



UNIVERSITAT DE  
BARCELONA

## Diversidad genética, genes de virulencia y estructuras de superficie implicadas en la patogenicidad del género *Aeromonas*

Ivania Loreto Cortés Cortés

**ADVERTIMENT.** La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX ([www.tdx.cat](http://www.tdx.cat)) i a través del Dipòsit Digital de la UB ([diposit.ub.edu](http://diposit.ub.edu)) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX ni al Dipòsit Digital de la UB. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX o al Dipòsit Digital de la UB (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

**ADVERTENCIA.** La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR ([www.tdx.cat](http://www.tdx.cat)) y a través del Repositorio Digital de la UB ([diposit.ub.edu](http://diposit.ub.edu)) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR o al Repositorio Digital de la UB. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR o al Repositorio Digital de la UB (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

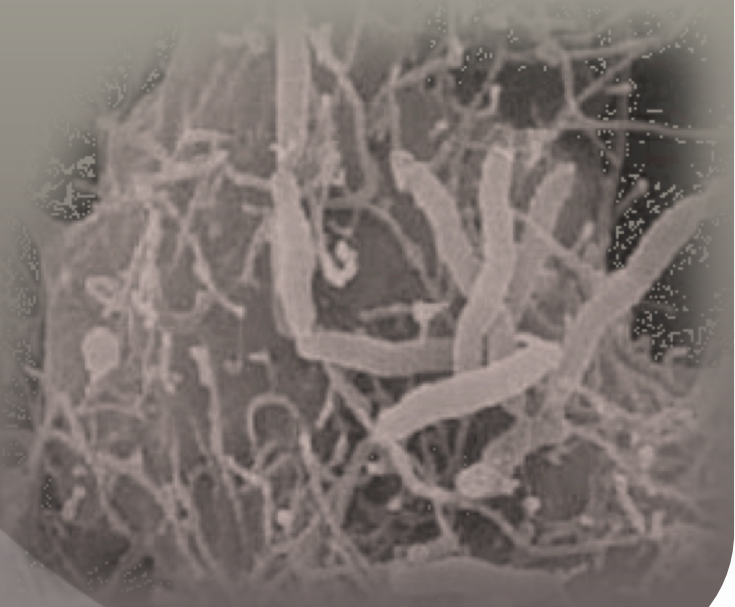
**WARNING.** On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX ([www.tdx.cat](http://www.tdx.cat)) service and by the UB Digital Repository ([diposit.ub.edu](http://diposit.ub.edu)) has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized nor its spreading and availability from a site foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository is not authorized (framing). Those rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.

Diversidad Genética, Genes de Virulencia  
y Estructuras de Superficie Implicadas en  
la Patogenicidad del Género *Aeromonas*

TESIS DOCTORAL

**Ivania Loreto Cortés Cortés**

2015





UNIVERSITAT DE  
BARCELONA

DIVERSIDAD GENÉTICA, GENES DE VIRULENCIA  
Y ESTRUCTURAS DE SUPERFICIE IMPLICADAS  
EN LA PATOGENICIDAD DEL GÉNERO *Aeromonas*

Ivania Loreto Cortés Cortés





UNIVERSITAT DE  
BARCELONA



Universidad de Barcelona  
Facultad de Biología  
Departamento de Microbiología

Instituto Ramon y Cajal de  
Investigación Sanitaria (IRYCIS)

DIVERSIDAD GENÉTICA, GENES DE VIRULENCIA Y  
ESTRUCTURAS DE SUPERFICIE IMPLICADAS EN LA  
PATOGENICIDAD DEL GÉNERO *Aeromonas*

Memoria presentada por Ivania Loreto Cortes Cortés  
para optar al grado de doctora por la Universidad de Barcelona

Programa de Doctorado  
Microbiología Ambiental y Biotecnología

VºBº directora

VºBº tutor

La doctoranda

Rosa del Campo

Carlos Balsalobre

Ivania Cortes

Barcelona, Noviembre 2015



“Enseñar siempre: en el patio y en la calle como en el salón  
de clases.

Enseñar con la actitud, el gesto y la palabra...

Maestro: sé fervoroso. Para encender lámparas basta llevar  
fuego en el corazón.

El amor a las personas enseña más caminos al que enseña,  
Incluso que la propia pedagogía”

**Gabriela Mistral**





## **Agradecimientos**

*“Hoy quiero expresar mi gratitud a la vida, pues me ha dado muchas cosas maravillosas, cada día me da un hermoso amanecer y una oportunidad más para hacer realidad todos mis sueños al lado de las personas que más quiero. Prometo dar todo lo mejor de mí y construir junto a mi familia un mejor mañana.”*

En primer lugar agradezco el apoyo, dedicación y cariño de la Dra. Rosa del Campo, gracias a ella he podido llegar hasta acá, he aprendido muchísimo de una mujer valiente, tenaz y lo mas importante: madre, que con todo el trabajo encima tiene siempre tiempo para mirar a cada persona a los ojos y escucharla, ahora, estaré en deuda de por vida contigo, querida directora de tesis y amiga...

En segundo lugar quiero agradecer a Carlos Balsalobre, por haber aceptado formar parte de esta tesis, por estar siempre pendiente de las consultas que le hacía incluso desde Chile y en horarios que no correspondían al trabajo, gracias por su apoyo profesional, ojalá nunca perdamos el contacto y en algún futuro, podamos realizar una investigación en conjunto.

Al doctor Juan Silva Ávalos, por haberme presentado a la Dra Rosa y por estar siempre pendiente de mí, ayudándome en mis nuevos proyectos, escuchando mis problemas y animándome, aplaudo su sencillez y su humanidad hacia sus alumnos.

Agradezco también a los docentes de la Universidad de Barcelona, que me ayudaron en mis comienzos: Anicet Blanch, Maite Muniesa, Joan Jofré, Susana Merino y Juan Tomás, gracias por haberme recibido en sus laboratorios, ahora en Chile he puesto en práctica muchas de las técnicas que aprendí en sus laboratorios, gracias desde ya...

No menos importante son todas aquellas personas que trabajaban a mi alrededor en la Universidad de Barcelona, compañeros de laboratorio, técnicos, secretarias, alumnos y amigos extranjeros etc, me llevo un lindo e inolvidable recuerdo de todos ustedes, siempre tuve con quien conversar y compartir, gracias a todas esas personas



Maravillosas que tuvieron la paciencia de escucharme, los llevo en el corazón.

También quiero agradecer a la “gente maravillosa” del Hospital Ramón y Cajal a todos los que me ayudaron a terminar esta etapa, gracias a todos los que se dieron el tiempo de enseñarme, escucharme y acompañarme muchas veces, estaré en deuda de por vida con todos ustedes. Antes de conocerlos no creí que existiera tanto compañerismo y nobleza dentro de un laboratorio, puedo asegurar que la calidez que vi allí jamás lo vi antes ni siquiera en mi propio país...

Y sin ser menos importante agradezco por último a mi familia, por el gran apoyo incondicional, a Cita y Emilio por todo su apoyo en mis largos años de estudio, por su ayuda en el cuidado de mis hijos. También agradezco a Cristian, mi compañero, que me apoya en todos mis proyectos, y siempre me da ánimos, gracias por estar a mi lado...

Agradezco a mis hijos Felipe y Antón, que son mi alegría de cada día y mi incentivo de querer seguir superándome, gracias por existir. Finalmente agradezco a Dios por todas las personas que ha puesto en mi camino y por todas las cosas que me han ocurrido.



# Índice



<b>Abreviaturas</b> .....	<b>1</b>
<b>Listado de Tablas</b> .....	<b>2</b>
<b>Listado de Figuras</b> .....	<b>2</b>
<b>1 INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>7</b>
1.1 Evolución Histórica del Género <i>Aeromonas</i> .....	10
1.2 Características Generales .....	11
1.3 Ecología.....	12
1.4 Taxonomía.....	13
1.5 Patogenicidad y Epidemiología.....	14
1.6 Infecciones por <i>Aeromonas</i> .....	15
1.6.1 Infecciones en Animales .....	15
1.6.2 Infecciones en Humanos.....	16
1.6.2.1 Infecciones Gastrointestinales.....	16
1.6.2.2 Bacteriemias .....	17
1.6.2.3 Infecciones de Piel y Tejidos Blandos.....	18
1.6.2.4. Infecciones Nosocomiales .....	19
1.7 Sensibilidad a los Antimicrobianos.....	19
1.7.1 Características de la Metallo-Beta-Lactamasa Imi H (Cph A).....	21
1.8 Factores de Virulencia y Mecanismos de Patogenicidad.....	21
1.9 Productos Extracelulares .....	23
1.10 Componentes Estructurales.....	27
1.10.1 Flagelos.....	27
1.10.2 Fimbrias y Pili.....	29
1.10.3 Cápsula.....	29

1.10.4 Capa o Lámina S .....	30
1.10.5 Lipopolisacárido .....	31
1.10.5.1 Lípido A.....	34
1.10.5.2 Núcleo .....	35
1.10.5.3 Antígeno O.....	36
1.11 Adherencia Bacteriana.....	37
<b>2 HIPÓTESIS Y OBJETIVOS .....</b>	<b>41</b>
2.1 Hipótesis de Trabajo.....	43
2.2 Objetivos.....	43
2.2.1 Objetivo General.....	43
2.2.2 Objetivos Específicos.....	43
<b>3 MATERIAL Y MÉTODOS.....</b>	<b>47</b>
3.1 Estudio Retrospectivo de la Incidencia y Prevalencia de la Infección por <i>Aeromonas</i> en un Hospital Terciario.....	49
3.2 Cepas Bacterianas .....	49
3.3 Identificación Bacteriana mediante MALDI-TOF MS.....	49
3.4 Sensibilidad Antibiótica .....	51
3.5 Test de Hodge .....	52
3.6 Extracción de ADN, Amplificación y Secuenciación Sanger	53
3.7 Detección de Genes de Virulencia .....	55
3.8 Tipado Molecular.....	56
3.8.1 Electroforesis en Gel de Campo Pulsado (PFGE).....	56
3.8.2 MultiLocus Sequence Typing (MLST).....	58
3.9 Caracterización del Lipopolisacárido .....	60
3.9.1 Electroforesis en Geles de Poliacrilamida con SDS.....	60
3.9.2 Tinción con Nitrato de Plata.....	61
3.10 Adhesión e Invasión Celular .....	61



<b>4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b> .....	<b>65</b>
4.1 Estudio Retrospectivo de la Infección por <i>Aeromonas</i> en el Hospital Universitario Ramón y Cajal de Madrid.....	67
4.2 Identificación Bacteriana y Sensibilidad Antibiótica.....	73
4.2.1- Test de Hogde.....	78
4.3 Genes de Virulencia.....	79
4.4 PFGE .....	84
4.5 MLST .....	87
4.6 Estudio del Lipopolisacárido.....	93
4.7 Adhesión e Invasión.....	96
4.8 Discusión General.....	97
<b>5- CONCLUSIONES</b> .....	<b>105</b>
<b>6- BIBLIOGRAFÍA</b> .....	<b>111</b>



## **Abreviaturas**

**ADN:** Acido desoxirribonucleico

**AerA:** gen Aerolisina (hemolisina)

**AMPc:** Adenosín monofosfato cíclico

**ARN:** Ácido Ribonucleico

**Caco-2:** Células humanas provenientes de carcinoma de colon

**CphA:** Cefalosporinasa

**dNTP:** Desoxinucleótido Trifosfato

**EDTA:** Ácido etilendiaminotetraacético

**Factor C3b:** Convertasa de la vía clásica del complemento, llamada también C4b2a

**GLcN:** Glucosamina

**HAPs:** proteínas asociadas a flagelos

**IL-1:** Interleuquina 1

**IMiH:** imipenem

**LOS:** Lipooligosacárido

**LPS:** Lipopolisacárido

**MLST:** MultiLocus Sequence Typing; Tipificación multilocus de secuencias

**PCR:** Polymerase Chain Reaction; Reacción en Cadena de la Polimerasa

**PFGE:** Pulse-Field Gel Electrophoresis; Electroforesis en geles de campo pulsado

**SDS-Page:** Gel de acrilamida con dodecil sulfato sódico

**SSIII:** Sistema de secreción tipo III

**TNF:** Factor de necrosis tumoral

## **Listado de Tablas**

**Tabla 1.** Cebadores utilizados para detectar la presencia de genes de virulencia.

**Tabla 2.** Cebadores y condiciones utilizados en la técnica de MLST (Martino *et al.*, 2011).

**Tabla 3.** Descripción de los 6 aislados clínicos utilizados en los ensayos de adhesión/invasión.

**Tabla 4.** Porcentajes de resistencia a los antibióticos en las cepas de *Aeromonas* aislados de los 3 orígenes. Las casillas vacías representan una ausencia de resistencia

**Tabla 5.** Porcentajes de los genes de virulencia en las cepas de *Aeromonas* para cada origen y especie.

**Tabla 6.** Alelos de MLST identificados en las 15 cepas estudiadas. En negrita se señalan los nuevos alelos detectados.

## **Listado de Figuras**

**Figura 1.** Clasificación del género *Aeromonas* publicada en la 1<sup>era</sup> edición del “Bergey’s Manual of Systematic Bacteriology” 1984.

**Figura 2.** Taxonomía actual de *Aeromonas* (Albarral, 2003).

**Figura 3.** Diversidad genética del género *Aeromonas*. En círculo rojo se marcan las especies aisladas en este estudio (Miñana-Galbis *et al.*, 2009).

**Figura 4.** Crecimiento de una cepa de *A. hydrophila* en agar sangre.

**Figura 5.** Esquema de la patogénesis de *Aeromonas* (adaptada de Albarral, 2013).

**Figura 6.** Sistema flagelar en *Aeromonas*: a) Flagelos laterales b) Flagelos polares (Kirov *et al.*, 2002).

**Figura 7.** Tinción lámina S de *A. hydrophila* (Noonan, 1997).

**Figura 8.** Estructura y disposición del LPS en la membrana de las bacterias Gram-negativas (Jiménez, 2008).

**Figura 9.** Esquema de trabajo de Maldi-Tof MS (Bruker, Alemania).

**Figura 10.** Sistema Wider con resultados de un panel de microdilución en la pantalla del ordenador.

**Figura 11.** Test de Hodge negativo en una cepa de *A. hydrophila*.

**Figura 12.** Esquema de la Electroforesis de Campo pulsado (PFGE). En la parte izquierda del dibujo se representa la electroforesis alternante y en la parte derecha el patrón de bandas de un gel después de haberlo teñido en bromuro de etidio.

**Figura 13.** Distribución de las especies de *Aeromonas* detectadas en las muestras clínicas.

**Figura 14.** Diferenciación de las muestras clínicas con aislados de *Aeromonas* durante el período 1996-2014 en el Hospital Universitario Ramón y Cajal.

**Figura 15.** Distribución proporcional de las especies de las 40 cepas de la colección según su origen.

**Figura 16.** Especies de *Aeromonas* aisladas en cada uno de los tres orígenes para las 40 cepas de la colección.

**Figura 17.** Placa del sistema semiautomático wider inoculada con una cepa de *A. bestiarum*. En rojo se destaca que la identificación que proporciona el sistema fue *A. hydrophila*.

**Figura 18.** Test de Hodge con control positivo (+), control negativo (-) y dos cepas de *A. veronii* ambiental. La cepa 10 es positiva.

**Figura 19.** Actividad hemolisina en placa de agar nutritivo con sangre de carnero (A) y con sangre humana (B). Se puede observar mayor hemólisis en la placa con sangre de carnero.

**Figura 20.** Dendrograma realizado con el software Phoretix 5.0 y el índice de similitud de Dice para analizar la relación genética entre los patrones de bandas obtenidos con PFGE. Exceptuando un clon de dos cepas de *A. veronii* de Túnez y dos *A. salmonicida* de aguas (ambas señaladas en rojo), no existe ninguna relación entre las cepas.

**Figura 21.** Diversidad genética para cada alelo de MLST.

**Figura 22.-**Análisis de los 6 alelos concatenados de las quince cepas de *Aeromonas*.

**Figura 23.** Diversidad genética de los registros en la base de datos de MLST en círculos grises se señala las quince cepas de nuestra colección.

**Figura 24.** Gel de acrilamida teñido con plata con la extracción de LPS de las 14 cepas estudiadas. El último carril corresponde al marcador de peso molecular. Se observa una gran variabilidad en los patrones de bandas, que son más numerosas en las cepas invasivas de bacteriemias.

**Figura 26.** Adhesión de 6 cepas a células intestinales Caco2 diferenciadas. Destaca la gran capacidad de adherencia de la cepa 28.







# **Introducción**



En las últimas décadas se ha reconocido al género *Aeromonas* como un patógeno emergente causante de cuadros gastrointestinales graves para el hombre y los animales (Chopra y Houston, 1999; Janda *et al.*, 2010). Se han publicado nuevos estudios que amplían el conocimiento de su taxonomía, de los factores asociados a su virulencia, así como también, de la resistencia a los antibióticos que pueden presentar, especialmente en las especies causantes de infecciones graves como *Aeromonas hydrophila*, *Aeromonas caviae* y *Aeromonas veronii* subsp. *sobria* (Albarral 2013; Ghenghesh *et al.*, 2014; Fatima *et al.*, 2013).

El verdadero papel de *Aeromonas* como agente causal de gastroenteritis humana es controvertido porque presenta una baja incidencia y no existe un modelo animal para reproducir esta enfermedad. Sin embargo, en los últimos años han aumentado considerablemente los casos de diarrea del viajero producidas por *Aeromonas* (Ghenghesh *et al.*, 2014; Chao *et al.*, 2014) y se ha demostrado la capacidad de algunas cepas de producir una enterotoxina citolítica, que se corresponde con una beta-hemolisina (Tequianez *et al.*, 2005; Janda *et al.*, 2010).

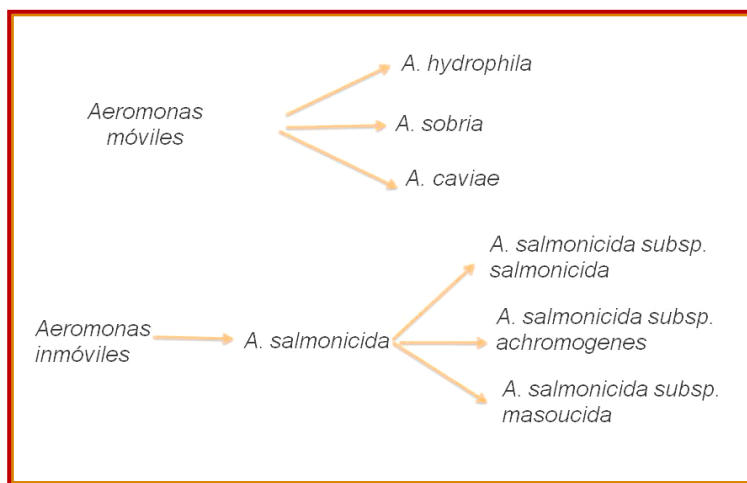
Por el contrario, la prevalencia de *Aeromonas* en el medio ambiente en general es bastante elevada, y existen evidencias epidemiológicas que demuestran que muchas de las infecciones son adquiridas a través del consumo de agua y/o alimentos contaminados (Chopra y Houston, 1999; Janda *et al.*, 2010; Carvalho *et al.*, 2012).

En la clínica humana, se han aislado cepas de *Aeromonas* causando cuadros gastrointestinales de diarrea, procesos infecciosos graves como bacteriemias y con menor frecuencia en heridas, endocarditis, meningitis y neumonías (Tequianez *et al.*, 2005; Rodríguez *et al.*, 2005; Fátima *et al.*, 2013; Grim *et al.*, 2013).

También se han caracterizado molecularmente factores de virulencia que pueden determinar su enteropatogenicidad, principalmente citotoxinas, enterotoxinas, hemolisinas, proteasas, gelatinasas, ADNasas y otros (Ghenghesh *et al.*, 2014; Grim *et al.*, 2013). Todo ello justifica la patogenicidad de determinadas cepas.

## 1.1 Evolución Histórica del Género *Aeromonas*

Muchos microorganismos en los que posteriormente se confirmaría su pertenencia al género *Aeromonas* fueron inicialmente clasificados en otro géneros como *Proteus*, *Pseudomonas*, *Escherichia*, *Achromobacter*, *Flavobacterium*, *Necromonas* y *Vibrio* (Farmer *et al.*, 2006). En la octava edición del “Bergey’s Manual of Determinative Bacteriology” (Schubert, 1974) se reubicó el género *Aeromonas* desde la familia *Pseudomonadaceae* a la familia *Vibrionaceae*. En esta publicación, el género *Aeromonas* se dividía en tres especies y cada una de ellas en distintas subespecies. Posteriormente, en 1984, se publicó una nueva clasificación que se refleja en la **Figura 1** (Popoff, 1984).



**Figura 1.** Clasificación del género *Aeromonas* publicada en la primera edición del “Bergey’s Manual of Systematic Bacteriology” en 1984.

El género *Aeromonas* se mantuvo dentro de la familia *Vibrionaceae* junto con los géneros *Vibrio*, *Photobacterium* y *Plesiomonas* hasta que Colwell en 1986 demostró, a partir del análisis de secuencias de los genes 16S ARNr y 5S ARNr y de estudios de hibridación ADN-ADN, que en realidad constituye una rama filogenética diferente y elevó el estatus de género a familia, creando la familia *Aeromonadaceae*. La última edición del “Bergey’s Manual of Systematic Bacteriology” (Martin-Carnahan y Joseph, 2005) incluye el género *Aeromonas* dentro de la familia *Aeromonadaceae* y de un nuevo orden denominado Aeromonadales, este nuevo orden incluye las familias *Succinivibrionaceae* y *Aeromonadaceae*, esta última con los géneros *Aeromonas*, *Oceanimonas* y *Tolumonas*.

## **1.2 Características Generales**

Los miembros del género *Aeromonas* son bacilos Gram-negativos, oxidasa y catalasa positivos y anaerobios facultativos, con forma de bacilos o cocobacilos con extremos redondeados, y un tamaño de entre 1 y 3,5 µm de diámetro. Todas las especies, a excepción de *A. salmonicida*, son móviles por flagelación polar y no forman endosporas. Fermentan la glucosa y numerosos hidratos de carbono con producción de ácido y gas, reducen el nitrato a nitritos, son resistentes al agente vibriostático O/129 y no requieren ClNa para su crecimiento (Sen *et al.*, 2004; Janda y Abbott, 2010; Chao *et al.*, 2014).

Algunas especies de *Aeromonas* son productoras de exoenzimas como: proteasas, ADNasas, ARNsas, elastasas, lecitinasas, amilasas, gelatinasas y lipasas entre otras. Su temperatura mínima de crecimiento es de 4°C y la máxima de 45°C, siendo 30°C la temperatura óptima con un pH de entre 4,5 y 9,0. Su porcentaje de

guanina/citosina fluctúa entre 57 y 64% (Janda y Abbot, 1998; Sen y Roger, 2004; Grim *et al.*, 2013).

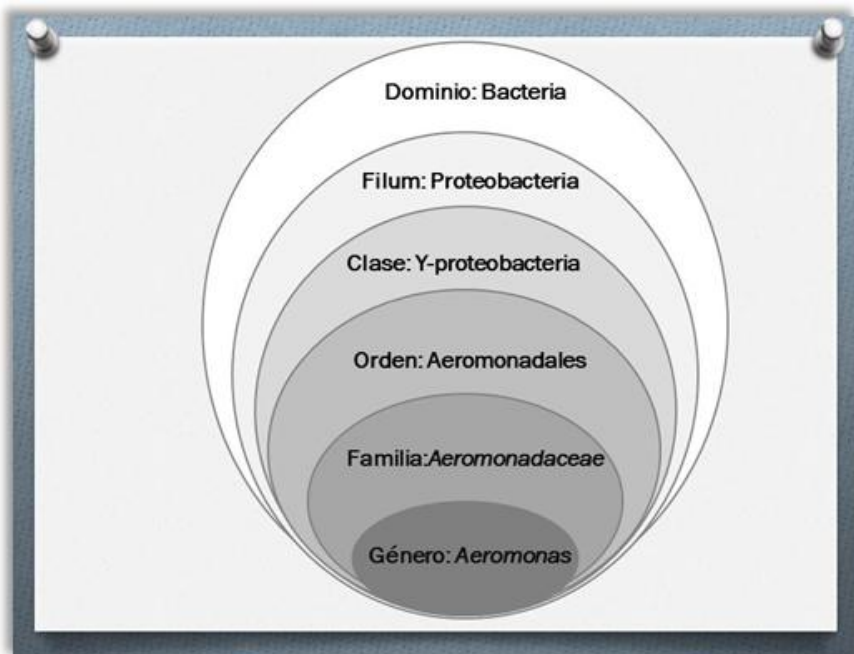
### 1.3 Ecología

*Aeromonas* tiene una amplia distribución en numerosos ecosistemas, aunque generalmente está en relación con el medio acuático, incluyendo todo tipo de aguas (dulces, saladas y/o estancadas) (Miranda y Castillo, 1998; Rodríguez, 2005, Janda y Abbott 2010, Lu *et al.*, 2015). Es un patógeno animal, especialmente en los poiquiloterms, incluyendo anfibios, peces y reptiles (Carnahan *et al.*, 1991; Lu *et al.*, 2015), y animales endotermos, incluyendo a los humanos (Janda y Abbot 2010; Boltaña *et al.*, 2014; Korkoca *et al.*, 2014). La especie psicrófila *A. salmonicida* es un importante patógeno de salmónidos produciendo en los mismos la enfermedad conocida como forunculosis sistémica (Austin *et al.*, 1998; Padra *et al.*, 2014; Romstad *et al.*, 2014) y otras especies causan numerosas patologías en peces de acuicultura (Romstad *et al.*, 2014).

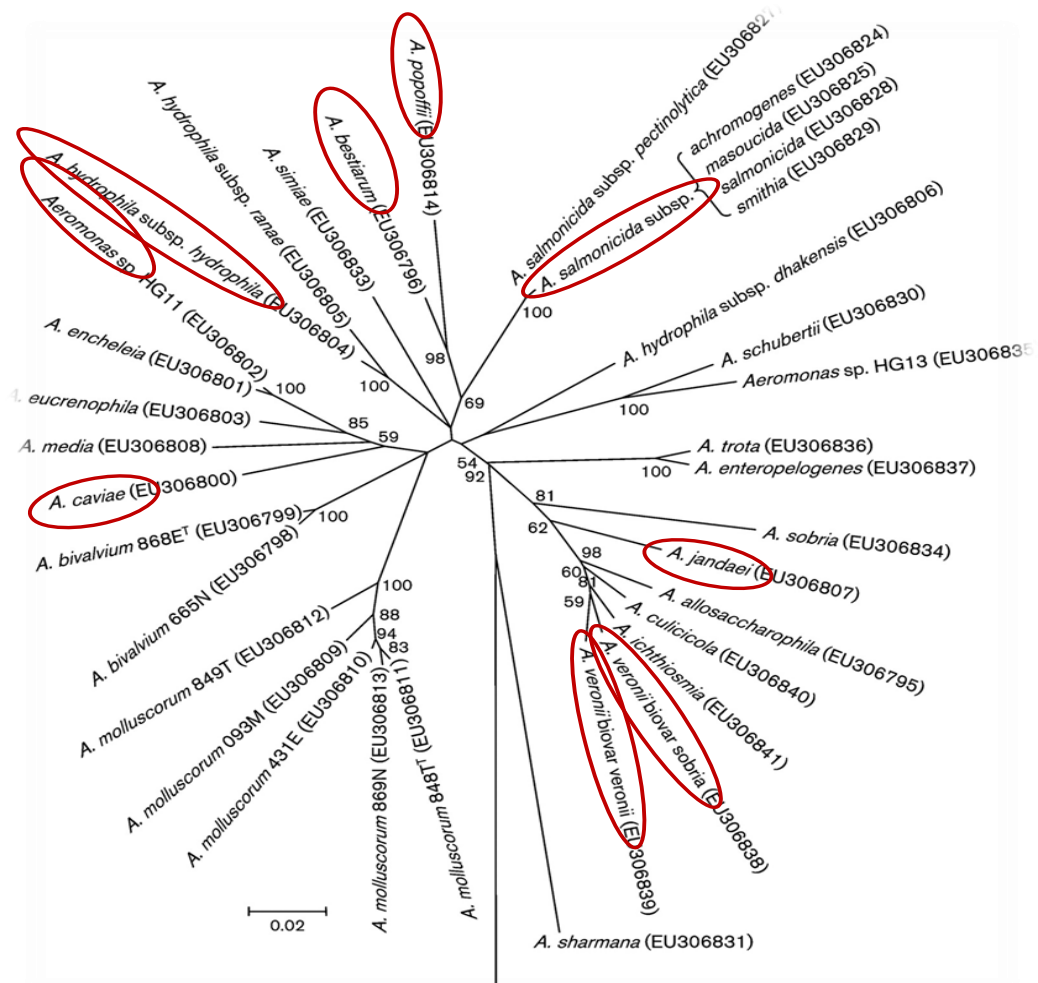
Se ha detectado la presencia de *Aeromonas* en distintos alimentos, como la carne (ternera, oveja, cerdo, pollo), los vegetales, los huevos, el pescado, los mariscos y los alimentos preparados, los productos lácteos y la pastelería (Soler, 2003; Ghenghesh *et al.*, 2014; Hussain *et al.*, 2014). Su presencia en estos alimentos se considera una contaminación a través del agua. Se han aislado cepas portadoras de gran variedad de factores de virulencia en sistemas municipales de tratamientos de agua potable asociados a núcleos urbanos (Cabrera, 2007; Robertson *et al.*, 2014).

## 1.4 Taxonomía

La clasificación taxonómica del género *Aeromonas* es muy compleja, ya que desde hace más de 15 años numerosos grupos de investigación han descrito nuevas especies y reclasificado otras. *Aeromonas aquariorum* se considera que es un sinónimo posterior de *A. hydrophila* subsp. *dhakensis*, y se ha propuesto que esta subespecie se eleve a especie, denominándose *A. dhakensis* (Martínez-Murcia *et al.*, 2009; Beaz-Hidalgo *et al.*, 2013). Según datos obtenidos por Albarral en el 2013, la clasificación actual de *Aeromonas* es la que se muestra en la **Figura 2**. Este género además muestra una gran diversidad genética que representa en la **Figura 3**. Las nueve especies estudiadas en este trabajo se han destacado con un círculo rojo.



