

## **II. INTERÉS Y OBJETIVOS**

El género *Aeromonas* está constituido por bacterias Gram-negativas aisladas frecuentemente en el agua, alimentos, en heces de pacientes con cuadros diarreicos y en infecciones extraintestinales. Además, algunas de las especies del género también son patógenas de peces. La taxonomía de *Aeromonas* es compleja, el género consta de 15 especies, sin embargo algunas de ellas no están bien delimitadas, lo que dificulta su identificación. Durante las últimas décadas el interés en el estudio de las distintas especies de *Aeromonas* como microorganismos patógenos ha ido creciendo gradualmente, como lo demuestran las numerosas publicaciones y simposios monográficos que en los últimos años se vienen celebrando en diversos países. Son por tanto numerosos los investigadores, en campos muy diversos de la microbiología, que han de enfrentarse a la difícil labor de identificar dichas bacterias. La mayoría de laboratorios clínicos utilizan para la identificación de las especies métodos miniaturizados semiautomáticos (API20E, Vitek GNI, BBL Crystal, MicroScan) u otras pruebas bioquímicas descritas en manuales de microbiología poco actualizados. Estos métodos bioquímicos conducen a identificaciones erróneas no sólo de las especies sino también del género, ya que la mayoría de cepas se identifican como *Aeromonas hydrophila* o como *Vibrio* spp. Uno de los objetivos de esta tesis consiste en ampliar el método molecular basado en el análisis de los RFLP del gen 16S rRNA, para que permita la identificación de todas las especies del género. La correcta identificación de las especies que integran el complejo fenotípico “*A. hydrophila*” (formado por las especies *A. hydrophila*, *A. bestiarum*, *A. salmonicida* y *A. popoffii*) constituye uno de los problemas fundamentales de la taxonomía del género. Como se ha mencionado en la introducción, el porcentaje de hibridación DNA-DNA entre las especies *A. bestiarum* y *A. salmonicida* es muy elevado y roza los límites establecidos para considerarlas especies distintas. A pesar de ello son consideradas especies válidas. También se ha considerado importante, dado que *A. hydrophila* es una de las tres especies más frecuentemente aisladas en muestras clínicas de origen humano, que *A. salmonicida* es un importante patógeno de peces, y que *A. popoffii* es una especie de reciente descripción, investigar las características bioquímicas y las relaciones filogenéticas entre estas especies.

Los patrones de resistencia de las especies de *Aeromonas* a los agentes antimicrobianos ha sido investigada en diversas ocasiones, no obstante la mayoría de estudios incluyen cepas identificadas bioquímicamente por lo que se desconoce si las especies identificadas genéticamente, presentan o no un patrón de resistencia

específico. Además, en la actualidad, debido a la elevada facilidad para realizar viajes internacionales, la movilidad de personas entre los diferentes países y continentes ha aumentado vertiginosamente, situación que ha conllevado un incremento de la diarrea del viajero. Hasta la fecha en nuestro país no existen estudios que aporten datos sobre la incidencia de *Aeromonas* en este tipo de infección intestinal, y en todo caso cual podría ser la terapia antimicrobiana más efectiva. Establecer la incidencia de estos microorganismos en este tipo de infección y conocer su patrón de sensibilidad a los agentes antimicrobianos, es otro de los objetivos concretos de esta tesis.

El hecho de que *Aeromonas* sea considerada como un potencial patógeno humano ha generado un especial interés en poder conocer la incidencia de las diferentes especies en aguas y alimentos, ambos considerados como posibles vías de contagio, y su posible relación con la infección humana. Para ello es importante disponer de métodos moleculares de tipado fiables. Uno de los objetivos concretos de esta tesis ha sido la evaluación comparativa de diversas técnicas rápidas y sencillas de tipado molecular para establecer cual de ellas puede ser la más eficaz. Se ha postulado que los peces pueden desempeñar un papel importante en el establecimiento de la infección humana, ya que *Aeromonas* es un reconocido patógeno de dichos animales. Es por tanto de interés poder conocer tanto la incidencia de las diferentes especies de *Aeromonas* en el pescado destinado al consumo humano como las características virulentas de las cepas implicadas en la patología de peces. Ambos aspectos son abordados en esta tesis. También es de resaltar la importante pérdida económica que las infecciones en peces pueden representar para las piscifactorías destinadas al cultivo de dichos peces.

