V. DISCUSIÓN

5.1. Taxonomía

5.1.1. Identificación por métodos bioquímicos y moleculares

La identificación bioquímica de las especies de *Aeromonas* es extremadamente compleja, habiéndose propuesto numerosos protocolos bioquímicos para la identificación de las cepas a nivel de especie o GH (Abbott y cols., 1992; Kämpfer y Altwegg, 1992; Noterdaeme y cols., 1996; Oakey y cols., 1996, Janda y cols., 1996; Borrell y cols., 1998; Kaznowski, 1998; Altwegg, 1999; Carson y cols., 2001; Valera y Esteve, 2002; Miñana-Galbis y cols., 2002; Fosse y cols., 2003). No obstante estos protocolos involucran un elevado número de pruebas bioquímicas y no garantizan una identificación fiable de las especies (Janda, 2001).

Con el fin de identificar todas las especies del género de forma rápida y fiable, Borrell y cols. (1997) diseñaron un método que se basaba en el análisis de los patrones de RFLP del gen 16S rRNA obtenidos tras digerir el gen completo (1502 pb) con distintas endonucleasas. La digestión con las endonucleasas *Alu*I-*Mbo*I permitía identificar 10 de las 13 especies descritas en aquél momento, entre las cuales se encontraban las más frecuentemente aisladas en muestras clínicas (*A. caviae*, *A. veronii* y *A. hydrophila*). Las tres especies que no podían ser identificadas eran *A. bestiarum*, *A. salmonicida* y *A. popoffii*. Ésta última fue descrita por Huys y cols. en 1997b simultáneamente a la publicación de Borrell y cols. (1997) y por tanto no se había contemplado en el estudio. Uno de los primeros objetivos de esta tesis fue ampliar el protocolo de identificación basado en los RFLP del gen 16S rRNA para que estas tres especies pudieran también identificarse de forma inequívoca. Esto se consiguió tras analizar las secuencias del gen 16S rRNA (Martínez-Murcia y cols., 1992a; Demarta y cols., 1999) y comprobar que cuando en la primera digestión se obtenía un patrón común podía recurrirse a digerir de nuevo todo el gen con *Nar*I, generándose un patrón de RFLP característico y común a las especies *A. bestiarum* y *A. salmonicida*, que podían diferenciarse definitivamente mediante una nueva digestión con *Sfa*NI o *Pst*I, aunque se recomienda el uso del *Pst*I ya que el *Sfa*NI es extremadamente caro. En caso de que el patrón obtenido con *Nar*I no se correspondiera con el de las especies anteriores se requeriría de dos nuevas digestiones con las endonucleasas *Hae*III y *Alw*NI para identificar la especie *A. popoffii* (Figueras y cols., 2000c). A pesar de que este protocolo puede parecer aparentemente

complejo, las especies con mayor prevalencia clínica y ambiental requieren de una única digestión para su identificación. A pesar de que Demarta y cols. (1999) aportaron datos que ponían de manifiesto que, en 12 cepas de *A. popoffii*, existían variaciones en dos o tres posiciones nucleotídicas en el gen 16S rRNA de esta especie, estas variaciones no afectaban a los puntos de corte de las endonucleasas propuestas por Figueras y cols. (2000c), obteniéndose por tanto el patrón de restricción esperado para las 26 cepas de la especie ensayadas. La aplicación de la técnica del 16S rDNA-RFLP permitió identificar por primera vez la especie *A. popoffii* en muestras de agua de mar pudiéndose establecer su incidencia en un total de 113 muestras de agua (aguas dulces superficiales y aguas de mar) recogidas en nuestra área geográfica. Se estableció que esta especie presenta una incidencia del 8% en aguas dulces superficiales y un 6.8% en aguas de mar, siendo estos los primeros aislados de la especie en España, y además, los primeros aislados procedentes de aguas de mar (Soler y cols., 2002). Además esta técnica también ha permitido establecer que las especies más frecuentemente aisladas en muestras de pescado destinado al consumo humano, en México y Polonia, son *A. salmonicida*, *A. bestiarum*, *A. veronii* y *A. encheleia*, aunque en México D.F. también pudo aislarse *A. hydrophila* (Castro-Escarpulli y cols., 2003) y en Polonia *A. sobria* (Kozińska y cols., 2002). En nuestro país, las especies de *Aeromonas* más frecuentemente aisladas en muestras de pescado destinado al consumo humano coinciden con las anteriores, aunque también se han aislado cepas de las especies *A. jandaei*, *A. caviae*, *A. schubertii* y *Aeromonas sp*. (GH11) (González y cols., 2001) o *A. eucrenophila* (González-Rodríguez y cols., 2002). La elevada incidencia de *A. salmonicida* en peces ya ha sido descrita por diversos autores (Hänninen y cols., 1997; Wiklund y Dalsgaard, 1998; Lee y cols., 2002). Es importante destacar que las cepas aisladas de pescado también fueron identificadas bioquímicamente, y que el espectro de distribución de especies fue bastante distinto debido a los errores que se cometen con estos sistemas de identificación (Castro-Escarpulli y col., 2003; Kozińska y cols., 2002), aspecto que discutimos más adelante.