**Figura 2.** Taxonomía actual de *Aeromonas* (Adaptada de Albarral, 2013).



**Figura 3.** Diversidad genética del género *Aeromonas*. En círculo rojo se marcan las especies aisladas en este estudio (adaptada de Miñana-Galbis *et al.*, 2009).

### 1.5 Patogenicidad y Epidemiología

Algunas especies de *Aeromonas* son de interés clínico por causar diferentes infecciones, tanto en animales como en personas, y por ser consideradas como patógenos oportunistas emergentes.



En los últimos años *Aeromonas* está adquiriendo importancia como patógeno entérico causante de diarreas, aunque también son responsables de cuadros de septicemia en inmunodeprimidos, infecciones en heridas, peritonitis, meningitis, infecciones oculares, de articulaciones y huesos (Janda y Abbott, 2010; Grim *et al.*, 2013; Rather *et al.*, 2014; Hee Shin *et al.*, 2015).

## **1.6 Infecciones por *Aeromonas***

### **1.6.1 Infecciones en Animales**

El género *Aeromonas* ha estado relacionado con infecciones en animales predominantemente poiquilotermos, incluyendo varias especies de peces, anfibios y reptiles, desde sus primeros aislamientos en ranas con septicemia y peces enfermos (Schubert, 1967a; 1967b; Romstad *et al.*, 2014; Padra *et al.*, 2014; Lu *et al.*, 2015).

Diversas especies del género son consideradas agentes etiológicos de numerosas patologías en peces de interés en acuicultura, causando infecciones que suponen importantes pérdidas económicas (Austin *et al.*, 1998; Janda *et al.* 1991; Janda *et al.*, 2010).

*A hydrophila* y *A jandaei* son causantes de aeromoniasis en especies de peces cultivadas en zonas templadas, como la anguila, la carpa o el pez gato (Jiménez 2008; Yi *et al.*, 2013).

La aeromoniasis es una septicemia hemorrágica que se caracteriza por la presencia de pequeñas lesiones superficiales, precedidas a menudo por la pérdida de escamas, hemorragias en agallas y ano, úlceras, abscesos, exoftalmia (ojos saltones) y

distensión abdominal y a nivel interno, se puede observar anemia e inflamación de hígado y riñón (Figueras, 2013).

## **1.6.2 Infecciones en Humanos**

Las cepas del género *Aeromonas* son causantes de numerosas infecciones tanto intestinales como extraintestinales, que van desde enfermedades leves, como la gastroenteritis aguda, a otras que pueden llegar a comprometer la vida del sujeto, como septicemia, fascitis necrotizante y mionecrosis (Janda y Abbott, 2010). También se han descrito infecciones intra-abdominales, oculares y osteomielitis (Gunasekaran *et al.*, 2009; Sahain y Barut, 2010; Gómez-Garcés *et al.*, 2011).

### **1.6.2.1 Infecciones Gastrointestinales**

El primer aislamiento documentado de *Aeromonas* en heces data de 1961, aunque en 1954 ya se había aislado *Aeromonas* como agente causal de miositis en una mujer jamaicana (Isoken *et al.*, 2012). Si bien *Aeromonas* es agente causal de diarreas, su papel como enteropatógeno no está claro, debido a la existencia de portadores asintomáticos, a los escasos brotes epidémicos documentados (Altwegg y Geiss, 1989; Von Graevenitz, 2007) y a que no cumple los postulados de Koch, debido a que no existe un modelo que pueda reproducir fielmente la diarrea asociada a *Aeromonas* (Janda y Abbott, 2010).

En los brotes epidémicos causados por *Aeromonas* es muy difícil localizar el foco de la infección, ya que se encuentran en aguas,

alimentos y suelos. Las infecciones por *Aeromonas* se adquieren principalmente por consumo de agua o alimentos contaminados (Carvalho *et al.*, 2012). Son pocos los brotes epidémicos documentados ya que las gastroenteritis causadas por *Aeromonas* suelen ser autolimitadas y no son de declaración obligatoria, aunque en ocasiones pueden prolongarse durante más de dos semanas pudiendo llegar a ser crónica. Una pequeña parte de los enfermos sufren náuseas, vómitos, fiebre y calambres abdominales, en cambio un tercio de los enfermos sufren colitis (Liesenfeld *et al.*, 1993; Von Graevenitz, 2007; Luca *et al.*, 2011; Tomás, 2012).

#### **1.6.2.2 Bacteriemias**

La principal infección invasiva producida por *Aeromonas* es la bacteriemia, y más del 80% de los casos se producen en enfermos inmunodeprimidos principalmente con trastornos mieloproliferativos o enfermedad hepática crónica (Wu *et al.*, 2007; Luca *et al.*, 2011; Tomás, 2012).

Los síntomas más comunes asociados con bacteriemia causada por *Aeromonas* incluyen fiebre, ictericia, disnea, dolor abdominal y shock séptico. Durante la bacteriemia también pueden aparecer cuadros diarreicos en un porcentaje muy pequeño de casos. La mayoría de estas infecciones son monomicrobianas (Janda y Abbott, 2010; Spadaro *et al.*, 2014).

En la **Figura 4** se muestra una cepa de *A. hydrophila* aislada en agar sangre, medio que permite identificar la existencia de hemólisis.



**Figura 4.** Crecimiento de una cepa de *A. hydrophila* en agar sangre.

### **1.6.2.3 Infecciones de Piel y Tejidos Blandos**

Las heridas infectadas son la manifestación más común de las infecciones de tejidos blandos causadas por *Aeromonas* y a menudo están asociadas con infecciones polimicrobianas junto con *Enterococcus*, *Clostridium* y otras enterobacterias (Chao *et al.*, 2012; Spadaro *et al.*, 2014). Estas heridas pueden ser superficiales, generar forunculosis o ser profundas con afectación muscular, de tendones, articulaciones y huesos. En personas sanas la infección se produce por contacto con aguas, suelos u objetos contaminados (Chao *et al.*, 2012).

El síndrome urémico hemolítico ocurre cuando una infección en el aparato digestivo produce sustancias tóxicas que destruyen los glóbulos rojos, causando anemia hemolítica, trombocitopenia y daño renal agudo. Este síndrome es producido por la toxina Shiga, típica de *Shigella dysenteriae* y de *E. coli* O157:H7, pero también se ha descrito

en cepas *Aeromonas* que han adquirido la capacidad de producir la toxina Shiga (Figueras *et al.*, 2007; Alperi y Figueras, 2010).

#### **1.6.2.4 Infecciones Nosocomiales y otras Situaciones**

La infección hospitalaria o nosocomial se define como aquella que se adquiere durante la estancia hospitalaria del paciente, y cuya detección no ocurre hasta pasadas las 48 horas del ingreso. Dickson *et al.*, 1984; Mercer *et al.*, 1987; Llopis *et al.*, 2004). Se ha descrito un caso de mionecrosis y shock séptico después de la aplicación de sanguijuelas tras realizar una cirugía reconstructiva. A pesar de que se ha demostrado que éstos ectoparásitos están constantemente colonizados por *Aeromonas* se siguen utilizando para la descongestión vascular post cirugía plástica (Rodríguez, 2005; Grim *et al.*, 2013).

En las últimas inundaciones en Nueva Orleans, producto del huracán Katrina, la frecuencia de los aislamientos por *Aeromonas* aumentó considerablemente, representando un problema de Salud Pública (Tomás, 2012).

Su papel oportunista se ha documentado en un paciente con leucemia linfocítica crónica que desarrolló una fascitis necrotizante y un fallo multiorgánico por una infección por *A. sobria*, que finalmente causó la muerte del paciente (Spadaro *et al.*, 2014).

### **1.7 Sensibilidad a Antimicrobianos**

En los trabajos en los que se ha estudiado la sensibilidad “*in vitro*” a los antibióticos se han utilizado las especies más frecuentes como *A.*

*hydrophila*, *A. caviae* y *A. sobria*, existiendo pocos datos de las especies más infrecuentes (Skwor *et al.*, 2014). En general podemos decir que los aislados de *Aeromonas* presentan una amplia sensibilidad a las tetraciclinas y a las quinolonas, siendo *A. hydrophila* y *A. veronii* las especies que con mayor nivel de resistencia (Grim *et al.*, 2013; Skwor *et al.*, 2014).

Estudios realizados por Isoken y colaboradores en el 2012, en donde se evaluó la prevalencia de la resistencia a los antibióticos en aislados de una planta de tratamiento de aguas residuales en Sudáfrica, observaron una resistencia intrínseca para los antibióticos betalactámicos y una sensibilidad variable para otros antibióticos como ciprofloxacina, cloranfenicol, ácido nalidíxico, gentamicina y minociclina (Isoken *et al.*, 2012).

Estos autores señalaron también que la resistencia intrínseca a los beta-lactámicos se debe a la expresión de una beta-lactamasa cromosómica que confiere resistencia a ampicilina, ticarcilina y carbenicilina y un elevado porcentaje, a la cefazolina. La asociación de amoxicilina-ácido clavulánico tiene actividad variable, según el aislado; la piperacilina es más activa que las carboxi-penicilinas y su actividad no se modifica en la asociación con tazobactam (Loza *et al.*, 2003). Las cefalosporinas de segunda generación presentan una actividad variable mientras que las cefalosporinas de tercera y cuarta generación, el aztreonam y los carbapenems son activos frente a la mayoría de los aislados de esta especie. *A. hydrophila* al igual que *A. veronii* subsp. *sobria* y *Aeromonas jandaei*, entre los aislados clínicos más estudiados, produce tres beta-lactamasas cromosómicas inducibles genéticamente y co-reguladas: una cefalosporinasa, CepH, del grupo 1 (pI: 6,6; clase molecular C); una penicilinasasa, AmpH, del grupo 2d (pI: 8,0; clase molecular D) y una carbapenemasa, ImiH, metalo-betalactamasa del grupo 3 (pI: 8,9 clase molecular B subgrupo B2). En condiciones normales (ausencia de inducción/hiperexpresión)

el nivel de expresión de estas enzimas es bajo. Las tres beta-lactamasas de *A. hydrophila* se caracterizan por tener un espectro hidrolítico reducido, no superponible, pero la suma de sus actividades, si es elevada, determina un espectro de resistencia global a todos los beta-lactámicos (Dias *et al.*, 2014).

### **1.7.1 Características Principales de la Metallo-Beta-Lactamasa ImiH (CphA)**

Esta enzima es responsable de la resistencia a los carbapenems y puede estar presente en aislados de *A. hydrophila*, *A. veronii* bv. *sobria*, *A. veronii* bv. *veronii*, y *A. jandaei*, mientras que nunca se ha descrito en *A. caviae*, *Aeromonas trota* y *Aeromonas shubertii* (Loza *et al.*, 2003; Isoken *et al.*, 2012).

Las propiedades catalíticas de ImiH (nombre que recibe en *A. hydrophila*) demuestran un perfil de sustrato reducido (esta beta-lactamasa ha sido definida como “specific carbapenemase”) que determina la hidrólisis exclusiva de los carbapenems con una escasa o incluso nula actividad frente a las penicilinas, las cefalosporinas y los monobactams. Esta carbapenemasa es una metalo-beta-lactamasa (clase molecular B, subclase B2) que se inhibe por EDTA y que requiere un solo ión  $Zn^{+2}$  como cofactor. No hidroliza la nitrocefina, o lo hace débilmente, por lo que este compuesto no debe utilizarse para su detección (Loza *et al.*, 2003).

### **1.8 Factores de Virulencia y Mecanismos de Patogenicidad**

La virulencia o patogenicidad se define como la capacidad de un microorganismo para causar infección, mientras que un factor de virulencia es el producto del microorganismo que contribuye a su

virulencia o patogenicidad (Espinoza 2007). A pesar de que las infecciones son un proceso de multietapas, los factores de virulencia pueden clasificarse en 3 tipos:

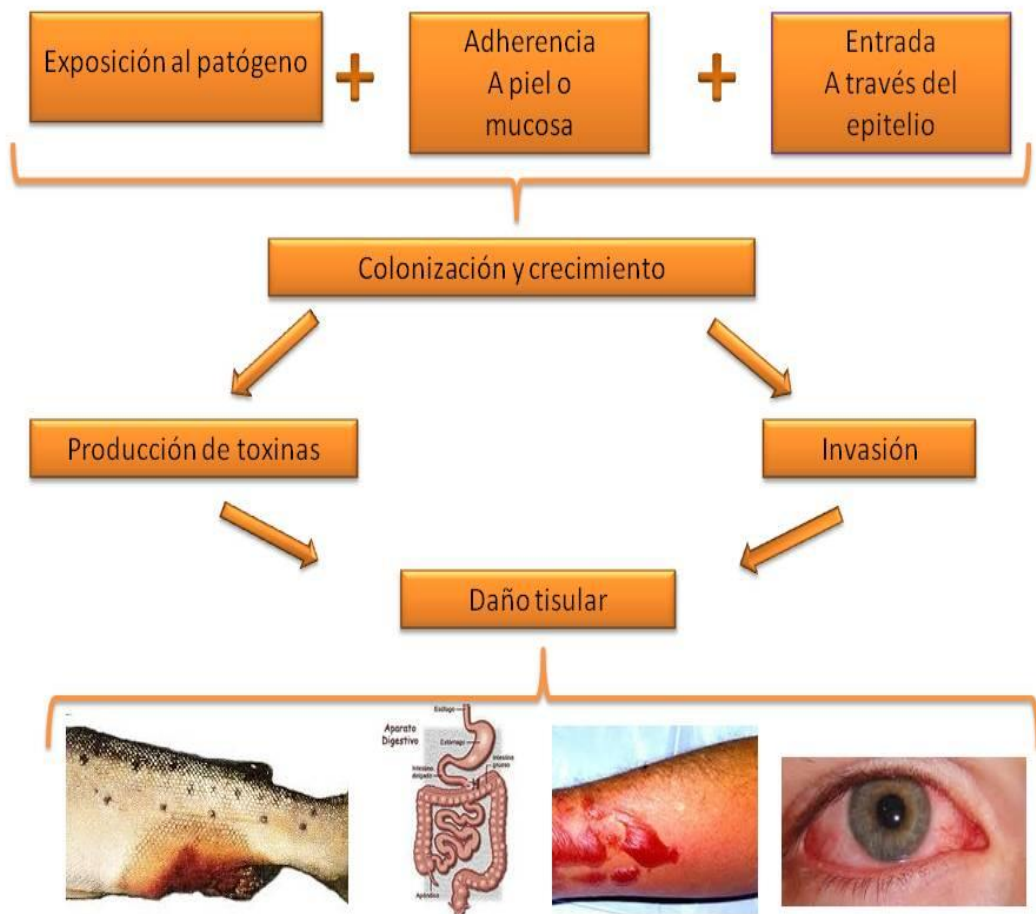
- a) Factores que promueven la colonización e invasión del huésped.
- b) Factores que contribuyen a evadir la acción inmunitaria del huésped.
- c) Factores que causan daño al huésped, ya sea por toxicidad directa o indirecta induciendo una respuesta inflamatoria.

Mientras que los factores que pertenecen a la categoría 1ª o 2ª son capaces de aumentar la probabilidad de infección, los factores pertenecientes a la 3ª categoría determinan la severidad de ésta infección (Salyers, 1994).

La presencia de factores de virulencia en aislados de *Aeromonas* es ampliamente conocido, sin embargo aún se desconoce el mecanismo por el que se produce la patogénesis. La variedad de manifestaciones clínicas observadas en las infecciones causadas por *Aeromonas* concuerda con la idea de que la patogenicidad de estos microorganismos es multifactorial (Yu *et al.*, 2004; Tomás, 2012).

Los factores de virulencia descritos para este género incluyen tanto componentes estructurales como productos extracelulares (Pemberton *et al.*, 1997; Janda y Abbott, 2010; Aravena *et al.*, 2014). En la **Figura 5** se observa la patogénesis de *Aeromonas*, la cual comienza con la exposición al patógeno, adherencia a la piel o mucosa del huésped y entrada a través de su epitelio, esto con lleva a la colonización del microorganismo, el cual termina produciendo toxinas por un lado e invadiéndolo por el otro, para así provocar finalmente un daño a nivel tisular (Albarral, 2013).





**Figura 5.** Esquema de la patogénesis de *Aeromonas*.  
(Adaptada de Albarral 2013).

### 1.9 Productos Extracelulares

La interacción entre las bacterias patógenas y las células huésped viene dada, además de por los componentes estructurales de éstas bacterias, por enzimas y toxinas que son secretadas al espacio extracelular (Soler 2003; Rodríguez *et al.*, 2005; Tomás, 2012). En *Aeromonas* existen varias enzimas y toxinas que son características,

entre las cuales cabe destacar las proteasas, lipasas/fosfolipasas, enolasas, ADNasas, enterotoxinas, hemolisinas, gelatinasas, citotoxina enterotóxica, sistema de secreción tipo III (T3SS) entre otras (Grim *et al.*, 2013).

No todas las cepas del género *Aeromonas* producen la totalidad de toxinas descritas hasta la fecha, además, aunque ciertas cepas posean genes que codifiquen para una toxina en concreto, éste solo se expresa bajo ciertas determinadas condiciones de crecimiento (Gavín, 2003; Rodríguez *et al.*, 2005; Ghenghesh *et al.*, 2014).

Las hemolisinas fueron descritas inicialmente en *E. coli* y *Vibrio cholerae* (Wake y Yamamoto, 1966). En *Aeromonas* se han descrito dos tipos de hemolisinas, una  $\alpha$ -hemolisina que se produce principalmente a 22°C y que es incapaz de lisar completamente los eritrocitos y una  $\beta$ -hemolisina que lisa a los eritrocitos de diferentes especies animales y que se produce en mayor cantidad a 37°C. La aerolisina es el prototipo de  $\beta$ -hemolisina para el género y fue caracterizada y parcialmente purificada en el año 1974, por Bernheimer y Avigad. El gen estructural se conoce como *aerA* y fue clonado y secuenciado por primera vez por Howard y Buckley 1987.

La  $\beta$ -hemolisina ha sido designada como AHH1 (Hirono y Aoki, 1991; Wang *et al.*, 2003), cuya secuencia presenta una elevada similitud con la proteína HlyA de *V. cholerae* y podría funcionar formando canales (Wong *et al.*, 1998). Las  $\alpha$ -hemolisinas producidas durante la fase estacionaria del crecimiento causan efectos reversibles y lisis completa de los eritrocitos, pero no se han relacionado con propiedades enterotoxigénicas (Thelestam y Ljungh, 1981; Robertson *et al.*, 2014).

En cuanto al efecto enterotóxico de las *Aeromonas*, éste es regulado por el gen *act*, el cual fue caracterizado a partir de una cepa de *A. hydrophila*, y la proteína presentaba un peso molecular de 52 kDa con actividad hemolítica, lipolítica, citotóxica y enterotóxica, y producía la muerte en ratones (Castro-Escarpulli *et al.*, 2002; Grim *et al.*, 2013). A nivel de ADN existe un 75% de homología entre el gen *aerA* y el gen *act*, sin embargo la región 5' de ambas secuencias presentan muchas diferencias (Chopra *et al.*, 1993; Soler, 2003). La activación de la toxina *act* es idéntica a la de la aerolisina, la enterotoxina se une al grupo 3'OH del colesterol en la membrana del huésped, momento en el cual la toxina se convierte en termoestable (Soler, 2003).

Por otro lado, Ferguson *et al.*, (1997), han descrito la enterotoxina citotóxica *act* de *A. hydrophila*, que ha sido implicada en el incremento del factor de necrosis tumoral (TNF) y en la producción de interleuquinas (IL-1) por los macrófagos o las células epiteliales intestinales, capacidad que puede ser responsable de la patogenicidad que muestre el intestino delgado afectado con *Aeromonas* (Castro-Escarpulli *et al.*, 2002; Cabrera, 2007).

Las enzimas de tipo citotónicas presentan un sistema de actuación similar al de la toxina colérica, aumentando los niveles del adenosín monofosfato cíclico (AMPc) y prostaglandinas en las células del epitelio intestinal (Chopra *et al.*, 1992). En *Aeromonas* se han descrito diversas enterotoxinas que presentan diferentes pesos moleculares y una reactividad variable con la antitoxina colérica (Chakraborty *et al.*, 1984; Potomski *et al.*, 1987; McCardell *et al.*, 1995). Estas enterotoxinas se dividieron en dos tipos: termolábiles (56°C durante 10 minutos) sin reactividad cruzada con la toxina colérica, y termoestables (100°C durante 30 minutos) que reaccionan con la antitoxina colérica (James *et al.*, 1982; Chang *et al.*, 2008).

El sistema de secreción de tipo III (T3SS) es un sistema de transporte de proteínas bacterianas, denominadas efectores, al citoplasma de las células hospedadoras. Las moléculas efectoras llevan a cabo una amplia gama de actividades bioquímicas y modulan la función de moléculas reguladoras cruciales para la célula hospedadora, de manera que son capaces de alterar el citoesqueleto o interferir en las cascadas de señalización intracelular (Vilches, 2008).

Se han identificado cuatro proteínas efectoras del sistema de secreción tipo III (T3SS) en *A. salmonicida*, Aext, AopP, AopH (Braun *et al.*, 2002; Dacanay *et al.*, 2006; Ferh *et al.*, 2006), y una en la cepa AH-3 y SSU de *A. hydrophila*, Aext y Aext-like (o AexU), respectivamente (Vilches *et al.*, 2008). La proteína Aext es una toxina bifuncional homóloga de los efectos bifuncionales ExoT/ExoS de *Pseudomonas aeruginosa*, que presenta actividad ADP-ribosiltransferasa y GAP (*GTPase activating protein*) (Vilches *et al.*, 2009).

Se ha caracterizado un T3SS funcional en *A. salmonicida* (Burr *et al.*, 2002; Burr *et al.*, 2003), el cual se halla codificado en un plásmido termolábil, y en las cepas AH-1, AH-3 y SSU, también se ha observado que es un factor importante para su patogenicidad, viéndose reducida su virulencia al inactivar algunos genes, tanto en modelos animales como en cultivos celulares (Sha *et al.*, 2005; Vilches, 2008).

El gen *ascV* de *A. salmonicida* subsp *salmonicida* codifica un componente de la membrana interna del T3SS, y sus delección anula la secreción de la toxina Aext (Burr *et al.*, 2002). Así mismo se ha estudiado la presencia de T3SS en diferentes cepas, ambientales y clínicas, de *Aeromonas* spp, y se ha observado una mayor frecuencia en *A. veronii* y *A. hydrophila* respecto a *A. caviae*. (Vilches *et al.*, 2004). Finalmente, podemos decir a modo de resumen que la

virulencia de *Aeromonas* es compleja y multifactorial (Soler, 2003; Cabrera, 2007; Ghenghesh *et al.*, 2014).

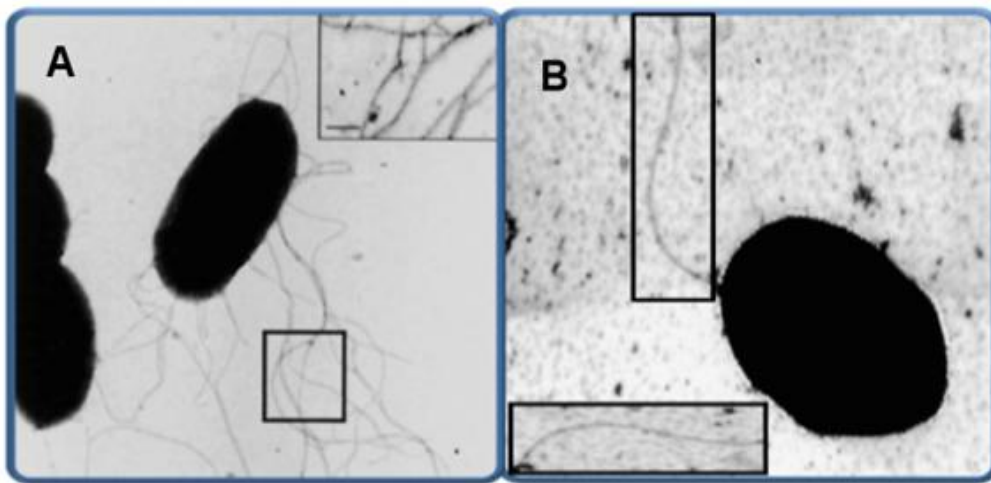
### **1.10 Componentes Estructurales**

La adhesión de las bacterias a los tejidos del huésped es un paso crítico en la fase inicial de las infecciones causadas por muchos microorganismos. Las bacterias se adhieren a los tejidos y células del huésped y alteran sus mecanismos de defensa iniciando así la colonización. Los componentes estructurales más estudiados en *Aeromonas* que se han involucrado en el proceso de adhesión y patogenicidad son los flagelos, los pili, la cápsula, la capa S, el lipopolisacárido (LPS), y las proteínas de la membrana externa (OMP) (Tomás, 2012). Las principales características de cada componente se describen a continuación.

#### **1.10.1 Flagelos**

Los flagelos son las principales estructuras responsables del movimiento de las bacterias, éstos se componen de un filamento, un gancho y un cuerpo basal. El filamento se une al gancho mediante proteínas asociadas (HAPs), que al mismo tiempo se acoplan al motor localizado en el cuerpo basal, la biosíntesis de la estructura completa y la rotación del filamento requiere aproximadamente 40 genes (Cabrera, 2007). La presencia de flagelos laterales confiere a las bacterias una movilidad de tipo rápido o pululante "swarming", propiedad que les permite moverse en superficies sólidas, y que se han asociado a la formación de biofilms y a la virulencia de las bacterias (Albarral, 2013).

Las *Aeromonas* mesófilas expresan constitutivamente un único flagelo polar y, en un 50-60% de las cepas asociadas a procesos diarreicos, se observa también la expresión de flagelos laterales (Kirov *et al.*, 2002; Gavín *et al.*, 2002). El flagelo polar permite la movilidad por natación (swimming) en ambientes líquidos, mientras que los flagelos laterales son responsables de la movilidad en crecimientos en medios sólidos o semisólidos (Jiménez *et al.*, 2009). En la **Figura 6** se observa el sistema flagelar en *Aeromonas*, múltiples flagelos laterales y un flagelo polar.



**Figura 6.** Sistema flagelar en *Aeromonas*. A) Flagelos laterales B) Flagelos polares (Kirov *et al.*, 2002).

La presencia del flagelo y su movilidad participan en las fases iniciales del proceso de infección, entre las que cabe destacar la adhesión a células eucariotas, la colonización del hospedador y la formación de biofilms (Merino *et al.*, 2006, Tomás, 2012).

### **1.10.2 Fimbrias o Pili (adhesinas filamentosas)**

Los pilis son estructuras que al igual que los flagelos tienen función de adherencia a otras bacterias o a la célula huésped. Estas estructuras se forman a partir de subunidades proteicas llamadas pilinas y pueden ser diferenciadas del flagelo porque tienen un diámetro menor (3-8 nm a 15-20 nm de los flagelos) y normalmente no presentan una estructura enrollada, los pilis de tipo IV (familia BFP) han sido los más estudiados en *Aeromonas* y se ha determinado que éstos son importantes para la colonización intestinal, implicados en las primeras fases de adhesión a células intestinales, éstas se han encontrado en cepas de origen clínico y ambiental (Jiménez *et al.*, 2008; Tomás, 2012).

En *Aeromonas* mesófilas se han descrito dos tipos de fimbrias o pili: 1) fimbrias cortas o rígidas (S/R, Short/Rigid), presentándose en un alto número por célula bacteriana, y 2) fimbrias largas y flexibles (L/W, Long, Wavy), que se encuentran en bajo número (Béchet y Blondeau, 2003, Tomás, 2012).

### **1.10.3 Cápsula**

La cápsula es una estructura formada por polisacáridos (disacáridos y trisacáridos) y polipéptidos que se encuentra recubriendo la membrana externa de la bacteria. Es importante para la supervivencia de la bacteria dentro del huésped, ya que promueve la resistencia a la acción del complemento, puede actuar como barrera frente a moléculas hidrofóbicas tóxicas como los detergentes y puede ayudar a la adherencia a otras bacterias o a los tejidos del huésped (Colwell y Carper, 1997).

La cápsula recubre la membrana externa de la bacteria, está altamente hidratada (~95% es agua) y se compone de repeticiones de monosacáridos unidos entre sí mediante enlaces glicosídicos, dando lugar a polisacáridos capsulares (CPS) que pueden ser homopolímeros o heteropolímeros (Jiménez, 2008; Tomás, 2012). Se ha descrito como un importante factor de virulencia en otras bacterias, ya que contribuye a la resistencia a la actividad del complemento y a la fagocitosis y favorece la adherencia a otras bacterias o tejidos del hospedador. Algunos CPS contienen componentes que inactivan al factor C3b, de manera que se impide la formación del complejo de ataque a la membrana. También se ha utilizado para la clasificación de las especies dentro de un mismo género debido a sus propiedades antigénicas (antígenos K) (Roberts, 1996; Jiménez, 2007, Tomás, 2012).

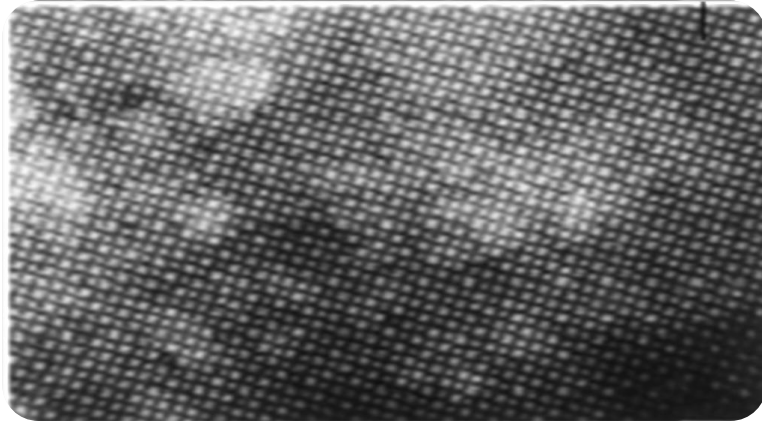
#### **1.10.4 La Capa o Lámina S**

Es una capa paracristalina que recubre la pared celular de la bacteria, protegiéndola de los mecanismos de defensa del huésped y por lo tanto facilitando la colonización del mismo. La capa o lámina S está formada por subunidades proteicas a través de los lipopolisacáridos (LPS) (Yáñez, 1998), y se ha detectado en *Aeromonas* que se asocian a patologías en humanos y que suelen causar enfermedades extraintestinales (Soler, 2003; Tequianez *et al.*, 2005; Tomás, 2012) (**Figura 7**).

