

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Origen y aislamiento de las cepas

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

3.1.1. Cepas clínicas

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

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

3.1.2. Cepas ambientales

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

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

3.1.3. Cepas de colección y de referencia

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

3.1.4. Cepas pertenecientes a otros géneros

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

3.2. Resiembra y conservación de cepas

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

3.2.1. Conservación a corto plazo

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

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

3.2.2. Conservación a largo plazo

Ultra-congelación

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

Liofilización

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

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

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

3.3.1. Cepas clínicas

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

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

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

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

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

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

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

3.3.4. Cepas aisladas de pescado congelado

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

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

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

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

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

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

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

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

purificación InstaGENE (Bio-Rad Laboratories Inc., Barcelona, España) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La amplificación del gen 16S rRNA se llevó a cabo en el termociclador Gene-AMP (PCR System Perkin Elmer 2400) utilizando la metodología de *Hot Start PCR* (Burke, 1996). La amplificación se realizó en un volumen final de 50 μ l que contenía 1 μ g de DNA genómico, 1 X tampón (20 mM Tris-HCl pH8.4, 50 mM KCl), 0.3 μ M de cebador Anti1, 0.3 μ M de cebador S, 1.8 mM $MgCl_2$, 0.3 mM dNTP's y 2.5 U *Taq* polimerasa (Invitrogen; Barcelona, España). Las condiciones para cada ciclo de reacción programada fueron: 96°C, 5 min (desnaturalización); seguida de 35 ciclos de 94°C, 1 min (desnaturalización), 56°C, 1 min (hibridación); 72°C, 1.30 min (extensión). Finalmente se efectuó una última polimerización durante 5 min a 72°C. La secuencia de los cebadores para la amplificación del gen 16S rRNA de *Aeromonas* y su localización según su posición en *Escherichia coli* es la siguiente:

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

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

Para la identificación de las especies, los productos de PCR se digirieron con las enzimas *AluI-MboI*, para ello se adicionaron 12 μ l del amplificado, 50 mM Tris-HCl (pH 8.0), 10 mM $MgCl_2$, 10 U de la enzima *AluI* y 10 U de la enzima *MboI* (Gibco BRL). La mezcla se incubó a 37°C durante toda la noche y se analizó por electroforesis en geles de poliacrilamida al 17% (Sambrook y cols., 1989). Éste primer paso permitió la identificación de 10 de las especies del género en base a patrones especie específicos. Las especies *A. encheleia*, *A. salmonicida*, *A. bestiarum*, *A. popoffii* y *Aeromonas* sp. (GH11) no pudieron ser identificadas con este primer paso debido a que presentaban el mismo patrón (Borrell y cols., 1997). Para la identificación de estas

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

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

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

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

3.5. Diseño de una sonda para la identificación del género

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

3.5.1. Colony blot

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

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

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

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

3.6. Secuenciación de genes esenciales

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

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

94°C, 1 min (desnaturalización), 61°C, 1 min (hibridación); 72°C, 1 min (extensión); 2 ciclos de 94°C, 1 min (desnaturalización), 59°C, 1 min (hibridación); 72°C, 1 min (extensión); y 30 ciclos de 94°C, 1 min (desnaturalización), 58°C, 1 min (hibridación); 72°C, 1 min (extensión). Todo el volumen de la reacción se analizó por electroforesis en un gel de agarosa al 0.8%. El producto de amplificación de 850 pb (tamaño esperado), fue recortado del gel de agarosa y posteriormente purificado mediante el GFX™ PCR DNA - Gel Band Purification Kit (Amersham Pharmacia Biotech; Barcelona, España) de acuerdo con las instrucciones del fabricante para su posterior secuenciación. Para la secuenciación de éste fragmento del gen *rpoD* se utilizaron 4 cebadores diferentes, 2 cebadores externos (*rpoDseqF*: 5'ACG ACT GAC CCG GTA CGC ATG TA³; *rpoDseqR*: 5'ATA GAA ATA ACC AGA CGT AAG TT³) y 2 cebadores internos (*rpoDseqF1*: 5'GTC AAT TCC GCC TGA TGC³; *rpoDseqR1*: 5'ATC ATC TCG CGC ATG TTG T³). La reacción de secuenciación se realizó en un volumen final de 10 µl que contenía 100-200 ng (4 µl) de producto de PCR purificado, 4 µl de ABI PRISM® BigDye™ Terminators vers. 2.0 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), 1 µl (3.2 pmol) de cebador y 1µl de _{bd}H₂O. Las condiciones para cada ciclo de reacción programada fueron: 94°C, 5 min (desnaturalización); seguida de 25 ciclos de 96°C, 10 seg (desnaturalización); 50°C, 5 seg (hibridación); 60°C, 4 min (extensión). El producto de ésta reacción fue precipitado con etanol y analizado en el secuenciador automático ABI PRISM® 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) de acuerdo con las recomendaciones del fabricante.

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

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

Para la amplificación del gen *gyrB*, se extrajo el DNA de 70 cepas (Anexo 9) resuspendiendo, en un vórtex, una colonia en 50 µl de TE e incubando a 96°C durante 10 min. A continuación la mezcla se centrifugó 2 min a 12000 rpm y el sobrenadante fue transferido a un tubo nuevo. La mezcla de PCR se hizo en un volumen final de 50 µl que contenía 1µl de DNA genómico, 1 X tampón (10 mM Tris-HCl pH9.0, 50 mM KCl, 0.1% Triton X-100), 20 pmol de cebador *gyrB3F* (5'TCC GGC GGT CTG CAC GGC GT³), 20 pmol de cebador *gyrB14R* (5'TTG TCC GGG TTG TAC TCG TC³) (Yáñez y cols., 2002), 1.5 mM MgCl₂, 0.2 mM dNTP's y 1 U *Taq* polimerasa. Las

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

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

3.6.3. Gen 16S rRNA

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

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

3.6.4. Análisis de las secuencias y construcción de los dendogramas

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

3.7. Técnicas de tipado

3.7.1. RFLP del 16S-23S ISR

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

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

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

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

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

Se realizaron diferentes tipos de digestiones:

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

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

3.7.2. ERIC - PCR

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

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

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

3.7.3. REP - PCR

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

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

3.7.4. Análisis de geles y dendogramas

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

3.8. Sensibilidad a agentes antimicrobianos

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

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

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

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

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

3.9. Estudio de factores de virulencia

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

3.9.1. Amplificación de los genes de virulencia

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

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

3.9.2. Dot blot

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

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

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

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

3.9.3. Pruebas fenotípicas para la detección de factores de virulencia

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

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

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

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

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

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

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

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

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

3.9.4. Ensayos de patogenicidad

Se utilizaron carpas comunes (*Cyprinus carpio* L.) de un peso medio de 150 g. Éstas fueron conservadas, manipuladas y alimentadas tal y como se detalla en el estudio 4.4.5 (Kozinińska y cols., 2002). Los peces fueron infectados por inyección subcutánea con un inóculo de 0.1 ml que contenía 10^6 células bacterianas diluidas en PBS. Se infectaron 10 peces por cepa, y 10 peces más fueron inyectados con PBS (control). La morbilidad y mortalidad de los peces se monitorizó durante 7 días, considerándose las cepas:

1. *Altamente virulentas:* Más de 6 peces mostraban síntomas de enfermedad y 5-10 peces murieron.
2. *Virulentas:* Más de 6 peces mostraban síntomas de enfermedad y 1-4 peces murieron.
3. *Poco virulentas:* Más de 4 peces mostraban síntomas de enfermedad pero ninguno murió.

4. *No virulentas*: De 1 a 4 peces mostraban síntomas leves de enfermedad pero ninguno murió.

Las cepas utilizadas en el estudio 4.4.5 se detallan en el Anexo 5.

3.9.5. Análisis estadístico

En el estudio Chacón y cols. (2003) (4.4.1) se determinó si existían diferencias significativas ($p < 0.05$) en la presencia y/o ausencia de los factores de virulencia y de su actividad fenotípica asociada en aquellas especies en las que se disponía de cepas ambientales y clínicas. Los tests aplicados fueron el Chi-cuadrado de Pearson y el Estadístico exacto de Fisher del paquete informático *Statistical Package for Social Sciences* (SPSS vers. 9.0 Inc., Chicago, Estados Unidos). En el estudio 4.1.1.2, también se aplicó el Chi-cuadrado de Pearson para establecer si las diferencias de identificación obtenidas entre el BBL Crystal y el MicroScan eran significativas ($p < 0.05$).

3.10. Estudio del Sistema de Secreción Tipo III (TTSS)

3.10.1. Diseño de cebadores para genes conservados del TTSS

Para estudiar la posible presencia del TTSS en *Aeromonas* sp. se seleccionaron genes conservados de éste sistema en otras bacterias patógenas (Hueck, 1998), uno ubicado en una de las regiones extremas del tándem de genes que codifican para dicho sistema en otros microorganismos (*scfV*), dos ubicados en la parte central (*scfR* y *scfT*) y otros dos ubicados en la otra región extrema de dicho tándem de genes (*scfJ-L*). Las secuencias de estos genes depositadas en las bases de datos fueron alineadas mediante el programa CLUSTAL W y se seleccionaron las regiones homólogas para diseñar cebadores específicos para cada gen.

3.10.2. Amplificación por PCR de genes del TTSS en *Aeromonas* y secuenciación de los productos amplificados

El DNA genómico de 12 cepas de diferentes especies (Anexo 14), aisladas de muestras humanas de origen intestinal y extraintestinal, fue extraído siguiendo la metodología descrita en el apartado 3.4. Para cada amplificación se añadieron 3 μ g de

DNA genómico en un volumen final de 100 µl que contenía 1 X tampón (20 mM Tris-HCl pH 8.4, 50 mM KCl), 0.1 µM de iniciador-F, 0.1 µM de iniciador-R, 1.8 mM MgCl₂, 0.2 mM dNTP's y 5 U de *Taq* polimerasa. Las condiciones para cada ciclo de reacción programada fueron: 95°C, 5 min (desnaturalización); seguida de 36 ciclos de 94°C, 1 min (desnaturalización), 50°C, 1 min (hibridación); 72°C, 1 min 10 seg (extensión); y una extensión final de 72°C, 7 min.

Todo el volumen de la reacción fue sometido a electroforesis en un gel de agarosa al 0.8%. El producto de la amplificación del tamaño esperado fue recortado del gel de agarosa y purificado con el GFX™ PCR DNA - Gel Band Purification Kit (Amersham Pharmacia Biotech) de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

De 100 a 200 ng de 20 a 30 productos de PCR purificados fueron secuenciados según las condiciones descritas en el apartado 3.6.1. Las secuencias obtenidas fueron ensambladas con el programa informático AutoAssembler alias vers. 1.40 (Applied Biosystems). Posteriormente fueron comparadas con todas las depositadas en la base de datos GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov) utilizando el programa BLAST tanto a nivel de DNA (blastn) como de proteína (tblastx). Aquellos productos de PCR que presentaban homología con genes del TTSS fueron utilizados como sondas en el cribado de las genotecas de *Aeromonas* que se construyeron como se describe a continuación.