Utilizando la técnica del 16S rDNA-RFLP se espera que generalmente se obtengan patrones especie-específicos semejantes a los descritos (Borrell y cols., 1997; Figueras y cols., 2000c), es por ello que cuando se obtienen nuevos patrones, estos pueden ser debidos tanto a que en el lugar de restricción del gen 16S rRNA exista variabilidad intraespecífica o a que se trate de una nueva especie. En ambos

casos serán necesarios estudios complementarios, como la secuenciación del gen 16S rRNA o incluso estudios de hibridación DNA-DNA, para validar la hipótesis. Recientemente en nuestro laboratorio encontramos un grupo de 37 aislamientos, procedentes de una red de distribución de agua potable, con un patrón de 16S rDNA-RFLP hasta ahora desconocido (datos no publicados). Tras la secuenciación del gen 16S rRNA de dos de estos aislados se demostró que se trataban de aislados de la nueva especie *A. culicicola* (Pidiyar y cols., 2002). Además en nuestro laboratorio también hemos encontrado variabilidad intraespecífica en la secuencia del gen 16S rRNA de *A. caviae*, ya que el 7.4% de las cepas de esta especie (24 de 326 cepas identificadas mediante los RFLP del gen 16S rRNA) presentaron una banda atípica. Esta posible variabilidad fue confirmada mediante la secuenciación del gen 16S rRNA en estas cepas (datos no publicados).

Otros estudios han intentado identificar las especies de *Aeromonas* mediante protocolos también basados en la técnica del 16S rDNA-RFLP, pero utilizando otras endonucleasas y regiones concretas del gen (Graff, 1999b; Lee y cols., 2002), en lugar de utilizar el gen completo. Graff en 1999b trató de validar el método de Borrell y cols. (1997), pero para ello utilizó un protocolo diferente que se basaba en la amplificación de los primeros 600 pb del gen y posterior digestión con las endonucleasas *Alu*I, *Cfo*I y *Mnl*I. Con este método, este autor obtenía diversos patrones de restricción para la especie *A. veronii*, lo cual era debido a la incorrecta identificación de las cepas utilizadas y a la utilización de endonucleasas poco adecuadas (Figueras y cols., 2000b; Figueras y cols., 2000c). Además, según Graf la enzima *Alu*I era capaz de separar las especies *A. veronii*, *A. caviae* y *A. hydrophila*. Para verificar este hecho realizamos una simulación informática y comprobamos que esta endonucleasa solo producía patrones especie-específicos para *A. sobria*, *A. jandaei*, *A. schubertii* y *A. veronii* (esta última presentaba idéntico patrón a la *Aeromonas* Grupo 501). Esto demostraba que el protocolo propuesto por Graff (1999b) se basaba en endonucleasas elegidas al azar, y que por lo tanto no era comparable al descrito previamente (Borrell y cols., 1997). Lee y cols. (2002) han diseñado recientemente un protocolo que permite, en primer lugar, identificar el género *Aeromonas* mediante la utilización de cebadores específicos para el gen 16S rRNA del género. Con estos cebadores se amplifica un fragmento de 953 pb que posteriormente es digerido con las endonucleasas *Alu*I, *Cfo*I, *Pvu*II y *Xho*II. Estos autores consiguen identificar todas las especies del género a excepción de *A. bestiarum*, *A. salmonicida*, *A. encheleia* y

Aeromonas sp. (GH11), especies que si pueden ser identificadas con nuestro protocolo (Figueras y cols., 2000c). La especie *A. culicicola*, descrita por Pidiyar y cols. (2002) tampoco está incluida en el estudio de Lee y cols. (2002), probablemente por la coincidencia en el tiempo de ambas publicaciones.