Debido a su posición, cumple distintas funciones biológicas: está implicada en adhesión y protección frente a la fagocitosis, presenta propiedades antigénicas, y es el lugar de anclaje de exoenzimas hidrolíticas y receptor de bacteriófagos, entre otras (Beveridge *et al.*,



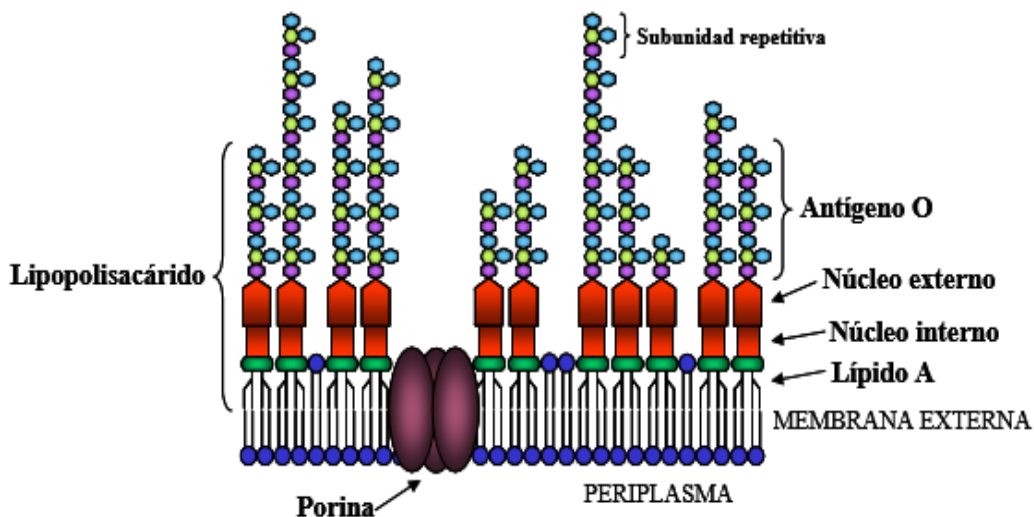
1997). Hasta el momento, todas las cepas de *Aeromonas* que poseen lámina S tienen en común la presencia de un lipopolisacárido (LPS) que contiene polisacáridos O de longitud de cadena homogénea en su superficie celular, y este hecho ha llevado a especular sobre la posible implicación del LPS en la unión de la lámina S a la superficie celular bacteriana (Kokka *et al.*, 1990; Esteve *et al.*, 2004; Tomás, 2012).



**Figura 7.** Tinción de lámina S de *A. hydrophila* (Noonan, 1997).

#### **1.10.5 Lipopolisacárido**

El lipopolisacárido (LPS), también conocido como endotoxina, es una molécula glucolipídica que representa la estructura mayoritaria de la membrana externa de la mayoría de las bacterias Gram-negativas (Funhara y Nikaido, 1980) (**Figura 8**). Es una molécula anfipática constituida por una región polisacárida (polar) unida covalentemente a una estructura lipídica (apolar), altamente conservada, denominada lípido A, que le permite el anclaje a la membrana.



**Figura 8.** Estructura y disposición del LPS en la membrana de las bacterias Gram-negativas (Jiménez, 2008).

La fracción polisacárida suele constar de 2 partes; una oligosacárida interna y conservada, unida al lípido A, conocida como núcleo del LPS, que se puede subdividir como núcleo interno y núcleo externo; y otra polisacárida más externa y variable, anclada al núcleo y denominada polisacárido O, cadena lateral O, antígeno O, por sus características inmunogénicas (Jiménez *et al.*, 2009). El antígeno O consiste en la repetición de una subunidad oligosacárida básica que varía en función de las diversas especies y serotipos y que puede estar formada por un único tipo de monosacárido, o por diferentes, constituyendo subunidades lineales o ramificadas.

Estas tres regiones (lípido A, núcleo del LPS y antígeno O), también se diferencian en sus rutas biosintéticas, en las agrupaciones génicas implicadas en su biosíntesis y en el grado de conservación

(Jiménez *et al.*, 2009; Tomás, 2012). La variabilidad estructural del LPS disminuye gradualmente desde el antígeno O al lípido A. La elevada conservación de las características generales del lípido A y del núcleo interno puede ser reflejo de las restricciones impuestas por su papel en el que es responsable de su actividad endotóxica (Rietschel *et al.*, 1996) y puede llegar a provocar una importante inflamación sistémica conocida como shock séptico o endotoxemia.

Las moléculas de LPS, que se liberan durante la división o muerte bacteriana, provocan la activación del sistema inmune para hacer frente a la infección. Sin embargo, en algunos casos, la activación continuada e incontrolada produce una respuesta excesiva en la secreción de citoquinas que, junto con las anafilotoxinas que se hayan podido generar en la cascada del complemento, son responsables del proceso inflamatorio. La respuesta sistémica que se produce se caracteriza por una elevada concentración de citoquinas proinflamatorias en sangre, especialmente del TNF- $\alpha$  (*Tumoral Necrosis Factor  $\alpha$* ), principal causante de los efectos patológicos del shock séptico, tales como daños en el endotelio, pérdida del tono vascular, coagulopatías e insuficiencia multiorgánica que, muchas veces lleva a la muerte (Cohen , 2002; Tomás, 2012).

Por otro lado, la presencia de las cadenas polisacáridicas del antígeno O facilita el proceso inicial de adhesión y colonización a las mucosas epiteliales (Merino *et al.*, 1996). Además actúa de barrera física impidiendo la correcta activación del complemento, confiriendo resistencia a la actividad bactericida del suero no inmune, debido a que sobre las cadenas más largas del antígeno O del LPS, no recubiertas por el polisacárido capsular, se deposita el componente C3b del complemento lejos de la membrana, lo que previene la formación del complejo de ataque a la membrana (C5b-9) que provoca

la lisis celular y la muerte bacteriana (Merino *et al.*, 1991; Merino *et al.*, 1992; Jiménez *et al.*, 2009).

#### **1.10.5.1 Lípido A**

El lípido A es el responsable de las propiedades endotóxicas del LPS y constituye su punto de anclaje hidrofóbico en la membrana externa de la mayoría de bacterias Gram-negativas. Es la región más conservada del LPS, con pequeñas variaciones interespecíficas. Su presencia es indispensable, dado su importante papel en la integridad de la membrana externa, siendo el responsable de su ensamblaje e interactuando con algunas proteínas de esta membrana de forma específica, de manera que probablemente contribuye a su correcto plegamiento (Ferguson *et al.*, 2000; Tomás, 2012; Turska-Szewczuk *et al.*, 2013).

Debido a que se trata de una molécula conservada y al mismo tiempo posee un papel importante como componente tóxico de la endotoxina, se ha desarrollado un gran interés en su biosíntesis, con el fin de analizar los motivos implicados en su toxicidad y desarrollar nuevos fármacos contra el *shock* séptico (Rietchel *et al.*, 1996; Onishi *et al.*, 1996). La mayoría de las bacterias Gram-negativas sintetizan un lípido A muy similar al de *Escherichia coli*; su estructura básica consiste en un disacárido de glucosamina (GlcN) (Tomás, 2012).

Aunque la estructura del lípido A presenta un alto grado de conservación, puede verse modificada como respuesta a cambios ambientales. Muchas de las enzimas necesarias para la modificación covalente de lípido A se sitúan en el periplasma o en la membrana externa, a diferencia de las enzimas implicadas en su biosíntesis (Raetz *et al.*, 2007).

### 1.10.5.2 Núcleo

El núcleo del LPS es un oligosacárido heterogéneo unido al lípido A, en bacterias que producen LPS de tipo S, se encuentra dividido en dos regiones: el núcleo interno, próximo al lípido A, y el núcleo externo, donde normalmente se une el antígeno O. Algunos patógenos de las mucosas, como *Neisseria*, *Haemophilus*, *Actinobacillus*, *Pasteurella*, *Moraxella* o *Campylobacter* producen una molécula denominada lipooligosacárido (LOS) que contiene un núcleo interno desde el que se extiende una o más ramificaciones mono u oligosacáridicas, que equivaldrían al núcleo externo, y carecen de antígeno O (Jiménez *et al.*, 2009; Tomás, 2012).

El núcleo del LPS está implicado de forma indirecta en la virulencia al ser el lugar de anclaje del antígeno O, aunque también se ha descrito una posible relación con la adhesión de ciertas bacterias a células del hospedador (Jacques, 1996; Tomás, 2012).

Dentro de un género o familia bacteriana, la estructura del núcleo interno tiende a estar bien conservada. Las similitudes estructurales en bacterias lejanamente relacionadas se atribuyen a su importante papel en la organización de la membrana externa (Heinrichs *et al.*, 1998; Jiménez *et al.*, 2009).

El núcleo externo muestra una mayor diversidad estructural por la exposición a las presiones selectivas del medio, de bacteriófagos y del sistema inmune del hospedador. Sin embargo, esta variabilidad dentro de una especie, o incluso un género, es limitada en comparación con la hipervariabilidad del antígeno O, lo que ofrece la posibilidad de utilizar el núcleo del LPS como vacuna que proteja, a la vez, contra diferentes especies de Gram-negativas (Cross *et al.*, 2004).

Los genes implicados en la biosíntesis del núcleo del LPS han sido identificados en un elevado número de bacterias, pero la asignación de una función a las proteínas que codifican se ha llevado a cabo en muy pocos casos.

No obstante, la caracterización química de mutantes en genes específicos del LPS y los estudios de complementación realizados en algunas bacterias, han permitido asignar funciones específicas a algunos genes (Heinrichs *et al.*, 1998). Las especies *Salmonella entérica* (Heinrichs *et al.*, 1998; Kaniuk *et al.*, 2002), *Klebsiella pneumoniae* (Regué *et al.*, 2005; Izquierdo *et al.*, 2003; Fresno *et al.*, 2007) y *Serratia marcescens* (Regué *et al.*, 2005) son las mejores caracterizadas.

### **1.10.5.3 Antígeno O**

El antígeno O es un polisacárido de la superficie bacteriana unido, frecuentemente, a un residuo terminal del núcleo externo que consiste en una serie de repeticiones, entre 10 y 30 normalmente, de una subunidad oligosacáridica básica, llamada unidad O, que generalmente contiene de 2 a 6 residuos de azúcares (Reeves *et al.*, 1996). Existe variabilidad en el número de repeticiones de esta subunidad, de forma que las moléculas de LPS de tipo S (lisas) de un cultivo bacteriano son heterogéneas en cuanto a su tamaño, lo que produce el característico patrón de migración en “escalera” al visualizarlas mediante electroforesis en geles de poliacrilamida con dodecil sulfato sódico (SDS-PAGE). Cada banda o “escalón” superior representa una molécula de núcleo-lípido A con una unidad O adicional respecto al interior, y el espacio entre cada uno de ellos está determinado por el tamaño de esta subunidad, manteniendo cada cepa

un patrón de distribución de longitudes de cadena específico (Whitfield *et al.*, 1997).

El antígeno O es la parte más externa, inmunogénica y variable del LPS. Es uno de los componentes de la bacteria que está sometido a una mayor presión selectiva, ya que actúa como receptor para bacteriófagos y es también importante en la respuesta inmune del hospedador, quedando reflejada en la elevada variabilidad estructural que presenta tanto a nivel de la naturaleza, como en el orden y en los enlaces de los diferentes azúcares que lo constituyen. Esta variabilidad se puede detectar mediante métodos inmunológicos, lo que ha permitido agrupar las cepas de una especie bacteriana en diferentes serotipos (Tomás, 2012; Merino *et al.*, 2012; Turska-Szewczuk *et al.*, 2013).

El antígeno O se trata de un importante factor de virulencia que proporciona a la bacteria una capa superficial hidrofílica que puede enmascarar importantes epítomos antigénicos conservados de la membrana externa y que es capaz de conferir resistencia a la actividad bactericida del complemento, en función de la cantidad de moléculas de LPS con antígeno O, así como de la longitud de esta cadena polisacáridica. Por otro lado, también se ha descrito, en muchas bacterias patógenas, el papel que juega como adhesina y, consecuentemente, su importancia en la colonización de las mucosas del organismo hospedador (Merino *et al.*, 1996; Jiménez *et al.*, 2009; Tomás, 2012).

### **1.11 Adherencia Bacteriana**

La adhesión bacteriana a líneas celulares es un proceso reversible, complejo y que se encuentra influenciado por numerosos factores y

que constan fundamentalmente de dos etapas. En la primera, se lleva a cabo una adhesión inespecífica y reversible, basada en interacciones hidrofóbicas y electrostáticas, que es seguida por una segunda etapa, en la que se lleva a cabo una unión irreversible y específica que dará origen a la infección. (Konkel *et al.*, 1997; Busscher y Weerkamp, 1987; Beachey *et al.*, 1981).

Para que un patógeno se adhiera a una célula hospedadora se requiere de receptores en la superficie celular, por lo general formados por glicoproteínas o glicolípidos, y de adhesinas, que son componentes macromoleculares y típicamente proteicos de la superficie celular bacteriana, y que interactúan con la parte glucosídica de los receptores del hospedador. Las adhesinas y los receptores suelen interactuar de manera complementaria y específica (Finlay y Falkow, 1989), aunque por lo general cada patógeno es capaz de expresar más de un tipo de adhesina (Ofek *et al.*, 2003). Solamente las bacterias que logran adherirse de manera irreversible podrán invadir posteriormente (Jones *et al.*, 1981).

Diversos estudios realizados *in vivo* e *in vitro* en distintas líneas celulares de mamíferos, han confirmado el potencial de adherencia e invasión de *Aeromonas* (Kirov, 1997; Janda y Abbott, 1998).

A modo de resumen podemos decir que tanto la adherencia como la producción de enterotoxinas parecen ser los principales determinantes de patogenicidad de *Aeromonas* en los procesos intestinales (Kirov *et al.* 1995). Sin embargo, la capacidad de estas cepas de invadir células epiteliales necesita ser estudiado mucho más, con el fin de explicar la relación entre los factores de virulencia y patogenia de la infección, especialmente en cuadros de gastroenteritis (Kirov 1997; Janda y Abbott 1998).







# **Hipótesis**

**y**

# **Objetivos**



## **2.1 Hipótesis de Trabajo**

Los aislados de las especies de *Aeromonas* presentes en muestras clínicas humanas que producen cuadros invasivos, poseen factores de virulencia y mecanismos de patogenicidad distintos a las muestras medio ambientales, y además corresponden a linajes genéticos diferentes.

## **2.2 Objetivos**

### **2.2.1 Objetivo General**

Caracterizar fenotípica y genotípicamente una colección de cepas de *Aeromonas* de distintos orígenes en relación con su patogenicidad.

### **2.2.2 Objetivos Específicos**

- 1 Analizar la prevalencia de las infecciones invasivas causadas por *Aeromonas* en el Hospital Universitario Ramón y Cajal de Madrid durante el periodo 1996-2014.
- 2 Crear una colección de cepas diferentes orígenes, incluyendo cepas aisladas en muestras clínicas humanas (coprocultivos y sangre) y también aislados ambientales de aguas de ríos y vertederos.
- 3 Analizar y comparar la sensibilidad de las cepas a diferentes antimicrobianos.
- 4 Identificar la presencia de genes de virulencia previamente descritos en *Aeromonas*.



- 5** Tipificar molecularmente mediante la técnica de Electroforesis en Campo Pulsado (PFGE) las cepas de la colección.
  
- 6** Analizar la diversidad poblacional mediante la técnica de MultiLocus Sequence Typing (MLST).
  
- 7** Comparar la estructura del lipopolisacárido entre las cepas con mayor virulencia.
  
- 8** Evaluar la capacidad de adhesión e invasión a líneas celulares intestinales en las cepas con mayor potencial patogénico.







# **Material**

**y**

# **Métodos**



### **3.1 Estudio Retrospectivo de la Incidencia y Prevalencia de la Infección por *Aeromonas* en un Hospital Terciario**

Se recogieron los datos clínicos de las muestras clínicas positivas para *Aeromonas* procesadas en el Servicio de Microbiología del Hospital Universitario Ramón y Cajal de Madrid en un periodo de 18 años (1996-2014). Estos datos se encuentran depositados en una base de datos interna y codificada del propio Servicio. La recogida de datos se llevó a cabo con los requerimientos éticos habituales y manteniendo el anonimato de los pacientes.

### **3.2 Cepas Bacterianas**

Se creó una colección de cuarenta cepas (n=40) de diferentes orígenes: cepas ambientales del Río Loa, Antofagasta en Chile (n=6), cepas ambientales de aguas residuales de la ciudad de Túnez en Túnez (n=5), cepas de origen clínico centro del Servicio de Microbiología del Hospital Universitario Ramón y Cajal (n=29), causando diarrea (n=19), bacteremia (n=9), y neumonía (n=1) en el año 2014.

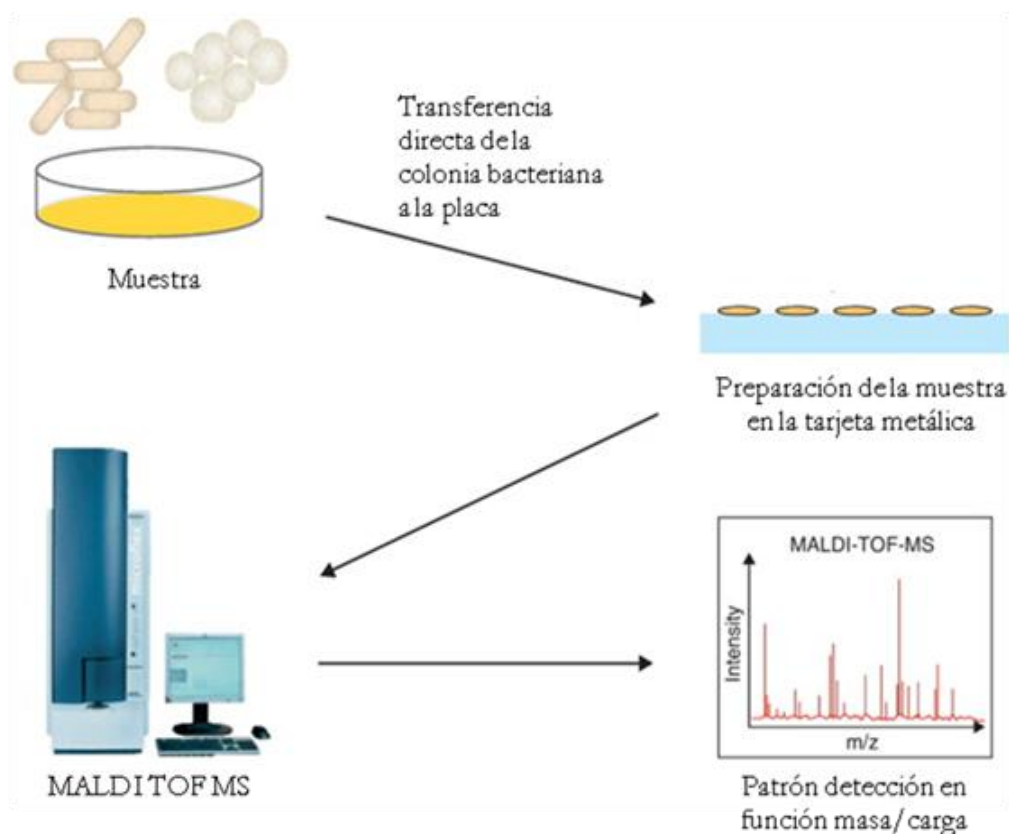
Las cepas se sembraron en placas de agar sangre (BioMerieux) o de Brain Heart Infusion (BHI, Difco) y fueron incubadas durante 18-24 horas a 30°C. La colección se mantuvo congelada a -70°C en leche semidescremada esterilizada.

### **3.3 Identificación bacteriana mediante MALDI-TOF MS**

Esta técnica recibe este nombre por sus siglas en inglés Matrix-

Assisted Laser Desorption Ionization Time-Of-Flight Mass Spectrometry (Hillenkamp y Karas, 1990). El flujo de trabajo para la identificación de las cepas se resume en la **Figura 9**.

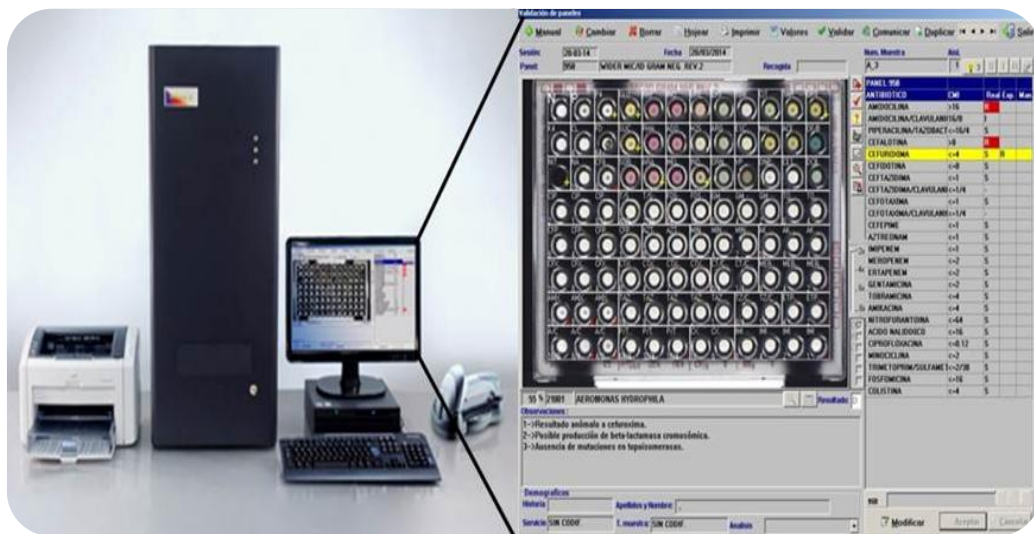
Se utilizó este sistema como técnica principal para la identificación de las especies bacterianas pertenecientes al género *Aeromonas*. Las colonias crecidas, no más de 24 horas, se depositaron sobre la tarjeta metálica y se extendieron adecuadamente. Posteriormente, se añadió 0,7  $\mu\text{l}$  de matriz y se dejó secar al aire. Finalmente se introdujo la placa con la muestra en el sistema y mediante la comparación de los espectros de masas generados con los de la librería se obtuvo la identificación de la especie bacteriana.



**Figura 9.** Esquema de trabajo de MALDI-TOF MS (Bruker, Alemania).

### 3.4 Sensibilidad Antibiótica

Las pruebas de sensibilidad definen la actividad *in vitro* de un antibiótico frente a un microorganismo determinado e indican la concentración necesaria para inhibir el crecimiento de una población bacteriana. La determinación de sensibilidad a diferentes agentes antimicrobianos de la colección de microorganismos estudiada se realizó mediante la técnica de microdilución utilizando el sistema semi-automatizado de paneles WIDER (Fco. Soria Melguizo, Madrid) (Figura 10).



**Figura 10.** Sistema Wider con los resultados de un panel de microdilución en la pantalla del ordenador.

Este sistema proporciona paneles de multipocillos en los que existen distintas concentraciones de antibióticos liofilizados y también una batería de pruebas bioquímicas con las que se puede llegar a identificar la especie bacteriana. Los

paneles se inoculan con 100 µl de una suspensión bacteriana al 0,5 McFarland y se incuban durante 18-24 horas a 37°C.

La lectura e interpretación de los paneles se realiza de forma automática, y el software devuelve un informe en que el se puede encontrar la identificación obtenida con las pruebas bioquímicas y los valores de concentración mínima inhibitoria (CMI) para cada uno de los antibióticos testados. Existen varios tipos de paneles, y en nuestro caso utilizamos los estandarizados para microorganismos Gram-negativos.

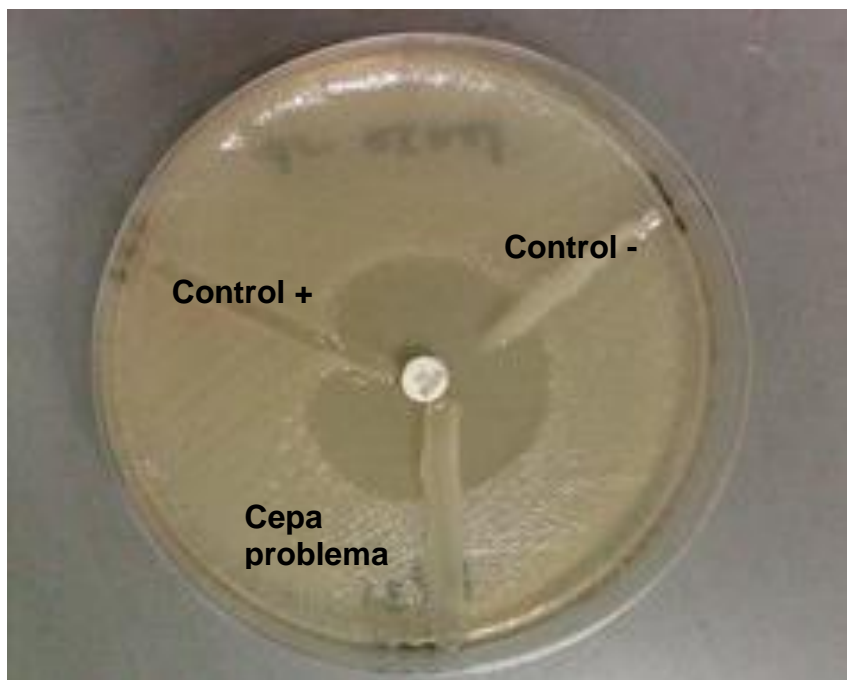
### **3.5 Test de Hodge**

El test de Hodge se utiliza para confirmar la producción de una enzima de tipo carbapenemasa, y se fundamenta en la capacidad que tiene la enzima de hidrolizar e inactivar al antimicrobiano permitiendo el crecimiento del microorganismo.

La técnica se realiza con la cepa control *E. coli* ATCC 25922 utilizando una dilución 1/10 de un inóculo 0,5 Mac Farland en agua destilada o solución salina con el que se siembra una placa de Mueller-Hinton. A continuación se coloca en el centro de la placa un disco de imipenem de 10 microgramos y con un asa estéril se recogen de 3 a 4 colonias del aislado problema y se realiza una estría desde el borde de la placa hacia el centro de la misma sin llegar a tocar el disco de imipenem. Finalmente se incuba en aerobiosis a 30°C por 24 horas.

Se considera que la prueba es positiva cuando se observa una reducción del halo de inhibición similar a la que se observa en el control positivo, por el contrario, se descarta la presencia de betalactamasas cuando no se observa ningún cambio en el halo de

inhibición del imipenem como ocurre en la cepa de control negativo (Figura 11).



**Figura 11.** Test de Hodge negativo en una cepa de *A. hydrophila*.

Esta prueba se realizó en 17 cepas de nuestra colección en las que se había observado en los paneles Wider un fenotipo de resistencia a antibióticos beta-lactámicos y carbapenems compatible con el de la existencia de una carbapenemasa.

### **3.6 Extracción de ADN, Amplificación y Secuenciación Sanger**

Para la extracción de ADN total se utilizó el método comercial Dneasy Blood and Tissue Kit (Qiam GmbH, Hilden, Alemania) siguiendo las recomendaciones del fabricante y utilizando columnas de sílice. El



ADN se eluyó con agua estéril. En ocasiones también se utilizaron métodos más rápidos como la inoculación de una colonia directamente en el tubo de PCR o el sobrenadante de una suspensión de cultivo bacteriano tras hervirlo durante 5 minutos y centrifugarlo a 14.000 rpm durante 5 minutos.

La amplificación de ADN fue a través de una PCR convencional, en un termociclador GeneAmp PCR System 9700 (Perkin Elmer Applied, EEUU). El volumen final de todas las reacciones fue de 15  $\mu$ l y la mezcla se componía de dos cebadores (5 pmoles del cebador Forward y 5 pmoles del cebador Reverse), 2,4  $\mu$ l de dNTP (10mM de dATP, dCTP, dGTP, dTTP), 1,5  $\mu$ l de 10X buffer, 0,2  $\mu$ l de la enzima Taq polimerasa (Roche, Suiza), 1  $\mu$ l de ADN y agua milli-Q estéril hasta completar el volumen final de 15  $\mu$ l.

Los productos de amplificación se separaron por electroforesis convencional en un gel de agarosa al 1% disuelta en tampón TBE (0,5X) (Tris Borato, EDTA) y se visualizaron por tinción en bromuro de etidio a una concentración final de 0,2  $\mu$ g/ml. El bromuro de etidio es un agente que se intercala en el ADN y que permite visualizar las moléculas de ácido nucleico mediante luz ultravioleta.

Los productos de amplificación obtenidos mediante PCR se purificaron con ExoSAP-it purification Kit (USB CORP, Cleveland, OH, EEUU) y fueron enviados para su secuenciación a la empresa Macrogen (<http://www.macrogen.com>) utilizando un secuenciador automático 373XL DNA sequencer (Applied Biosystems, Foster, CA, USA). El análisis de las secuencias nucleotídicas se realizó mediante el programa Chromas Lite (versión 2.1, Technalysisian pty. Ltd, Tewartin, Australia).

### 3.7 Detección de Genes de Virulencia

En los 40 aislados de la colección testamos la presencia de 7 genes de virulencia: *ahh1* (hemolisina extracelular), *asa* (hemolisina), *act* (enterotoxina citotóxica), *ast* (enterotoxina citotóxica termoestable), *ascV* (sistema de secreción tipo III), *eno* (enolasa) y *aexT* (ADP-ribosilada) mediante PCR con cebadores específicos para cada uno de los genes. En la **Tabla 1** se detallan los cebadores utilizados.