3.10.3. Construcción de genoteca en cósmidos

Para seleccionar las cepas más adecuadas para la construcción de las genotecas se realizó un *dot blot* con 12 cepas clínicas de origen extraintestinal, incluyendo representantes de las tres especies más predominantes en clínica (*A. veronii*, *A. caviae* y *A. hydrophila*), utilizando como sonda los genes que presentaban homología con el TTSS. El *dot blot* se realizó tal y como se detalla en el apartado 3.9.2. Se eligió la cepa 283c (*A. veronii* bt sobria) aislada de hemocultivo para la construcción de la genoteca ya que presentó una intensa señal de hibridación con las sondas del TTSS. El DNA total de esta cepa fue parcialmente digerido con la enzima de restricción *Mbol* y se defosforiló. Para la defosforilación se añadió 0.1 U CIAP por cada 1-20 pmol de DNA en una mezcla de 10 mM Tris-HCl (pH 7.5), 10 mM MgCl₂ y se incubó a 37°C durante 30 min. A continuación se inactivó la CIAP ajustando la mezcla a una concentración 15 mM EDTA y se incubó durante 10 min a 68°C y se procedió a la extracción de la enzima con fenol-cloroformo. Finalmente el DNA se

ajustó a una concentración 0.3 M NaOAc (pH 5.5) y se precipitó con etanol, tras lo cual se resuspendió en TE a una concentración final de 1 µg/µl.

El vector utilizado para la construcción de la genoteca fue el *SuperCos 1 Cosmid Vector* de 7.9 Kb (Stratagene, California, USA). Este vector fue elegido por su capacidad de aceptar fragmentos de gran tamaño, compatibles con el tamaño del sistema de secreción tipo III (20-40 Kb). Este vector, se digirió con los enzimas *XbaI* y *BamHI* y se desfosforiló, tal y como se ha detallado anteriormente, para evitar su recircularización.

La ligación de los fragmentos de DNA de *Aeromonas* (cepa 283c) cortados con *MboI* al vector *SuperCos 1* se llevó a cabo en las siguientes condiciones: 2.5 µg de DNA de *Aeromonas* cortados con *MboI*, 1 µg del vector *SuperCos1*, 30 mM Tris-HCl (pH 7.8), 10 mM MgCl₂, 10 mM DTT, 1 mM ATP y 1-2 *Weiss U* de T4 DNA ligasa (Fermentas; Barcelona, España). La reacción se incubó a 8°C durante 48 h. El DNA de *Aeromonas* unido al cósmido se empaquetó en cápsides aisladas de bacteriófagos *Gigapack III XL-4* (Stratagene), siguiendo las instrucciones del fabricante. Paralelamente se hicieron competentes las células de *E. coli XL1-Blue MR* para su posterior infección con los bacteriófagos, incubándolas en medio LB suplementado con 10 mM MgSO₄ y 0.2% (p/v) de maltosa a 30°C en agitación (200 rpm) durante toda la noche. Las células fueron centrifugadas a 3000 rpm durante 10 min y se resuspendieron con 10 mM MgSO₄ hasta obtener una lectura de densidad óptica de 0.5 a 600 nm para conseguir una concentración de 4 x 10⁸ células competentes por cada 10¹⁰ fagos.

Con los fagos se infectaron la células competentes de *E. coli XL1-Blue MR*. El éxito de la genoteca se evaluó determinando el número de colonias (ufc/ml) de *E. coli XL1 Blue MR* en medio Luria Bertani Agar (LB) (Difco) suplementado con 50 mg/l de ampicilina (Sigma-Aldrich Ltd). Suponiendo que *Aeromonas* tiene un genoma total de 4.5 Mb, el número de colonias de *E. coli* que deberíamos obtener después de infectar con el fago sería de un mínimo 100, ya que éstos cósmidos pueden aceptar entre 30 y 40 Kb.

3.10.4. Cribado de la genoteca

Aproximadamente 2500 ufc de la genoteca resultante se sembraron con un asa de Digrafski en membranas de nylon (Roche Diagnostics) que se colocaron en placas de Petri de 15 cm de diámetro que contenían LB-ampicilina (50µg/ml) y se incubaron

durante 24 h a 37°C. Transcurrido este tiempo se tomó una réplica con una segunda membrana de nylon. Ambas membranas de nylon (original y réplica) fueron incubadas durante 4 h a 37°C en placas de LB-ampicilina (50µg/ml). Posteriormente la membrana de nylon original fue conservada a 4°C y la membrana de nylon réplica fue sometida al siguiente procedimiento: se colocó encima de un papel filtro empapado con 10% SDS durante 5 min, a continuación se desnaturalizó el DNA colocando la membrana de nylon sobre un papel filtro empapado con 0.5M NaOH durante 5 min y se neutralizó sobre papeles filtro empapados con 1M Tris-HCl (pH7.6) durante 5 min y 5 min más en 1M Tris-HCl (pH 7.6) y 1.5M NaCl. Finalizados estos procesos, la membrana de nylon fue sumergida en una solución de 1M Tris-HCl (pH 7.6) y 1.5M NaCl. Finalmente el DNA fue fijado a la membrana de nylon con luz ultravioleta durante 3 min. Las membranas de nylon se lavaron con agua bidestilada, se secaron y se guardaron hasta su utilización.

Los productos de PCR resultantes de la amplificación de los genes *sctV* (700 pb) y *sctJ-L* (1500 pb) con DNA de *Aeromonas* fueron marcados con digoxigenina por PCR tal y como se detalla en el apartado 3.9.2. La pre-hibridación e hibridación con la sonda se realizó a 50°C. La detección inmunológica se realizó tal y como se detalla en el apartado 3.5.1. Los clones que dieron señal positiva en el cribado fueron recuperados de la placa original y sembrados en placas de LB-ampicilina (50µg/ml) que se incubaron 24h a 37°C. Posteriormente estos clones se conservaron individualmente a -80°C en medio LB-ampicilina (50µg/ml) con un 15% de glicerol hasta su posterior análisis.

3.10.5. Extracción de los cósmidos

Para la extracción del DNA de los cósmidos positivos se inoculó una colonia positiva en un tubo de ensayo que contenía 5 ml de LB-ampicilina (50 µg/ml) y se incubó a 37°C en agitación (200 rpm) durante toda la noche. A continuación 50 µl del procedentes del cultivo obtenido se inocularon en 25 ml de LB-ampicilina (50 µg/ml) y volvieron a ser incubados en las mismas condiciones que el cultivo original. Posteriormente el tubo fue cetrifugado durante 15 min a 2500 rpm a 4°C y se desechó el sobrenadante. Las células bacterianas se resuspendieron en 1 ml de solución GTE (50 mM glucosa; 10 mM EDTA, pH 8.0; 25 mM Tris-HCl, pH 8.0) y se incubaron durante 5 min a temperatura ambiente. Seguidamente se añadieron 2 ml de solución de lisis recién preparada (0.2 N NaOH; 1% SDS) y se mezcló invirtiendo el tubo varias

veces. La mezcla se incubó en hielo durante 5 min. El DNA cromosómico y las proteínas fueron precipitadas añadiendo 1.5 ml de una solución 5M acetato potásico y 1.5% ácido acético glacial, quedando a una concentración de 3 M potasio 5 M acetato (pH 4.8) e incubando la mezcla en hielo durante 5 min. Se centrifugó la mezcla durante 5 min a 3000 rpm a 4°C y se recuperó el sobrenadante que se transfirió a otro tubo al que se le añadió una solución fenol-cloroformo (v/v) y se centrifugó 10 min a 3000 rpm a temperatura ambiente, recuperándose la fase acuosa. Finalmente el cósmido fue precipitado añadiendo 0.6 v de isopropanol a 4°C a la fase acuosa e incubando la reacción a temperatura ambiente durante 15 min tras lo cual se centrifugó 10 min a 3000 rpm y se desechó el sobrenadante. El DNA precipitado se lavó dos veces con 2.5 ml de etanol al 70% a 4°C centrifugando durante 15 min a 3000 rpm a temperatura ambiente. Finalmente el DNA se secó a temperatura ambiente y se resuspendió en 100 µl de TE (1M Tris, 0.5 mM EDTA; pH 8.0) con 0.02 mg/ml de RNase A, incubándose durante 30 min a 37°C.

3.10.6. Caracterización de los cósmidos

Para la liberación del inserto de los cósmidos positivos, se procedió a la digestión del cósmido con las enzimas *EcoRI* y *HindIII*. El producto de la digestión fue separado en un gel de agarosa al 1% junto al marcador de peso molecular 1 Kb DNA ladder (Takara, Barcelona) y se transfirió por capilaridad mediante la técnica de *Southern Blot* (Southern, 1992) a membranas de nylon. La hibridación con la sonda (*sctV* y *sctJ-L*) marcada con digoxigeneina se realizó a 50°C y posteriormente se procedió a la detección inmunológica tal y como se ha especificado anteriormente.

Los clones que dieron una señal positiva en el *Southern Blot* se volvieron a digerir con las enzimas mencionadas y se corrieron en un gel al 1% de agarosa. Las bandas que hibridaron con las sondas *sctV* (una banda de 12 Kb) o *sctJ-L* (una banda de 14 Kb) fueron recuperadas con el *QIAquick Gel Extraction Kit* (Qiagen; Crawley, Reino Unido) siguiendo las instrucciones del fabricante para su posterior subclonación y caracterización por secuenciación.

Subclonación en pBR322

Los fragmentos aislados fueron subclonados en el plásmido pBR322. Para ello, 3 µg de pBR322 fueron digeridos con 15 U de *BamHI*, 20 mM Tris-HCl (pH 8.5), 10 mM MgCl₂, 1 mM DTT y 100 mM KCl incubándose a 37°C durante toda la noche.

Posteriormente los extremos fueron rellenados (*blunt-ends*) según el siguiente protocolo: se añadieron 3 µg de pBR322 digerido con *Bam*HI en una mezcla de 0.1 mM dNTPs, 67 mM Tris-HCl (pH 8.8), 6.6 mM MgCl₂, 1 mM DTT, 16.8 mM (NH₄)₂SO₄ y 5 U de T4 DNA polimerasa (Fermentas). La mezcla se incubó 15 min a temperatura ambiente y la reacción se detuvo sometiendo la mezcla a 70°C durante 10 min. A continuación se eliminó la T4 DNA polimerasa mediante una extracción con fenol-cloroformo (Sambrook y cols., 1989) y el DNA fue desfosforilado con CIAP (Fermentas) añadiendo 3 µg de pBR322 linearizado en una mezcla de 10 mM Tris-HCl (pH 7.5), 10 mM MgCl₂ y 1 U CIAP. La reacción se llevó a cabo a 37°C durante 15 min y a continuación se añadió 1 U más de CIAP y se incubó a 55°C durante 45 min. Finalmente la reacción se inactivó a 85°C durante 15 min y se procedió otra vez a la extracción de la enzima con fenol-cloroformo, tras lo cual el pBR322 linearizado fue resuspendido a una concentración final de 60 ng/µl.

En paralelo, las bandas de 12 Kb y 14 Kb ya purificadas (tal como se ha especificado en el apartado anterior) también fueron sometidas al rellenado de sus extremos (*blunt-ends*), tal como ya se ha mencionado.