Otras técnicas de identificación molecular aplicadas al género *Aeromonas* son el ribotipado (Martinettii-Lucchini y Altwegg, 1992), AFLP (Huys y cols., 1996b; Huys y Swings, 1999) y la aplicación de sondas especie-específicas (Husslein y cols., 1992; Ash y cols., 1993a,b; Dorsh y cols., 1994; Cascon y cols., 1996; Demarta y cols., 1999). Sin embargo, cabe destacar que tanto el ribotipado como el AFLP son técnicas complejas, y que por lo tanto su utilización rutinaria no es tan factible como la del 16S rDNA-RFLP. Además, ambas técnicas generan patrones muy complejos, por lo que cada vez son más utilizadas con fines epidemiológicos que con fines taxonómicos (Demarta y cols., 2000; Lund y cols., 2002; Bauab y cols., 2003). En cuanto a la utilización de sondas especie-específicas, ésta tiene el inconveniente de que no existen sondas para todas las especies y además es necesario utilizar muchas de ellas para llegar a la correcta identificación (Chacón y cols., 2002).

A pesar de que, como hemos demostrado, existen métodos genéticos capaces de identificar de forma rápida y fiable todas las especies del género, los laboratorios destinados al diagnóstico clínico siguen utilizando métodos bioquímicos miniaturizados semiautomáticos. Sin embargo, se ha demostrado que la correlación entre la identificación mediante algunos de éstos métodos (BBL Crystal E/NF y MicroScan W/A) y la identificación obtenida con la técnica del 16S rDNA-RFLP, en cepas clínicas, es muy baja (estudio 4.1.1.2). Con el sistema BBL Crystal solo se identifican correctamente el 26.9% de las cepas, y únicamente el 19.3% de ellas con el MicroScan. Este último resultado contrasta con el obtenido por Vivas y cols. (2000) cuando ensayaron el sistema MicroScan con cepas de *Aeromonas* identificadas con protocolos bioquímicos clásicos, ya que estos autores obtuvieron un 78.8% de concordancia entre ambos métodos. La falta de fiabilidad de los protocolos bioquímicos clásicos ha sido ya demostrada por numerosos estudios (Kaznowski, 1998; Castro-Escarpulli y cols., 2003; Kozińska y cols., 2002) y podría explicar perfectamente estas discrepancias. Por otro lado, el BBL Crystal y el MicroScan, respectivamente, identificaron incorrectamente el 71.4% y 85.7% de las cepas como *A. hydrophila* (estudio 4.1.1.2). Según Vivas y cols. (2002) esta es la especie más frecuentemente aislada en muestras clínicas. En nuestro laboratorio, sin embargo

hemos identificado 490 cepas de origen clínico mediante la técnica genética del 16S rDNA-RFLP y hemos encontrado que esta especie sólo representa el 8.1% de los aislados clínicos, siendo las especies más prevalentes *A. caviae* y *A. veronii* (datos no publicados). Resultados parecidos han sido obtenidos por otros autores al utilizar métodos genéticos (Janda y Abbott, 1998; Janda, 2001). Debido a la tendencia de los sistemas comerciales miniaturizados a identificar las cepas de *Aeromonas* como *A. hydrophila*, actualmente esta especie tiene una relevancia clínica inmerecida y más elevada de lo que le corresponde, quitándole importancia a otras especies del género más relevantes (Overman y cols., 1985; Overman y Overley, 1986; Kuijper y Peeters, 1991). Estos errores de identificación a nivel de especie son básicamente debidos a que las bases de datos de estos sistemas son inapropiadas e incompletas (estudio 4.1.1.2), siendo necesario desarrollar nuevos métodos que aseguren la identificación correcta de las especies de *Aeromonas* aisladas a partir de muestras clínicas.