**Tabla 1.** Cebadores utilizados para detectar la presencia de genes de virulencia.

Cebador	Secuencia	Producto	Tamaño pb
<b><i>ahh1-F</i></b> <b><i>ahh1-R</i></b>	gccgagcgcccagaaggtgagtt gagcggctggatgcggttgt	Hemolisina extracelular	130
<b><i>asa-F</i></b> <b><i>asa-R</i></b>	taaagggaaataatgacggcg ggctgtaggtatcggtttctg	Hemolisina	249
<b><i>act-F</i></b> <b><i>act-R</i></b>	agaaggtgaccaccaagaca aactgacatcggcctgaactc	Enterotoxina citotóxica	232
<b><i>ast-F</i></b> <b><i>ast-R</i></b>	tctccatgcttccttccact gtgtagggattgaagaagccg	Enterotoxina citotóxica termoestable	331
<b><i>ascV-F</i></b> <b><i>ascV-R</i></b>	ctcgaactggaagagcagaatg gaacatctggctcctctcgtg	Sistema de secreción tipo III	577
<b><i>eno-F</i></b> <b><i>eno-R</i></b>	cgccgacaacaacgtcgacatc cttgatggcagccagagtttcg	Enolasa	598
<b><i>aexT-F</i></b> <b><i>aexT-R</i></b>	atgcagattcaagcaaacac ttgccgatccactctttgat	ADP-ribosilada	226

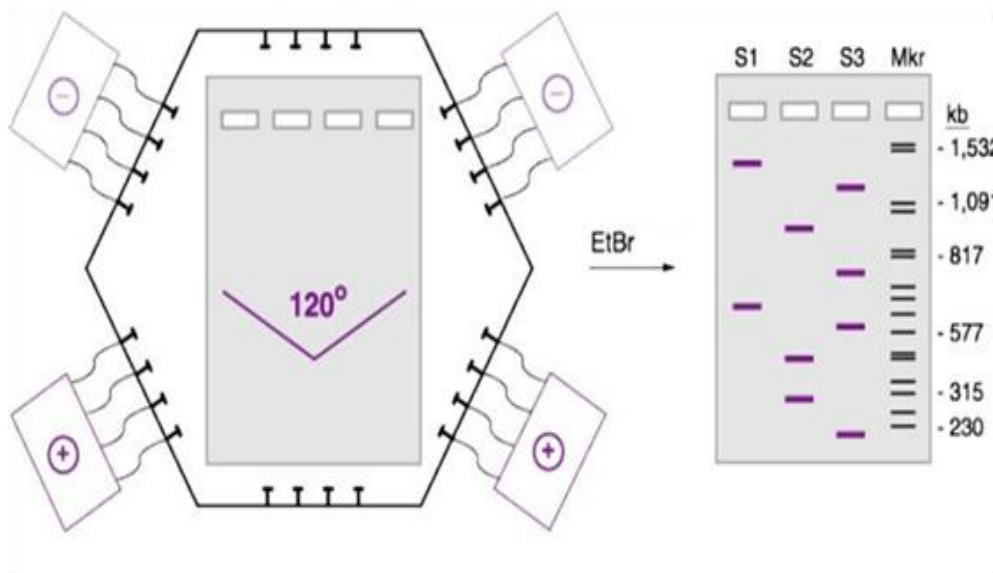
Los productos de amplificación se visualizaron en una electroforesis con un gel de agarosa al 1% y se fotografiaron en un transiluminador GelDoc (BioRad). Al menos uno amplicón por cada gen se purificó y se secuenció para usarlo como control positivo en las siguientes reacciones.

### 3.8 Tipado Molecular

El análisis de clonalidad de las 40 cepas de *Aeromonas* se realizó mediante las técnicas de tipificación molecular de electroforesis en campo pulsado ó Pulsed Field Gel Electrophoresis (PFGE) siguiendo los esquemas descritos para esta especie bacteriana. También se realizó el tipado molecular mediante la técnica de MultiLocus Sequence Typing (MLST).

#### 3.8.1 Electroforesis en Gel de Campo Pulsado (PFGE)

Esta técnica fue desarrollada en 1984 por Schwartz y Cantor, y es una variación de la electroforesis en gel de agarosa en la cual la orientación del campo eléctrico no es unidireccional sino que la dirección es alternante.



**Figura 12.** Esquema de la Electroforesis de Campo pulsado (PFGE). En la parte izquierda del dibujo se representa la electroforesis alternante y en la parte derecha el patrón de bandas de un gel después de haberlo teñido en bromuro de etidio.

Este cambio periódico en la dirección de migración de las moléculas de ADN, previamente digerido con endonucleasas de baja frecuencia de corte, permite separar fragmentos de ADN de alto peso molecular, produciéndose patrones de 5 a 20 fragmentos de un tamaño de 10 a 800 Kb (**Figura 12**). El protocolo que se utilizó en esta técnica se detalla a continuación:

- 1) Se inoculó una colonia de cada aislado en 1 ml de caldo Luria Broth (LB) (Oxoid, LTD., Basingstoke, Hampshire, R.U) y se incubó durante 16 horas a 30°C.
- 2) El cultivo obtenido se centrifugó a 4.000 rpm durante 10 minutos y el sedimento se resuspendió en 100 µl de solución estabilizadora TBE 5x.
- 3) Los 100 µl de esta suspensión se mezclaron con 100 µl de agarosa al 1,2% (Pulsed Field Certificated, BioRad) + 10% de SDS, dicha mezcla se depositó en moldes adecuados y se enfrió a 4°C durante 10 minutos.
- 4) Los bloques de agarosa formados se depositaron en tubos con 1 ml de solución de lisis (50 mM Tris-ClH pH8, 50 mM EDTA pH 9,5, 1% sarcosyl y proteinasa K 1 mg/ml) y se incubaron durante 16 horas a 56°C con agitación. Posteriormente, la solución de lisis se decantó y se sustituyó por 1 ml de solución TE (10 mM Tris ClH pH 8, 0,1 mM EDTA) incubándose nuevamente durante 15 minutos a 56°C.
- 5) Los bloques de agarosa se lavaron 2 veces más con 1 ml de TE durante 15 minutos a 35°C y después del último lavado se mantuvieron a 4°C en esta solución hasta su uso.
- 6) Para cada uno de los geles de campo pulsado se utilizó un tercio de los tacos, que se colocaron en un tubo eppendorf con 100 µl de

solución con el tampón adecuado (buffer 10x y BSA 0,1%) y 10 U de la enzima de restricción *Xba*I. La digestión de los bloques se realizó con la enzima *Xba*I (10–20 U para cada bloque) durante al menos 3 horas.

7) Las condiciones que se aplicaron a la electroforesis fueron: 5-40 seg durante 22 horas a 6 v/cm<sup>2</sup> y 14°C.

Los bloques se cargaron en un gel de agarosa Certified Molecular Biology preparada al 1,2 % en TBE 0,5x. La separación de fragmentos de ADN se llevó a cabo en el sistema CHEF-DRIII (BioRad, La Jolla, EEUU) con las siguientes condiciones: 6 voltios/cm<sup>2</sup> con rampas de 5-40 segundos durante 24 horas.

Una vez finalizada la electroforesis, el gel se sumergió en agua con bromuro de etidio (0,5 µl/ml) durante 30 minutos y se visualizó en un transiluminador. En cada gel se incluyeron dos carriles con marcadores de peso molecular que incluyen 50 líneas diferentes en un rango desde 48,5 hasta 1018,5 Kb (Lamba Ladder PFGE Marker, New England). La interpretación de los perfiles electroforéticos se realizó de forma visual y también mediante el software Phoretix 5.0 (Nonlinear Dynamics Lt., Reino Unido) que generó un dendrograma con el coeficiente de similitud Dice. Se consideró que dos cepas eran iguales cuando su índice estaba entre 90 y 100, mientras que entre 80-90 las cepas estaban muy relacionadas genéticamente, entre 70 y 80 las cepas tenían una relación débil, y finalmente por debajo del 70 no existía ninguna relación entre ellas.

### **3.8.2 MultiLocus Sequence Typing (MLST)**

Esta técnica consiste en amplificar mediante PCR y secuenciar en

cada especie seis o siete genes altamente conservados (dependiendo del género) y que son imprescindibles para el mantenimiento celular (*housekeeping genes*). Se analizan directamente los cambios en la secuencia nucleotídica, asignando un número de alelo para cada una de las variantes de la secuencia. Los cebadores utilizados se detallan en la **Tabla 2**.

**Tabla 2.** Cebadores y condiciones utilizados en la técnica de MLST (Martino *et al.*, 2011).

Cebador	Secuencia	Producto del gen	Pb
<b><i>gyrB-F</i></b> <b><i>gyrB-R</i></b>	ggggtctactgcttcaccaa cttgccccgggtgtactcgt	DNA girasa, subunidad $\beta$	477
<b><i>groL-F</i></b> <b><i>groL-R</i></b>	caaggaagttgctccaagg catcgatgatgggtggtggtc	Chaperona GroEL	510
<b><i>gltA-F</i></b> <b><i>gltA-R</i></b>	ttcgtctgctctccaagat tcatgatgatgccggagta	Citrato sintasa I	495
<b><i>metG-F</i></b> <b><i>metG-R</i></b>	tggcaactgatcctcgtaca tctgttgccatctcttcc	Metionyl-tRNA sintetasa	504
<b><i>ppsA-F</i></b> <b><i>ppsA-R</i></b>	agtccaacgagtagccaac tcggccagatagagccaggt	Fosfoenolpiruvato sintasa	537
<b><i>recA-F</i></b> <b><i>recA-R</i></b>	agaacaaacagaaggcactgg aactgagcgcgttaccac	Recombinasa A	561

Las distintas combinaciones de alelos se asignaron con su correspondiente secuencia tipo (ST) según la página web desarrolladas por Keith Jolley en la Universidad de Oxford: <http://pubmlst.org/aeromonas/> (Curran *et al.*, 2004).

### **3.9 Caracterización del Lipopolisacárido**

En primer lugar se procedió a extraer el lipopolisacárido partiendo de los aislados en placas de agar sangre frescos, utilizando el protocolo previamente descrito por Darveau y Hancock en 1993, como se detalla a continuación:

Se recogió con un palillo una colonia del aislado del tamaño de la punta de un alfiler y se depositó en un tubo eppendorf. Esta colonia se resuspendió en 25  $\mu$ l de tampón y se puso a hervir durante 10 min a 100°C. Una vez frío, se añadieron 25  $\mu$ l de proteinasa K (1 mg/ml) para degradar las proteínas y se incubó de nuevo a 58°C durante 2 h. El gel se carga con 10-15  $\mu$ l de esta solución.

#### **3.9.1 Electroforesis en Geles de Poliacrilamida con SDS**

El estudio del perfil electroforético del LPS se realizó mediante electroforesis en geles de poliacrilamida con docedil sulfato sódico (SDS-PAGE) siguiendo el método de Laemmli modificado por Ames (Laemmli, 1970; Ames *et al.*, 1974).

Para la preparación de los geles, se utilizaron placas de vidrio y teflón de 8 x 10 cm de Amersham Biosciences. En la parte superior del gel, fase de compactación, se utilizó un porcentaje de acrilamida del 5% y en la parte inferior, fase de resolución, de un 12%.

Para la electroforesis, se usaron cubetas verticales modelo SE250 de Hoefer y tampón de electroforesis Tris-Glicina-SDS. Se aplicó una corriente de 10 mA (60V) hasta que las muestras superaron la fase de compactación, y de 20 mA (150V) durante el paso de las muestras a través de la fase de resolución.

### **3.9.2 Tinción con Nitrato de Plata**

Tras la electroforesis se fijaron los geles en una solución de metanol al 50% y ácido acético al 5% durante 30 minutos. Después se lavaron con metanol al 50% durante 15 minutos y con agua MilliQ durante otros 15 minutos. A continuación se sumergieron durante un minuto en una solución de tiosulfato sódico al 0,01% y se lavaron dos veces con agua MilliQ. Los geles se introdujeron en una solución de nitrato de plata al 0,1% durante 25 min a 4°C. A continuación, se lavaron brevemente con agua y se revelaron en una solución de carbonato sódico al 3% en formaldehído al 0,05%.

### **3.10 Adhesión e Invasión Celular**

Para los ensayos de adhesión e invasión tisular seleccionamos 6



aislados obtenidos a partir de muestras clínicas humanas (2 coprocultivos, 3 hemocultivos y 1 de neumonía), pertenecientes a las 3 especies principales (**Tabla 3**).

**Tabla 3.** Descripción de los 6 aislados clínicos utilizados en los ensayos de adhesión/invasión.

Especie	Origen	Identificación
<i>A. hydrophila</i>	Coprocultivo	Ah12
<i>A. hydrophila</i>	Hemocultivo	Ah28
<i>A. caviae</i>	Coprocultivo	Ac20
<i>A. caviae</i>	Hemocultivo	Ac27
<i>A. veronii</i>	Hemocultivo	Av34
<i>A. veronii</i>	Respiratorio	Av40

Se emplearon células Caco-2 (ATCC HTB37), línea celular de epitelio intestinal humano derivada de adenocarcinoma colorrectal. En primer lugar se sembraron  $10^5$  células/pocillo ( $5,2 \times 10^4$  células/cm<sup>2</sup>) sobre placas de cultivo celular de 24 pocillos (15,6 mm de diámetro y 1,9 cm<sup>2</sup>) con el medio esencial Eagle modificado de Dulbecco (DMEM; Gibco BRL, NY, USA) suplementado con suero bovino fetal al 10% (FCS: Gibco), 0,5% L-glutamina y penicilina (100 U/ml) y estreptomycin (100 µg/ml). Las células cultivaron a 37°C en atmósfera de 5% CO<sub>2</sub> durante una media de 10-14 días, tiempo suficiente para que, tras alcanzar confluencia, las células iniciasen el proceso de diferenciación espontáneo.

Para el ensayo de adhesión, las monocapas celulares se lavaron dos veces con 500 µl de solución salina tamponada con fosfato atemperada (PBS, Gibco) y se incubaron durante 1 hora y media con 460 µl de medio DMEM sin antibióticos. Transcurrido este tiempo se

añadieron por triplicado los inóculos bacterianos, procedentes de un cultivo overnight de los distintos aislados de *Aeromonas* ( $10^6$ - $10^7$  UFC/ml, multiplicidad de infección, MOI de 10), se centrifugaron las placas durante 3 minutos a 250 rpm y se incubaron durante 1 hora y media a 37°C en atmósfera de 5% CO<sub>2</sub>.

Tras la incubación, se retiró el medio y se lavaron 3 veces las monocapas con 500 µl de solución salina tamponada con fosfato atemperada para retirar las bacterias no adheridas. A continuación se incubaron 15 min con 200 µl de tritón X-100/PBS al 0,1% y se hicieron diluciones seriadas del sobrenadante que posteriormente se sembró en placas de LB agar (Difco). Las placas se incubaron a 18-24 h a 30°C y se contaron las colonias, estimando las UFC/ml adheridas. Este ensayo se repitió en triplicado para cada aislado y en 2-3 días diferentes. Los resultados muestran los valores medios de la repetición de los experimentos.

Para determinar la capacidad de invasión de los aislados de *Aeromonas* se procedió de igual manera que para el ensayo de adhesión, sembrando placas de 24 pocillos con  $10^5$  células/pocillo que se mantuvieron en cultivo a 37°C y atmósfera de 5% CO<sub>2</sub> durante 10-14 días.

El día del ensayo se lavó las monocapas celulares dos veces con 500 µl de solución salina tamponada con fosfato atemperada (PBS, Gibco) y se incubaron durante al menos 1,5 h con 460 µl de medio DMEM sin antibióticos. Se añadieron por triplicado los inóculos bacterianos, procedentes de un cultivo *overnight* de los distintos aislados ( $10^6$ - $10^7$  UFC/ml, multiplicidad de infección, MOI de 10), se centrifugaron las placas 3' a 250 rpm y se incubaron 1,5 h a 37°C en atmósfera de 5% CO<sub>2</sub>. Tras este periodo de incubación, se lavaron 3 veces las monocapas con 500 µl de solución salina tamponada con

fosfato atemperada para retirar las bacterias no adheridas y se adicionó a cada pocillo 500  $\mu$ l de DMEM suplementado con gentamicina (Cf=16 mg/l) para eliminar todas aquellas bacterias adheridas. Se incubaron 40' a 37°C-5% CO<sub>2</sub> y posteriormente se retiró esta solución y se lavó 2 veces con 500  $\mu$ l de solución salina tamponada con fosfato atemperada.

Las células se lisaron con 200  $\mu$ l tritón X-100/PBS al 1% y diluyeron de forma seriadas y se sembraron en placas de LB. Las placas se incubaron a 18-24h a 30°C y se contaron las UFC de bacterias intracelulares viables en cada placa y se estimaron las UFC/ml invasivas. Este ensayo se repitió en triplicado para cada aislado y en 2-3 días diferentes. De nuevo, los resultados son el valor medio de estos experimentos independientes.



# **Resultados**

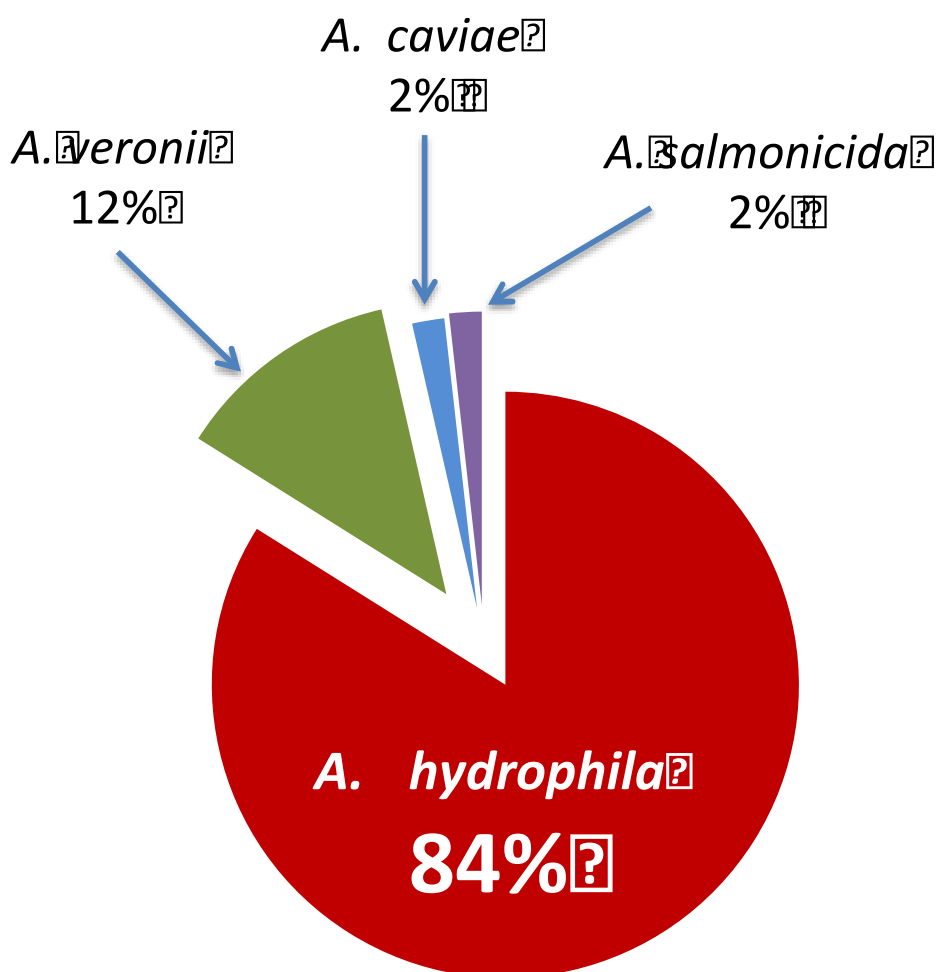
**y**

# **Discusión**



#### 4.1 Estudio Retrospectivo de la Infección por *Aeromonas* en el Hospital Universitario Ramón y Cajal de Madrid

En el análisis retrospectivo de los archivos del Hospital Universitario Ramón y Cajal pudimos observar que durante los 19 últimos años, *A. hydrophila* fue la especie aislada con mayor número de frecuencia en las muestras clínicas, seguida por *A. veronii*, y en menor proporción las especies *A. caviae* y *A. salmonicida* (**Figura 13**).



**Figura 13.** Distribución de las especies de *Aeromonas* detectadas en las muestras clínicas del Hospital Ramón y Cajal durante 1996-2014.

Otros autores también han publicado la alta prevalencia de la especie *A. hydrophila* en muestras clínicas (Janda y Abbott, 1998; Aravena *et al.*, 2011). Sin embargo, trabajos más recientes señalan a la especie *A. dhakensis* como la de mayor prevalencia (Wu *et al.*, 2015; Chen *et al.*, 2014). Estas discordancias se deben a errores en la correcta identificación de las especies de *Aeromonas* más recientemente descritas, como *A. dhakensis*. En nuestro hospital, las cepas causantes de procesos de diarrea no se conservan, por lo que no hemos podido recuperar esas cepas para identificarlas con los esquemas actuales. La introducción de los nuevos sistemas automatizados de identificación, como el sistema MALDI-TOF, ha supuesto un gran avance para la identificación certera de especies minoritarias sin necesidad de recurrir a técnicas moleculares. En el caso de *Aeromonas*, MALDI-TOF ha demostrado ser muy útil (Shin *et al.*, 2015; Benagli *et al.*, 2012). Desde el año 2009 se dispone de esta metodología en el Servicio de Microbiología del Hospital Universitario Ramón y Cajal, por lo que podemos asumir que las identificaciones a partir de ese año son correctas, pero no podemos descartar que en los años anteriores existieran errores.

Al igual que ocurre en nuestra serie, otras especies minoritarias en muestras clínicas son *A. caviae*, *A. veronii* biovariedad *sobria*, pero también se han descrito especies que nosotros no hemos encontrado como *Aeromonas eucrenophila*, *Aeromonas jandaei* y *Aeromonas schubertii* (Janda y Abbott, 1998; Aravena *et al.*, 2011).

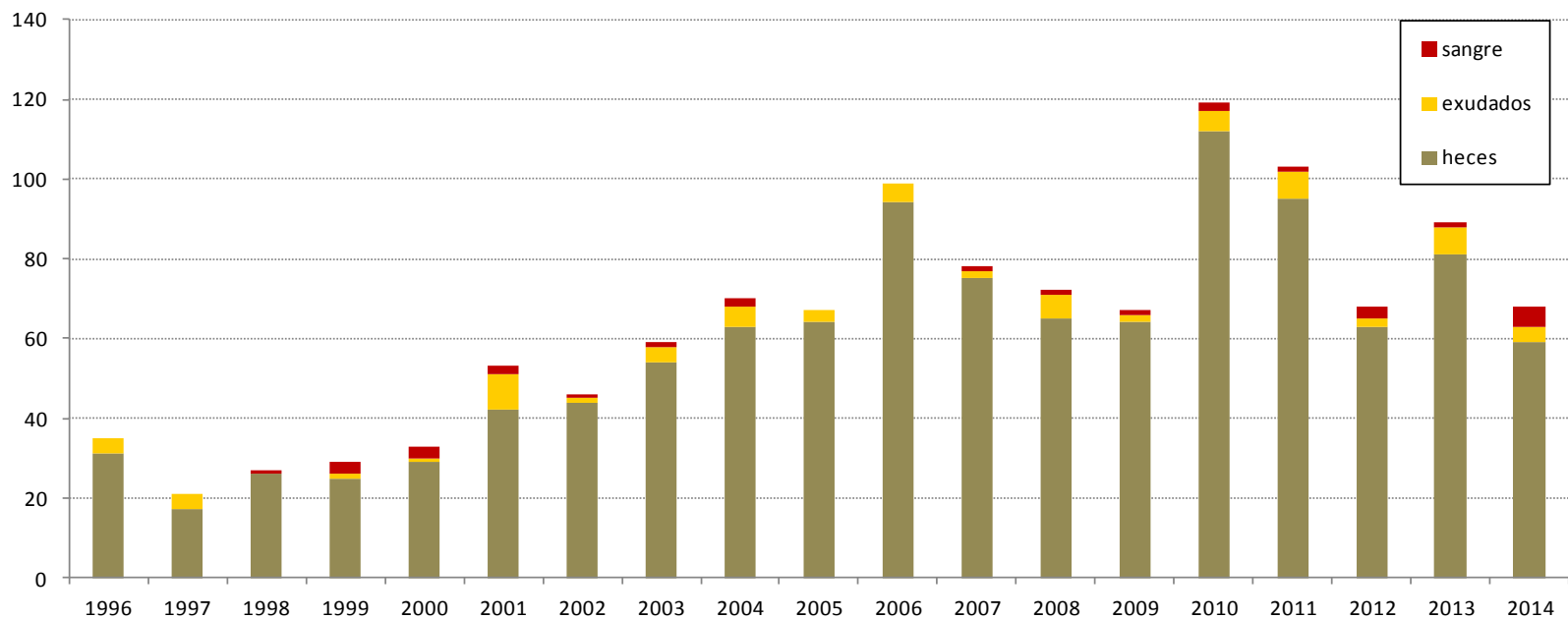
A continuación analizamos la evolución en el periodo del estudio de la prevalencia de todas las *Aeromonas*, y en relación con la muestra clínica de la cual provenían (**Figura 14**). Este análisis mostró que las heces son el origen de muestra más numeroso, seguido por exudados y muestras de sangre. Las fluctuaciones observadas en la



prevalencia se deben sobre todo a los cambios de las muestras de heces (desde 17 muestras en 1997 a 115 muestras en 2010).

Se estima que *Aeromonas* es responsable del 0,8 al 7% de todas las diarreas infecciosas, aunque este porcentaje puede variar en función del país y las medidas higiénico-sanitarias (Figueras *et al.*, 2005). Las cifras que han sido publicadas en los diferentes países son: 0,62-4% en Malasia, encontrándose *Aeromonas* en el quinto lugar de las especies bacterianas mas aisladas (Lee y Puthuchear, 2002) y también 2% en Argentina, en donde se aisló *Aeromonas* de aguas tratadas previamente con cloro (Fernández *et al.*, 2000); 0,75% en Nigeria en niños con cuadros diarreicos (Kehinde *et al.*, 2001); 4,8% en Suiza (Essers *et al.*, 2000); 2,3% en Taiwán (Juan *et al.*, 2000). También se encontró *Aeromonas* en un estudio realizado en Grecia. (6,8%), en niños que acudieron a servicios de urgencias por causa de diarreas agudas con resistencia a algunos antimicrobianos (Maltezou *et al.*, 2001).

## Número de muestras



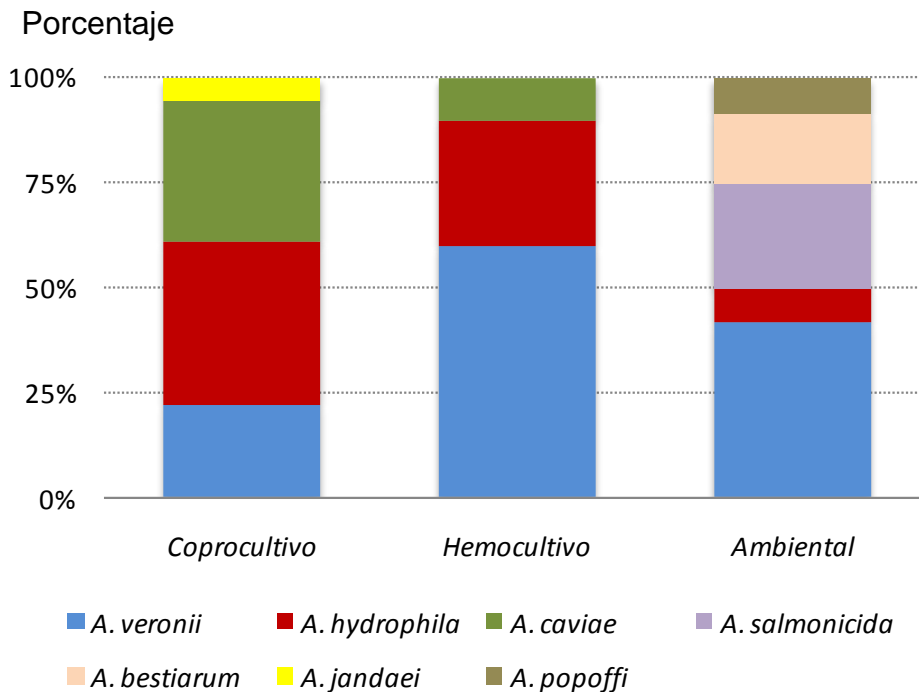
**Figura 14.** Evolución de las muestras clínicas positivas para *Aeromonas* durante el periodo 1996-2014 en el Hospital Universitario Ramón y Cajal.

*A hydrophila*, y en general todas las especies de aeromonas, se pueden detectar como colonizador saprofita de la microbiota intestinal humana sin causar enfermedad, especialmente en niños menores de 5 años (Isoken *et al.*, 2012). En 1968, Von Graevenitz y Mensch revisaron 30 casos de infecciones causadas por *Aeromonas* en humanos y en ese entonces ellos sugirieron que algunas de éstas cepas pueden estar sociadas con enfermedades gastrointestinales (Isoken *et al.*, 2012), pero por otro lado, *Aeromonas* es bien conocida por causar diarreas de corta duración en niños, ancianos y en individuos inmunocomprometidos. En nuestro trabajo detectamos un incremento en la incidencia de las infecciones y cuadros de diarreas causadas por este microorganismo durante los 19 años analizados (**Figura 14**).

En California se describió una incidencia en infecciones invasivas entre 0,7 y 1,4% (Centers for Disease Control and Prevention en 1990). Sin embargo en mayo de 1988, se detectó un aumento de las infecciones por estos microorganismos, y a raíz de ello se llevó a cabo un estudio epidemiológico, donde detectaron que 5 de los 219 pacientes estudiados murieron por infecciones de *Aeromonas*, probablemente debido a procesos de traslocación intestinal (King *et al.*, 1992). Sin embargo, no podemos generalizar nuestros resultados con los obtenidos por otros autores en otros países, ya que este microorganismo no se suele valorar desde un punto de vista epidemiológico y hay muy pocos datos de su prevalencia en colonización gastrointestinal. La tragedia del tsunami en Tailandia en 2004 puso de manifiesto la verdadera importancia de este patógeno en catástrofes naturales, ya que se detectó causando infección de piel y tejidos blandos en un 20% de los afectados (Dixon, 2008).

Una vez analizada la incidencia y la prevalencia de *Aeromonas* en nuestro Hospital, se creó una colección prospectiva con 40 cepas

procedentes de tres orígenes: coprocultivo (n=18), hemocultivo (n=10) y ambiental (n=12) en las que se centró esta Tesis Doctoral. Las cepas se identificaron mediante MALDI-TOF y también mediante secuenciación de un fragmento interno del gen 16S rADN, correspondiéndose finalmente con *A. veronii* (n=14, 35%), *A. hydrophila* (n=11, 28%), *A. caviae* (n=7, 18%), *A. salmonicida* (n=3, 8%), *A. bestiarum* (n=2, 5%), *A. jandaei* (n=1, 2%) y *A. popoffi* (n=1, 2%) (Figura 16).