Los fragmentos de nuestro inserto fueron ligados con el plásmido pBR322 según las proporciones vector:inserto de 1:1, 1:3 y 3:1, y en cada reacción de ligación se añadió la cantidad de vector e inserto, según la proporción molar obtenida por la fórmula que se especifica a continuación, a una mezcla que contenía 30 mM Tris-HCl (pH 7.8), 10 mM MgCl₂, 10 mM DTT, 1 mM ATP y 1-2 Weiss U de T4 DNA ligasa, y que se incubó a 4°C durante toda la noche.

$$\frac{\text{ng de vector} \times \text{tamaño del inserto en Kb}}{\text{tamaño del vector en Kb}} \times \text{ratio molar de} \frac{\text{inserto}}{\text{vector}} = \text{ng de inserto}$$

Paralelamente a la ligación las células de *E. coli XL1-Blue MR* fueron incubadas a 37°C en agitación (200 rpm) durante 4 h en medio LB hasta que se obtuvo una lectura de densidad óptica de 0.5 a 600 nm. Para hacer competentes estas células, se centrifugaron a 3000 rpm durante 10 min a 4°C y se resuspendieron en 1/2 vol de 0.1 M CaCl₂ frío, a continuación se incubaron en hielo durante 30 min, y se volvieron a centrifugar. Finalmente se resuspendieron en 1/10 vol de 0.1 M CaCl₂ frío, haciéndose alicuotas de 100 µl que se conservaron a -80°C con un 15% de glicerol para su posterior utilización.

La transformación de las células con el pBR322 se realizó mezclando el producto de la ligación con 100 µl de células competentes, ésta mezcla se incubó 30 min en hielo y posteriormente se sometió a un choque térmico de 42°C durante 90 seg y a continuación se colocó en hielo 5 min, y se añadieron 400 µl de LB. Finalmente la mezcla se incubó durante 1 h a 37°C y se sembró en placas de LB-ampicilina (50 µg/ml) que fueron incubadas a 37°C durante toda la noche. Transcurrido este tiempo los clones obtenidos se resembraron en paralelo en placas de LB-ampicilina (50 µg/ml) y LB-tetraciclina (5 µg/ml) considerándose positivos aquellos clones capaces de crecer sólo en LB-ampicilina (50 µg/ml) después de una incubación a 37°C durante 24 h.

Extracción del DNA del pBR322

Para la extracción del pBR322 de las células se utilizó la metodología de la *mini-prep*, que consistió en hacer crecer una colonia en tubos que contenían 5 ml de LB-ampicilina a 37°C en fuerte agitación durante un máximo de 12 h. A continuación todo el volumen fue centrifugado durante 2 min a 12000 rpm y se retiró el sobrenadante. El precipitado se resuspendió en 200 µl de una solución 50 mM glucosa, 10 mM EDTA (pH 8.0), 25 mM Tris-HCl (pH 8.0). A continuación se añadieron 400 µl de una solución de 0.2 N NaOH, 1% SDS y se mezcló invirtiendo el tubo, tras lo cual se incubó 5 min en hielo. Pasado este tiempo se añadieron 300 µl de una solución de 5M acetato potásico y 1.5% ácido acético glacial, quedando a una concentración de 3 M potasio 5 M acetato (pH 4.8) y se centrifugó a 12000 rpm durante 5 min a 4°C. Se recuperó el sobrenadante y se hizo una extracción fenol-cloroformo tras lo cual el DNA del plásmido se precipitó con etanol. Finalmente el DNA del plásmido se resuspendió en 50 µl de TE (1M Tris, 0.5 mM EDTA; pH 8.0) para su posterior secuenciación.

Secuenciación de los plásmidos

Para la secuenciación del inserto subclonado en el pBR322 se utilizaron los cebadores pBR322BamHI-F (5' CAC TAT CGA CTA CGC GAT CA³) y pBR322BamHI-R (5' ATG CGT CCG GCG TAG A³). Aproximadamente 500 ng del DNA del plásmido se desnaturalizaron durante 10 min a 90°C y transcurrido este tiempo se añadieron a una mezcla que contenía 3.2 pmol del cebador (forward o reverse), 4 µl de ABI PRISM® BigDye™ Terminators vers. 2.0 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) y 1 µl de agua bidestilada. Las condiciones para cada ciclo de reacción programada

fueron: 25 ciclos de 96°C, 10 seg (desnaturalización); 55°C, 5 seg (hibridación); 60°C, 4 min (extensión).

3.10.7. Análisis e interpretación de las secuencias

Las secuencias obtenidas fueron comparadas con todas las depositadas en la base de datos GenBank tanto a nivel de DNA (blastn) como de proteína (tblastx). Una vez comprobado que nuestro inserto se correspondía a un gen homólogo a los ya descritos del TTSS de *Aeromonas*, se procedió al diseño de otro cebador capaz de leer a continuación de nuestra secuencia y así sucesivamente (*genomic "walking"*). Las diferentes secuencias fueron ensambladas con el programa informático AutoAssembler alias vers. 1.40 (Applied Biosystems) y las secuencias resultantes se fueron comparando sucesivamente con todas las depositadas en las bases de datos.

3.10.8. Distribución del TTSS en *Aeromonas* spp

Para determinar la distribución por *dot blot* de los genes que codifican para el TTSS (*ascF-G* y *ascV*) y del gen *aexT* que codifica para una toxina que es secretada por éste sistema en cepas de *Aeromonas* spp. de origen clínico se utilizaron las siguientes sondas:

1. Fragmento de 900 pb de los genes *ascF-G*, cuyo conocimiento en *Aeromonas* es fruto de los resultados obtenidos en el presente trabajo. Este fragmento fue amplificado utilizando los siguientes cebadores: *ascFG-For*: 5'ATG AGG TCA TCT GCT CGC GC^{3'}; *ascFG-Rev*: 5' GGA GCA CAA CCA TGG CTG AT^{3'}.
2. Fragmento de 710 pb del gen *ascV*, cuyo conocimiento es fruto de los resultados obtenidos en el presente trabajo, aunque en paralelo ha sido publicado por Burr y cols. (2002). Este fragmento fue amplificado utilizando los siguientes cebadores: *ascV-For*: 5'ATG GAC GGC GCC ATG AAG TT^{3'} y *ascV-Rev*: 5'TAT TCG CCT TCA CCC ATC CC^{3'}.
3. Fragmento de 552 pb del gen *aexT*, gen que codifica para la toxina AexT que es secretada vía TTSS (Braun y cols., 2002). Este fragmento fue amplificado utilizando los siguientes cebadores: *aexT-For*: 5'GGC GCT TGG GCT CTA CAC^{3'} y *aexT-Rev*: 5'GAG CCC GCG CAT CTT CAG^{3'}.

Los *dot blot* se realizaron en 84 cepas de las tres especies más predominantes en clínica (*A. veronii*, *A. caviae* y *A. hydrophila*), y la metodología del *dot blot* empleada fue la que se detalla en el apartado 3.9.2. En el anexo 14 se detallan las cepas empleadas para este estudio (4.5.1).

3.11. Anexos

Anexo 1. Listado de cepas tipo y de referencia

Especie	GH	Cepa utilizada	Referencia en otras colecciones	Origen	Identificación por 16S rDNA-RFLP
<i>A. hydrophila</i>	1	CECT 839 ^T	ATCC 7966 ^T , NCIMB 9240 ^T , DSMZ 30187 ^T , Popoff 543	Leche	<i>A. hydrophila</i>
<i>A. bestiarum</i>	2	CECT 4227 ^T	CIP 74.30 ^T , ATCC 51108 ^T , NCIMB 1134 ^T	Pez enfermo (<i>Salmo gairdneri</i>)	<i>A. bestiarum</i>
<i>A. bestiarum</i>		LMG 13662	A295	Heces humanas	<i>A. bestiarum</i> / <i>A. salmonicida</i>
<i>A. bestiarum</i>		LMG 13448	A169	Heces humanas	<i>A. salmonicida</i>
<i>A. hydrophila</i>	3	LMG 13451	CECT 5173, Popoff 316	Agua dulce	<i>A. salmonicida</i>
<i>A. salmonicida</i> subsp. <i>salmonicida</i>		CECT 894 ^T	ATCC 33658 ^T , NCIMB 1102 ^T	Pez (<i>Atlantic salmon</i>)	<i>A. salmonicida</i>
<i>A. salmonicida</i> subsp. <i>salmonicida</i>		CECT 4235	ATCC 14174, NCIMB 833, Véron 29	Pez enfermo (<i>Salvelinus fontinalis</i>)	<i>A. salmonicida</i>
<i>A. salmonicida</i> subsp. <i>salmonicida</i>		CECT 4236	JCM 8200, NCIMB 1104, cepa 2994/59	Pez	<i>A. salmonicida</i>
<i>A. salmonicida</i> subsp. <i>salmonicida</i>		CECT 4237	JCM 8199, NCIMB 1103, Smith 2	Pez (<i>Salmo trutta</i>)	<i>A. salmonicida</i>
<i>A. salmonicida</i> subsp. <i>achromogenes</i>		CECT 895	ATCC 33659, NCIMB 1110	Pez (<i>Salmo trutta</i>)	<i>A. bestiarum</i>
<i>A. salmonicida</i> subsp. <i>achromogenes</i>		CECT 4238	ATCC 19261, ATCC 23310, NCIMB 1109	Pez enfermo (<i>Salmo trutta</i>)	<i>A. bestiarum</i>
<i>A. salmonicida</i> subsp. <i>achromogenes</i>		CECT 4239	NCIMB 2112; cepa A654/76	Pez (<i>Phoxinus phoxinus</i>)	<i>A. bestiarum</i>
<i>A. salmonicida</i> subsp. <i>masoucida</i>		CECT 896	ATCC 27103, NCIMB 2020	Pez enfermo (<i>Oncorhynchus masou</i>)	<i>A. bestiarum</i>
<i>A. salmonicida</i> subsp. <i>smitia</i>		NCIMB 13210	CECT 5179, ATCC 49393	Úlcera (<i>Rutilus rutilus</i>)	<i>A. bestiarum</i>
<i>A. salmonicida</i> subsp. <i>pectinoytica</i>		34 MEL ^T	DMS 12609 ^T	Agua de Río	<i>A. bestiarum</i> / <i>A. salmonicida</i>
<i>A. salmonicida</i> subsp. <i>pectinoytica</i>		85 MEL		Agua de Río	<i>A. bestiarum</i> / <i>A. salmonicida</i>
<i>A. salmonicida</i> subsp. <i>pectinoytica</i>		93 MEL		Agua de Río	<i>A. bestiarum</i> / <i>A. salmonicida</i>
<i>A. caviae</i>	4	CECT 838 ^T	ATCC 15468 ^T , DSMZ 30190 ^T , Popoff 545	Cobaya	<i>A. caviae</i>
<i>A. caviae</i>		CECT 4221	ATCC 15467, LMG 3755, Popoff 544	Emulsión de aceite	<i>A. caviae</i>
<i>A. media</i>	5	CECT 4232 ^T	ATCC 33907 ^T , NCIMB 2237 ^T	Agua piscifactoria	<i>A. media</i>
<i>A. media</i>		CECT 4234	ATCC 35950	Agua piscifactoria	<i>A. media</i>
<i>A. eucrenophila</i>	6	CECT 4224 ^T	ATCC 23309 ^T , NCIMB 74 ^T , Popoff 546	Ascitis en un pez	<i>A. eucrenophila</i>
<i>A. eucrenophila</i>		CECT 4827	CCUG 30341, LMG 13057, Popoff 546	Ascitis en un pez	<i>A. eucrenophila</i>
<i>A. eucrenophila</i>		CECT 4825	CCUG 30347, LMG 13691, CEPA 23/II	Agua de pozo	<i>A. encheleia</i>
<i>A. eucrenophila</i>		CECT 4826	CCUG 30345, LMG 13061, cepa BPE113	Agua de infiltración	<i>A. eucrenophila</i>