Bajo nuestro punto de vista, es importante identificar las cepas de *Aeromonas* mediante técnicas genéticas, ya que las basadas en métodos bioquímicos, incluso cuando se utilizan protocolos bioquímicos complejos definidos específicamente para este género, producen un elevado grado de error (Borrell y cols., 1997; Kozińska y cols., 2002; Castro-Escarpulli y cols., 2003; estudio 4.1.1.2). Esto provoca que la incidencia real de las especies del género esté desvirtuada.

Otro aspecto importante es que los sistemas bioquímicos tienden a confundir *Aeromonas* spp. con otros géneros bacterianos, de hecho, el MicroScan y el BBL Crystal confundieron respectivamente el 21.6% y el 8.1% de las cepas de *Aeromonas* con otros géneros (estudio 4.1.1.2). Generalmente esta confusión es con bacterias del género *Vibrio* (Abbott y cols., 1998). En nuestro estudio (4.1.1.2) el sistema MicroScan confundió un 10.8% de las cepas de *Aeromonas* con *Vibrio fluvialis*, resultado similar al encontrado (8%) por Vivas y cols. (2000), mientras que el sistema BBL Crystal confundió un 2.7% de las cepas de *Aeromonas* con *Vibrio cholerae* (estudio 4.1.1.2). Estos resultados ponen de manifiesto la necesidad de desarrollar métodos alternativos para identificar correctamente las bacterias del género *Aeromonas*, para evitar la confusión con las del género *Vibrio*. En este sentido, Chacón y cols. (2002) desarrollaron una sonda basada en un fragmento de 237 pb del gen que codifica para la glicerofosfolípido-colesterol aciltransferasa (GCAT) que híbrida con todas las especies de *Aeromonas*, pero no con cepas de otros géneros, incluido el género *Vibrio*. Esta sonda fue marcada con digoxigenina y utilizada mediante la técnica de

colony blot para reconocer colonias de *Aeromonas* en cultivo primario. Se demostró además que esta sonda era igualmente efectiva en cualquiera de los medios de cultivo utilizados de forma rutinaria para el aislamiento clínico de enteropatógenos (MacConkey, SS, agar sangre y Hecktoen). Como hemos mencionado previamente, existen sondas especie-específicas para *Aeromonas* (Husslein y cols., 1992; Ash y cols., 1993a,b; Dorsh y cols., 1994; Cascon y cols., 1996; Demarta y cols., 1999; Byers y cols., 2002a; 2002b), aunque se desconoce si estas también hibridan con bacterias de otros géneros. Kämpfer y cols. (1996) diseñaron una sonda basada en el gen 16S rRNA que era capaz de detectar *Aeromonas* spp. por hibridación *in situ* en muestras de agua, sin embargo esta sonda no ha sido ensayada con todas las especies del género. Además, en un estudio posterior esta sonda fue utilizada para detectar *Aeromonas* en biofilms sin obtenerse señal en ninguna de las muestras ensayadas (MacDonald y Brözel, 2000), a pesar de que se ha descrito que *Aeromonas* es uno de los microorganismos más comunes en los biofilms (Szewzyk y cols., 2000).

La utilización de la sonda diseñada por Chacón y cols. (2002) permitió identificar las colonias de *Aeromonas* spp. de forma fiable en sólo 36 horas, en lugar de las 72 horas necesarias si se utilizan los métodos bioquímicos clásicos.

5.1.2. Estudio de especies taxonómicamente complejas

Aunque se han llevado a cabo muchas aproximaciones para clarificar las relaciones filogenéticas de las especies de *Aeromonas* (Martínez-Murcia y cols., 1992a; Huys y cols., 1996b; Martínez-Murcia, 1999), la taxonomía del género sigue confusa. Como ya se ha mencionado, uno de los problemas más evidentes reside en la definición de la especie *A. bestiarum*, ya que aunque los porcentajes de hibridación DNA-DNA entre esta especie y las especies *A. hydrophila* y *A. salmonicida* eran muy elevados y no aportaban resultados concluyentes, se propuso como una especie válida (Hänninen, 1994; Ali y cols., 1996).