**Figura 15.** Distribución proporcional de las especies de las 40 cepas de la colección según su origen.

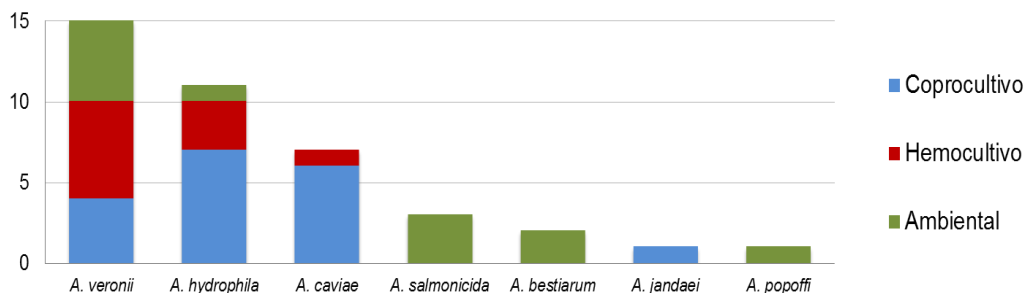
*A. salmonicida* y *A. bestiarum* solo se detectaron en muestras ambientales (**Figura 15**). Cabe destacar que *A. salmonicida* son patógenos que causan forunculosis y septicemia bacteriana en un amplia variedad de peces (Wiklund y Dalsgaard, 1998). Los programas

epidemiológicos deberían incluir la vigilancia activa de estas cepas en el río Loa donde han sido aisladas, ya que podrían representar un posible riesgo de salud para los seres humanos y los animales (Hyung *et al.*, 2011).

Las especies *A. veronii* y *A. hydrophila* fueron las únicas que estaban representadas en los tres orígenes, mientras que *A. jandaei* se identificó solo en muestras de coprocultivo (**Figura 16**).

Esta diferente distribución de especies según el origen ya había sido descrita anteriormente por los autores Janda y Abbott en el año 1998, y sin duda corresponde con una adaptación nicho-huésped dependiente (Janda y Abbott, 1998).

Número de cepas

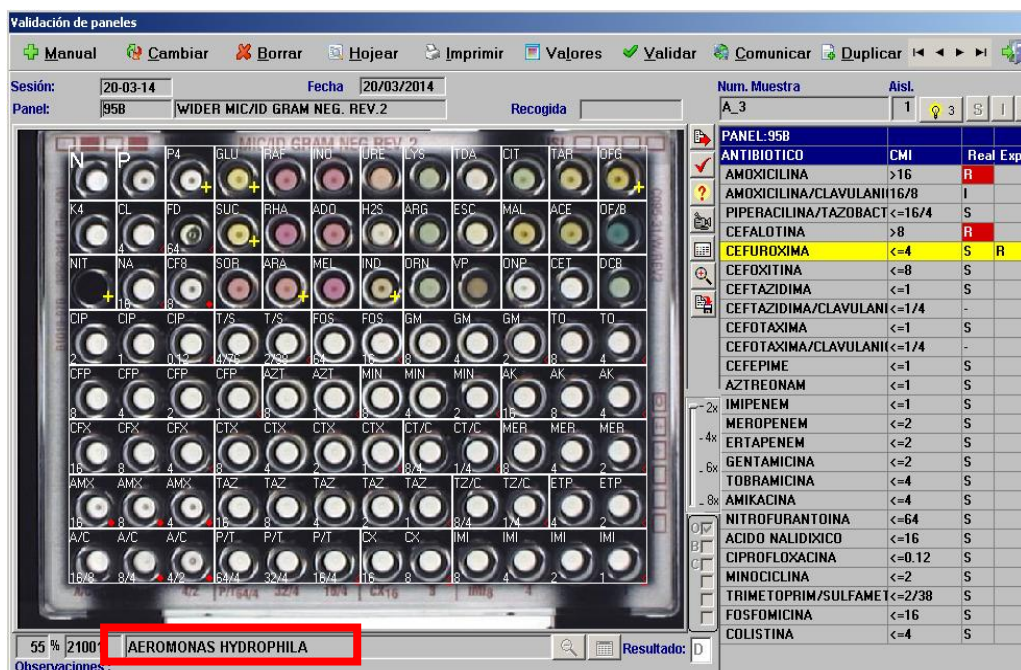


**Figura 16.** Especies de *Aeromonas* aisladas en cada uno de los tres orígenes para las 40 cepas de la colección.

#### **4.2 Identificación Bacteriana y Sensibilidad Antibiótica**

Se determinó la sensibilidad de los aislados de nuestra colección a los antibióticos más habitualmente utilizados en la práctica clínica. En la siguiente **Figura 17** se observa una placa del sistema semiautomático Wider inoculada con una cepa de *A. bestiarum* de origen ambiental. Como se aprecia en la figura, el resultado que se obtuvo de éste

sistema fue erróneo ya que identificó la cepa de *A. bestiarum* como *A. hydrophila*.



**Figura 17.** Placa del sistema semiautomático Wider inoculada con una cepa de *A. bestiarum*. En rojo se destaca que la identificación que proporciona el sistema fue *A. hydrophila*.

Como se puede observar en la anterior figura, la metodología de Wider proporcionó una información muy valiosa de la sensibilidad antibiótica pero no identificó correctamente a la cepa *A. bestiarum* que había sido inoculada en el panel. De hecho, mediante este sistema las 40 cepas de nuestra colección fueron todas identificadas como *A. hydrophila*, en clara divergencia con los resultados obtenidos mediante MALDI-TOF y la secuenciación del 16S rADN.

Este fallo en la identificación es muy importante, ya que demuestra fallos en los sistemas automatizados que se utilizan en los laboratorios de rutina. En este caso, podemos decir que en nuestro

Servicio de Microbiología, la metodología Wider dejó de usarse en 2009, siendo reemplazada por el MicroScan, que tiene una mayor fiabilidad en la identificación de las especies de *Aeromonas*. Como ya se ha comentado anteriormente, otro gran avance de los últimos tiempos, es la incorporación de la espectrometría de masas (MALDI-TOF) a los Laboratorios de Microbiología, aunque la secuenciación nucleotídica de algunos genes sigue siendo la técnica más segura para llegar a una correcta identificación en el complejo género de *Aeromonas* (Shin *et al.*, 2015). En nuestro caso, las 40 cepas de este estudio fueron identificadas mediante MALDI-TOF, y los resultados obtenidos con esta técnica fueron idénticos a los obtenidos mediante la secuenciación del fragmento interno del gen 16S rADN.

Se estudió la susceptibilidad antibiótica de los aislados de nuestra colección y los resultados se muestran en la **Tabla 4**. En general podemos decir que nuestras cepas presentaron escaso nivel de resistencia a los antibióticos estudiados, con la excepción de los beta-lactámicos (74% amoxicilina, 61% cefalotina, y 35% a piperaciclina/tazobactam), como era de esperar por la expresión de su carbapenemasa cromosómica.

**Tabla 4.** Porcentajes de resistencia a los antibióticos en las cepas de *Aeromonas* aisladas de los tres orígenes.

Las casillas vacías representan una ausencia de resistencia.

Origen	Especies	% Resistencia a antibióticos																						
		Amoxicilina	Amoc/Clav	Piper/Tazo	Cefalotina	Cefuroxima	Cefoxitina	Cefepime	Ceftazidima	Cefotaxima	Aztreonam	Imipenem	Meropenem	Ertapenem	Gentamicina	Tobramicina	Amikacina	Nitrofurantoina	Ac. Nalidixico	Ciprofloxacino	Minociclina	SXT	Fosfomicina	Colistina
Coprocultivo n=18	<i>A. hydrophila</i> (n=7)	85,7	57,1	28,5	28,5	-	-	-	-	-	42,8	-	14,2	-	14,2	28,5	-	-	-	-	14,2	14,2	57,1	
	<i>A. caviae</i> (n=6)	57,1	57,1	-	-	-	42,8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	57,1	-
	<i>A. veronii</i> (n=4)	100	100	100	100	25	-	-	-	-	100	50	75	-	50	25	25	50	25	-	25	-	-	
	<i>A. jandaei</i> (n=1)	100	100	100	100	-	-	-	-	-	100	-	-	-	100	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Hemocultivo n=10	<i>A. hydrophila</i> (n=3)	100	66,6	66,6	66,6	33,3	33,3	-	-	-	33,3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	33,3	66,6	
	<i>A. veronii</i> (n=6)	100	40	60	60	-	-	-	-	-	40	20	20	-	40	-	-	40	-	-	-	-	-	
	<i>A. caviae</i> (n=1)																							
Ambiental n=12	<i>A. hydrophila</i> (n=1)	100	100	100	100	-	-	-	-	-	100	100	100	-	-	-	-	100	-	-	-	-	-	
	<i>A. veronii</i> (n=5)	100	80	80	-	-	-	-	-	-	80	80	80	-	-	-	-	20	-	-	-	20	20	
	<i>A. salmonicida</i> (n=3)	100	66,6	-	100	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	33,3	33,3
	<i>A. bestiarum</i> (n=2)	50	-	-	100	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	<i>A. poppoffi</i> (n=1)	100	100	100	100	-	-	-	-	-	100	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-



La alta sensibilidad antibiótica de las cepas clínicas ha sido también reflejada en otros trabajos previos (Awan *et al.*, 2009; Chen 2014). Sin embargo, también se ha demostrado la existencia de cepas ambientales, especialmente en los ambientes de piscifactorías, con altas tasas de resistencia a los antibióticos (Esteve *et al.*, 2015; Libisch *et al.*, 2008).

Este hecho parece deberse al elevado consumo de sustancias antibióticas que se administra al pescado en estas factorías (Kaskhedikar y Chabra, 2010). Como es el caso de un estudio realizado en el año 2002 en la Universidad de Bharatiar, India, en donde se aislaron cepas de *Aeromonas* de peces y gambas y se observó una alta resistencia antibiótica en las cepas aisladas de las gambas (Thayumanavan *et al.*, 2003).

La adquisición de mecanismos de resistencia a los antimicrobianos puede considerarse como una consecuencia más de la evolución microbiana para la que es esencial la variabilidad genética (Mayer *et al.*, 1990). A ella puede llegarse a través de cambios microevolutivos, relacionados con mutaciones puntuales en un par de bases de un nucleótido que modifiquen la diana del antibiótico interfiriendo con su actividad, o a expensas de alteraciones macroevolutivas originadas por “traslados” de secuencias de ADN de un lugar a otro del cromosoma, y que incluyen: inversiones, duplicaciones, inserciones, deleciones o transposiciones (Kopecko, 1980).

Generalmente, estas últimas son vehiculizadas por elementos genéticos especializados conocidos como transposones o secuencias de inversión, que tienen gran maniobrabilidad en el cromosoma, o entre el cromosoma y otros replicones. Además, y de forma sustantiva, a la variabilidad genética y a la evolución del mundo microbiano, han contribuido la posibilidad de adquirir material genético del exterior a

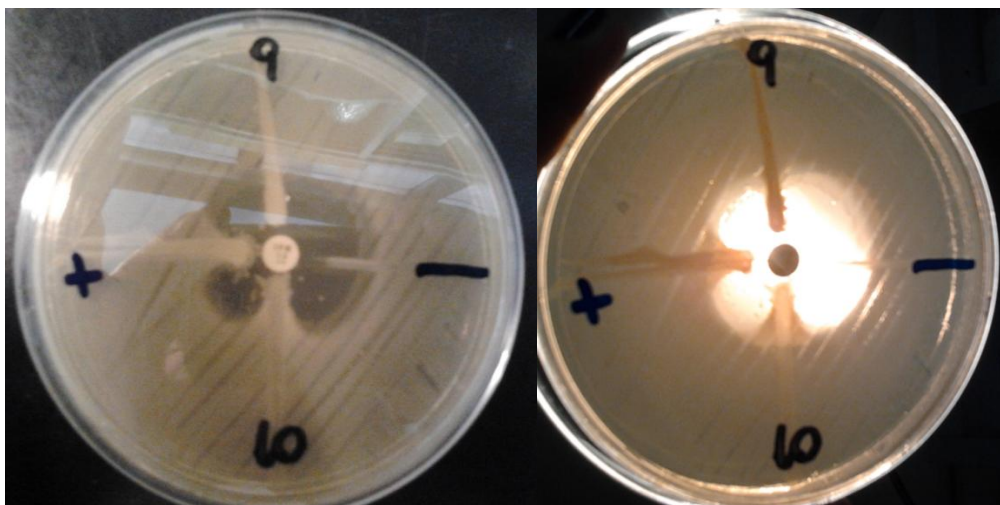
expensas de plásmidos, bacteriófagos o elementos de transposición (Martínez-Beltrán, 1992).

En nuestro caso, las especies que presentaron mayor nivel de resistencia fueron *A. hydrophila* y *A. veronii*, especialmente las cepas aisladas de muestras clínicas. También cabe destacar que las cepas ambientales de la especie *A. veronii* presentaron resistencia a los carbapenems (imipenem, meropenem y ertapenem), probablemente debido a la expresión de su metalo-beta-lactamasa cromosómica intrínseca (Rossolini y Amicosante, 1996; Girilch *et al.*, 2010, Walsh *et al.*, 2015).

Además de esta resistencia intrínseca que poseen todas las cepas de aeromonas, se han descrito cepas portadoras de genes de resistencia a antibióticos adquiridos, lo que justifica la continua vigilancia de este microorganismo. Recientemente se ha identificado el gen *bla<sub>VIM</sub>* en cepas de *Aeromonas* resistentes a carbapenems en un integrón de clase I (Libisch *et al.*, 2008, Adler *et al.*, 2014).

#### **4.2.1 Test de Hodge**

Este test se realizó para explorar la posible presencia de carbapenemasas adquiridas en 16 cepas que mostraron resistencia a imipenem. Únicamente la cepa 10 mostró un test positivo (**Figura 18**), pero se descartó la existencia de todas las carbapenemasas adquiridas conocidas mediante PCR, por lo que la causa de esta resistencia podría ser la sobre expresión de su carbapenemasa cromosómica o la presencia de un nuevo gen. Se ha señalado que la expresión de esta beta-lactamasa es especie y método dependiente (Ruiz-Castillo *et al.*, 2015).



**Figura 18.** Test de Hodge con control positivo (+), control negativo (-) y dos cepas de *A. veronii* ambiental. La cepa 10 es positiva.

Cabe destacar que se ha descrito el desarrollo de resistencia a imipenem por sobreexpresión del gen *imiS* que codifica una carbapenemasa cromosómica en cepas clínicas causantes de una colangitis (Sánchez-Céspedes *et al.*, 2009). Estos autores señalan que pudo haber sido consecuencia de un tratamiento previo con amoxicilina/ácido clavulánico de una infección del tracto urinario. También se ha observado la resistencia en cepas ambientales (Yano *et al.*, 2015).

### **4.3 Genes de Virulencia**

La imposibilidad de diferenciar las cepas colonizadoras sin sintomatología de las cepas causantes de infecciones limita el estudio de la virulencia de este microorganismo (Janda y Abbott, 2010). Sin embargo, se han identificado varios genes cuya presencia se ha

asociado con mayor virulencia (Aravena. *et al.*, 2014) y que han sido testados en nuestra colección de 40 aislados (**Tabla 5**).

Los resultados mostraron que las cepas clínicas portaban mayor número de genes de virulencia, y si tenemos en cuenta la especie, *A. veronii* y *A. hydrophila* presentaron un mayor número de factores de virulencia con independencia del origen.

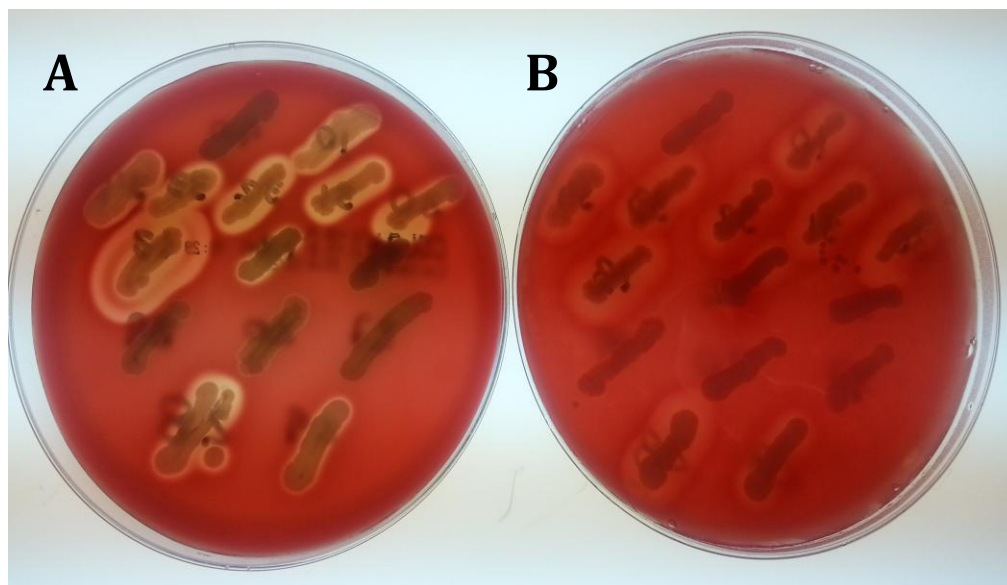
Los genes más frecuentes fueron *eno*, presente en todas las cepas, seguido por los genes *act*, *ascV* y *aexT*. Por el contrario, el gen *Asa1* solo fue identificado en cepas de *A. veronii* de origen ambiental mientras que *ahh1* no fue detectado. Finalmente el gen *ast* también tuvo poca representación y no se detectó en cepas ambientales (**Tabla 5**).

**Tabla 5.** Porcentajes de los genes de virulencia en las cepas de *Aeromonas* para cada origen y especie.

Origen	Especies	Genes de virulencia													
		<i>ascV</i>		<i>eno</i>		<i>aexT</i>		<i>act</i>		<i>ast</i>		<i>asa1</i>		<i>ahh1</i>	
		n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
Coprocultivo n=18	<i>A. hydrophila</i> (n=7)	2	28	7	100			5	70	4	57				
	<i>A. caviae</i> (n=6)	1	16	6	100					1	16				
	<i>A. veronii</i> (n=4)	1	25	4	100	3	75	4	100	1	25				
	<i>A. jandaei</i> (n=1)			1	100										
Hemocultivo n=10	<i>A. hydrophila</i> (n=3)	1	33	3	100	1	33	3	100	1	33				
	<i>A. veronii</i> (n=6)	6	100	6	100	4	66	6	100						
	<i>A. caviae</i> (n=1)			1	100										
Ambiental n=12	<i>A. hydrophila</i> (n=1)			1	100			1	100			1	100		
	<i>A. veronii</i> (n=5)	4	75	5	100	5	100	5	100			5	100		
	<i>A. salmonicida</i> (n=3)	2	75	3	100	3	100	2	75						
	<i>A. bestiarum</i> (n=2)	2	100	2	100	2	100	2	100						
	<i>A. poppoffi</i> (n=1)			1	100										

Resultados similares a los nuestros se han reportado en Australia, siendo *A. hydrophila* la especie que acumuló mayor número de genes de virulencia, seguida por *A. dhakensis*, y *A. veronii* (Aravena *et al.*, 2014). Otros autores también señalan a la especie *A. dhakensis* como la más virulenta (Chen *et al.*, 2014a; Chen *et al.*, 2014b; Ghenghesh *et al.*, 2014). Se ha demostrado una mayor virulencia y citotoxicidad en cepas de *A. veronii* frente a líneas celulares intestinales HT-29 cuando expresan los genes *ascV*, *aexT* (Chen *et al.*, 2014a).

La producción fenotípica de hemolisina se evidenció en 10 cepas, siendo menor la lisis frente a eritrocitos humanos que frente a los de carnero. La capacidad de producir esta hemolisina se observó principalmente en las cepas de origen clínico, especialmente en la especie *A. hydrophila* (**Figura 19**).



**Figura 19.** Actividad hemolisina en placa de agar nutritivo con sangre de carnero (A) y con sangre humana (B). Se puede observar mayor hemólisis en la placa con sangre de carnero.

En *Aeromonas* se han descrito al menos dos clases de hemolisinas: las  $\beta$ -hemolisinas y las  $\alpha$ -hemolisinas. Además de la enterotoxina citotóxica con actividad  $\beta$ -hemolítica, *Aeromonas* puede producir otras  $\beta$ -hemolisinas (Jiménez, 2008) provocando la formación de poros en las membranas celulares produciendo así una lisis osmótica y una destrucción completa de los eritrocitos. La proteína AHH1 es un tipo de  $\beta$ -hemolisina (Hirono y Aoki, 1991), y su secuencia presenta una elevada similitud con la proteína HlyA de *Vibrio cholerae*, por lo que podría funcionar formando canales de manera similar (Wong *et al.*, 1998). En nuestras cepas no se detectó el gen productor de esta hemolisina, sin embargo no parece ser infrecuente, ya que se ha detectado en otras series (Gehua *et al.*, 2003, Wang *et al.*, 2003, Martino *et al.*, 2011). En consecuencia, desconocemos el sistema genético de la hemolisina detectada en nuestras cepas, y bien pudiera corresponder con una hemolisina de tipo  $\alpha$ .

La producción de enzimas extracelulares se ha asociado con una mayor virulencia debido al daño celular que causan (Janda y Abbott, 2010). Algunas de estas enzimas se han identificado como enterotoxinas, proteasas, fosfolipasas, y hemolisinas (Gavin *et al.*, 2003). En el caso de las hemolisinas se ha detectado una relación estadística significativamente de mayor virulencia en cepas causantes de brotes en ganado (Pridgeon *et al.*, 2010) y también se ha descrito la presencia del sistema genético de la hemolisina de *Vibrio parahaemolyticus*, que tendría su homólogo en cepas de *A. veronii* de origen clínico con una identidad de un 84% entre los dos géneros. *trh* es una hemolisina termoestable, que ha sido considerada como un importante factor de virulencia en cepas de *Vibrio parahaemolyticus* (Raghunath *et al.*, 2010).

A modo de resumen de nuestros resultados sobre el potencial virulento de nuestra colección de cepas podríamos decir que las

especies *A.veronii* y *A. hydrophila* son potencialmente más virulentas que las otras, aunque el verdadero potencial patogénico de *Aeromonas* spp. probablemente dependa de otros factores no-microbiológicos como pueden ser las condiciones del huésped.

#### **4.4 PFGE**

Para conocer la diversidad genética de las cepas de nuestra colección, utilizamos la técnica de PFGE junto con el análisis bioinformático de los patrones de bandas mediante la construcción de un dendrograma (Figura 21). Los resultados mostraron que existe una gran diversidad genética en nuestras cepas, con la excepción de tres cepas clonales de *A. veronii* de aguas residuales aisladas en Túnez y dos cepas de *A. bestiarum* de origen ambiental aisladas en Chile (**Figura 20**).

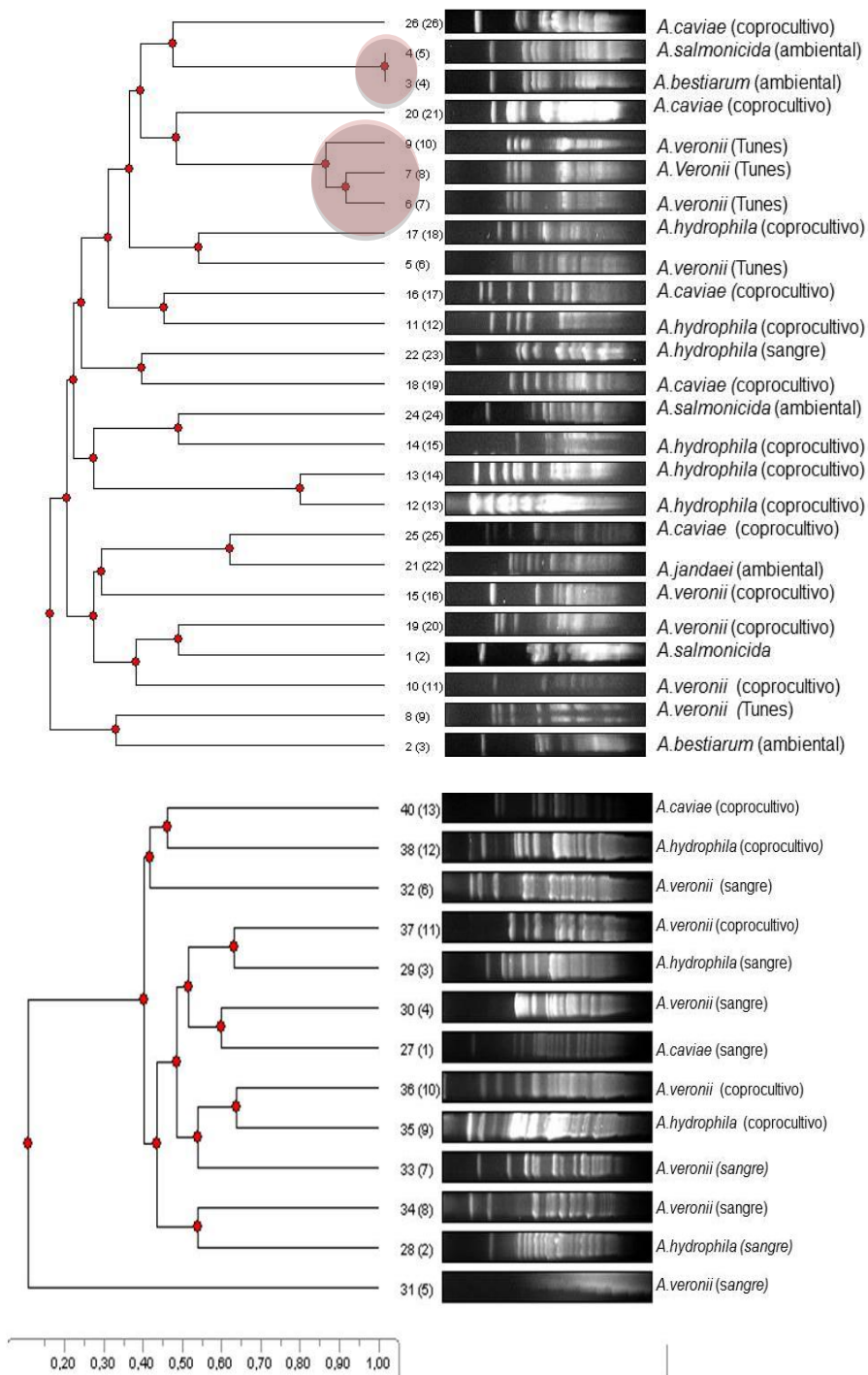
En estudios epidemiológicos se ha utilizado esta técnica para comparar cepas aisladas de agua potable y cepas de pacientes con diarrea, detectando el mismo patrón en cepas de ambos orígenes (Pablos *et al.*, 2010; Khajanchi *et al.*, 2010). Estos estudios han servido para demostrar el riesgo de adquisición de esta bacteria a través de la red de agua potable, y posteriormente como es capaz de provocar un cuadro infeccioso. En nuestro estudio no se investigó la transmisión que existe entre agua potable y aislados clínicos en humanos, pero si podemos observar la gran diversidad genética de nuestra colección, incluso entre cepas del mismo origen.

La técnica de PFGE es muy útil para identificar cepas epidémicas causantes de brotes y aisladas en un periodo corto de tiempo. Así esta técnica ha permitido identificar los clones ampliamente distribuidos en la naturaleza y que han podido ser transmitidos al ser humano a través de aguas ambientales (Khajanchi *et al.*, 2010). La amplia variedad de patrones de bandas de nuestras cepas, nos permite asegurar que no



existe una fuente común para la infección por *Aeromonas*, y que la adquisición de las cepas ha ocurrido en la comunidad desde varios orígenes sin relación epidemiológica entre ellos.

Una limitación de nuestro estudio fue tal vez el hecho de no contar con un mayor número de aislados de los distintos orígenes, lo que sugiere seguir realizando estudios de éste tipo en donde se involucren una mayor número de cepas sobre todo de origen ambiental, ya que esto sería crucial para comprender mejor el mecanismo patogénico de éstas cepas. Debido a la gran variabilidad que observamos mediante PFGE, decidimos ampliar el estudio de tipado genético de nuestras cepas con el estudio de su estructura poblacional de nuestras cepas mediante MLST, seleccionando 15 cepas de origen clínico para este análisis.



**Figura 20.** Dendrograma realizado con el software Phoretix 5.0 y el índice de similitud de Dice para analizar la relación genética entre los patrones de bandas obtenidos con PFGE. Exceptuando un clon de dos cepas de *A. veronii* de Túnez y dos *A. salmonicida* de aguas (ambas señaladas en rojo), no existe ninguna relación entre las cepas.

#### **4.5 MultiLocus Sequence Typing**

Mientras que la técnica de PFGE es particularmente adecuada para estudiar diseminación clonal de cepas en cortos periodos de tiempo, la irrupción de la técnica de MultiLocus Sequence Typing (MLST) ha permitido comparar los datos genéticos entre diferentes países y elaborar estudios epidemiológicos sobre la estructura poblacional global. El primer estudio de MLST en *Aeromonas* apareció en el año 2011 (Martino *et al.*, 2011), describiendo una elevada diversidad genética, evidencias de recombinación horizontal y especialización de nicho (Martino *et al.*, 2014).