Anexo 1. Continuación

Especie	GH	Cepa utilizada	Referencia en otras colecciones	Origen	Identificación por 16S rDNA-RFLP
<i>A. eucrenophila</i>		CECT 4853	CCUG 30342, NCIMB 73, LMG 13058	Ascitis en un pez (<i>Cyprinus carpio</i>)	<i>A. eucrenophila</i>
<i>A. eucrenophila</i>		CECT 4854	CCUG 30343, LMG 13687, cepa K 2232/1	Agua de pozo	<i>A. eucrenophila</i>
<i>A. eucrenophila</i>		CECT 4855	CCUG 30344, LMG 13060, cepa 37/20b	Agua de pozo	<i>A. eucrenophila</i>
<i>A. sobria</i>	7	CECT 4245 ^T	ATCC 43979 ^T , NCIMB 12065 ^T , Popoff 208	Pez (<i>Cyprinus carpio</i>)	<i>A. sobria</i>
<i>A. sobria</i>		CECT 4248	Popoff 204	Pez	<i>A. sobria</i>
<i>A. sobria</i>		CECT 4249	JCM 2138, Popoff207	Pez	<i>A. sobria</i>
<i>A. sobria</i>		CECT 4251	CCM 2142, Popoff 215	Pez	<i>A. sobria</i>
<i>A. veronii</i> bt sobria	8	CECT 4246	ATCC 9071, NCIMB 37, Popoff 311	Rana infectada	<i>A. veronii</i>
<i>A. veronii</i> bt sobria		CECT 4250	JCM 2140, Popoff 209	Pez	<i>A. veronii</i>
<i>A. veronii</i> bt sobria		LMG 13074	CDC 337, CCUG 30363	Heces humanas	<i>A. sobria</i>
<i>A. veronii</i> bt sobria		LMG 13068	CCUG 30357	Heces humanas	<i>A. veronii</i>
<i>A. veronii</i> bt sobria		LMG 13694		Desconocido	<i>A. veronii</i>
<i>A. veronii</i> bt sobria		LMG 13695		Heces humanas	<i>A. sobria</i>
<i>A. veronii</i> bt sobria		LMG 13071	CCUG 30360	Heces humanas	<i>A. sobria</i>
<i>A. veronii</i> bt sobria		LMG 13073	CCUG 30362	Heces humanas	<i>A. sobria</i>
<i>A. jandaei</i>	9	CECT 4228 ^T	ATCC 49568 ^T , LMG 12221 ^T	Heces humanas	<i>A. jandaei</i>
<i>A. jandaei</i>		CECT 4229	ATCC 49570, LMG 13077, cepa WRII/4658	Herida humana	<i>A. jandaei</i>
<i>A. jandaei</i>		CECT 4231	ATCC 49572, LMG 13078, cepa AS-167	Gamba	<i>A. jandaei</i>
<i>A. jandaei</i>		CECT 4335	Esteve TW-9	Agua piscifactoria	<i>A. veronii</i>
<i>A. jandaei</i>		CECT 4339	Esteve SO-337	Higado de un pez sano	<i>A. veronii</i>
<i>A. veronii</i> bt veronii	10	CECT 4257 ^T	ATCC 35624 ^T , NCIMB 13015 ^T , LMG 9075 ^T	Espuito humano	<i>A. veronii</i>
<i>A. veronii</i> bt veronii		LMG 16334	ATCC 35625, CDC 1170-83	Herida humana	<i>A. veronii</i>
<i>A. veronii</i> bt veronii		CECT 4338	Esteve E-30	Anguila enferma (<i>European eel</i>)	<i>A. veronii</i>
<i>A. ichtiosmia</i>		CECT 4486 ^T	ATCC 49804 ^T , DSMZ 6393 ^T , LMG 12645 ^T	Agua superficial	<i>A. veronii</i>
<i>Aeromonas</i> sp	11	CECT 4253	ATCC 35941, CDC 1306-83, LMG 13075	Herida humana	<i>Aeromonas</i> sp HG11
<i>A. schubertii</i>	12	CECT 4240 ^T	ATCC 43700 ^T , CDC 2446-81 ^T , LMG 9074 ^T	Abceso cutáneo	<i>A. veronii</i>
<i>A. schubertii</i>		CECT 4243	ATCC 43945, CDC 2508-86	Herida humana	<i>A. veronii</i>
<i>A. schubertii</i>		CECT 4244	ATCC 43947, CDC 0463-83	Líquido pleural humano	<i>A. veronii</i>
<i>Aeromonas</i> sp (Enteric group 501)	13	CECT 5178	CDC 2555-87, ATCC700064	Herida humana	<i>Aeromonas</i> sp (Enteric group 501)
<i>Aeromonas</i> sp (Enteric group 501)		CECT 4254	ATCC 43946, CDC 2478-85	Herida humana	<i>Aeromonas</i> sp (Enteric group 501)
<i>A. trota</i>	14	CECT 4255 ^T	ATCC 49657 ^T , LMG 12223 ^T , cepa AH2	Heces humanas	<i>A. trota</i>
<i>A. enteropelogenes</i>		CECT 4487 ^T	ATCC 49803 ^T , LMG 12646 ^T , DSMZ 6394 ^T	Heces humanas	<i>A. trota</i>
<i>A. allosaccharophila</i>	15	CECT 4199 ^T	ATCC 51208 ^T , LMG 14059 ^T , Esteve 289 ^T	Anguila enferma (<i>Anguilla anguilla</i>)	<i>A. allosaccharophila</i>
<i>A. allosaccharophila</i>		CECT 4200	LMG 14058, Esteve 290	Anguila enferma (<i>Anguilla anguilla</i>)	<i>A. allosaccharophila</i>
<i>A. allosaccharophila</i>		CECT 4220	ATCC 35942, LMG 14021, CDC 0715-84	Heces humanas	<i>A. allosaccharophila</i>

Anexo 1. Continuación
Especie

GH	Cepa utilizada	Referencia en otras colecciones	Origen	Identificación por 16S rDNA-RFLP
16	CECT 4342 ^T	ATCC 51929 ^T , LMG 16330 ^T	Anguila sana (<i>Anguilla anguilla</i>)	<i>A. encheleia</i>
	CECT 4340	ATCC 51931, Esteve S177	Anguila sana (<i>Anguilla anguilla</i>)	<i>A. encheleia</i>
	CECT 4341	ATCC 51930, Esteve S176	Anguila sana (<i>Anguilla anguilla</i>)	<i>A. encheleia</i>
	CECT 4343	LMG 16331, Esteve S191	Anguila sana (<i>Anguilla anguilla</i>)	<i>A. encheleia</i>
	CECT 5025	LMG 16403	Agua de pozo	<i>A. encheleia</i>
	CECT 5026	LMG 16405	Agua de pozo	<i>A. sobria</i>
	CECT 5027	LMG 16406	Agua de pozo	<i>A. sobria</i>
	CECT 5028	LMG 17060	Agua de planta potabilizadora	<i>A. encheleia</i>
	CECT 5029	LMG 17064	Agua de embalse	<i>A. sobria</i>
17	LMG 17541 ^T	CECT 4995 ^T , ATCC BAA-243 ^T , CCM 4708 ^T , CIP 105493 ^T , NCIMB 13618 ^T	Agua de planta potabilizadora	<i>A. popoffii</i>
	LMG 17542		Agua de planta potabilizadora	<i>A. popoffii</i>
	LMG 17543		Agua de planta potabilizadora	<i>A. popoffii</i>
	LMG 17544		Agua de planta potabilizadora	<i>A. popoffii</i>
	LMG 17545		Agua de planta potabilizadora	<i>A. popoffii</i>
	LMG 17546		Agua de planta potabilizadora	<i>A. popoffii</i>
	LMG 17547		Agua de planta potabilizadora	<i>A. popoffii</i>

Anexo 2. Cepas de otros géneros bacterianos

Especie	Cepa utilizada	Referencia en otras colecciones	Origen
<i>Salmonella typhimurium</i>	CECT 443	ATCC 13311, CCUG 11732, CIP 58.58, DSMZ 5569, JCM 1652, LMG 10396	Brote alimentario
<i>Serratia marcescens</i>	CECT 846	ATCC 13880, CCUG 1647, CDC 318-60, CIP 103235, DSMZ 30121, JCM 1239, LMG 2792, NCIMB 9155	Agua de estanque
<i>Citrobacter freundii</i>	CECT 401 ^T	ATCC 8090 ^T , CCUG 418 ^T , CIP 57.32 ^T , DSMZ 30039 ^T ; LMG 3246 ^T , NCIMB 11490 ^T	Desconocido
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	CECT 143 ^T	ATCC 13883 ^T , CCUG 225 ^T ; CDC 298-53 ^T ; CIP 82.91 ^T , DSMZ 30104 ^T , JCM 1662 ^T , LMG 2095 ^T , NCIMB 13281 ^T	Desconocido
<i>Shigella sonnei</i>	CECT 4631	ATCC 25931, CCUG 32351, CDC 1120-66, CIP 104223, LMG 10473	Heces humanas
<i>S. sonnei</i>	CECT 413		Heces humanas
<i>S. sonnei</i>	CECT 457	ATCC 11060	Heces humanas
<i>S. flexneri</i>	CECT 585	CCUG 9566	Disenteria
<i>Escherichia coli</i> O:157 H7	CECT 4076	CCUG 20570	Colitis hemorrágica humana
<i>E. coli</i> O:25 H42	CECT 685		Desconocido
<i>E. coli</i> O:128 K67	CECT 742	CCUG 11427	Desconocido
<i>E. coli</i> O:158 K:H34	CECT 744		Heces humanas
<i>Yersinia enterocolitica</i>	CECT 754	CIP 81.42, DSMZ 9499	Heces humanas
<i>Y. enterocolitica</i>	CECT 4315 ^T	ATCC 9610 ^T , CIP 80.27 ^T , DSMZ 4780 ^T , JCM 7577 ^T	Herida en la cara
<i>Enterobacter aerogenes</i>	CECT 684 ^T	ATCC 13048 ^T , CCUG 1429 ^T , CDC 819-56 ^T , CIP 60.86 ^T , DSMZ 30053 ^T , JCM 1235 ^T , LMG 2968 ^T , NCIMB 10102 ^T	Espuito
<i>Edwardsiella tarda</i>	CECT 886	ATCC 15977, NCIMB 2034	Pez
<i>Vibrio cholerae</i> NO:O1	CECT 557		Agua de río
<i>V. cholerae</i> NO:O1	CECT 653		Agua de Bangladesh
<i>V. parahaemolyticus</i>	CECT 511 ^T	ATCC 17802 ^T , CCUG 15657 ^T , CDC 9062-79 ^T , CIP 75.2 ^T , DSMZ 10027 ^T , LMG 2850 ^T ; NCIMB 1902 ^T	Brote alimentario
<i>V. parahaemolyticus</i>	CECT 588	CCUG 4991	Mejillones
<i>V. parahaemolyticus</i>	CECT 611		Agua de mar
<i>V. parahaemolyticus</i>	CECT 612	CCUG 38426	Agua de mar
<i>V. parahaemolyticus</i>	CECT 613		Pláncton marino
<i>V. vulnificus</i>	CECT 529 ^T	ATCC 27562 ^T , CCUG 16394 ^T , CDC 9107-79 ^T , CIP 75.4 ^T , DSMZ 10143 ^T , JCM 3725 ^T , LMG 7898 ^T , NCIMB 2046 ^T	Sangre humana
<i>V. vulnificus</i>	CECT 4602		Anguila enferma (<i>Anguilla anguilla</i>)
<i>V. vulnificus</i>	CECT 4606	CCUG 38431	Anguila sana (<i>Anguilla anguilla</i>)
<i>V. vulnificus</i>	CECT 4608		Agua de piscifactoría
<i>V. vulnificus</i>	CECT 897	ATCC 33147, ATCC 33147, CCRC 13846, CCUG 38429, CIP 103196, NCIMB 2136	Anguila enferma (<i>Anguilla anguilla</i>)
<i>V. fluvialis</i>	ATCC 33810 ^T		Heces humanas
<i>V. fluvialis</i>	ATCC 33812		Heces humanas
<i>V. fluvialis</i>	ATCC 33811		Desconocido
<i>V. furnissii</i>	CECT 4203 ^T	ATCC 35016 ^T , CDC B3215 ^T ; CIP 102972 ^T ; LMG 7910 ^T	Heces humanas
<i>V. furnissii</i>	ATCC 33841		Heces de cerdo
<i>V. furnissii</i>	ATCC 33813		Agua de río
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	CECT 118	ATCC 25668, CCUG 1423, CIP 103837, DSMZ 46358, NCIMB 13063	Exsudado humano