La secuenciación del gen 16S rRNA está considerada una herramienta taxonómica fiable y ha sido muy utilizada en taxonomía bacteriana. La secuencia de este gen sólo difiere en dos nucleótidos (posiciones 1011 pb y 1018 pb) entre las especies *A. bestiarum* y *A. salmonicida*, y las subespecies *A. salmonicida* subsp. achromogenes y *A. salmonicida* subps. masoucida presentan una secuencia idéntica a

la de *A. bestiarum* (Martínez-Murcia y cols., 1992a). A pesar de que mediante la aplicación de la técnica de identificación basada en los RFLP del gen 16S rRNA se pueden diferenciar las cepas tipo de ambas especies, un 60% de las cepas pertenecientes a estas especies comparten el patrón de *A. bestiarum* y *A. salmonicida*. Al secuenciar este gen en estas cepas se demostró que compartían operones ribosómicos de ambas especies por lo que se denominaron *A. bestiarum/A. salmonicida* (estudio 4.1.2.1). Estos resultados evidenciaban de nuevo la proximidad genética entre ambas especies y corroborarían la teoría del entrecruzamiento de Sneath (1993), la cual postula que en los ancestros de especies de *Aeromonas* se han producido entrecruzamientos genéticos que han podido dar lugar a híbridos para el gen 16S rRNA. Según este autor es difícil que estos entrecruzamientos se hayan dado en todas las copias del operón ribosómico. En *Aeromonas* se ha indicado que probablemente existen 10 copias de este operón (Dodd y Pemberton, 1998) y en nuestro trabajo se demuestra que estos entrecruzamientos no se han dado en todas las copias del operón ribosómico de *A. bestiarum* y *A. salmonicida*, ya que un 60% de las cepas de éstas especies comparten operones de ambas (estudio 4.1.2.1).

Con ánimo de obtener más información sobre la posición taxonómica de estas especies, se llevó a cabo un estudio de caracterización bioquímica, ya que un requisito esencial para que dos especies puedan ser consideradas distintas es que sean separables mediante pruebas bioquímicas (Vandamme y cols. 1996). Tradicionalmente la especie *A. salmonicida* ha sido considerada psicrófila, con una temperatura óptima de crecimiento de entre 22°C y 25°C (Kimura, 1969a; 1969b; Popoff, 1984; Austin y cols., 1989; Austin y cols., 1998). Sin embargo algunos autores ya han indicado que algunas cepas de *A. salmonicida* son capaces de crecer a 37°C (Austin y cols., 1989; Pavan y cols., 2000), esta característica claramente mesofílica de algunas cepas de *A. salmonicida* ha sido confirmada en nuestro estudio, y coincidió con el comportamiento observado por nosotros y ya descrito para *A. bestiarum* (estudio 4.1.2.1). Las pruebas bioquímicas clásicamente utilizadas para separar las subespecies de *A. salmonicida* son el indol y la movilidad (Popoff, 1984; Wiklund y Dalsgaard, 1998; Pavan y cols., 2000; Janda, 2001). Sin embargo estas pruebas no fueron útiles para este propósito (estudio 4.1.2.1). Otra prueba tradicionalmente utilizada para diferenciar *A. salmonicida* subsp. salmonicida del resto de subespecies es la producción de pigmento marrón (Kimura, 1969a; Kimura, 1969b; Millership, 1996; Austin y cols., 1989; Wiklund y Dalsgaard, 1998). Hemos demostrado que la