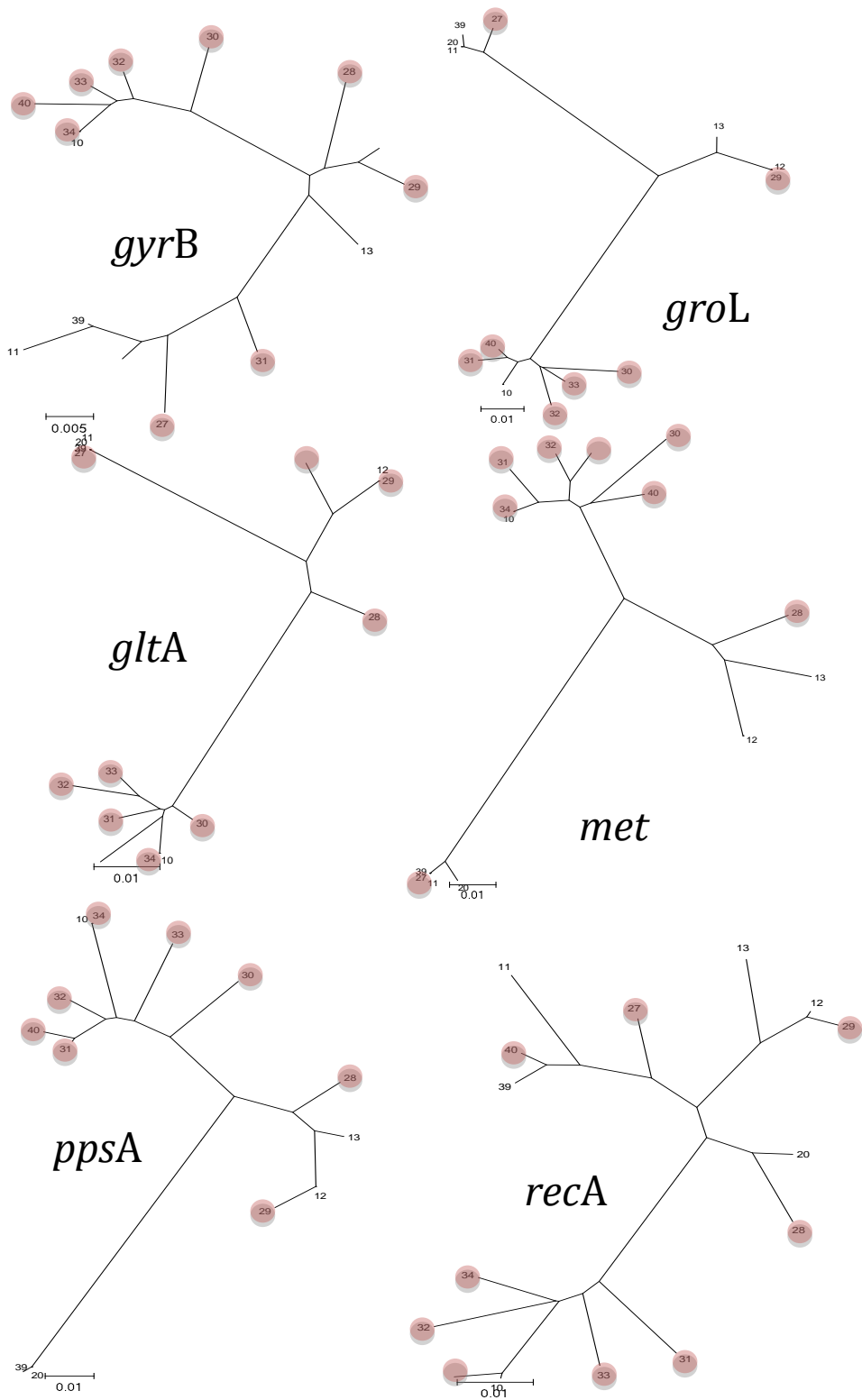
Ante el escaso número de cepas depositadas en la base de datos de MLST, y la relevancia de estas cepas, decidimos aplicar MLST para el tipado de 15 cepas con diferente patrón de PFGE, en las que también se incluyeron cepas causantes de diarrea.

De nuevo, y al igual que ocurrió con el PFGE, se observó una alta diversidad genética, detectando en la mayoría de los casos alelos y combinaciones que no habían sido previamente descritos (54 alelos de un total de 90) (**Tabla 6**). Todos los alelos fueron registrados en la página web para su asignación numérica nueva, y en consecuencia de las nuevas ST o linajes genéticos.

A continuación, decidimos analizar la relación filogenética para cada uno de los 7 alelos utilizando para ello su secuencia nucleotídica (**Figura 21**). En las siguientes figuras se muestran los árboles filogenéticos construidos con el software MEGA, destacando en círculos coloreados aquellas cepas causantes de infecciones extraintestinales invasivas, frente a las causantes de diarrea que no están coloreadas.

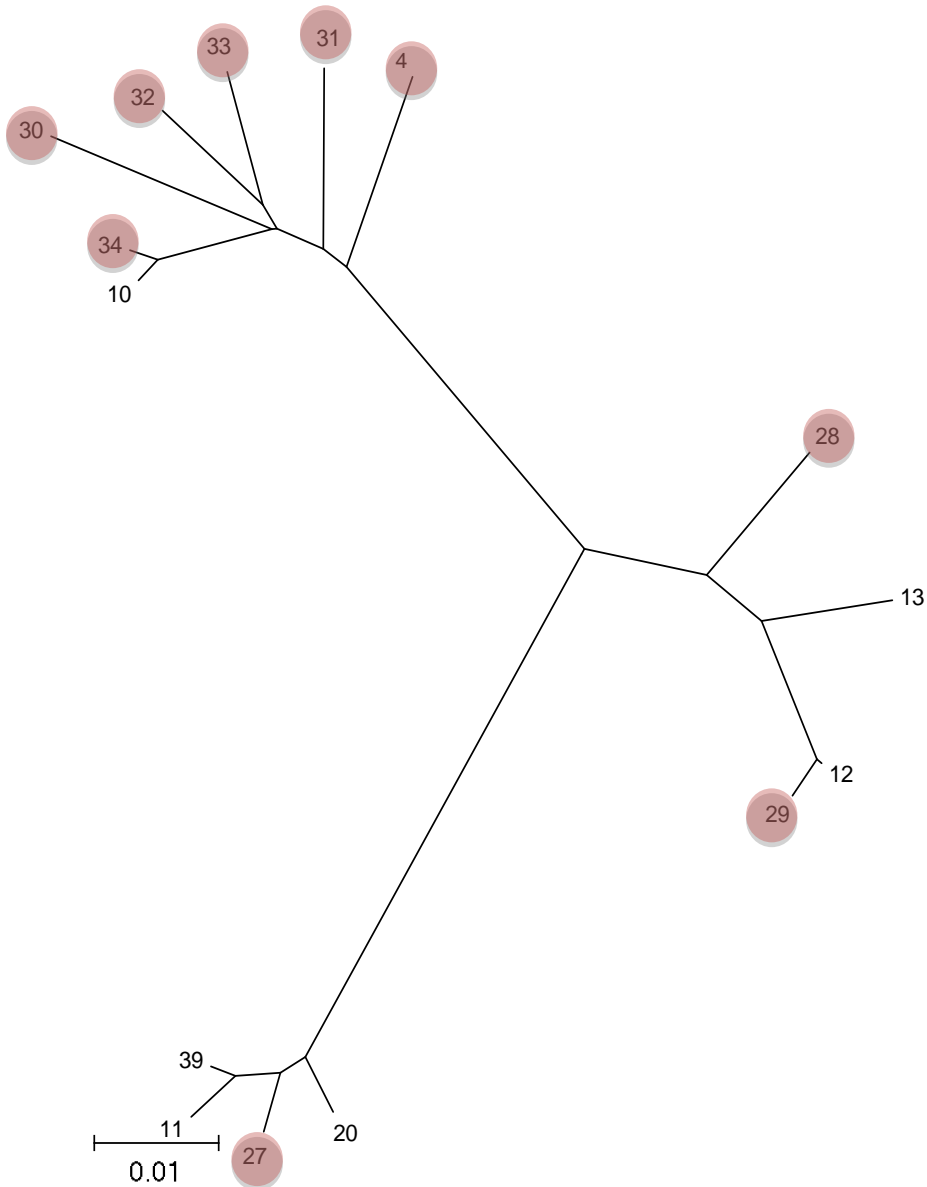
**Tabla 6.** Alelos de MLST identificados en las 15 cepas estudiadas. En negrita se señalan los nuevos alelos detectados. Todas las STs se corresponden con linajes que no habían sido previamente descritos.

Cepa	Especie	Origen	<i>gyrB</i>	<i>groL</i>	<i>gltA</i>	<i>metG</i>	<i>ppsA</i>	<i>recA</i>	ST
10	<i>A. veronii</i>	Heces	<b>275</b>	125	<b>275</b>	<b>277</b>	<b>297</b>	<b>291</b>	<b>364</b>
11	<i>A. hydrophila</i>	Heces	158	102	96	159	<b>298</b>	<b>167</b>	<b>365</b>
12	<i>A. hydrophila</i>	Heces	<b>276</b>	248	252	254	<b>299</b>	<b>292</b>	<b>366</b>
13	<i>A. hydrophila</i>	Heces	<b>277</b>	<b>266</b>	<b>276</b>	<b>278</b>	<b>300</b>	<b>293</b>	<b>367</b>
20	<i>A. caviae</i>	Heces	163	102	96	96	<b>305</b>	161	<b>378</b>
27	<i>A. caviae</i>	Sangre	<b>278</b>	<b>267</b>	96	159	97	<b>294</b>	<b>368</b>
28	<i>A. hydrophila</i>	Sangre	<b>279</b>	248	<b>277</b>	<b>279</b>	<b>301</b>	<b>295</b>	<b>369</b>
29	<i>A. hydrophila</i>	Sangre	117	248	252	254	<b>302</b>	<b>296</b>	<b>370</b>
30	<i>A. veronii</i>	Sangre	167	<b>268</b>	<b>278</b>	<b>280</b>	<b>303</b>	<b>297</b>	<b>371</b>
31	<i>A. veronii</i>	Sangre	93	<b>269</b>	110	<b>281</b>	<b>304</b>	<b>298</b>	<b>372</b>
32	<i>A. veronii</i>	Sangre	<b>280</b>	<b>270</b>	<b>279</b>	149	118	<b>299</b>	<b>373</b>
33	<i>A. veronii</i>	Sangre	<b>280</b>	<b>270</b>	<b>279</b>	<b>149</b>	29	<b>300</b>	<b>374</b>
34	<i>A. veronii</i>	Sangre	<b>275</b>	125	<b>275</b>	<b>277</b>	<b>297</b>	<b>301</b>	<b>375</b>
39	<i>A. caviae</i>	Heces	<b>282</b>	<b>272</b>	96	159	97	<b>261</b>	<b>376</b>
40	<i>A. veronii</i>	Respiratorio	89	<b>273</b>	94	92	95	95	<b>377</b>



**Figura 21.** Diversidad filogenética de cada alelo del esquema de MLST. Las cepas invasivas se resaltan en círculos rojos.

Este análisis se repitió usando una secuencia única de ADN tras la concatenación de los seis alelos de MLST (**Figura 22**). Como se puede apreciar en la siguiente figura, la mayor parte de las cepas invasivas se agrupan en una rama, aunque no parece existir una segregación total con respecto de las cepas causantes de diarrea.



**Figura 22.** Análisis filogenético del concatenado de los 6 alelos. Las cepas invasivas están resaltadas con los círculos de color rojo.

Finalmente, quisimos conocer el grado de relación de las cepas de nuestra colección con el resto de las cepas descritas en la base de datos de MLST (**Figura 23**). Para ello repetimos el análisis de los concatenados utilizando los datos de la web de un total de 443 aislados, y el resultado se muestra en la siguiente figura, donde se aprecia una gran dispersión genética de nuestras cepas en relación a las ya descritas.



**Figura 23.** Relación filogenética de todas las cepas registradas en la base de datos de MLST, utilizando como secuencia única la concatenación de los 6 alelos. En círculos grises se señalan las 15 cepas de nuestra colección.

Dentro del apartado de tipado molecular y a modo de resumen, podemos decir que no existe ninguna relación genética entre las cepas clínicas estudiadas, ni entre ellas ni con el resto de cepas previamente descritas en el mundo. Esto descarta la existencia de brotes epidémicos en nuestra institución y anula la posibilidad de una adquisición nosocomial desde una fuente común, señalando a eventos de adquisición comunitaria sin ningún tipo de relación entre ellos.

Este tipo de estudios filogenéticos también ha permitido describir recientemente tres nuevas especies que presentaban poca relación genética con el resto de especies (Beaz-Hidalgo *et al.*, 2015). Estos autores al realizar los análisis respectivos de 16S ADNr y análisis filogenético de MLST, con 6 genes conservados, en cepas aisladas de un lago nórdico mostraron que existían tres nuevas cepas de *Aeromonas* (*Aeromonas aquatica*, *Aeromonas finlandiensis* y *Aeromonas lacus*) y que no se agrupan con las cepas descritas a la fecha, con lo cual formarían tres especies nuevos independientes. En la Figura 24 se puede observar la separación de estas cepas en una rama independiente en la parte inferior.

También se puede aplicar el tipado mediante MLST para estudiar las cepas causantes de los brotes epidémicos en diferentes países. La comparación definitiva entre dos cepas para confirmar si son la misma se debe realizar mediante la secuenciación genómica completa (Hossain *et al.*, 2014). Recientemente se ha completado la secuenciación completa de cepas epidémicas del clon de alto riesgo *A. hydrophila* ST251, causantes de bacteremias en China (Pang *et al.*, 2015).

Por el momento la disponibilidad de genomas de las especies de *Aeromonas* es reducida y la mayoría provienen de las cepas clínicas que han causado infecciones severas o recurrentes y que se asocian con clones de riesgo (Grim *et al.*, 2013). Sin lugar a duda esta



estrategia nos aportará una valiosa información cuando aumente el número de cepas de cada especie y nos permitirá comprender mejor los factores que pueden influenciar en la virulencia de determinadas cepas.

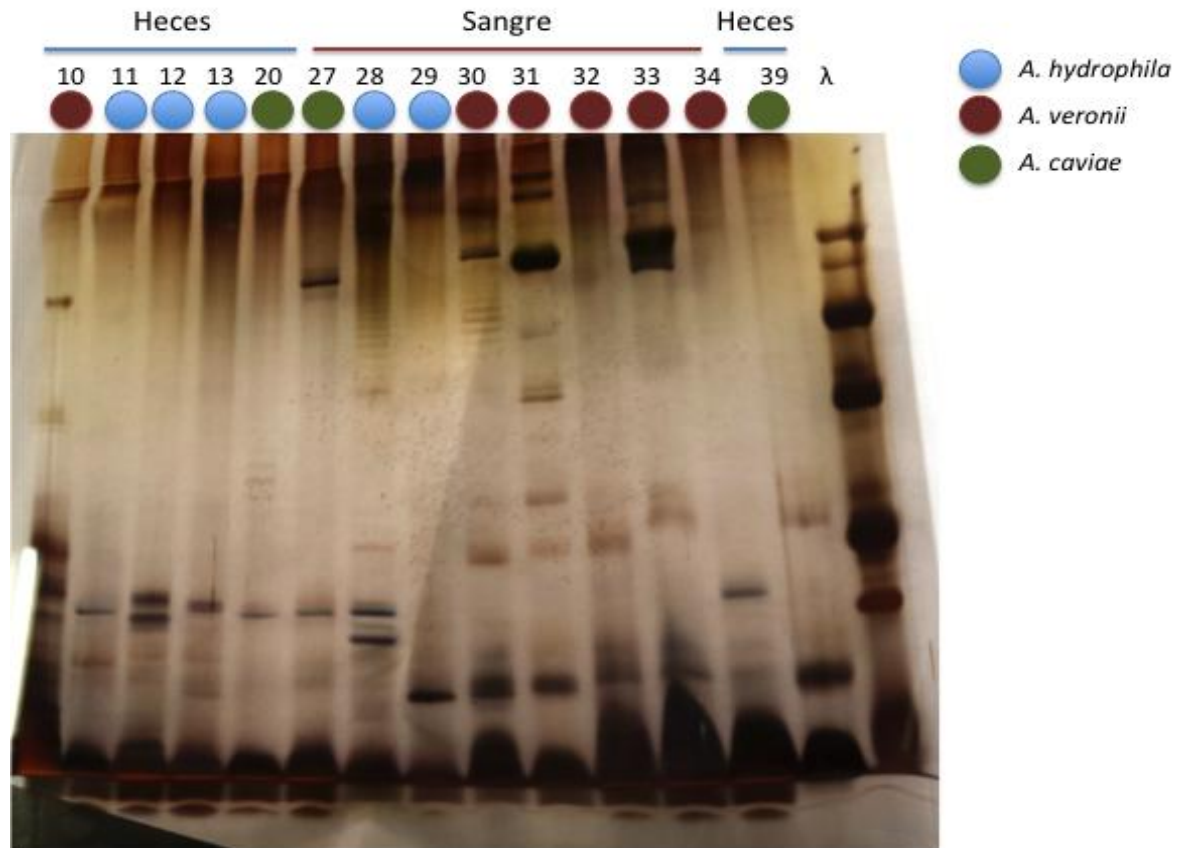
#### **4.6 Estudio del Lipopolisacárido**

Una vez descartada la existencia de relación genética entre las 15 cepas clínicas, nos propusimos identificar las diferencias estructurales de su LPS, comparando especialmente las cepas invasivas con las causantes de diarrea. La electroforesis en gel de acrilamida de las fracciones de LPS mostró una gran variabilidad en el perfil de bandas en las diferentes cepas (**Figura 24**), sin ningún tipo de relación con la especie o el origen de la cepa. Únicamente podemos destacar que las cepas aisladas de sangre presentaban mayor número de bandas, especialmente en la zona superior del gel.

Una de las limitaciones de este estudio es que no se conoce el serotipo de las cepas de nuestra colección, ya que el serotipo O11 se asocia con infecciones graves en humanos mientras que el serotipo O34 se relaciona con infecciones en los peces (Merino *et al.*, 2015). Sin embargo la existencia de diferencias en la estructura del LPS en relación al potencial de virulencia de la cepa ya ha sido descrita por otros autores (Jiménez *et al.*, 2008; Swain *et al.*, 2010).

Estudios previos han demostrado que el LPS puede ser muy variable dentro del mismo género, y presentar diferente potencial patogénico (Rietschel *et al.*, 1996). Esta toxina es capaz de provocar una importante inflamación sistémica conocida como shock séptico o endotoxemia, provocando a su vez la activación del sistema inmune para hacer frente a la infección (Jiménez, 2008).

Otra de las funciones importantes del LPS es facilitar el proceso inicial de adhesión bacteriana y colonización de mucosas, además actúan de barrera física impidiendo la correcta activación del complemento, confiriendo resistencia a la actividad bactericida del microorganismo (Merino *et al.*, 1992).



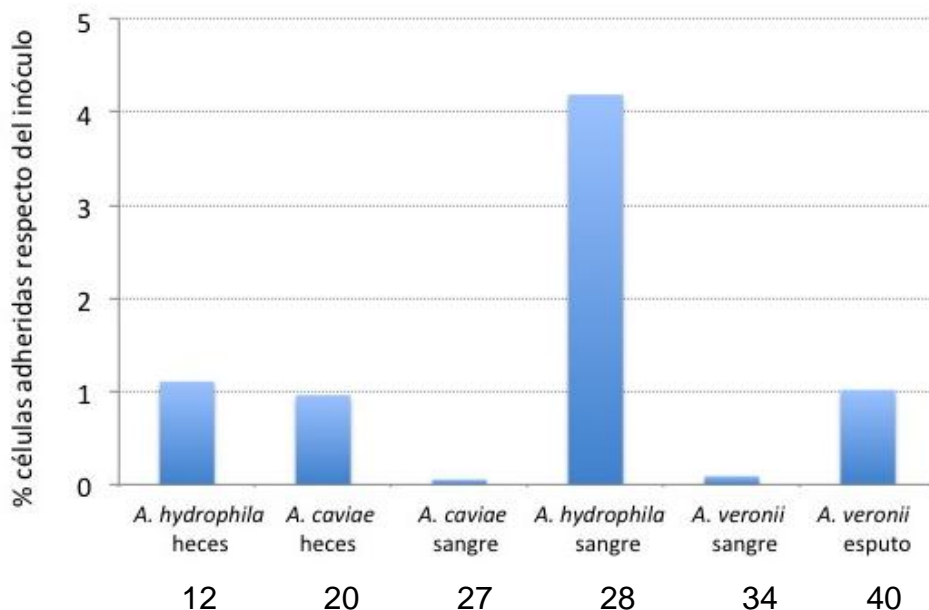
**Figura 24.** Gel de acrilamida teñido con plata con la extracción de LPS de las 14 cepas estudiadas. El último carril corresponde al marcador de peso molecular. Se observa una gran variabilidad en los patrones de bandas, que son más numerosas en las cepas invasivas de bacteriemias.

## 4.7 Adhesión e Invasión

La última parte de esta tesis está dedicada al estudio de la adherencia a líneas celulares e invasión de 6 cepas clínicas seleccionadas por sus factores de virulencia.

Se pudo comprobar en tres experimentos independientes que estas cepas no tienen capacidad de invadir e internalizarse dentro de las células Caco2 diferenciadas a mucosa intestinal.

En cuanto a su capacidad de adhesión, observamos diferencias importantes en el comportamiento de las 6 cepas, destacando la cepa *A. hydrophila* 28 de hemocultivo (**Figura 25**). Este aislado también fue el que mostró una mayor cantidad de bandas de LPS, por lo que ambos factores podrían estar relacionados.



**Figura 25.** Adhesión de 6 cepas a células intestinales Caco2 diferenciadas. Destaca la gran capacidad de adherencia de la cepa 28.

La funcionalidad del flagelo polar es imprescindible para una correcta motilidad, adhesión y formación de biofilm (Rabaan *et al.*, 2001; Gavín *et al.*, 2002), y también se ha descrito para los pilli (Hadi *et al.*, 2012). Otros factores que influyen en la etiopatogenia de *Aeromonas* son el pH y la salinidad (Mafu *et al.*, 2011; Pianetii *et al.*, 2012). Aproximadamente el 60% de las aeromonas poseen un segundo flagelo lateral que contribuye a la adhesión en superficies. Ambos sistemas flagelares (polar y lateral), han demostrado ser importantes en el inicio de la colonización (Lowry *et al.*, 2014). Las cepas que son capaces de invadir podrían emplear otros factores que como la expresión de la capa-S, la cápsula e incluso el mismo LPS (Lowry *et al.*, 2014).

#### **4.8 Discusión General**

Las enfermedades infecciosas son uno de los principales retos de salud a los que se enfrentan los países en vías de desarrollo, siendo las diarreas las que mayor mortalidad producen. Las bacterias más frecuentemente involucradas en los procesos diarreicos son *Salmonella*, *Shigella*, algunos serotipos de *Escherichia coli*, *Aeromonas* y *Campylobacter* (Bravo *et al.*, 2012). Existe la sospecha de que muchos casos de diarrea causados por *Aeromonas* pasan desapercibidos por falta de un adecuado estudio microbiológico de las heces con el consecuente infradiagnóstico (Taneja *et al.*, 2004, Chang *et al.*, 2003).

*Aeromonas* también puede formar parte de la microbiota habitual de sujetos sanos (Pitarangsi *et al.*, 1982), aunque tienen un marcado carácter medioambiental, estando siempre relacionadas con ambientes acuáticos y aunque muchas veces se pone en duda su potencial

patogénico, también se han descritos causando procesos invasivos extraintestinales (Janda y Abbott). Las infecciones graves causadas por *Aeromonas* spp. se asocian con patologías de base en el huésped, especialmente neoplasias, cirrosis hepática y diabetes mellitus, y en personas sometidas a tratamientos inmunosupresores, aunque también se atribuye un papel importante a la virulencia de este género mediante la producción de sustancias extracelulares como enterotoxinas, citolisinas y hemolisinas (Moyer y Larebb 1988).

Aunque se han descrito cepas en todo el mundo, existen diferencias geográficas en la prevalencia de las enfermedades causadas por estas bacterias (Ko *et al.*, 1996; Saavedra *et al.*, 2004; Aravena *et al.*, 2012); existiendo una particular distribución de especies en cada ambiente: *A. caviae* es más frecuente en heces mientras que *A. veronii* lo es en el ambiente acuático. También se han puesto de manifiesto diferencias en la virulencia de cepas ambientales y clínicas (Chen *et al.*, 2014; Ghenghesh *et al.*, 2014; Li *et al.*, 2015), aunque al igual que ocurre en otros microorganismos, la virulencia debe ser demostrada cepa a cepa, ya que generalmente no se puede generalizar dentro de una misma especie (Chen *et al.*, 2014).

La diarrea asociada con *Aeromonas*, así como la ocasionada por virus y otras bacterias, es normalmente un proceso autolimitado aunque en algunos casos el curso clínico puede agravarse y requerir tratamiento antimicrobiano. La resistencia a los antibióticos suele estar relacionada con la exposición al ambiente hospitalario y con el abuso de este tipo de drogas, pero en el caso de *Aeromonas* se ha descrito también en cepas de origen acuático, especialmente ligadas a la acuicultura. Estas cepas finalmente pueden llegar a colonizar/infectar al ser humano por exposición con el agua contaminada (Carvalho *et al.*, 2012; Robertson *et al.*, 2014; Cisar *et al.*, 2014; Esteve *et al.*, 2015). Además, la transferencia horizontal de genes está asegurada

por su gran capacidad de incorporar ADN externo mediante transformación y conjugación (Huddleston *et al.*, 2013; Nguyen *et al.*, 2014). Recientemente se ha demostrado la existencia de plásmidos en cepas de aeromonas con genes de resistencia a antibióticos y factores de virulencia (Marti y Balcázar, 2012; Maravić *et al.*, 2013; Vincent *et al.*, 2015), e incluso se han llegado a detectar cepas resistentes a los antibióticos en agua de consumo humano (Figueira *et al.*, 2011) y en ríos y lagos con acceso del hombre (Girlich *et al.*, 2011; Skwor *et al.*, 2014), lo que plantea un reto para la Salud Pública y justifica la continua vigilancia de este género. El reciente estudio del mobiloma en este género pone de manifiesto la gran capacidad de incorporar genes mediante sistemas de transferencia horizontal (Piotrowska y Popowska 2015).

Con todos los antecedentes anteriores nos planteamos una tesis doctoral con la hipótesis de que las cepas causantes de cuadros invasivos de nuestro hospital podrían poseer factores de virulencia y mecanismos de patogenicidad distintos a las muestras ambientales, y además corresponden a linajes genéticos diferentes. El objetivo general fue caracterizar fenotípica y genotípicamente una colección de cepas de *Aeromonas* de distintos orígenes en relación con su patogenicidad.

En el estudio retrospectivo de 16 años de nuestra casuística, hemos observado un aumento progresivo del aislamiento de *Aeromonas* en muestras de coprocultivo, manteniéndose constante la frecuencia de las muestras de origen invasivo. En este aumento del aislamiento también deben considerarse otros factores como la mejora de los sistemas de detección, y especialmente de los sistemas identificación como ocurre tras la incorporación del MALDI-TOF. Como hemos podido comprobar, la metodología de Wider no identifica correctamente las especies.

Respecto a la distribución de las especies en las muestras de origen clínico, podemos decir que *A. hydrophila* es sin lugar a dudas la especie más prevalente en nuestro hospital, al igual que ocurre en otros trabajos con muestras clínicas (Bravo et al., 1995; Sinha et al., 2004, Arteaga-Garibay et al., 2005), mientras que la distribución ambiental es diferente (Ginestrea et al., 2005; Hu et al., 2012). Recientemente, se ha descrito la especie *A. dhakensis* que parece estar infraidentificada en los laboratorios de rutina, y que parece ser mucho más virulenta que *A. hydrophyla* (Chen et al., 2014). En nuestra serie podemos estar seguros de que no contamos con ninguna cepa de *A. dhakensis*, ya que además de la identificación fenotípica, también contamos con la secuenciación nucleotídica del gen 16S rADN, al que se considera como el método de referencia para la identificación bacteriana y la tecnología MALDI-TOF que es capaz de diferenciar esta especie (Chen et al., 2014).

En reciente informe la OMS ha definido como una de las principales prioridades de Salud Pública el control de la resistencia a los antimicrobianos, y en concreto *Aeromonas* puede conectar diversos ambientes debido a su predilección por los sistemas acuáticos. Se han descrito cepas con resistencia en diversas especies, incluyendo una cepa de *A. caviae* productora de carbapenemasa VIM (Adler et al., 2014), aunque la presencia de múltiples determinantes de resistencia está asociado con cepas de origen hospitalario (McNicol et al., 1980, Motyl et al., 1985, Awan et al., 2009, Chen et al., 2014 Esteve et al., 2015), siendo escasa la representación en cepas de origen ambiental (Carvalho et al., 2012, Marti y Balcazar, 2012, Maravić et al., 2013, Vincent et al., 2015). En nuestra serie no hemos detectado cepas con multiresistencia, si bien la mayor parte de los fenotipos de resistencia a  $\beta$ -lactámicos se justifica por la expresión de la betalactamasa cromosómica que posee de forma intrínseca todo el



género (Walsh *et al.*, 1995). A pesar de que detectamos algunas cepas con resistencia a carbapenems, el test de Hodge fue negativo en todas ellas, descartando la producción de otras carbapenemasas.

Otro de los puntos importantes en el que se ha centrado esta tesis, es el estudio de los determinantes de virulencia y las diferencias en las cepas según su origen. Los resultados mostraron que las cepas de origen clínico acumulan más cantidad de determinantes de virulencia, particularmente las especies *A. veronii* y *A. hydrophila*. Las enzimas extracelulares identificadas en mayor proporción en nuestro estudio resultaron ser la enolasa, las enterotoxinas citotóxicas y las enzimas que forman parte del sistema de secreción tipo III (T3SS) AscV y AexT, respectivamente. A pesar de que no se detectó la presencia de los genes de la hemolisina *ahh1*, pudimos corroborar la producción fenotípica de hemolisina en 10 cepas. Se han descrito  $\beta$ -hemolisinas y  $\alpha$ -hemolisinas en *Aeromonas* (Erova *et al.*, 20017; Jiménez, 2007), que como cualquier otro factor, su expresión puede estar condicionada por las condiciones de crecimiento (Jiménez *et al.*, 2008; Tomás 2012).

La diversidad genética de las cepas también es un aspecto importante que nos ayuda a entender la epidemiología global de los microorganismos. En ese sentido hemos estudiado la diversidad de nuestra colección con dos herramientas de tipado molecular: PFGE y MLST. La alta diversidad genética que hemos encontrado nos permite rechazar la posibilidad de una fuente común de contagio, e incluso de la existencia de una situación de brote en el hospital. De hecho, podemos estar seguros de que todas las cepas proceden de fuentes diferentes y de un ambiente relacionado con la comunidad.

El esquema de MLST para *Aeromonas* se describió en 2011 (Martino *et al.*, 2011), considerando que el número de taxones se ha

incrementado en la última década con más de 20 especies descritas, pero que en algunos casos, la validez de la designación no ha sido universalmente aceptada (Carnahan *et al*, 2005). En la base de datos disponible en internet no existen muchos registros, y todas las 15 cepas que se tiparon con MLST no se correspondieron con ninguna de las cepas anteriormente descritas, siendo muchos de los alelos de nuestras cepas también nuevos. Los métodos moleculares basados en la secuenciación nucleotídica del ADN son ampliamente aceptados debido a su reproducibilidad, simplicidad y por presentar un poder discriminatorio alto. En nuestro caso decidimos ampliar el estudio con la construcción de árboles filogenéticos usando los concatenados de los genes del MLST. Este análisis nos ha permitido ver que nuestras cepas no tienen ninguna agrupación y están distribuidas entre los grupos filogenéticos del género.