La virulencia de *Aeromonas*, como en la mayoría de microorganismos patógenos, es compleja y multifactorial. Hasta la fecha se han descrito numerosos factores de virulencia (aerolisina/hemolisina, GCAT, lipasas extracelulares, DNasas y serina proteasa) en *Aeromonas*. No existen estudios que intenten determinar la distribución de estos factores de virulencia simultáneamente en un número representativo de cepas de todas las especies del género, utilizando cepas bien caracterizadas genéticamente. Además hasta la fecha los estudios existentes se han centrado principalmente en establecer la prevalencia de uno de ellos, la aerolisina. Por lo tanto, se desconoce si los otros factores de virulencia mencionados predominan en las cepas de *Aeromonas* de origen clínico o en determinadas especies, así como si se hallan solos o asociados. El determinar estos aspectos constituye otro de los objetivos

del presente trabajo. En especial se ha considerado de interés el investigar la presencia de los factores de virulencia mencionados en *A. popoffii*, por tratarse de una especie de reciente descripción poco conocida y aislada en aguas de potencial consumo humano. También se han investigado los genes que codifican para el flagelo lateral, los cuales se han asociado a la capacidad invasora de las cepas de *Aeromonas*, y los genes *alt* y *ast* que codifican para enterotoxinas citotónicas. Muy recientemente se ha demostrado que la presencia simultánea de los dos últimos genes en las cepas aisladas de heces condiciona la gravedad del cuadro diarreico. Otros autores han demostrado que cepas mutantes para los genes *alt*, *ast* y aerolisina son capaces de reducir drásticamente la secreción de fluidos en un modelo animal de asa ligada en rata y ratón. Es por este motivo, que se ha considerado importante estudiar la presencia simultánea de los genes *lafA* (flagelo lateral), *alt*, *ast* y aerolisina en cepas de *A. jandaei*. Esta especie fue seleccionada porque a pesar de que se aísla con cierta frecuencia en muestras clínicas (tanto de origen intestinal como extraintestinal), su potencial virulento ha sido poco estudiado.

A pesar de que se conoce que determinados genes pueden jugar un papel importante en la virulencia de *Aeromonas*, el mecanismo de patogenicidad de éstas bacterias, tal y como se ha comentado, es más complejo. Recientemente se ha descrito, en una cepa de *A. salmonicida* patógena de peces, una toxina denominada Aext que se secreta por el sistema de secreción tipo III (TTSS), así como varios genes que integran este sistema. La función del TTSS es hacer llegar directamente al citoplasma de la célula huésped toxinas que inducen su apoptosis. Este sistema ha sido descrito en bacterias enteropatógenas tales como *Escherichia coli*, *Yersinia* spp., *Salmonella* spp., por lo que consideramos interesante investigar su presencia en cepas de las especies de *Aeromonas* de más relevancia en clínica.

En la presente tesis pretendemos contribuir al esclarecimiento de los aspectos mencionados anteriormente a través de los siguientes objetivos concretos:

1. Ampliar el protocolo de identificación basado en los RFLP del gen 16S rRNA seleccionando y ensayando nuevas endonucleasas que permitan identificar de forma rápida y fiable todas las especies de *Aeromonas*, incluyendo las de más reciente descripción.

2. Evaluar comparativamente la eficacia de los métodos bioquímicos miniaturizados BBL Crystal y MicroScan para la identificación de las especies de *Aeromonas*, comparando sus resultados con los obtenidos por la técnica de los RFLP del gen 16S rRNA.
3. Diseñar una sonda específica para la identificación de las colonias de *Aeromonas* en cultivos primarios.
4. Intentar esclarecer la taxonomía de las especies del complejo fenotípico “*A. hydrophila*” y en especial de *A. bestiarum*, *A. salmonicida* y *A. popoffii* mediante métodos fenotípicos y moleculares.
5. Determinar la sensibilidad a los agentes antimicrobianos de cepas de *Aeromonas* de origen clínico, ambiental y aisladas de peces.
6. Estudiar retrospectivamente, en colaboración con la Unidad de Medicina Tropical del Hospital Clínico de Barcelona, la incidencia de las distintas especies de *Aeromonas* en la diarrea del viajero.
7. Evaluar comparativamente diversos métodos de tipado molecular (ERIC-PCR, REP-PCR y 16S-23S ISR-RFLP) para determinar cual de ellos es el más discriminativo y poder investigar la variabilidad genética intraespecífica en *Aeromonas*.
8. Determinar la distribución de genes que codifican para factores de virulencia tales como aerolisina/hemolisina, lipasas, serina proteasa, DNasas, flagelo lateral y enterotoxinas citotónicas en cepas de *Aeromonas* de origen clínico y ambiental.
9. Establecer la incidencia de las diferentes especies de *Aeromonas* en muestras de pescado destinado al consumo humano y determinar las características fenotípicas y virulentas de las cepas aisladas.

10. Establecer si el sistema de secreción tipo III (TTSS), asociado al potencial virulento de microorganismos patógenos, está presente en cepas clínicas de *Aeromonas* spp.