Anexo 2. Continuación

Especie	Cepa utilizada	Referencia en otras colecciones	Origen
<i>P. aeruginosa</i>	CECT 4122	ATCC 15692, CIP 104116, NCIMB 10548	Herida humana
<i>P. aeruginosa</i>	CECT 110	ATCC 10145, CCUG 551; CIP 100720, DSMZ 50071, JCM 5962, LMG 1242, NCIMB 8295	Exudado humano
<i>Plesiomonas shigelloides</i>	CECT 4262 ^T	ATCC 14029 ^T , CCUG 410 ^T , CDC 3085-55 ^T , CIP 63.5 ^T , DSMZ 8224 ^T , LMG 4242 ^T , NCIMB 9242 ^T	Heces de perro
<i>Pl. shigelloides</i>	CECT 4352		Anguila sana (<i>Anguilla anguilla</i>)
<i>Pl. shigelloides</i>	CECT 597		Heces humanas
<i>Clostridium perfringens</i>	CECT 376 ^T	ATCC 13124 ^T , CCM 5744 ^T , CCRC 10913 ^T , CCUG 1795 ^T , CIP 103409 ^T , DSMZ 756 ^T , JCM 1290 ^T , LMG 11264 ^T , NCIMB 6125 ^T	Bovino
<i>C. perfringens</i>	CECT 563	ATCC 14809	Rissoles
<i>C. perfringens</i>	CECT 486	ATCC 12917, CCUG 18370	Ternera hervida
<i>C. septicum</i>	CECT 965 ^T	ATCC 12464 ^T , CCUG 4855 ^T , CIP 61.10 ^T , DSMZ 7534 ^T , JCM 8144 ^T , NCIMB 547 ^T	Desconocido
<i>Streptococcus pyogenes</i>	CECT 985 ^T	ATCC 12344 ^T , CCUG 4207 ^T , CCUG 12701 ^T , CIP 56.4 ^T , DSMZ 20565 ^T , JCM 5674 ^T , NCIMB 11841 ^T	Piel de un paciente con escarlatina
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 12600		Líquido pleural
<i>Listeria monocytogenes</i>	CECT 935	ATCC 13932, CIP 59.53	Líquido espinal

Anexo 3. Cepas clínicas de *Aeromonas* spp utilizadas en el ensayo del método de BBL^R *Crystal*, MicroScan y ensayo de antibióticos (Estudios 4.1.1.2 y 4.2.1)

Cepa	Origen	Hospital de origen (ciudad)	Identificación por 16S rDNA-RFLP
63C*	heces	Valle Hebrón (Barcelona)	<i>A. hydrophila</i>
103C*	heces	Valle Hebrón (Barcelona)	<i>A. hydrophila</i>
127C*	heces	Valle Hebrón (Barcelona)	<i>A. hydrophila</i>
184C*	heces	Valle Hebrón (Barcelona)	<i>A. hydrophila</i>
191C*	líquido articular	Sant Pau (Barcelona)	<i>A. hydrophila</i>
194C*	líquido articular	Sant Pau (Barcelona)	<i>A. hydrophila</i>
217C*	heces	La Concha (Madrid)	<i>A. hydrophila</i>
218C*	heces	La Concha (Madrid)	<i>A. hydrophila</i>
221C*	exudado herida	La Concha (Madrid)	<i>A. hydrophila</i>
250C*	heces	Sant Joan (Reus)	<i>A. hydrophila</i>
220C	exudado herida	La Concha (Madrid)	<i>A. salmonicida</i>
19C*	sangre	Son Dureta (Palma de Mallorca)	<i>A. caviae</i>
22C*	sangre	Son Dureta (Palma de Mallorca)	<i>A. caviae</i>
25C*	abceso	Son Dureta (Palma de Mallorca)	<i>A. caviae</i>
102C*	heces	Valle Hebrón (Barcelona)	<i>A. caviae</i>
104C*	heces	Valle Hebrón (Barcelona)	<i>A. caviae</i>
131C*	heces	Valle Hebrón (Barcelona)	<i>A. caviae</i>
132C*	heces	Valle Hebrón (Barcelona)	<i>A. caviae</i>
140C*	heces	Valle Hebrón (Barcelona)	<i>A. caviae</i>
145C*	heces	Valle Hebrón (Barcelona)	<i>A. caviae</i>
148C*	heces	Valle Hebrón (Barcelona)	<i>A. caviae</i>
160C*	heces	Valle Hebrón (Barcelona)	<i>A. caviae</i>
162C*	heces	Valle Hebrón (Barcelona)	<i>A. caviae</i>
219C*	celulitis	La Concha (Madrid)	<i>A. caviae</i>
224C*	sangre	La Concha (Madrid)	<i>A. caviae</i>
262C*	heces	Valle Hebrón (Barcelona)	<i>A. caviae</i>
270C*	heces	Valle Hebrón (Barcelona)	<i>A. caviae</i>
274C*	heces	Valle Hebrón (Barcelona)	<i>A. caviae</i>
277C*	heces	Valle Hebrón (Barcelona)	<i>A. caviae</i>
286C*	heces	Valle Hebrón (Barcelona)	<i>A. caviae</i>
89C	heces	Valle Hebrón (Barcelona)	<i>A. media</i>
98C	heces	Valle Hebrón (Barcelona)	<i>A. media</i>
211C	heces	Clínic (Barcelona)	<i>A. media</i>
258C	heces	Valle Hebrón (Barcelona)	<i>A. media</i>
20C*	ulcera	Son Dureta (Palma de Mallorca)	<i>A. veronii</i>
112C*	heces	Valle Hebrón (Barcelona)	<i>A. veronii</i>
114C*	heces	Valle Hebrón (Barcelona)	<i>A. veronii</i>
115C*	heces	Valle Hebrón (Barcelona)	<i>A. veronii</i>
125C*	heces	Valle Hebrón (Barcelona)	<i>A. veronii</i>
146C*	heces	Valle Hebrón (Barcelona)	<i>A. veronii</i>
171C*	heces	Valle Hebrón (Barcelona)	<i>A. veronii</i>
176C*	heces	Valle Hebrón (Barcelona)	<i>A. veronii</i>
264C*	heces	Valle Hebrón (Barcelona)	<i>A. veronii</i>
271C*	heces	Valle Hebrón (Barcelona)	<i>A. veronii</i>
278C*	heces	Sant Joan (Reus)	<i>A. veronii</i>
281C*	heces	Sant Joan (Reus)	<i>A. veronii</i>
283C*	heces	Sant Joan (Reus)	<i>A. veronii</i>
285C*	sangre	Sant Joan (Reus)	<i>A. veronii</i>
141C	heces	Valle Hebrón (Barcelona)	<i>A. jandaei</i>
225C	sangre	La Concha (Madrid)	<i>A. jandaei</i>

*cepas utilizadas en el estudio de antibióticos (4.2.1)

Anexo 4. Cepas pertenecientes al complejo fenotípico “*A. hydrophila*” (estudio 4.1.2.1).