Finalmente nos propusimos estudiar un importante componente estructural de las cepas como es el lipopolisacárido, comparando su estructura en las 15 cepas que habían sido tipadas por MLST. Los resultados mostraron una estructura de lipopolisacárido mucho más compleja en las cepas invasivas que en las causantes de diarrea, reforzando la idea de que esta estructura participa como un factor de virulencia más (Tomas 2012). En este sentido también la adhesión a células eucariotas es un proceso clave, ya que si no es suficiente, la bacteria nunca va a poder ejercer su patogenicidad. Diferentes factores pueden participar en el proceso de adhesión como el flagelo polar, el lipopolisacárido y otras adhesinas (Merino *et al.*, 1997, Thornley *et al.*, 1997, Rabaan *et al.*, 2001). Se ha visto que mutantes no flagelados, cepas sin flagelos o la aglutinación de estos con anticuerpos anti-flagelina reducen tanto la adhesión como la invasión (Gavín *et al.*, 2003). El estudio de adhesión a líneas celulares Caco-2 se realizó en 6 cepas, comprobando que tenían un escaso poder de

adhesión, y ningún efecto citotóxico, destacando una cepa de *A. hydrophila* de bacteriemia con mayor capacidad de adhesión que el resto de las cepas.

Finalmente podemos resumir que en nuestro Hospital en los últimos años hemos detectado un aumento del diagnóstico de *Aeromonas* en muestras de coprocultivo, manteniéndose estable el número de cepas invasivas. Hemos detectado fallos en la identificación de especie en la etapa previa a la incorporación del MALDI-TOF, y se ha descartado la presencia de la especie *A. dhakensis* en las muestras invasivas de los últimos años mediante la secuenciación de un fragmento interno del gen 16S rADN. *A. hydrophila* (84%) y *A. veronii* (12%) son las especies más relevantes en nuestra serie, existiendo una asociación entre *A. veronii* (60%) y las muestras invasivas. Las cepas estudiadas no presentaron determinantes de resistencia a los antibióticos, aunque sí se observó una mayor acumulación de factores de virulencia en las cepas clínicas (n=28) que en las de origen ambiental (n=12). El tipado molecular de las cepas mediante PFGE (n=40) y MLST (n=15) nos permitió asignar linajes genéticos diferentes y rechazar la hipótesis de un fuente de contagio común. Cabe resaltar que para el tipado de MLST se eligieron 15 cepas clínicas de coprocultivo y hemocultivos con la mayor acumulación de factores de virulencia. En estas mismas 15 cepas se analizó la estructura de su lipopolisacárido, observando una mayor complejidad en las cepas invasivas. En el estudio de la adherencia a líneas celulares en 6 cepas pudimos observar una mayor adherencia en la cepa 40 de hemocultivos, no existiendo en ningún momento efectos citotóxicos en ninguna de las 6 cepas analizadas.



# Conclusiones



1. La prevalencia de la infección por *Aeromonas* en el Hospital Universitario Ramón y Cajal se ha mantenido estable durante los últimos 19 años, aunque se ha detectado un aumento en el número de muestras de heces con diarrea positivas para este microorganismo.
2. *Aeromonas hydrophila* es la especie más prevalente en las muestras clínicas seguida por *Aeromonas caviae*, sin embargo no hay que descartar la especie *A. veronii* como un potencial patógeno, ya que ésta especie está presente en todos los aislados de los distintos orígenes.
3. La metodología de Wider no identifica adecuadamente las especies del género *Aeromonas*, mientras que el sistema MALDI-TOF se correlaciona completamente con la secuenciación nucleotídica de un fragmento del gen 16S ADNr siendo éstos dos últimos congruentes y concordantes.
4. Las cepas de nuestra colección no presentan resistencia a los antibióticos, exceptuando a las cepas de *Aeromonas veronii* de origen ambiental con resistencia a los carbapenems, probablemente debido a una hiperexpresión de su metalo-beta-lactamasa cromosómica.
5. Las cepas aisladas de muestras clínicas portan mayor número de genes de virulencia, en comparación que las ambientales, siendo las especies *A. veronii* y *A. hydrophila* las que acumularon más genes con independencia del origen.





6. Mediante la técnica de electroforesis de campo pulsado, PFGE, se observó una gran diversidad genética en las cepas analizadas que descarta una fuente común de contagio.
7. Esta alta diversidad genética también ha sido demostrada mediante MLST, describiéndose 15 nuevas STs que no habían sido previamente detectadas. El análisis filogenético de nuestras cepas con el resto de la base de datos internacional, ha demostrado que no existe ninguna relación genética entre los aislados.
8. La caracterización del lipopolisacárido demuestra que es una estructura cepa-dependiente, con lo cual se necesitan analizar de forma separada y que puede ser utilizado para clasificar a las especies de *Aeromonas* por debajo del nivel de especies.
9. Las cepas analizadas en este estudio no presentan capacidad para invadir e internalizarse dentro de las células Caco2 diferenciadas a mucosa intestinal, solo se destaca un aislado de *A. hydrophila* productor de una bacteremia con gran capacidad de adhesión a esta línea celular.
10. Finalmente, y a modo de conclusión general, podemos que al igual que ocurre en otros microorganismos, la virulencia y patogenicidad debe ser demostrada cepa a cepa, ya que generalmente no se puede generalizar dentro de una misma especie, y que el estado inmunológico del huésped también juega un relevante papel en la infección por *Aeromonas*.



# **Bibliografía**



- Adler, A., M. Assous, S. Paikin, A. Shulman, T. Miller-Roll, S. Hillel, R. Aronov, Y. Carmeli, M. J. Schwaber.** 2014. Emergence of VIM-producing *Aeromonas caviae* in Israeli hospitals. *J Antimicrob Chemother.* 69 (5):1211-1214.
- Albarral, V.** 2013. Diversidad intraespecífica y factores de virulencia en el “complejo de especies de *Aeromonas hydrophila*” (*A. hydrophila*, *A. salmonicida*, *A. bestiarum*). Memoria presentada para optar al título de Doctora por la Universitat de Barcelona. 205pp.
- Alperi, A. y M. Figueras.** 2010. Human isolates of *Aeromonas* possess Shiga toxin genes (*stx1* and *stx2*) highly similar to the most virulent gene variants of *Escherichia coli*. *Clin Microbiol Infect.* 16(10):1563–1567.
- Altwegg, M. and H. K. Geiss.** 1989. *Aeromonas* as a human pathogen. *Crit Rev Microbiol* 16(4):253–286.
- Aravena, R. M., T. J. Inglis, B. Henderson, T. V. Riley and B. J. Chang.** 2012. Antimicrobial susceptibilities of *Aeromonas* strains isolated from clinical and environmental sources to 26 antimicrobial agents. *Antimicrob Agents Chemother.* 56(2):1110-1112.
- Aravena, R. M., T. J. Inglis, T. V. Riley and B. J. Chang.** 2014. Distribution of 13 virulence genes among clinical and environmental *Aeromonas* spp. in Western Australia. *Eur J Microbiol Infect Dis.* 33: 1889-1895.
- Austin, B.** 1998. Marine Microbiology. First Edition. Cambridge University Press, New York, USA. pp. 222.
- Austin, B., D. Austin, I. Dalsgaard, B. Gudmundsdottir and J. M. Thornton.** 1998. Characterization of atypical *Aeromonas salmonicida* by different methods. *System Appl. Microbiol.* 21(1):50-64.
- Beaz-Hidalgo, R. y M. J. Figueras.** 2013. *Aeromonas* spp. whole genomes and virulence factors implicated in fish disease. *J Fish Dis* 36(4): 371–388.
- Beaz-Hidalgo, R., A. Martínez-Murcia, y M. J. Figueras.** 2013. Reclassification of *Aeromonas hydrophila* subsp. *dhakensis* Huys *et al.* 2002 and *Aeromonas aquariorum* Martínez-Murcia *et al.* 2008 as *Aeromonas dhakensis* sp. nov. comb nov. and emendation of the species *Aeromonas hydrophila*. *Syst Appl Microbiol* 36(3): 171–176.
- Beaz-Hidalgo, R., F. Latif-Eugenín, M. J. Hossain, K. Berg, R. M. Niemi, J. Rapala, C. Lyra, M. R. Liles, M. J. Figueras.** 2015. *Aeromonas aquatica* sp. nov., *Aeromonas finlandiensis* sp. nov. and *Aeromonas lacus* sp. nov.

- isolated from Finnish waters associated with cyanobacterial blooms. *Syst Appl Microbiol.* 38(3):161-8.
- Béchet, M. and R. Blondeau.** 2003. Factors associated with the adherence and biofilm formation by *Aeromonas caviae* on glass surfaces. *J. Appl Microbiol.* 94(6): 1072-1078.
- Bennett-Guerrero, E., T. J. McIntosh, G. R. Barclay, D. S Snyder, R. J. Gibbs, M.G. Mythen, I. R. Poxton.** 2000. Preparation and preclinical evaluation of a novel liposomal complete-core lipopolysaccharide vaccine. *Infect Immun.* 68(11): 6202-6208.
- Bernheimer, A. W., L. S. Avigad.** 1974. Partial characterization of aerolysin, a lytic exotoxin from *Aeromonas hydrophila*. *Infect Immun.* 9(6):1016-1021.
- Bertuccio, M. P., I. Picerno, M. E. Scoglio.** 2012. Adherence of *Aeromonas hydrophila* strains to human enterocyte-like cells pre-infected with rotavirus. *Prev Med Hyg.* 53(3):165-168.
- Boltaña, S., R. Tridico, M. Teles, S. Mackenzie and L. Tort.** 2014. Lipopolysaccharides isolated from *Aeromonas salmonicida* and *Vibrio anguillarum* show quantitative but not qualitative differences in inflammatory outcome in *Sparus aurata* (Gilthead seabream). *Fish Shellfish Immunol.* 39:475-82.
- Borrell, N., M. J. Figueras y J. Guarro.** 1998. Phenotypic identification of *Aeromonas* geno-species from clinical and environmental sources. *Can. J. Microbiol.* 44(2):103-108.
- Braun, M., K. Stuber, Y. Schlatter, T. Wahli, P. Kuhnert and J. Frey.** 2002. Characterization of an ADP-ribosyltransferase toxin (AexT) from *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida*. *J Bacteriol.* 184(7): 1851-1858.
- Bravo, L. Cabrera, G. Castro, M. Ramírez, A. Fernández.** 2007. Aislamiento e identificación de especies pertenecientes a los géneros *Aeromonas*, *Vibrio* y *Plesiomonas* procedentes de muestras extra-intestinales en Cuba. *Rev Chil Infect.* 24 (3): 204-8.
- Bravo, L., A. Fernández, A. Nuñez, L. Rivero, M. Ramírez, A. Águila, Y. Ledo, Y. Cruz, y J. Hernández.** 2012. *Aeromonas* spp asociada a enfermedad diarreica aguda en Cuba: estudios de casos y controles. *Rev Chil Infect.* 29 (1): 44-48.
- Bravo, L., A. Fernández, J. Ledo, M. Ramírez, A. Aguila, el A. Nuñez, L. Cabrera, Y. Cruz.** 2011. Caracterización fenotípica y factores de virulencia en cepas de *Aeromonas* aisladas de

pacientes con enfermedad diarreica aguda en Cuba. *Rev Chil Infect* 28(2): 159-165.

- Burr, E., K. Stuber and J. Frey.** 2003. The ADP-ribosylating toxin, Aext, from *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida* is translocated via a type III secretion pathway. *J Bacteriol.* 185(22): 6583-6591.
- Burr, S. E., K. Stuber, T. Wahli and J. Frey.** 2002. Evidence for a type III secretion system in *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida*. *J Bacteriol.* 184: 5966-70.
- Cabrera, R., E. Castro y A. M. Ramírez.** 2007. Isolation and identification of species from the genera *Aeromonas*, *Vibrio*, and *Plesiomonas* from extraintestinal samples in Cuba. *Rev. Chil. Infectol.* 24(3): 204-208.
- Carnahan, A., T. Chakraborty, G.R. Fanning, D. Verma, A. Ali, J. M. Janda and S. W. Joseph.** 1991. *Aeromonas trota* (Guilthead seabream). *Fish Shelfish Immunol* 39(2): 475-482.
- Carvalho, M. J., A. Martínez-Murcia, A. C. Esteves, A. Correia and M. J. Saavedra.** 2012. Phylogenetic diversity, antibiotic resistance and virulence traits of *Aeromonas* spp. from untreated waters for human consumption. *Int J Food Microbiol.* 159(3):230-239.
- Castro-escarpulli, G., G. Aguilera, S. Giono, C. Hernández, M Rodríguez, L. Soler, G. M. Salvat.** 2002. El género *Aeromonas* ¿Un patógeno importante en Mexico? *Clin. Microbiol.* 22(4): 206-216.
- Castro-Escarpulli, G., M. J. Figueras, G. Aguilera-Arreola, L. Soler, E. Fernández-Rendón, G. O. Aparicio, J. Guarro and M. R. Chacón.** 2003. Characterisation of *Aeromonas* spp. isolated from frozen fish intended for human consumption in Mexico. *Int J Food Microbiol.*84(1): 41-49.
- Chakraborty, T., M. A. Montenegro, S. C. Sanyal, R. Helmuth, E. Bulling and K. N. Timmis.** 1984. Cloning of enterotoxin gene from *Aeromonas hydrophila* provides conclusive evidence of production of a cytotoxic enterotoxin. *Infect Immun.* 46(2): 435-441.
- Chang, Y., J. Y- Wang, A. Selvam, S. C. Kao, S. S. Yang and D. Y. Shih.** 2008. Multiplex PCR detection of enterotoxin genes in *Aeromonas* spp. from suspect food samples in northern Taiwan. *J Food Prot.* 71(10): 2094-2099.
- Chao, C., Lai, C., Tang, H., Ko, W. and Hsueh, P.** 2013. Biliary tract infections caused by *Aeromonas* species. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 32(2): 245-250.

- Chao, S. M., C. C. Lay, S. H. Huang and S. Lin.** 2014. Comparison of Skin and Soft Tissue Infections Caused by *Vibrio* and *Aeromonas* Species. *Surg Infect.* 15(5): 576-580.
- Chen, P. L., C. J. Wu, P. J. Tsai, H. J. Tang, Y. C. Chuang, N. Y. Lee, C. C. Lee, C. W. Li, M. C. Li, C. C. Chen, H. W. Tsai, C. C. Ou, C. S. Chen, W. C. Ko.** 2014. Virulence diversity among bacteremic *Aeromonas* isolates: *ex vivo*, animal, and clinical evidences. *PLoS One.* 6(9):e111213.
- Chen, P. L., P. J. Tsai, C. S. Chen, Y. C. Lu, H. M. Chen, N. Y. Lee, C. C. Lee, C. W. L, M. C. Li, C. J. Wu, W. C. Ko.** 2014. *Aeromonas* stool isolates from individuals with or without diarrhea in southern Taiwan: Predominance of *Aeromonas veronii*. *J Microbiol Immunol Infect.* 1182(14):00176-00175.
- Chen P. L., C. J. Wu, C. S. Chen, P. J. Tsai, H. J. Tang, W. C. Ko.** 2014. A comparative study of clinical *Aeromonas dhakensis* and *Aeromonas hydrophila* isolates in southern Taiwan: *A. dhakensis* is more predominant and virulent. *Clin Microbiol Infect.* 20:O428-434.
- Chen, P., W. Ko, C. Wu.** 2012. Complexity of  $\beta$ -lactamases among clinical *Aeromonas* isolates and its clinical implications. *J Microbiol Immunol Infect.* 45(6):398-403.
- Chhabra, G.,T. Upadhyaya, A. Dixit.** 2011. Molecular cloning, sequence analysis and structure modeling of OmpR, the response regulator of *Aeromonas hydrophila*. *Mol Biol Rep.* 39(1):41-50.
- Chopra, A. K. y C. W. Houston.** 1989. Purification and partial characterization of a cytotoxic enterotoxin produced by *Aeromonas hydrophila*. *Can J Microbiol.* 35(7):719-727.
- Chopra, A. K., C. W. Houston, J. W. Peterson and G. F. Jin.** 1993. Cloning, expression, and sequence analysis of a cytolytic enterotoxin gene from *Aeromonas hydrophila*. *Can J Microbiol.* 39(5): 513-523.
- Chopra, A. K., Vo, T. N. and Houston, C. W.** 1992. Mechanism of action of a cytotoxic enterotoxin produced by *Aeromonas hydrophila*. *FEMS Microbiol Lett* 70(1): 15-19.
- Cisar, C. R., S. K. Henderson, M. L. Askew, H. G. Risenhoover, C. R. McAndrews, S. D. Kennedy, C. S. Paine.** 2014. Antibiotic resistance in *Aeromonas* upstream and downstream of a water resource recovery facility. *Water Environ Res.* 86(9):835-843.
- Cohen, J.** 2002. The immune-pathogenesis of sepsis. *Nature.* 420: 885-891.



- Colwell, R and L. Karper.** 1997. Microbiología. 3a Edición norteamericana "Fundamentals of Microbiology". Barcelona, España.743 pp
- Colwell, R., M. MacDonell and J. De Ley.** 1986. Proposal to recognize the family *Aeromonadaceae* fam. nov. *Int J Syst Bacteriol* 36: 473–477.
- Conn, H.** 1964. Spontaneous peritonitis and bacteremia in laennec's cirrhosis caused by enteric organisms: A relatively common but rarely recognized syndrome. *Ann Intern Med.*60: 568–580.
- Couto, C. R., S. S. Oliveira, M. L. Queiroz, A. C. Freitas-Almeida.** 2007. Interactions of clinical and environmental *Aeromonas* isolates with Caco-2 and HT29 intestinal epithelial cells. *Lett Appl Microbiol.* 45(4):405-410.
- Cross, A. S., S. Opal, P. Cook, J. Drabick and Bhattacharjee.** 2004. Development of an anticore lipopolisaccharide vaccine for the prevention and treatment of sepsis. *Vaccine.* 22(7): 812-817.
- Curran, B., D. Jonas, H. Grundmann, T. Pitt, C. Dowson,** 2004. Development of a multilocus sequence typing scheme for the opportunistic pathogen *Pseudomonas aeruginosa*. *J Clin Microbiol.* 42(12): 5644-5649.
- Dacanay, A., L. Knikle, K. S. Solanky, J. M. Boyd, J. A. Walter, L. L. Brown, S. C. Johnson and M. Reith.** 2006. Contribution of the type III secretion system (TTSS) to virulence of *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida*. *Microbiology.* 152(6): 1847-1856.
- Días, C., C. R. Serra, L. C. Simões, A. Martinez-Murcia and M. J. Saavedra.** 2014. Extended-spectrum  $\beta$ -lactamase and carbapenemase-producing *Aeromonas* species in wild animals from Portugal. *Vet Rec.* 174(21):532.
- Dickson, R.** Charlotte Gray. 1984. *Can Med Assoc J.* 1984. 130 (6): 753.
- dos Santos, P.A., A. C. Pereira, A. F. Ferreira, M. A. de Mattos Alves, A. C. Rosa, A. C. Freitas-Almeida.** 2015. Adhesion, invasion, intracellular survival and cytotoxic activity of strains of *Aeromonas* spp. in HEp-2, Caco-2 and T-84 cell lines. *Antonie Van Leeuwenhoek.* 107:1225-36.
- Rietschel E., C. Alexander.** 2001. Bacterial lipopolysaccharides and innate immunity. *J Endotoxin Res* 7(3):167-202.
- El-Bouri, K., M. Reid, B. Ben-Ismaeil, A. R. Davies, L. G. Harris, D. Mack.** 2012. Comparison of bacterial identification by MALDI-TOF

- mass spectrometry and conventional diagnostic microbiology methods: agreement, speed and cost implications. *Br J Biomed Sci.* 69(2):47-55.
- Erova, T. E., J. Cha, A. J. Horneman, M. A. Borchardt, B. K. Khajanchi, A. A. Fadl and A. K. Chopra.** 2007. Identification of a new hemolysin from diarrheal isolate SSU of *Aeromonas hydrophila*. *FEMS Microbiol Lett.* 275(2): 301-311.
- Espinoza H.** 2006. Efecto de las actividades humanas sobre la resistencia a antibióticos y metales pesados en *Aeromonas* spp. presentes en aguas del río Loa Región de Antofagasta Chile, tesis de grado para optar al grado de magíster en Cs Biomédicas, mención Microbiología Aplicadas, Universidad de Antofagasta. 82pp.
- Esteve, C., E. Alcaide, M. Giménez.** 2015. Multidrug-resistant (MDR) *Aeromonas* recovered from the metropolitan area of Valencia (Spain): diseases spectrum and prevalence in the environment. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 34(1):137-145.
- Esteve, C., E. Alcaide, R. Canals, S. Merino, D. Blasco, M. J. Figueras y J. M. Tomás.** 2004. Pathogenic *Aeromonas hydrophila* serogrupo O:14 and O:81 strain with an S layer. *Appl Environ Microbiol.* 7(10): 5898-5904.
- Esteve. C., E. Alcaide, M. D. Blasco.** 2012. *Aeromonas hydrophila* subsp. dhakensis isolated from feces, water and fish in Mediterranean Spain. *Microves Microbes Environ.* 27(4): 367–373.
- Farmer III, J., M. Arduino, F. Hickman-Brenner.** 2006. The genera *Aeromonas* and *Plesiomonas*. In *The Prokaryotes: A Handbook on the Biology of Bacteria*, pp. *New York: Springer.* 564–596
- Fatima, A., F. I. Afridi, A. Qureshi, B. J. Farooqiand J. Hussain.** 2013. A. Bacteremia due to *Aeromonas hydrophila* in acute lymphoblastic leukemia. *J Coll Physicians Surg Pak.* 23(12):893-895.
- Fehr, D., C. Casanova, A. Liverman, H. Blazkova, K. Orth, D. Dobbelaere, J. Frey, S. E. Burr.** 2006. AopP, a type III effector protein of *Aeromonas salmonicida*, inhibits the NF- $\kappa$ B signalling pathway. *Microbiology.* 152(9): 2809-2818.
- Ferguson, A. D., W. Welte, E. Hofmann, B. Lindner, O. Holst, J. W. Coulton and K. Diederichs.** 2000. A conserved structural motif for lipopolysaccharide recognition by procaryotic and eucaryotic proteins. *Structure.* 8(6): 585-592.

- Ferguson, M., X. Xu, C. Houston, J. Peterson, D. Coppenhaver, V. Popov and A. Chopra.** 1997. Hyperproduction, purification and mechanism of action of the cytotoxic enterotoxin produced by *Aeromonas hydrophila*. *Infect. Immun.* 65(10): 4299-4308.
- Ferguson, M., X. Xu, C. Houston, J. Peterson, D. Coppenhaver, V. Popov y A. K. Chopra.** 1997. Hyperproduction, purification, and mechanism of action of the cytotoxic enterotoxin produced by *Aeromonas hydrophila*. *Infect Immun.* 65(10): 4299-4308.
- Ferreira, L., S. Vega, F. Sánchez-Juanes, M. González, A. Herrero, M. C. Muñiz, M. González-Buitrago, J. L. Muñoz.** 2010. Identifying bacteria using a matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight (MALDI-TOF) mass spectrometer. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 28(8): 492-497.
- Figueira, V., I. Vaz-Moreira, M. Silva, C. M. Manaia.** 2011. Diversity and antibiotic resistance of *Aeromonas* spp. in drinking and wastewater treatment plants. *Water Res.* 45(17): 5599-55611.
- Figueras, M. J., A. Alperi, R. Beaz-Hidalgo, E. Stackebrandt, E. Brambilla, A. Monera, A. Martínez-Murcia.** 2011. *Aeromonas rivuli* sp. nov., isolated from the upstream region of a karst water rivulet. *Int J Syst Evol Microbiol* 61(2):242-248.
- Figueras, M. J., Horneman, A. J., Martínez-Murcia, A and J.Guarro.** 2007. Controversial data on the association of *Aeromonas* with diarrhoea in a recent Hong Kong study. *J Med Microbiol.* 56(7): 996-998.
- Figueras, M. J., J. Guarro, and y A. Martínez-Murcia.** 2000. Clinically relevant *Aeromonas* species. *Clin Infect Dis* 30(6): 988-989.
- Finlay, B. B., F. Heffron, S. Falkow.** 1989. Epithelial cell surfaces induce Salmonella proteins required for bacterial adherence and invasion. *Science.* 243(4893): 940-943.
- Fresno, S., N. Jiménez, L. Izquierdo, S. Merino, M. M. Corsaro, C. De Castro, M. Parrillini, T. Naldi, M. Regué and J. M. Tomás.** 2007. The ionic interaction of *Klebsiella pneumoniae* K2 capsule and core lipopolysaccharide. *Microbiol.* 152(6): 1807-1818.
- Funahara, Y. and H. Nikaido.** 1980. Asymmetric localization of lipopolysaccharides on the outer membrane of *Salmonella typhimurium*. *J Bacteriol.* 141(3):1463-1465.
- Gavín R.** 2003. Caracterización Genética y Fenotípica del Flagelo de *Aeromonas*. Tesis Doctoral, Universidad de

- Barcelona, Barcelona, España. 188pp.
- Gavín, R., A. A. Rabaan, S. Merino, J. M. Tomás, I. Gryllos and J. G. Sha.** 2002. Lateral flagella of *Aeromonas* species are essential cell adherence and biofilm formation. *Mol Microbiol.* 43(2): 383-397.
- Ghenghesh, K. S., S. F. Ahmed, P. Cappuccinelli, J. D. Klena.** 2014. Genospecies and virulence factors of *Aeromonas* species in different sources in a North African country. *Libyan J Med.* 9;9: 25497.
- Ghenghesh, K., F. Salwa., Ahmed, P. Cappuccinelli and J. Klena.** 2014. Genospecies and virulence factors of *Aeromonas* species in different sources in a North African country. *Libyan J Med.* 9: 10-3402.
- Ginestrea, M., G. Rincón, S. Romero, B. Harris, M. Castellano, G. Colina.** 2005. Especies de *Aeromonas* en vegetales frescos que se expenden en un mercado popular de Maracaibo. *Rev. Soc. Ven. Microbiol.* 25:2
- Girlich, D., L. Poirel, P. Nordmann.** 2011. Diversity of clavulanic acid-inhibited extended-spectrum  $\beta$ -lactamases in *Aeromonas* spp. from the Seine River, Paris, France. *Antimicrob Agents Chemother.* 55(3):1256-1261.
- Girlich, D., L. Poirel, P. Nordmann.** 2010. PER-6, an extended-spectrum beta-lactamase from *Aeromonas allosaccharophila*. *Antimicrob Agents Chemother.* 54:1619-22.
- Gómez-Garcés, J. L., D. Saéz, M. Almagro, S. Fernández-Romero, F. Merino, J. Campos and J. Oteo.** 2011. Osteomyelitis associated to CTX-M-15-producing *Aeromonas hydrophila*: first description in the literature. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 70(3): 420-422.
- Grim, C. J., E. V. Kozlova, J. Sha, C. E. Fitts, C. J. Lier, M. L. Kirtley, S. J. Joseph, T. D. Lee, E. M. Burd, B. D. Tall, S. W. Jose, A. J. Horneman, A. K. Chopra, J. R. Shak.** 2013. Characterizations *Aeromonas hydrophila* wound pathotypes by comparative genomic and functional analyses of virulence genes. *MBio.* 4(2):e00064-13.
- Gunasekaran, L., S. Ambalkar, R. A Samarji y A. Qamruddin.** 2009. A Post-traumatic osteomyelitis due to *Aeromonas* species. *Indian J Med Microbiol.* 27(2):163-165.
- Hadi, N., Q. Yang, T. C. Barnett, S. M. Tabei, S. M. Kirov, J. G. Shaw.** 2012. Bundle-forming pilus locus of *Aeromonas veronii* bv. *Sobria*. *Infect Immun.* 80(4):1351-1360.
- Hatje, E., C. Neuman, M. Katouli.** 2014. Interaction of

- Aeromonas* strains with lactic acid bacteria via Caco-2 cells. *Appl Environ Microbiol.* 80(2):681-686.
- Hayes, M., C. Thomson, A. Amyes.** 1994. Three beta-lactamases isolated from *Aeromonas salmonicida*, including a carbapenemase not detectable by conventional methods. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 13(10): 805-811.
- Heinrichs, D. E., J. A. Yethon and C. Whitfield.** 1998. Molecular basis for structural diversity in the core regions of the lipopolysaccharides of *Escherichia coli* and *Salmonella* entérica. *Mol Microbiol.* 30(2): 221-232.
- Hillenkamp F., M. Karas.** 1990. Mass spectrometry of peptides and proteins by matrix-assisted ultraviolet laser desorption/ionization. *Methods Enzymol.* 193:280-295.
- Hirono, I. and T. Aoaki.** 1991. Nucleotide sequence and expression of an extracellular hemolysin gene of *Aeromonas hydrophila*. *Microb Pathog.* 11(13): 189-197.
- Hossain, M. J., D. Sun, D. J. McGarey, S. Wrenn, L. M. Alexander, M. E. Martino, Y. Xing, J. S. Terhune, M. R. Liles.** An Asian origin of virulent *Aeromonas hydrophila* responsible for disease epidemics in United States-farmed catfish. *MBio.* 2014. 5(3):e00848-14.
- Howard, S. P. and J. T. Buckley.** 1986. Molecular cloning and expression in *Escherichia coli* of the structural gene for the hemolytic toxin aerolysin from *Aeromonas hydrophila*. *Mol Gen Genet.* 204(2): 289-295.
- Hu M., N. Wang, Z. H. Pan, C. P. Lu, Y. J. Liu.** 2012. Identity and virulence properties of *Aeromonas* isolates from diseased fish, healthy controls and water environment in China. *Lett Appl Microbiol.* 55:224-233.
- Huddleston, J. R., J. M. Brokaw, J. C. Zak, R. M. Jeter.** 2013. Natural transformation as a mechanism of horizontal gene transfer among environmental *Aeromonas* species. *Syst Appl Microbiol.* 36(4):224-234.
- Hussain, I. A., G. Jeyasekaran, R. J. Shakila, K. T. Raj and E. Jeevithan.** 2014. Detection of hemolytic strains of *Aeromonas hydrophila* and *A sobria* along with other *Aeromonas* spp from fish and fishery products by multiplex PCR. *J Food Sci Technol.* 51(2):401-7.
- Isoken, H., Igbinosa and I. Anthony.** 2012. Antibiotic susceptibility profile of *Aeromonas* species isolated from wastewater treatment plant. *Scientific World Journal.* 764563.

