

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*.

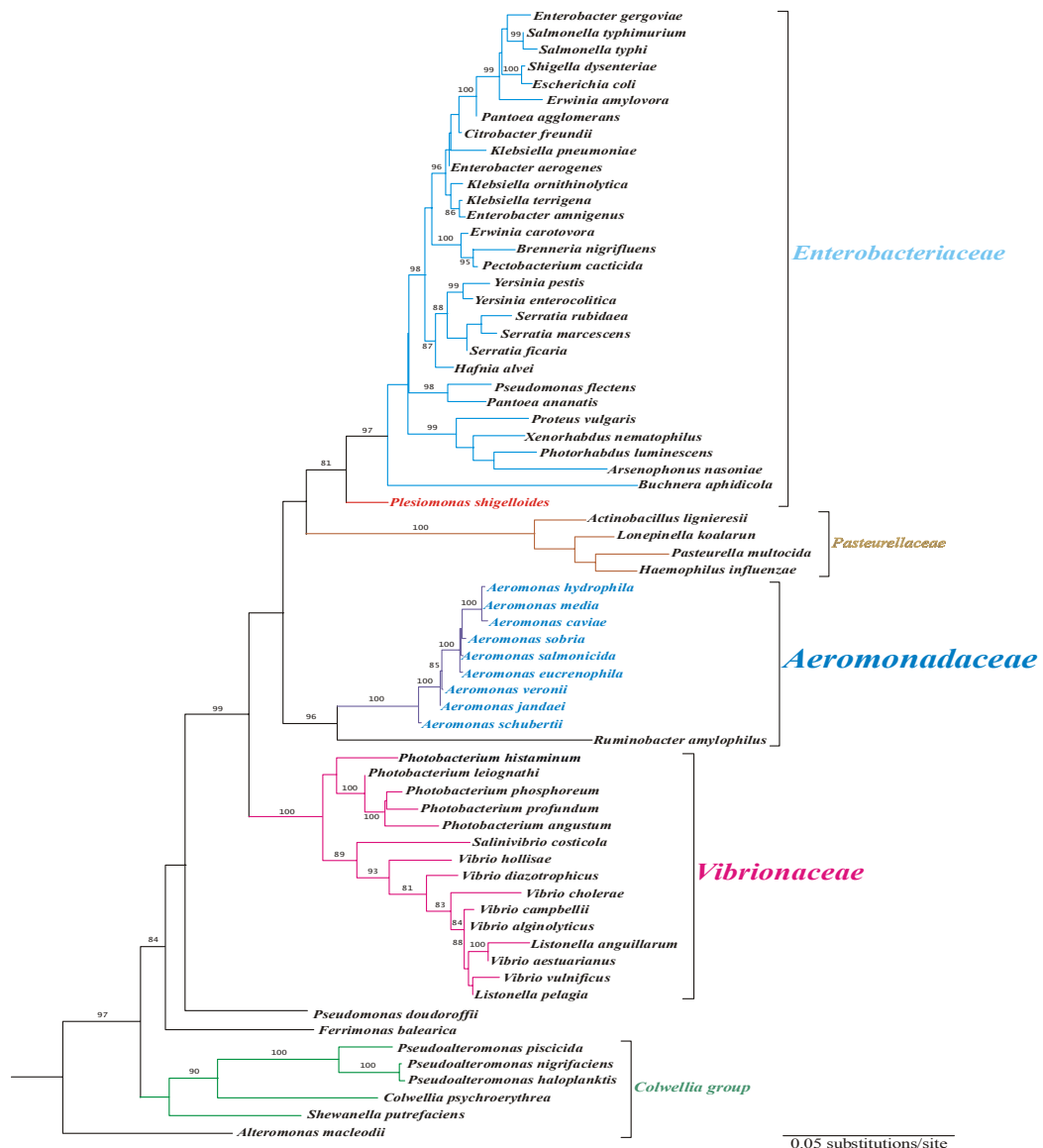


Figura 1.1. Posición filogenética de la familia *Aeromonadaceae* respecto a la familia *Vibrionaceae* y especies relacionadas. La posición deriva del análisis de similitud de la secuencia del gen 16S rRNA. Los porcentajes de *bootstrap* iguales o superiores al 80% indican la solidez de las ramas (Anzai 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. ichtiosmia* (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. ichtiosmia* y *A. veronii* mediante estudios de hibridación DNA-DNA que han confirmado que *A. ichtiosmia* 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 isotopos 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 que 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).