Cepa	Origen	País	Identificación por 16S rDNA-RFLP
413*	Agua de la desembocadura de La Muga	España	<i>A. hydrophila</i>
614*	Agua del río Ter	España	<i>A. hydrophila</i>
112p	Agua potable. Cisterna 499	España	<i>A. hydrophila</i>
139p*	Agua potable. Pozo 719	España	<i>A. hydrophila</i>
142p	Agua de la red de distribución 812	España	<i>A. hydrophila</i>
145f	Mejillón 1633	España	<i>A. hydrophila</i>
146f	Mejillón 1633	España	<i>A. hydrophila</i>
63c	Heces	España	<i>A. hydrophila</i>
103c	Heces	España	<i>A. hydrophila</i>
127c*	Heces	España	<i>A. hydrophila</i>
184c	Heces	España	<i>A. hydrophila</i>
191c*	Líquido articular	España	<i>A. hydrophila</i>
194c*	Líquido articular	España	<i>A. hydrophila</i>
250c*	Heces	España	<i>A. hydrophila</i>
251c*	Heces	España	<i>A. hydrophila</i>
292c*	Heces	España	<i>A. hydrophila</i>
293c*	Heces	España	<i>A. hydrophila</i>
303c*	Heces	España	<i>A. hydrophila</i>
81f*	Mejillón	España	<i>A. bestiarum</i>
108f	Mejillón 1298	España	<i>A. bestiarum</i>
A936 ^{b*}	Desconocido	Suiza	<i>A. bestiarum</i>
A937 ^{b*}	Desconocido	Suiza	<i>A. bestiarum</i>
F530B ^{a*}	Alrededor del hogar	Suiza	<i>A. bestiarum</i>
F713L ^{a*}	Alrededor del hogar	Suiza	<i>A. bestiarum</i>
P1W-98 ^{c*}	Ulcera en un pez	Polonia	<i>A. bestiarum</i>
21*	Agua del Torrente de Merles	España	<i>A. salmonicida</i>
27*	Agua de la playa de Gavà	España	<i>A. salmonicida</i>
68*	Agua del lago de Bañolas	España	<i>A. salmonicida</i>
105*	Agua de la playa de Torredembarra	España	<i>A. salmonicida</i>
130*	Agua de la playa de La Platjola	España	<i>A. salmonicida</i>
122*	Agua del Canal Olímpico	España	<i>A. salmonicida</i>
156*	Agua del embalse de Sant Antoni	España	<i>A. salmonicida</i>
161*	Agua del embalse de Camarasa	España	<i>A. salmonicida</i>
440*	Agua del lago de Bañolas	España	<i>A. salmonicida</i>
552*	Agua del río Llobregat	España	<i>A. salmonicida</i>
93f	Pastel 1066	España	<i>A. salmonicida</i>
102f*	Pastel 1066	España	<i>A. salmonicida</i>
106f*	Pastel 1289	España	<i>A. salmonicida</i>
115f	Mejillón 1299	España	<i>A. salmonicida</i>
150p	Agua de la mina 1602	España	<i>A. salmonicida</i>
LMG 17548	Agua de planta potabilizadora	España	<i>A. salmonicida</i>
896T	Agua de cisterna, Tomadero.	España	<i>A. salmonicida</i>
220c*	Exudado de herida	España	<i>A. salmonicida</i>
22**	Agua del torrente de Merles	España	<i>A. bestiarum</i> / <i>A. salmonicida</i>
26*	Agua de la playa de Gavà	España	<i>A. bestiarum</i> / <i>A. salmonicida</i>
37**	Agua de la playa de Grau de Cadaqués	España	<i>A. bestiarum</i> / <i>A. salmonicida</i>
40*	Agua del río Noguera Pallaresa	España	<i>A. bestiarum</i> / <i>A. salmonicida</i>
41*	Agua del río Noguera Pallaresa	España	<i>A. bestiarum</i> / <i>A. salmonicida</i>
48*	Agua del embalse de Camarasa	España	<i>A. bestiarum</i> / <i>A. salmonicida</i>
58*	Agua del embalse de Sant Antoni	España	<i>A. bestiarum</i> / <i>A. salmonicida</i>
465*	Agua de la playa del Masnou	España	<i>A. bestiarum</i> / <i>A. salmonicida</i>
113p*	Agua potable. Cisterna 499	España	<i>A. bestiarum</i> / <i>A. salmonicida</i>
116p**	Agua potable. Pozo 501	España	<i>A. bestiarum</i> / <i>A. salmonicida</i>
117p**	Agua potable. Pozo 501	España	<i>A. bestiarum</i> / <i>A. salmonicida</i>
118p**	Agua potable. Pozo 501	España	<i>A. bestiarum</i> / <i>A. salmonicida</i>
119p*	Agua potable. Pozo 542	España	<i>A. bestiarum</i> / <i>A. salmonicida</i>
120p*	Agua potable. Pozo 542	España	<i>A. bestiarum</i> / <i>A. salmonicida</i>
123p	Agua potable. Fuente 648	España	<i>A. bestiarum</i> / <i>A. salmonicida</i>
140p	Agua de la red de distribución 812	España	<i>A. bestiarum</i> / <i>A. salmonicida</i>
101f*	Pastel 1066	España	<i>A. bestiarum</i> / <i>A. salmonicida</i>
107f*	Mejillón 1298	España	<i>A. bestiarum</i> / <i>A. salmonicida</i>
117f**	Mejillón 1299	España	<i>A. bestiarum</i> / <i>A. salmonicida</i>

Anexo 4. Continuación

Cepa	Origen	País	Identificación por 16S rDNA-RFLP
130f*	Mejillón 1399	España	<i>A. bestiarum</i> / <i>A. salmonicida</i>
1419T	Huevos	España	<i>A. bestiarum</i> / <i>A. salmonicida</i>
852T*	Ensalada	España	<i>A. bestiarum</i> / <i>A. salmonicida</i>
J4N-98**	Riñón de pez enfermo	Polonia	<i>A. bestiarum</i> / <i>A. salmonicida</i>
A7*	Ambiente	Alemania	<i>A. bestiarum</i> / <i>A. salmonicida</i>
361c*	Abceso	España	<i>A. bestiarum</i> / <i>A. salmonicida</i>
A99*	Heces	Suiza	<i>A. bestiarum</i> / <i>A. salmonicida</i>
32	Agua de la playa de La Gola. St. Pere Pescador	España	<i>A. popoffii</i>
137	Agua de embalse	España	<i>A. popoffii</i>
159*	Agua del río Segre	España	<i>A. popoffii</i>
203	Agua de la playa del Masnou	España	<i>A. popoffii</i>
210	Agua de la desembocadura del Llobregat	España	<i>A. popoffii</i>
254*	Agua del río Noguera Pallaresa	España	<i>A. popoffii</i>
274*	Agua del río Noguera Pallaresa	España	<i>A. popoffii</i>
366*	Agua del torrente de Merles	España	<i>A. popoffii</i>
370*	Agua del embalse de Baells	España	<i>A. popoffii</i>
594*	Agua del torrente de Merles	España	<i>A. popoffii</i>
638*	Agua del río Fluvià	España	<i>A. popoffii</i>
LMG 17542*	Agua de planta potabilizadora, DeBlankaart	Bélgica	<i>A. popoffii</i>
LMG 17543*	Agua de planta potabilizadora (Snellegem)	Bélgica	<i>A. popoffii</i>
LMG 17544	Agua de planta potabilizadora (Eeklo)	Bélgica	<i>A. popoffii</i>
LMG 17545*	Agua de planta potabilizadora (Snellegem)	Bélgica	<i>A. popoffii</i>
LMG 17546*	Agua de planta de agua potable (Undy Station)	Escocia	<i>A. popoffii</i>
LMG 17547*	Agua de planta potabilizadora (Turiff)	Escocia	<i>A. popoffii</i>
F548B ^{a*}	Agua potable (Vinagello)	Suiza	<i>A. popoffii</i>
F533E ^a	Agua potable (Pregassona)	Suiza	<i>A. popoffii</i>
F548C ^a	Agua potable (Vinagello)	Suiza	<i>A. popoffii</i>
F600B ^a	Agua potable (Vinagello)	Suiza	<i>A. popoffii</i>
F600C ^a	Agua potable (Vinagello)	Suiza	<i>A. popoffii</i>
F539A ^a	Agua potable (Vinagello)	Suiza	<i>A. popoffii</i>
F479E ^{a*}	Agua de fuente (Vezió)	Suiza	<i>A. popoffii</i>
F498B ^{a*}	Agua de grifo (Cadro)	Suiza	<i>A. popoffii</i>

Cepas tipo y de referencia:

Cepa	Identificación original	Origen	Identificación por 16S rDNA-RFLP
CECT 839 ^T =	<i>A. hydrophila</i> (HG1)	Leche	<i>A. hydrophila</i>
Popoff543*			
CECT 4227 ^T =	<i>A. bestiarum</i> (HG2)	Pez	<i>A. bestiarum</i>
Popoff218**			
LMG 13448*	<i>A. bestiarum</i> (HG2)	Heces	<i>A. salmonicida</i>
LMG 13662**	<i>A. bestiarum</i> (HG2)	Heces	<i>A. bestiarum</i> / <i>A. salmonicida</i>
LMG 13451 =	" <i>A. hydrophila</i> " (HG3)	Heces	<i>A. salmonicida</i>
Popoff316*			
CECT 894 ^{T**}	<i>A. salmonicida</i> subsp. <i>salmonicida</i> (HG3)	Pez	<i>A. salmonicida</i>
CECT 4235	<i>A. salmonicida</i> subsp. <i>salmonicida</i> (HG3)	Pez enfermo	<i>A. salmonicida</i>
CECT 4236	<i>A. salmonicida</i> subsp. <i>salmonicida</i> (HG3)	Pez	<i>A. salmonicida</i>
CECT 4237*	<i>A. salmonicida</i> subsp. <i>salmonicida</i> (HG3)	Pez	<i>A. salmonicida</i>
CECT 895*	<i>A. salmonicida</i> subsp. <i>achromogenes</i> (HG3)	Pez	<i>A. bestiarum</i>
CECT 4238*	<i>A. salmonicida</i> subsp. <i>achromogenes</i> (HG3)	Pez	<i>A. bestiarum</i>
CECT 4239	<i>A. salmonicida</i> subsp. <i>achromogenes</i> (HG3)	Pez	<i>A. bestiarum</i>
CECT 896*	<i>A. salmonicida</i> subsp. <i>masoucida</i> (HG3)	Pez enfermo	<i>A. bestiarum</i>

Anexo 4. Continuación

Cepa	Identificación original	Origen	Identificación por 16S rDNA-RFLP
NCIMB 13210*	<i>A. salmonicida</i> subsp. <i>smithia</i> (HG3)	Pez	<i>A. bestiarum</i>
34 MEL ^{e*}	<i>A. salmonicida</i> subsp. <i>pectinolytica</i>	Agua de río	<i>A. bestiarum</i> / <i>A. salmonicida</i>
85 MEL ^{e*}	<i>A. salmonicida</i> subsp. <i>pectinolytica</i>	Agua de río	<i>A. bestiarum</i> / <i>A. salmonicida</i>
93 MEL ^{e*}	<i>A. salmonicida</i> subsp. <i>pectinolytica</i>	Agua de río	<i>A. bestiarum</i> / <i>A. salmonicida</i>
AS222 ^d	Atypical <i>A. salmonicida</i>	Pez	<i>A. bestiarum</i> / <i>A. salmonicida</i>
AS203 ^d	Atypical <i>A. salmonicida</i>	Pez	<i>A. bestiarum</i>
AS24 ^d	Atypical <i>A. salmonicida</i>	Pez	<i>A. bestiarum</i>
AS4 ^d	Atypical <i>A. salmonicida</i>	Pez	<i>A. bestiarum</i>
AS167 ^d	Atypical <i>A. salmonicida</i>	Pez	<i>A. bestiarum</i>
LMG 17541 ^T	<i>A. popoffii</i>	Agua de planta potabilizadora (Oelegem); Bélgica	<i>A. popoffii</i>

^aCepas de la Dra. Demarta; ^bCepas del Dr. Kingombe; ^cCepas de la Dra. Kozińska; ^dCepas del Dr. Austin; ^eCepas del Dr. Janda.

*Cepas utilizadas para la secuenciación del gen 16S rRNA. *Cepas utilizadas para el análisis de los RFLP del espaciador intergénico 16S-23S.

Anexo 5. Cepas de *Aeromonas* aisladas de carpa común (*Cyprinus carpio* L.) (estudio 4.4.5).

