. M., and C. E. Frach. (1982). A sensitive silver strain for detecting lipopolysaccharide in polyacrilamide gels. Anal. Biochem. 119: 115-119.
163. Van Alphen L., B. Lugtenberg, E. T. Reitschel, and C. Mommers. (1979). Architecture of the outer membrane of Escherichia coli K12. Phase transition of the bacteriophage K3 receptor complex. Eur. J. Biochem. 101: 571-579.
164. Van Oss C. J. (1978). Phagocytosis as a surface phenomenon. Ann. Rev. Microbiol. 39: 19-39.
165. Vukajlovich S. W. (1986). Antibody-independent activation of the classical pathway of human serum complement by lipid A is restricted to Re-chemotype lipopolysaccharide and purified lipid A. Infect. and Immun. 53: 480-485.
166. Wartenberg K., W. Knapp, N. M. Ahamed, C. Widemann, and H. Mayer. (1983). Temperature dependent changes in the sugar and fatty acid composition of lipopolysaccharides from Yersinia enterocolitica strains. Zentralbl. Bakteriol., Parasitenkd. Infektionskr. Abt. 1 Orig. Reche. A. 253:523-530.
167. Wecke J., B. Reinicke, and G. Schallehn. (1974). Remarkable differences in the ultrastructure of the cell wall of toxigenic Clostridia. 8th. International Congress of Electron Microscopy, Camberra. 2: 644-645.
168. West, D., C. Lagenaur, and N. Agabian. (1976). Isolation and characterization of Caulobacter crescentes bacteriophage OCd1. Journal of Virology. 17:568-575.
169. Westphal O. and K. Jann. (1965). Bacterial lipopolisaccharides: extraction with nitrophenol-water and further applications of the procedure. Methods Carbohydr. Chem. 5: 83-91.
170. Wiggins B. A., and M. Alexander. (1985). Minimum bacterial density for bacteriophage replication: implications for significance of bacteriophages in natural ecosystems. Appl. Environ. Microbiol. 49:19-23.
171. Williams and Wilkins CO. (1984). Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Volumen 1. Baltimore.
172. Williamson I. J. F. (1928). Furunculosis of the salmonidae. Fishery Board of Scotland, Salmon Fisheries. 5: 1-17.

173. Wilson M. E., and Morrison D. C. (1982). Evidence for different requirements in physical state for the interaction of lipopolysaccharides with the classical and alternative pathway of complement. *Eur. J. Biochem.* 128: 137-141.
174. Wright A. (1971). Mechanism of conversion of the Salmonella O antigen by bacteriophage $\phi$ 34. *J. Bacteriol.* 105: 927-936.







**UNIVERSITAT DE BARCELONA**  
Divisió de Ciències Experimentals  
i Matemàtiques  
Facultat de Biologia