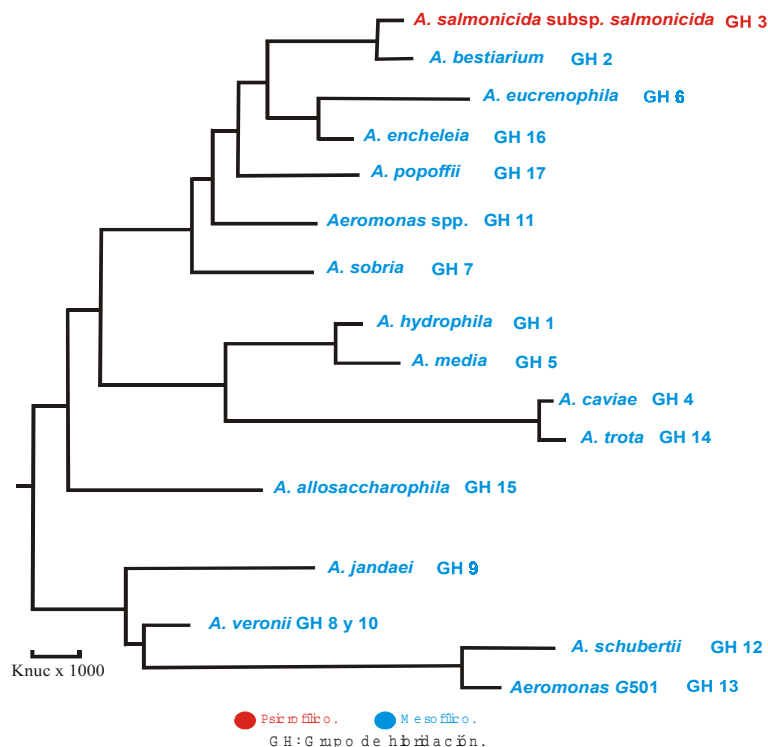


Figura 1.2. Relación filogenética entre las distintas especies incluídas en el género *Aeromonas* establecida en base a la secuencia del gen 16S rRNA (Modificado de Martínez-Murcia, 1999).

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 ampliamente 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 aquel 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 com *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	Antígeno	Serología*		Biopsia	Especie
				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 WC	16 25	...	Intestino delgado	<i>A. veronii</i>

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 y 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 Goulet, 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 cómo 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 del 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 resolutiva 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 ente 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).

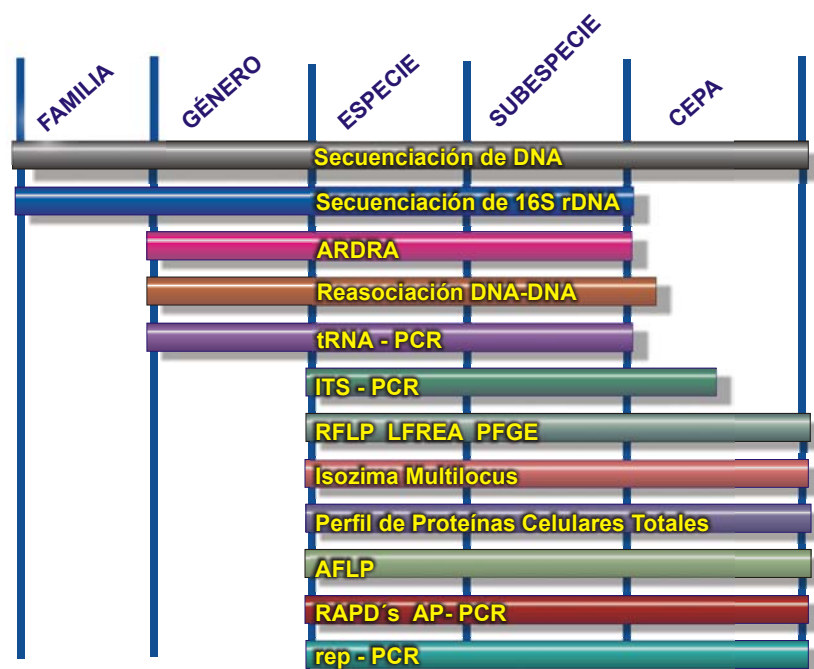
La técnica del REP-PCR no fue aplicada con finalidades epidemiológicas hasta 1992 (Woods y cols., 1992) y el ERIC hasta 1993 (Endtz y cols., 1993). La primera