Cepa ♦	Origen	Identificación por 16S rDNA-RFLP
J4N-98	Riñón de pez enfermo	<i>A. bestiarum</i>
P1W-98	Úlcera en la piel	<i>A. bestiarum</i>
P1S-98	Piel de pez enfermo	<i>A. bestiarum</i>
14S-93	Piel de pez enfermo	<i>A. bestiarum*</i>
15S-93	Piel de pez enfermo	<i>A. bestiarum*</i>
R6N-98	Riñón de pez enfermo	<i>A. salmonicida*</i>
1S-91	Úlcera en la piel	<i>A. salmonicida</i>
32-93	Agua potable	<i>A. salmonicida</i>
10E-91	Úlcera en la piel	<i>A. salmonicida</i>
6N-91	Riñón de pez enfermo	<i>A. salmonicida</i>
A14-99	Riñón de pez enfermo	<i>A. salmonicida</i>
A16-99	Riñón de pez enfermo	<i>A. salmonicida*</i>
A12-99	Riñón de pez enfermo	<i>A. salmonicida*</i>
A9-99	Riñón de pez enfermo	<i>A. salmonicida*</i>
A11-99	Riñón de pez sano	<i>A. salmonicida*</i>
A15-99	Riñón de pez enfermo	<i>A. salmonicida</i>
1S-95	Piel de pez enfermo	<i>A. salmonicida</i>
A5-99	Riñón de pez sano	<i>A. salmonicida*</i>
4S-93	Piel de pez enfermo	<i>A. sobria</i>
A8-99	Riñón de pez enfermo	<i>A. sobria</i>
A2-99	Riñón de pez sano	<i>A. sobria</i>
A10-99	Riñón de pez enfermo	<i>A. sobria</i>
A1-99	Riñón de pez sano	<i>A. sobria</i>
A6-99	Riñón de pez enfermo	<i>A. sobria</i>
A3-99	Riñón de pez sano	<i>A. veronii</i>
S3W-98	Úlcera en la piel	<i>A. veronii</i>
Rej 1-98	Úlcera en la piel	<i>A. veronii</i>
S2W-98	Úlcera en la piel	<i>A. veronii</i>
S4W-98	Úlcera en la piel	<i>A. veronii</i>
5S-93	Piel de pez enfermo	<i>A. veronii</i>
16S-93	Úlcera en la piel	<i>A. veronii</i>
10S-93	Piel de pez enfermo	<i>A. veronii</i>
20E-93	Úlcera en la piel	<i>A. veronii</i>
Rej3-98	Úlcera en la piel	<i>A. veronii</i>
W1-97	Agua potable	<i>A. veronii</i>
A7-99	Riñón de pez enfermo	<i>A. encheleia</i>
A4-99	Riñón de pez sano	<i>A. encheleia</i>

*Cepas que a raíz de estudios posteriores (4.1.2.1) se han identificado como *A. bestiarum* / *A. salmonicida*.

♦ Cepas de la Dra. Kozińska

Anexo 6. Cepas de *Aeromonas* sp. aisladas de pescado congelado destinado al consumo humano en México (estudio 4.4.4).

Cepa ♦	Identificación fenotípica	Identificación por 16S rDNA-RFLP
101	<i>A. veronii</i> bt sobria	<i>A. salmonicida</i>
102	<i>A. veronii</i> bt sobria	<i>A. salmonicida</i>
103	<i>A. veronii</i> bt sobria	<i>A. bestiarum</i> *
104	<i>A. veronii</i> bt sobria	<i>A. bestiarum</i> *
105	<i>A. veronii</i> bt sobria	<i>A. salmonicida</i>
106	<i>A. veronii</i> bt sobria	<i>A. salmonicida</i>
107	<i>A. veronii</i> bt sobria	<i>A. salmonicida</i>
108	<i>A. veronii</i> bt sobria	<i>A. salmonicida</i>
109	<i>A. veronii</i> bt sobria	<i>A. bestiarum</i> *
110	<i>A. veronii</i> bt sobria	<i>A. veronii</i>
111	<i>A. veronii</i> bt sobria	<i>A. veronii</i>
202	<i>A. caviae</i>	<i>A. salmonicida</i>
204	<i>A. caviae</i>	<i>A. bestiarum</i> *
206	<i>A. caviae</i>	<i>A. salmonicida</i>
207	<i>A. caviae</i>	<i>A. salmonicida</i>
208	<i>A. caviae</i>	<i>A. salmonicida</i>
209	<i>A. caviae</i>	<i>A. salmonicida</i>
210	<i>A. caviae</i>	<i>A. bestiarum</i>
211	<i>A. caviae</i>	<i>A. salmonicida</i>
212	<i>A. caviae</i>	<i>A. salmonicida</i>
213	<i>A. caviae</i>	<i>A. salmonicida</i>
214	<i>A. caviae</i>	<i>A. salmonicida</i>
301	<i>A. eucrenophila</i>	<i>A. salmonicida</i>
302	<i>A. eucrenophila</i>	<i>A. encheleia</i>
304	<i>A. eucrenophila</i>	<i>A. salmonicida</i>
305	<i>A. eucrenophila</i>	<i>A. salmonicida</i>
306	<i>A. eucrenophila</i>	<i>A. salmonicida</i>
307	<i>A. eucrenophila</i>	<i>A. hydrophila</i>
308	<i>A. eucrenophila</i>	<i>A. encheleia</i>
309	<i>A. eucrenophila</i>	<i>A. encheleia</i>
310	<i>A. eucrenophila</i>	<i>A. salmonicida</i>
311	<i>A. eucrenophila</i>	<i>A. salmonicida</i>
312	<i>A. eucrenophila</i>	<i>A. salmonicida</i>
401	<i>A. salmonicida</i>	<i>A. bestiarum</i> *
402	<i>A. salmonicida</i>	<i>A. salmonicida</i>
403	<i>A. salmonicida</i>	<i>A. salmonicida</i>
404	<i>A. salmonicida</i>	<i>A. salmonicida</i>
405	<i>A. salmonicida</i>	<i>A. salmonicida</i>
406	<i>A. salmonicida</i>	<i>A. salmonicida</i>
407	<i>A. salmonicida</i>	<i>A. salmonicida</i>
408	<i>A. salmonicida</i>	<i>A. salmonicida</i>
410	<i>A. salmonicida</i>	<i>A. salmonicida</i>
411	<i>A. salmonicida</i>	<i>A. salmonicida</i>
412	<i>A. salmonicida</i>	<i>A. salmonicida</i>
413	<i>A. salmonicida</i>	<i>A. veronii</i>
414	<i>A. salmonicida</i>	<i>A. salmonicida</i>
415	<i>A. salmonicida</i>	<i>A. salmonicida</i>
416	<i>A. salmonicida</i>	<i>A. salmonicida</i>
417	<i>A. salmonicida</i>	<i>A. salmonicida</i>
418	<i>A. salmonicida</i>	<i>A. salmonicida</i>
419	<i>A. salmonicida</i>	<i>A. salmonicida</i>
420	<i>A. salmonicida</i>	<i>A. bestiarum</i> *
422	<i>A. salmonicida</i>	<i>A. salmonicida</i>
423	<i>A. salmonicida</i>	<i>A. bestiarum</i> *
424	<i>A. salmonicida</i>	<i>A. bestiarum</i> *
425	<i>A. salmonicida</i>	<i>A. salmonicida</i>
426	<i>A. salmonicida</i>	<i>A. bestiarum</i>
427	<i>A. salmonicida</i>	<i>A. salmonicida</i>
428	<i>A. salmonicida</i>	<i>A. bestiarum</i> *
429	<i>A. salmonicida</i>	<i>A. bestiarum</i> *
501	<i>A. hydrophila</i>	<i>A. salmonicida</i>
502	<i>A. hydrophila</i>	<i>A. salmonicida</i>

Anexo 6. Continuación

Cepa	Identificación fenotípica	Identificación por 16S rDNA-RFLP
503	<i>A. hydrophila</i>	<i>A. bestiarum</i> *
504	<i>A. hydrophila</i>	<i>A. bestiarum</i> *
505	<i>A. hydrophila</i>	<i>A. bestiarum</i>
506	<i>A. hydrophila</i>	<i>A. salmonicida</i>
507	<i>A. hydrophila</i>	<i>A. veronii</i>
508	<i>A. hydrophila</i>	<i>A. salmonicida</i>
509	<i>A. hydrophila</i>	<i>A. salmonicida</i>
510	<i>A. hydrophila</i>	<i>A. salmonicida</i>
511	<i>A. hydrophila</i>	<i>A. salmonicida</i>
512	<i>A. hydrophila</i>	<i>A. salmonicida</i>
513	<i>A. hydrophila</i>	<i>A. salmonicida</i>
514	<i>A. hydrophila</i>	<i>A. salmonicida</i>
515	<i>A. hydrophila</i>	<i>A. hydrophila</i>
516	<i>A. hydrophila</i>	<i>A. salmonicida</i>
517	<i>A. hydrophila</i>	<i>A. bestiarum</i>

*Cepas que a raíz de estudios posteriores (4.1.2.1) se han identificado como *A. bestiarum* / *A. salmonicida*. ♦Cepas de la Dra. Castro-Escarpulli.

Anexo 7. Cepas utilizadas para la ampliación del protocolo de identificación basado en los RFLP del gen 16S rRNA (estudio 4.1.1.1.)

Especies	Cepas	Origen
<i>A. bestiarum</i>	ATCC5 1108 ^T , CECT 5200, CECT 5201, CECT 5202, CECT 5203, CECT 895, CECT 896, CECT 5179, CECT 4239 LMG 13662 CECT5219 CECT 5222, CECT 5223 CECT 5224, CECT 5226, CECT 5228, CECT 5236 CECT 5248, CECT 5211 CECT 5213, CECT 5212 CECT 5214, CECT 5215, CECT5239, CECT5242, CECT 5205, CECT 5217, CECT 5247, CECT 5206	Pez Heces Pastel Mejillón Agua potable Agua de mar Agua de río Agua de embalse
<i>A. salmonicida</i>	ATCC 33658 ^T , CECT 4236, CECT 4237 LMG13448 LMG 18998 LMG 19037, CECT 5221, CECT 5218 CECT 5225, CECT 5227 CECT 5229, CECT 5232, CECT 5238, CECT 5230, LMG 19036 CECT 5209, CECT 5220, CECT 5234 CECT 5231 CECT 5249	Pez Heces Exudado de herida Pastel Mejillón Agua potable Agua de mar Agua de embalse Agua de río
<i>A. popoffii</i>	LMG17541 ^T , LMG17542, LMG17543, LMG17544, LMG17545, LMG17546, LMG17547 CECT 5235, CECT 5246, CECT 5245, CECT 5250 CECT 5240, CECT 5243, CECT 5244, CECT 5251 CECT 5210	Agua potable Agua de embalse Agua de río Agua de mar
<i>A. encheleia</i>	CECT4340, CECT4341, CECT 4342 ^T , CECT4343	Pez
<i>Aeromonas</i> Grupo 501	ATCC 43946	Herida
<i>Aeromonas</i> sp (HG11)	ATCC 35941	Sutura de herida
<i>A. veronii</i> bt sobria	LMG 13068, LMG 13071, LMG 13073, LMG 13074, LMG 13695 LMG 13694	Heces Desconocido

Anexo 8. Cepas utilizadas para el diseño de la sonda de género (estudio 4.1.1.3).