- Izquierdo, L., N. Coderech, N. Piqué, E. Bedini, M. M. Corsar, S. Merino, S. Fresno, J. M. Tomás and Regué.** 2003<sup>a</sup>. The *Klebsiella pneumoniae wabG* gene: role in biosynthesis of the core lipopolysaccharide and virulence. *J bacteriol.* 185(24): 7213-7221.
- Izquierdo, L., S. Merino, M. regué, F. Rodríguez, J. M. Tomás.** 2003b. Synthesis of a *Klebsiella pneumoniae* O-antigen hetero-polisaccharide (O12) requires ABC 2 transporter. *J bacteriol.* 185(5): 1634-1641.
- Jacques, M.** 1996. Role of lipooligosaccharides and lipopolysaccharides in bacterial adherence. *Trends Microbiol.* 4(10): 408-409.
- James, C., M. Dibley, V. Burke, J. Robinson and M. Gracey.** 1982. Immunological cross-reactivity of enterotoxin of *Aeromonas hydrophila* and cholera toxin. *Clin Exp Immunol.* 47: 34-42.
- Janda J. M., Abbott S. L.** 1998. Evolving concepts regarding the genus *Aeromonas*: an expanding panorama of species, disease presentations, and unanswered questions. *Clin Infect Dis.* 27:332-344.
- Janda, J. M.** 2001. *Aeromonas* & *Plesiomonas*. In *Molecular Medical Microbiology.* 252: 525-534.
- Janda, J. M. y Abbott, S. L.** 2010. The genus *Aeromonas*: Taxonomy, pathogenicity, and infection. *Clin Microbiol* 23(1): 35-73.
- Janda, J. M., S. L. Abbott.** 1998. Evolving concepts regarding the genus *Aeromonas*: an expanding Panorama of species, disease presentations, and unanswered questions. *Clin Infect Dis.* 27(2): 332-344.
- Jiménez, N., A. Lacasta, S. Vilches, M. Reyes, J. Vazquez J, E. Aquillini, S. Merino, M. Regué and J. M. Tomás.** 2009. Genetics and proteomics of *Aeromonas salmonicida* lipopolysaccharide core biosynthesis. *J Bacteriol.* 191(7): 2228-2236.
- Jiménez, N., R. Canals, A. Lacasta, A. N. Kondakova, B. Lindner, Y. A. Knirel, S. Merino, M. Regué, J. M. Tomás.** 2008. Molecular analysis of three *Aeromonas hydrophila* AH-3 (serotype O34) lipopolysaccharide core biosynthesis gene clusters. *J Bacteriol* 190(9): 3176-3184.
- Kaniuk, N. A., M. A. Monteiro, C. T. Parker and C. Whitfield.** 2002. Molecular diversity of the genetic loci responsible for lipopoly-saccharide core oligosaccharide assembly within the genus *Salmonella*. *Mol Microbiol.* 46(5): 1305-18.
- Kaskhedikar, M., D. Chhabra.** 2010. Multiple drug resistance

- in *Aeromonas hydrophila* isolates of fish. *Veterinary World*. 3(1):76–77.
- Khajanchi, B. K., A. A. Fadi, M. A. Borchardt, R. L. Berg, A. J. Horneman, M. E. Stemper, S. W. Joseph, N. P. Moyer, J. Sha, A. K. Chopra.** 2010. Distribution of virulence factors and molecular fingerprinting of *Aeromonas* species isolates from water and clinical samples: suggestive evidence of water-to-human transmission. *Appl Environ Microbiol*. 76(6):2313-25.
- Kirov, S. M., C. Tasell, A. B. Semmler, L. O'Donovan, A. A. Rabaan and J. G. Shaw.** 2002. Lateral flagella and swarming motility in *Aeromonas* species. *J Bacteriol*. 184(2): 547-555.
- Kirov, S. M., Barnett, T. C., Pepe, C. M., Strom, M. S., Albert, M. J.** 2000. Investigation of the role of type IV *Aeromonas* pilus (Tap) in the pathogenesis of *Aeromonas* gastrointestinal infection. *Infect Immun* 68: 4040–4048.
- Kokka, R. P., N. A. Vedros and J. M. Janda.** 1990. Electrophoretic analysis of the Surface components of autoagglutinating Surface array protein-positive and Surface array protein-negative *Aeromonas hydrophila* and *Aeromonas sobria*. *J Clin Microbiol*. 28(10): 2240-2247.
- Körkoca, H., Y. Alan, S. Bozari, M. Berktas, Y. Goz.** 2014. Detection of putative virulence genes in *Aeromonas* isolates from humans and animals. *J Infect Dev Ctries*. 8(11):1398-1406.
- Li, F., W. Wang, Z. Zhu, A. Chen, P. Du, R. Wang, H. Chen, Y. Hu, J. Li, B. Kan, D. Wang.** 2015. Distribution, virulence-associated genes and antimicrobial resistance of *Aeromonas* isolates from diarrheal patients and water, China. *J Infect*. 70:600-8.
- Liesenfeld, O., T. Weinke, and H. Hahn.** 1993. Three-year prevalence of enteropathogenic bacteria in an urban patient population in Germany. *Infection*. 21(2):101-105.
- Llopis, F., I. Grau, F. Tubau, M. Císnal, R. Pallares.** 2004. Epidemiological and clinical characteristics of bacteraemia caused by *Aeromonas* spp. as compared with *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa*. *Scand J Infect Dis*. 36(5): 335-41.
- Lowry, R., S. Balboa, J.L. Parker, J. G. Shaw.** 2014. *Aeromonas* flagella and colonisation mechanisms. *Adv Microb Physiol*. 65: 203-256.
- Lu, X., X. Zhang, K. Huang, Y. Wang, W. Liang, Y. Tan, B. Liu and J. Tang.** 2015. Bacterial pathogens and community composition in advanced sewage treatment

- systems revealed by metagenomics analysis based on high-throughput sequencing. *PLoS One*. 4(10):e0125549.
- Luca, C. M., R. Nemescu, A. Teodor, R. Fântânu, C.M. Petrovici, C.Dorobăţ.** 2011. Etiological aspects of acute gastroenteritis a ten-year review (1.01. 2001-31.12.2010)]. *Med Chir Soc Med Nat Iasi*.115:712-7.
- Mafu, A., C. Plumety, L. Deschênes, J. Goulet.** 2011. Adhesion of Pathogenic Bacteria to Food Contact Surfaces: Influence of pH of Culture. *Int J Microbiol*. 972494.
- Maravić, A., M. Skočibušić, I. Samanić, Z. Fredotović, S. Cvjetan, M.Jutronić, J. Puizina.** 2013. *Aeromonas* spp. simultaneously harbouring bla(CTX-M-15), bla(SHV-12), bla(PER-1) and bla(FOX-2), in wild-growing Mediterranean mussel (*Mytilus galloprovincialis*) from Adriatic Sea, Croatia. *Int J Food Microbiol*. 166(2):301-8.
- Marti, E., B. L. Balcázar.** 2012. Multidrug resistance-encoding plasmid from *Aeromonas* sp. strain P2G1. *Clin Microbiol Infect*. 18:E366-8.
- Martin-Carnahan, A. and S. W. Joseph.** 2005. Order XII. Aeromonadales ord. nov. In Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, 2<sup>a</sup> ed, vol. 2, Part B, pp. 556–578.
- Martínez-Murcia, A., A. Monera, A. Alperi, M. J. Figueras, and M. J Saavedra.** 2009. Phylogenetic evidence suggests that strains of *Aeromonas hydrophila* subsp. *dhakensis* belong to the species *Aeromonas aquariorum* sp. nov. *Curr Microbiol* 58(1): 76–80.
- Martinez-Murcia, A., S. Benlloch, D.Collins.** 1992. Phylogenetic interrelationships of members of the genera *Aeromonas* and *Plesiomonas* as determined by 16S ribosomal DNA sequencing: lack of congruence with results of DNA-DNA hybridizations. *Int J Syst Bacteriol*. 42(3):412-21
- Martino, M. E., L. Fasolato, F. Montemurro, E. Novelli, B. Cardazzo.** 2014. *Aeromonas* spp.: ubiquitous or specialized bugs? *Environ Microbiol*. 15(4):1005-18.
- Martino, M. E., L. Fasolato, F. Montemurro, M. Rosteghin, A. Manfrin, T. Patarnello, E. Novelli, B. Cardazzo.** 2011. Determination of microbial diversity of *Aeromonas* strains on the basis of multilocus sequence typing, phenotype, and presence of putative virulence genes. *Appl Environ Microbiol*. 77(44):4986-5000.
- McCardell, B. A., J. M. Madden, M. H. Kothary and V. Sathyamoorthy.** 1995. Purification and characterization of a CHO cell-elongating toxin produced by



- Aeromonas hydrophila*. *Microb Pathog*. 19(1): 1-9.
- Mercer, N. S., D. M. Beere, A. J. Bornemisza, P. Thomas.** 1987. Medical leeches as sources of wound infection. *Br Med J*. 294 (6577): 937.
- Merino, S. M. Wilhelms, J. M. Tomás.** 2014. Role of *Aeromonas hydrophila* flagella glycosylation in adhesion to Hep-2 cells, biofilm formation and immune stimulation. *Int J Mol Sci*. 12:21935-46.
- Merino, S., A. Aguilar, Rubires, D. Simon-Pujol, F. Congregado and J. M. Tomás.** 1996. The role of capsular polysaccharide of *Aeromonas salmonicida* in the adherence and invasion of fish cell lines. *FEMS Microbiol Lett*. 142(2): 185-189.
- Merino, S., J. G. Shaw and J. M. Tomás.** 2006. Bacterial lateral flagella: an inducible flagella system. *FEMS Microbiol Lett*. 263: 127-135.
- Merino, S., K. M. Fulton, S. M. Twine, M. Wilhelms, R. Molero, J. M. Tomás.** 2014. *Aeromonas hydrophila* flagella glycosylation: involvement of a lipid carrier. *PLoS One*. 9:2:e89630.
- Merino, S., L. Bouamama, Y. A. Knirel, S. N. Senchenkova, R. Regué and J. M. Tomás.** 2012. *Aeromonas* surface glucan attached through the O-antigen ligase represents a new way to obtain UDP-glucose. *PloS One*. 7(5):e35707
- Merino, S., R. Canals, Y. A. Knirel, J. M. Tomás.** 2015. Molecular and chemical analysis of the lipopolysaccharide from *aeromonas hydrophila* strain AH-1 (Serotype O11). *Mar Drugs*. 13(4):2233-2249.
- Merino, S., X. Rubires, A. Aguilar, S. Albertí, S. Hernandez-Alles, V. J. Benedí and J. M. Tomás.** 1996. Mesophilic *Aeromonas* sp. Serogrupo O:11 resistance to complement-mediated killing. *Infect Immun*. 64(12): 5302-5309.
- Miñana-Galbis D, A. Urbizu-Serrano, M. Farfán, M. C. Fusté, and J. G. Lorén.** 2009. Phylogenetic analysis and identification of *Aeromonas* species based on sequencing of the *cpn60* universal target. *Int J Syst Evol Microbiol*. 59(8):1976-1983.
- Miranda, C. and G. Castillo.** 1998. Resistance to antibiotic and heavy metals of motile *Aeromonas* from Chilean freshwater. *Sc Total Environ*. 224(3): 167-176.
- Molero R., M. Wilhelms, B. Infanzón, J. M. Tomás, S. Merino.** 2011. *Aeromonas hydrophila* *motY* is essential for polar flagellum function, and requires coordinate expression of *motX* and *Pom* proteins. *Microbiology*. 10: 2772-2284.

- Morosini, M. I., E. Loza, R. Del Campo, F. Almaraz, F. Baquero and R. Cantón.** 2003. Fluoroquinolone-resistant *Streptococcus pneumoniae* in Spain: activities of garenoxacin against clinical isolates including strains with altered topoisomerase. *Antimicrob Agents Chemother.* 47(8): 2692-2695.
- Muller-Loennies, S., L. Brade and H. Brade.** 2007. Neutralizing and cross-reactive antibodies against enterobacterial lipopolysaccharide. *Int J Med Microbiol.* 297: 321-340.
- Nagar, V., R. Shashidhar, J. R. Bandekar.** 2013. Characterization of *Aeromonas* strains isolated from Indian foods using *rpoD* gene sequencing and whole cell protein analysis. *World J Microbiol Biotechnol.* 29(4):745-52.
- Nguyen, H. N., T. T. Van, H. T. Nguyen, P. M. Smooker, J. Shimeta, P. J. Coloe.** 2014. Molecular characterization of antibiotic resistance in *Pseudomonas* and *Aeromonas* isolates from catfish of the Mekong Delta, Vietnam. *Vet Microbiol* 171(3):397-405.
- Noonan, B. and T. J. Trust.** 1995. Molecular analysis of an A-protein secretion mutant of *Aeromonas salmonicida* reveals a Surface layer-specific protein secretion pathway. *J Mol Biol.* 248(2): 316-327.
- Ofek, I., D. Hasty, N. Sharon.** 2003. Anti-adhesion therapy of bacterial diseases: prospects and problems. *FEMS Immunol Med Microbiol.*38(3) :181-91.
- Pablos, M., M. Remacha, J. Rodríguez-Calleja, J. Santos, J. Otero, M. García-López.** 2010. Identity, virulence genes, and clonal relatedness of *Aeromonas* isolates from patients with diarrhea and drinking water. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 29(9):1163-72.
- Padilla, J., P. Bustos, G. Castro-Escarpulli, A. Sánchez-Varela, I. Palma-Martinez, P. Arzate-Barbosa, C. García-Pérez, M. López, V. González, X. Guo.** 2015. Draft Genome Sequence of *Aeromonas caviae* Strain 429865 INP, Isolated from a Mexican Patient. *Genome Announc.* 3(5): pii: e01240
- Padra, J. T., H. Sundh, C. Jin, N. G. Karlsson, K. Sundell and S. K. Lindén.** 2014. *Aeromonas salmonicida* binds differentially to mucins isolated from skin and intestinal regions of Atlantic salmon in an N-acetylneuraminic acid dependent manner. *Infect Immun.* 82(12): 5235-5245.
- Pang, M., J. Jiang, X. Xie, Y. Wu, Y. Dong, A. H. Kwok, W. Zhang, H. Yao, C. Lu C, F. C Leung, Y. Liu.** 2015. Novel insights into the pathogenicity of epidemic *Aeromonas hydrophila* ST251 clones from

- comparative genomics. *Sci Rep.* 27; 5: 9833.
- Pemberton, J. M., S. P Kidd, and R. Schmidt.** 1997. Secreted enzymes of *Aeromonas*. *FEMS Microbiol Lett* 152, 1–10.
- Pianetti, A., M. Battiste, F. Barbieri, F. Bruscolini, E. Falcieri, A. Manti, L. Sabatini, B. Citterio.** 2012. Changes in adhesion ability of *Aeromonas hydrophila* during long exposure to salt stress conditions. *J Appl Microbiol.* 113(4):974-982.
- Piotrowska M., M. Popowska M.** 2015. Insight into the mobilome of *Aeromonas* strains. *Front Microbiol.* 6:494.
- Pitarangsi C., P. Echeverría, R. Whitmire, C. Tirapat, S. Formal, G. J. Dammin.** 1982. Enteropathogenicity of *Aeromonas hydrophila* and *Plesiomonas shigelloides*: prevalence among individuals with or without diarrhea in Thailand. *Infect Immun.* 35:666-673.
- Popoff, M.** 1984. Facultative anaerobic Gram-negative rods. In: *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*.1: 545–548.
- Popoff, M. y R. Lallier, R.** 1984. Biochemical and serological characteristics of *Aeromonas*”, *Methods in Microbiology.* *Methods in Microbiology* 16(4): 127–145.
- Potomski, J., Burke, J. Robinson, D. Fumarola and G. Miragliotta.** 1987. *Aeromonas* cytotoxic enterotoxin cross reactive with cholera toxin. *J Med Microbiol.* 23(2): 179-186.
- Prakash, O.** 2007. Polyphasic approach of bacterial classification—an overview of recent advances. *Indian J. Microbiol.* 47:98–108
- Pridgeon, J. W., P. H. Klesius, L. Song, D. Zhang, K. Kojima, J. A. Mobley.** 2013. Identification, virulence, and mass spectrometry of toxic ECP fractions of West Alabama isolates of *Aeromonas hydrophila* obtained from a 2010 disease outbreak. *Vet Microbiol.* 164(3):336-343.
- Qin, Y., G. Lin, W. Chen, B. Huang, W. Huang, Q. Yan.** 2014. Flagellar motility contributes to the invasion and survival of *Aeromonas hydrophila* in *Anguilla japonica* macrophages. *Fish Shellfish Immunol.*39(2 ):273-9.
- Rabaan, A. A., I.Gryllos, J. M. Tomás, J. G. Shaw.** 2001. Motility and the polar flagellum are required for *Aeromonas caviae* adherence to HEp-2 cells. *Infect Immun.* 69(7):4257-4267.
- Raetz, C. R., C. M. Reynolds, M. S. Trent and R. E. Bioshop.** 2007. Lipid A modification systems in gram-negative

- bacteria. *Annu Rev Biochem.* 76: 295-329.
- Raghunath, P., B. Maiti, M. Shekar, I. Karunasagar.** 2010. Clinical isolates of *Aeromonas veronii* biovar *veronii* harbor a nonfunctional gene similar to the thermostable direct hemolysin-related hemolysin (trh) gene of *Vibrio parahaemolyticus*. *FEMS Microbiol Lett.* 307(2):151-157.
- Reeves, P. R., M. Hobbs, M. A. Valvano, M. Skurnik, C. Whitfield, D. Coplin, N. Kido, J. Klena, D. Maskell, C. R. Raetz y P. D. Rick.** 1996. Bacterial polysaccharide synthesis and gene nomenclature. *Trends Microbiol.* 4(12): 495-503.
- Regué, M., L. Izquierdo, S. Fresno, N. Jiménez, N. Piqué, M. M. Corsaro, M. Parrilli, T. Naldi, S. Merino and J. M. Tomás.** 2005. The incorporation of glucosamine into enterobacterial core lipopolysaccharide: two enzymatic steps are required. *J Biol Chem.* 280(44): 36648-36656.
- Roberts, I. S.** 1996. The biochemistry and genetics of capsular polysaccharide production in bacteria. *Annu Rev Microbiol.* 50: 285-315.
- Robertson, B. K., C. Harden, S. B. Selvaraju, S. Pradhan, J. S. Yadav.** 2014. Molecular Detection, Quantification, and Toxicogenicity Profiling of *Aeromonas* spp. in Source- and Drinking-Water. *Open Microbiol J.* 30(8):32-39.
- Rodríguez, M., E. Botero, C. A. Iregui and J. Figueroa.** 2005. *Aeromonas hydrophila* extracellular products extraction and its effects on Tilapia Roja (*Oreochromis spp.*) and Cachama Blanca (*Piaractus brachypomus*). Tesis de Doctorado. Universidad nacional de Colombia, Bogotá. 150 pp.
- Roger, F., H. Marchandin, E. Jumas-Bilak, A.** 2012. Multilocus genetics to reconstruct *Aeromonas* evolution. *BMC Microbiol* 30;12:62.
- Romstad, A.B., L. J. Reitan, P. Midtlyng, K. Gravningen, V. Emilsen and Evensen.** 2014. Comparison of a serological potency assay for furunculosis vaccines (*Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida*) to intraperitoneal challenge in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Biologicals* 42(29): 86-90.
- Rossolini, G. M., T. Walsh, G. Amicosante.** 1996. The *Aeromonas* metallo-beta-lactamases: genetics, enzymology, and contribution to drug resistance. *Microb Drug Resist.* 2(2):245-252.
- Saavedra. M., S. Guedes, A. Alves, P. Rema, M. Tacao, A. Correia, A. Martínez.** 2004. Resistencia a antibióticos  $\beta$ -

- lactámicos en *Aeromonas hydrophila* aislados de truchas arcoiris (*Oncorhynchus mykiss*). *Int. Microbiol.* 7:3 \*
- Sahin, I. and H. S. Barut.** 2010. Quinolone-resistant *Aeromonas hydrophila* peritonitis in a CAPD patient. *Clin Nephrol.* 73(3): 241-243.
- Sánchez-Céspedes, J., M. J. Figueras, C. Aspiroz, M. J. Aldea, M. Toledo, A. Alperí, F. Marco, J. Vila.** 2009. Development of imipenem resistance in an *Aeromonas veronii* biovar *sobria* clinical isolate recovered from a patient with cholangitis. *J Med Microbiol.* 58(4):451-455.
- Schaeffer, A.J., J. M. Jones, J. K. Dunn.** Association of *in vitro* *Escherichia coli* adherence to vaginal and buccal epithelial cells with susceptibility of women to recurrent urinary-tract infections. *N Engl J Med.* 304(18):1062-6.
- Sen, K and M. Roger.** 2004. Distribution of six virulence factors in *Aeromonas* species isolated from US drinking water utilities: a PCR identification. 2004. *J Appl Microbiol.* 97(5): 1077-1086.
- Seshadri, R., S. Joseph, A. Chopra, J. Sha, J. Graft, D. Hft, M. Wu, Q. Ren, M. Rosovitz, R. Madupu, L. Tallon, M. Kim, S. Jin, H. Vuong, O. Stine, A. Ali, A. Horneman, J. Heidelberg.** 2003. Molecular mechanisms of bacterial pathogenesis from an emerging pathogen: *Aeromonas* spp. *J Bacteriol* 188(23): 8272-8282.
- Sha, J., L. Pillai, A. A. Fadl, C. L. Galindo, T. E. Erova and A. K. Chopra.** 2005. The type III secretion system and cytotoxic enterotoxin alter the virulence of *Aeromonas hydrophila*. *Infect immun.* 73: 6446-6457.
- Sharma, M., A. Dixit.** 2015. Identification and immunogenic potential of B cell epitopes of outer membrane protein OmpF of *Aeromonas hydrophila* in translational fusion with a carrier protein. *Appl Microbiol Biotechnol* 99(15): 6277-6291
- Shin, H., J. Yoon, Y. Lee, M. S. Kim, K. Lee.** 2015. Comparison of MALDI-TOF MS, housekeeping gene sequencing, and 16S rRNA gene sequencing for identification of *Aeromonas* clinical isolates. *Yonsei Med J.* 56(2):550-5.
- Sinha S., T. Shimada, T. Ramamurthy, S. K. Bhattacharya, S. Yamasaki, Y. Takeda, G. B. Nair** GB. 2004. Prevalence, serotype distribution, antibiotic susceptibility and genetic profiles of mesophilic *Aeromonas* species isolated from hospitalized diarrhoeal cases in Kolkata, India. *J Med Microbiol.* 53:527-534.

- Skwor, T., J. Shinko, A. Augustyniak, C. Gee, and G. Andrasoc.** 2014. *Aeromonas hydrophila* and *Aeromonas veronii* predominate among potentially Pathogenic ciprofloxacin- and tetracycline-resistant *Aeromonas* isolates from Lake Erie. *Appl Environ Microbiol.* 80: 841–848.
- Soler, L.** 2003. Importancia Biosanitaria de *Aeromonas*: taxonomía y Epidemiología. Tesis de Doctorado en Ciencias Biológicas, mención Microbiología. Departamento de Ciencias Básicas, Barcelona, España. 240 pp.
- Soler, L., M. A. Yáñez, M. R. Chacón, M. G. Aguilera-Arreola, V. Catalán, M. J. Fuigeras and A. J. Martínez-Murcia.** 2004. Phylogenetic analysis of the genus *Aeromonas* base don two housekeeping genes. *Int J Syst Evol Microbiol.* 54(5): 1511-1519.
- Soler, L., M. J. Figueras, M. R. Chacón, J. Vila, F. Marco, A. Martínez-Murcia and J. Guarro.** 2002. Potential virulence and antimicrobial susceptibility of *Aeromonas popoffii* recovered from freshwater and seawater. *FEMS Immunol Med Microbiol* 32(3): 243–247.
- Spadaro, S., A. Berselli, E. Marangoni, A. Romanello, M. Colamussi, R. Ragazzi, S. Zardi, and C. Volta.** 2014. *Aeromonas sobria* necrotizing fasciitis and sepsis in an immunocompromised patient: a case report and review of the literature. *J Med Case Rep.*8: 315
- Sreedharan, K., R. Philip, I. S Singh.** 2013. Characterization and virulence potential of phenotypically diverse *Aeromonas veronii* isolates recovered from moribund freshwater ornamental fishes of Kerala, India. *Antonie Van Leeuwenhoek* 103(1):53-67.
- Swain, P. T. Behera, D. Mohapatra, P. K. Nanda, S. Nayak, P.K. Meher, B. K. Das.** 2010. Derivation of rough attenuated variants from smooth virulent *Aeromonas hydrophila* and their immunogenicity in fish. *Vaccine.* 29(29):4626-4631.
- Taneja, N., S. Khurana, A. Trhan R. Marwaha, M. Sharma.**2004. An outbreak of hospital acquired diarrhea due to *Aeromonas sobria*. *Indian Pediatr* 2004; 41: 912
- Tequianez, L. D. Pérez, M. Gonzalez, M. Florez and R. Marroquín.** 2005. Aislamiento de *Aeromonas* productoras de aerolisinas y enterotóxina en muestras de agua potable en la facultad de estudios superiores de Zaragoza y otras dependencias de la Universidad. México, tesis doctoral 350 pp.
- Thelestam, M. y A. Ljungh.** 1981. Membrane-damaging

- and cytotoxic effects on human fibroblasts of alpha-and beta-hemolysin from *Aeromonas hydrophila*. *Infect Immun.* 34(3):949-956.
- Tomás, J. M.** 2012. The main *Aeromonas* pathogenic factors. *ISRN Microbiol.* 256261.
- Turska-Szewczuk, A., B. Lindner, W. Komaniecka, A. Kozinska, A. Pekala, A. Choma and O.Holst.** 2013. Structural and immunochemical studies of the lipopolysaccharide from the fish pathogen, *Aeromonas bestiarum* strain K296, Serotype O18. *Mar Drugs* 11(14): 1235–1255.
- Turska-Szewczuk, A., K. A. Duda, D. Schwudke, A. Pekala, A. Kozinska, O. Holst.** 2014. Structural studies of the lipopolysaccharide from the fish pathogen *Aeromonas veronii* strain Bs19, serotype O16. *Mar Drugs.* 12(3):1298-12316.
- Vanden Bergh, P., M. Heller, S. Braga-Lagache, J. Frey.** 2013. The *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida* exoproteome: determination of the complete repertoire of Type-Three Secretion System effectors and identification of other virulence factors. *Proteome Sci.* 11(1): 42.
- Vilches, S., C. Urgell, S. Merino, M. R. Chacon, L. Soler, G. Castro-Escarpulli, M. J. Figueras and J. M. Tomas.** 2004. Complete type III secretion system of a mesophilic *Aeromonas hydrophila* strain. *Appl Environ Microbiol.* 70(11): 6914-6919.
- Vilches, S., M. Wilhelms, H. B. Yu, K. Y. Leung, J. M. Tomás and S. Merino.** 2008. *Aeromonas hydrophila* AH-3 AexT is an ADP-ribosylating toxin secreted through the type III secretion system. *Microb Pathog.* 44(1): 1-12.
- Vincent, A. T., K. H. Tanaka, M. V. Trudel, M. Frenette, N. Derome, S. J. Charette.** 2015. Draft genome sequences of two *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida* isolates harboring plasmids conferring antibiotic resistance. *FEMS Microbiol Lett.* 362 (4). doi: 10.1093/femsle/ fnv002.
- Vivekanandhan, G., A. A. Savithamani, P. Hatha.** 2002. Antibiotic resistance of *Aeromonas hydrophila* isolated from marketed fish and prawn of South India. *Int J Food Microbiol.* 76(1):165-168.
- Von Graevenitz, A.** 2007. The role of *Aeromonas* in diarrhea: A review. *Infection* 35(2): 59–64.
- Wake, A., M. Yamamoto.** 1966. Hemolysin-destructive factor of *Vibrio cholerae* (*Vibrio comma*). *J Bacteriol.* 91(1):461-2.
- Walsh, T., R. Stunt, J. Nabi, A. MacGowan, P. Bennett,** 1997. Distribution and expression of b-lactamase gene among

- Aeromonas* spp. *J. Antimicrob. Chemother.* 40(2): 171-178.
- Wang, G., C. G. Clark, C. Liu, C. Pucknell, C. K. Munro, T. M Kruk, R. Caldeira, D. L. Woodward and F. G Rodgers.** 2003. Detection and characterization of the hemolysin genes in *Aeromonas hydrophila* and *Aeromonas sobria* by multiplex PCR. *J Clin Microbiol.* 41:1048-1054.
- Walsh T. R., D. J. Payne, A. p: MacGowan, P. M. Bennett.** 1995. A clinical isolate of *Aeromonas sobria* with three chromosomally mediated inducible beta-lactamases: a cephalosporinase, a penicillinase and a third enzyme, displaying carbapenemase activity. *J Antimicrob Chemother.* 35:271-279.
- Wilhelms, M., V. Gonzalez, J. M. Tomás, S. Merino.** 2013. *Aeromonas hydrophila* lateral flagellar gene transcriptional hierarchy. *J Bacteriol* 195(7):1436-45.
- Wong, C. Y., M. W. Heuzenroeder and R. L. Flower.** 1998. Inactivation of two haemolytic toxin genes in *Aeromonas hydrophila* attenuates virulence in a suckling mouse model. *Microbiology.* 144(2): 291-298.
- Wu, C., J. Wu, J. Yan, H. Lee, N. Lee, C. Chang, H. Shin, H.Wu, L. Wang, W. Ko.** 2007. Clinical significance and distribution of putative virulence markers of 116 consecutive clinical *Aeromonas* isolates in Southern Taiwan. *J Infect* 54(2): 151-158.
- Yano, Y., K. Hamano, I. Tsutsui, D. Aue-Umneoy, M. Ban, M. Satomi.** 2015. Occurrence, molecular characterization, and antimicrobial susceptibility of *Aeromonas* spp. in marine species of shrimps cultured at inland low salinity ponds. *Food Microbiol.* 47:21-7.
- Yi, S. W., M. J. You, H. S. Cho, C. S. Lee, J. K. Kwon, G. W. Shin.** 2013. Molecular characterization of *Aeromonas* species isolated from farmed eels (*Anguilla japonica*). *Vet Microbiol.* 164: 1-2.
- Yu, H. B., P. S. Rao, H. C. Lee, S. Vilches, S. Merino, J. M. Tomás, and K. Y. Leung.** 2004. A type III secretion system is required for *Aeromonas hydrophila* AH-1 pathogenesis. *Infect Immun* 72(3): 1248-1256.