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 intergénico16S-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 cobaya 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 isogénicos o espontáneos para este gen aumentan 10.000 veces su DL₅₀ 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 DL₅₀ 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 DL_{50} 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). Éstas 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				
<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>)	Eleva 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				
	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
Metaloproteasas	- ^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 proteína (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.

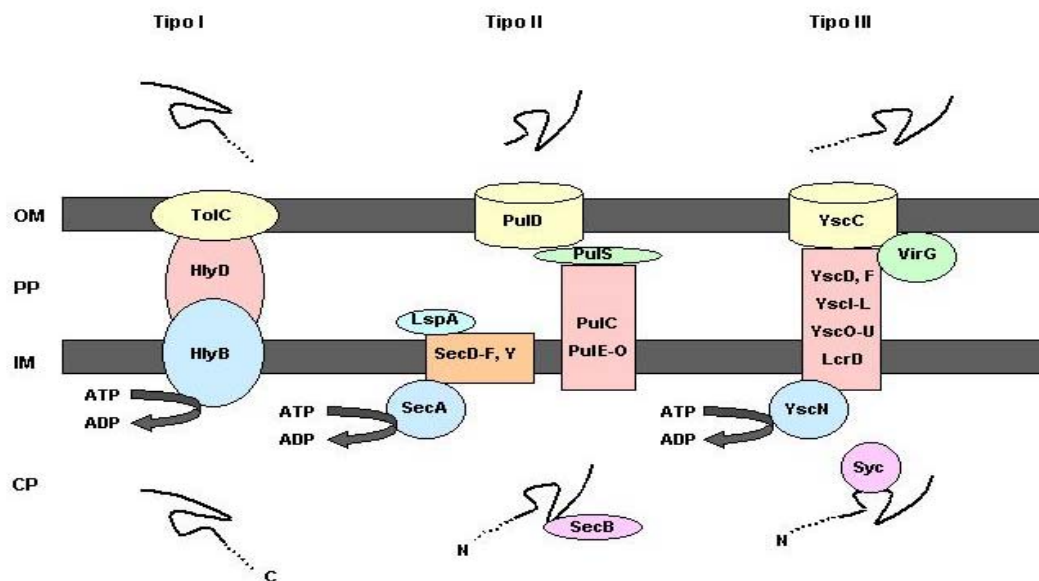
1.3.2.1 Sistemas de secreción

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-sígnal 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.

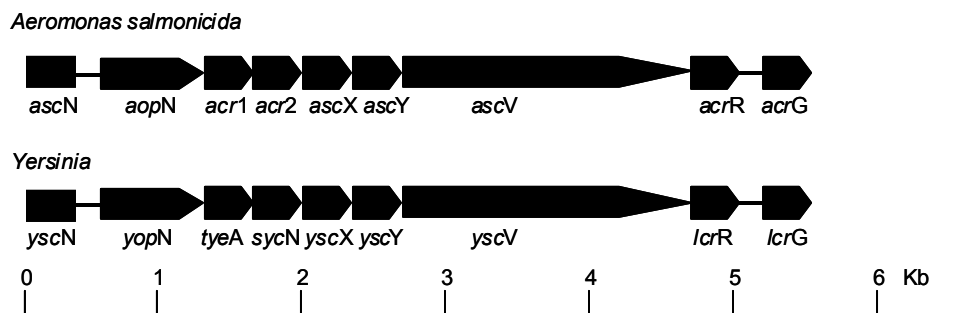
En *A. hydrophila* se ha identificado y caracterizado el operón *exe* que es responsable de la secreción tipo II (Jiang y Howard, 1992; Howard y cols., 1993). Este operón presenta una elevada homología con el operón pullulanasa, responsable de la vía secretora general en *Klebsiella oxytoca*. Los productos 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.