Especie	Cepa	Origen
<i>A. hydrophila</i>	ATCC 7966 ^T	Leche
<i>A. bestiarum</i>	ATCC 51108 ^T	Pez
<i>A. salmonicida</i>	ATCC 33658 ^T	Pez
<i>A. caviae</i>	ATCC 15468 ^T	Cobaya
<i>A. media</i>	ATCC 33907 ^T	Pez
<i>A. eucrenophila</i>	ATCC 23309 ^T	Pez
<i>A. sobria</i>	ATCC 43979 ^T	Pez
<i>A. veronii</i>	ATCC 35624 ^T	Esputo
<i>A. jandaei</i>	ATCC 49568 ^T	Heces
<i>Aeromonas</i> GH11	ATCC 35941	Sutura
<i>A. schubertii</i>	ATCC 43700 ^T	Abceso
<i>A. trota</i>	ATCC 49657 ^T	Heces
<i>A. encheleia</i>	ATCC 51929 ^T	Pez
<i>A. allosaccharophila</i>	ATCC 51208 ^T	Pez
<i>A. popoffii</i>	LMG 17541 ^T	Agua de planta de potabilizadora
<i>Aeromonas</i> Group 501	CECT 5178 ^T	Desconocido
<i>Vibrio fluvialis</i>	ATCC 33809 ^T	Heces
<i>V. vulnificus</i>	ATCC 27562 ^T	Sangre
<i>V. vulnificus</i>	ATCC 33147	Pez enfermo
<i>V. vulnificus</i>	CECT 4608	Agua
<i>V. vulnificus</i>	CECT 4606	Agua
<i>V. vulnificus</i>	CECT 4602	Agua
<i>V. cholerae</i> NO:01	CECT 557	Agua de río
<i>V. cholerae</i> NO:01	CECT 653	Agua
<i>V. parahaemolyticus</i>	ATCC 17802 ^T	Brote alimentario
<i>V. parahaemolyticus</i>	CECT 612	Agua de mar
<i>V. parahaemolyticus</i>	CECT 613	Pláncton marino
<i>V. parahaemolyticus</i>	CECT 611	Agua de mar
<i>V. parahaemolyticus</i>	CECT 588	Mejillón
<i>Escherichia coli</i> O:157:H7	CECT 4076	Colitis enterohemorrágica humana
<i>E. coli</i> O:128: K68 (B)	CECT 742	Desconocido
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC 25668	Aislado clínico humano
<i>Salmonella thyphimurium</i>	ATCC 13311	Brote alimentario
<i>Shigella flexneri</i>	CECT 585	Disenteria
<i>Plesiomonas shigelloides</i>	CECT 4262 ^T	Heces
<i>Yersinia enterocolitica</i>	CECT 754	Heces

Anexo 9. Cepas utilizadas para el estudio filogenético del género *Aeromonas* utilizando los genes estructurales *gyrB* y *rpoD* (4.1.2.2).

Cepa	Identificación por 16S rDNA-RFLP	Número de acceso para el gen <i>gyrB</i>	Número de acceso para el gen <i>rpoD</i>
CECT 839 ^T	<i>A. hydrophila</i>	AY101778	AY169325
63c	<i>A. hydrophila</i>	AY101789	AY169366
830	<i>A. hydrophila</i>	AY237561	AY169364
874	<i>A. hydrophila</i>	AY237562	AY169365
140P	<i>A. hydrophila</i>	AY237560	AY169356
CECT 4227 ^T	<i>A. bestiarum</i>	AY101774	AY169326
108F	<i>A. bestiarum</i>	AY237575	AY169360
P1W-98 ^b	<i>A. bestiarum</i>	AY237563	AY185588
CECT 896	<i>A. bestiarum</i>	AY101790	AY169330
CECT 895	<i>A. bestiarum</i>	AY101784	AY169329
CECT 894 ^T	<i>A. salmonicida</i>	AY101773	AY169327
CECT 4237	<i>A. salmonicida</i>	AY237567	AY169332
CECT 5173	<i>A. salmonicida</i>	AY101810	AY169328
220c	<i>A. salmonicida</i>	AY101816	AY169358
130	<i>A. salmonicida</i>	AY237573	AY169355
156	<i>A. salmonicida</i>	AY237570	AY169361
LMG 13448	<i>A. salmonicida</i>	AY101822	AY185580
440	<i>A. salmonicida</i>	AY237572	AY169334
101F	<i>A. bestiarum</i> / <i>A. salmonicida</i>	AY101788	AY169357
A7 ^c	<i>A. bestiarum</i> / <i>A. salmonicida</i>	AY101815	AY169335
22	<i>A. bestiarum</i> / <i>A. salmonicida</i>	AY237576	AY169363
26	<i>A. bestiarum</i> / <i>A. salmonicida</i>	AY237578	AY169368
37	<i>A. bestiarum</i> / <i>A. salmonicida</i>	AY101819	AY169350
40	<i>A. bestiarum</i> / <i>A. salmonicida</i>	AY237564	AY185593
361c	<i>A. bestiarum</i> / <i>A. salmonicida</i>	AY237574	AY169353
116P	<i>A. bestiarum</i> / <i>A. salmonicida</i>	AY237566	AY185592
117P	<i>A. bestiarum</i> / <i>A. salmonicida</i>	AY237565	AY185591
119P	<i>A. bestiarum</i> / <i>A. salmonicida</i>	AY237568	AY169351
120P	<i>A. bestiarum</i> / <i>A. salmonicida</i>	AY237569	AY169359
107F	<i>A. bestiarum</i> / <i>A. salmonicida</i>	AY237577	AY169362
34 MEL ^a	<i>A. bestiarum</i> / <i>A. salmonicida</i>	AY101785	AY169324
LMG 13662	<i>A. bestiarum</i> / <i>A. salmonicida</i>	AY101786	AY185590
A99 ^c	<i>A. bestiarum</i> / <i>A. salmonicida</i>	AY237571	AY169352
CECT 838 ^T	<i>A. caviae</i>	AY101783	AY169337
CECT 4221	<i>A. caviae</i>	AY101794	AY185587
665c	<i>A. caviae</i>	AY237579	AY249199
CECT 4232 ^T	<i>A. media</i>	AY101782	AY169338
CECT 4234	<i>A. media</i>	AY101824	AY249191
741	<i>A. media</i>	AY299321	AY249192
CECT 4224 ^T	<i>A. eucrenophila</i>	AY101776	AY169339
CECT 4827	<i>A. eucrenophila</i>	AY101820	AY249193
CECT 4245 ^T	<i>A. sobria</i>	AY101781	AY169340
350	<i>A. sobria</i>	AY101807	AY249195
CECT 4228 ^T	<i>A. jandaei</i>	AY101780	AY169341
344	<i>A. jandaei</i>	AY101796	AY249196
CECT 4246	<i>A. veronii</i>	AY101775	AY169333
CECT 4486 ^T	<i>A. veronii</i>	AY101795	AY169342
LMG 16334	<i>A. veronii</i>	AY101787	AY169354

Anexo 9. Continuación

Cepa	Identificación por 16S rDNA-RFLP	Número de acceso para el gen <i>gyrB</i>	Número de acceso para el gen <i>rpoD</i>
CECT 4253	<i>Aeromonas</i> sp. (HG11)	AY101779	AY169343
CECT 4856	<i>Aeromonas</i> sp. (HG11)	AY101808	AY249197
CECT 4240 ^T	<i>A. shubertii</i>	AY101772	AY169336
CECT 4254	<i>Aeromonas</i> sp.	AY101806	AY169345
CECT 4255 ^T	<i>A. trota</i>	AY101800	AY169344
CECT 4935	<i>A. trota</i>	AY101805	AY249198
CECT 4199 ^T	<i>A. allosaccharophila</i>	AY101777	AY169348
CECT 4220	<i>A. allosaccharophila</i>	AY101812	AY185585
CECT 4200	<i>A. allosaccharophila</i>	AY101823	AY185586
CECT 4342 ^T	<i>A. encheleia</i>	AY101799	AY169346
CECT 4341	<i>A. encheleia</i>	AY101804	AY249194
LMG 17541 ^T	<i>A. popoffii</i>	AY101801	AY169347
LMG 17543	<i>A. popoffii</i>	AY101803	AY169367
LMG 17544	<i>A. popoffii</i>	AY101821	AY169349
LMG 17545	<i>A. popoffii</i>	AY237583	AY185582
LMG 17546	<i>A. popoffii</i>	AY237584	AY185583
MTCC 3249	<i>A. culicicola</i>	AF175891	AY127871
239	<i>A. sp</i>	AY237580	AY308843
480	<i>A. sp</i>	AY237581	AY308844
57	<i>A. sp</i>	AY237582	AY308845
280	<i>A. sp</i>	AY299324	AY308846
610	<i>A. sp</i>	AY101814	AY308847

^aCepa del Dr. Janda; ^bCepas de la Dra. Kozińska; ^cCepas del Dr. Kingombe. ND, No depositadas.

Anexo 10. Cepas utilizadas para el ensayo de técnicas de tipado molecular (estudio 4.3.1) y para el estudio de los factores de virulencia y resistencia a antibióticos de *A. popoffii* (estudio 4.4.2).

Especie	Cepa	Origen	Localidad
<i>A. popoffii</i>	LMG 17541 ^T	Agua de planta potabilizadora	Oelegem, Bélgica
<i>A. popoffii</i>	LMG 17542	Agua de planta potabilizadora	DeBlankaart, Bélgica
<i>A. popoffii</i>	LMG 17543	Agua de planta potabilizadora	Snellegem, Bélgica
<i>A. popoffii</i>	LMG 17544	Agua de planta potabilizadora	Eeklo, Bélgica
<i>A. popoffii</i>	LMG 17545	Agua de planta potabilizadora	Snellegem, Bélgica
<i>A. popoffii</i>	LMG 17546	Agua de planta potabilizadora	Undy Station, Escocia
<i>A. popoffii</i>	LMG 17547	Agua de planta potabilizadora	Turiff, Escocia
<i>A. popoffii</i>	F533E ^a	Agua potable	Pregassona, Suiza
<i>A. popoffii</i>	F548B ^a	Agua potable	Vinagello, Suiza
<i>A. popoffii</i>	F548C ^a	Agua potable	Vinagello, Suiza
<i>A. popoffii</i>	F600B ^a	Agua potable	Vinagello, Suiza
<i>A. popoffii</i>	F600C ^a	Agua potable	Vinagello, Suiza
<i>A. popoffii</i>	F539A ^a	Agua potable	Vinagello, Suiza
<i>A. popoffii</i>	F479E ^a	Agua potable	Veizio, Suiza
<i>A. popoffii</i>	F498B ^a	Agua potable	Cadro, Suiza
<i>A. popoffii</i>	32	Agua de desembocadura de río	Río Fluvia, España
<i>A. popoffii</i>	137	Agua de embalse	Baells, España
<i>A. popoffii</i>	159	Agua de río	Río Segre, España
<i>A. popoffii</i>	203	Agua de mar	Masnou-Barcelona, España
<i>A. popoffii</i>	210	Agua de desembocadura de río	Río Llobregat, España
<i>A. popoffii</i>	254	Agua de río	Río Noguera Pallaresa, España
<i>A. popoffii</i>	274	Agua de río	Río Noguera Pallaresa, España
<i>A. popoffii</i>	366	Agua de torrente	Torrente de Merles, España
<i>A. popoffii</i>	370	Agua de embalse	Baells, España
<i>A. popoffii</i>	594	Agua de torrente	Torrente de Merles, España
<i>A. popoffii</i>	638	Agua de río	Río Fluviá, España
<i>A. hydrophila</i>	CECT 839 ^T	Leche	
<i>A. bestiarum</i>	CECT 4227 ^T	Pez enfermo	
<i>A. salmonicida</i> subsp. <i>salmonicida</i>	CECT 894 ^T	Pez	

^aCepas de la Dra. Demarta