producción de pigmento marrón depende de la temperatura de incubación y no es específica para *A. salmonicida* subsp. salmonicida (Austin y cols., 1998; estudio 4.1.2.1). Además se ha descrito que *A. salmonicida* subsp. achromogenes también puede producir este tipo de pigmento (Dalsgaard y cols., 1998), sin embargo las cepas que nosotros estudiamos no fueron productoras de éste pigmento (estudio 4.1.2.1). En el intento de encontrar pruebas bioquímicas capaces de diferenciar las subespecies de *A. salmonicida*, se ensayó por primera vez la utilización del ácido urocánico en todas las subespecies, sin embargo, todas resultaron ser negativas a esta prueba, y por lo tanto no fue de utilidad (estudio 4.1.2.1). Otras pruebas bioquímicas ensayadas en nuestro estudio y recomendadas para la separación de las subespecies de *A. salmonicida* son la oxidación del gluconato, producción de ácido de la lactosa y sacarosa, la hidrólisis de la esculina, utilización de la N-acetil-glucosamina y producción de la elastasa (Austin y cols., 1989; Oakey y cols., 1996; Austin y cols., 1998; Wiklund y Dalsgaard, 1998; Pavan y cols., 2000). Sin embargo ninguna de ellas fue útil en nuestro estudio (4.1.2.1) coincidiendo con Noterdaeme y cols. (1996) que tampoco fueron capaces de diferenciar las subespecies de *A. salmonicida* a pesar de utilizar un total de 128 pruebas bioquímicas. De hecho, la sinonimización de las subespecies de *A. salmonicida* ha estado en discusión durante muchos años (McCarthy, 1978; Belland y Trust, 1988; Austin y cols., 1989), pero no se ha llegado a ningún consenso. A pesar de ello recientemente se ha descrito la nueva subespecie *A. salmonicida* subsp. pectinolytica (Pavan y cols., 2000), los aislados de la cual hemos comprobado que comparten operones ribosómicos de *A. bestiarum* y *A. salmonicida* (estudio 4.1.2.1). Debido a la gran dificultad en asignar las cepas de *A. salmonicida* a una de sus subespecies, cada vez es más frecuente la aparición de publicaciones donde se describen cepas atípicas de esta especie (Austin y cols., 1989; Wiklund y Dalsgaard, 1998; Austin y cols., 1998; Høie y cols., 1999; Sørum y cols., 2000; Lund y cols., 2002).

En la literatura se encuentran muchos datos contradictorios acerca de la respuesta bioquímica de las especies *A. hydrophila*, *A. bestiarum* y *A. salmonicida* a las pruebas consideradas útiles para su separación: producción de ácido del sorbitol (Abbott y cols., 1992), ramnosa (Abbott y cols., 1992, Hänninen, 1994; Ali y cols., 1996) y lactosa (Abbott y cols., 1992; Ali y cols., 1996; Kaznowski, 1998), utilización del ácido urocánico y del DL-lactato (Ali y cols., 1996). Nuestros resultados al ensayar estas pruebas en un número representativo de cepas de *A. hydrophila*, *A. bestiarum* y

A. salmonicida, todas ellas identificadas con la técnica del 16S rDNA-RFLP, indicaban que la utilización del DL-lactato y la producción de ácido del sorbitol y de la lactosa eran las pruebas más útiles para diferenciarlas, aunque ninguna de ellas podría ser considerada como criterio inequívoco para la identificación de éstas especies (estudio 4.1.2.1).

Según Huys y cols. (1997b), las pruebas de mayor utilidad para diferenciar *A. popoffii* de *A. hydrophila*, *A bestiarum* y *A. salmonicida* son la producción de ácido de la D-sacarosa, utilización del DL-lactato y descarboxilación de la lisina. Sin embargo estos autores solo ensayaron un grupo de siete cepas de *A. popoffii*. En nuestro estudio (4.1.2.1) ensayamos 26 cepas de *A. popoffii* que incluían todas las descritas hasta la fecha y nuevos aislamientos, demostrándose que las pruebas bioquímicas útiles para su identificación eran la hidrólisis de la esculina y la producción de ácido de la D-sacarosa. La utilización del DL-lactato solo fue útil para diferenciar *A. popoffii* de *A. bestiarum* y *A. salmonicida*, pero no de *A. hydrophila.*

También hemos analizado los patrones de RFLP del espaciador intergénico 16S-23S de las especies del complejo fenotípico "A. hydrophila". El espaciador intergénico 16S-23S contiene genes que codifican para tRNA, y DNA que no codifica, es por este motivo que se considera un buen marcador filogenético a corto plazo, o un reloj molecular rápido (Zavaleta y cols., 1996). El análisis de los patrones de restricción del espaciador intergénico 16S-23S demostró que las especies *A. hydrophila* y *A. popoffii* formaban dos grupos bien diferenciados, mientras que todas las cepas que en base a los RFLP del gen 16S rRNA se habían identificado como *A. bestiarum*, *A. salmonicida* y *A. bestiarum/A. salmonicida* formaban un único grupo (estudio 4.1.2.1). Este resultado sugeriría que estas especies representan un único taxon, resultado que está de acuerdo con el de estudios previos (Hänninen, 1994; Martínez-Murcia y cols., 1992a; Yañez y cols., 2003).

Todos estos resultados pusieron de manifiesto que no existen suficientes criterios fenotípicos y/o genéticos para diferenciar las especies *A. bestiarum* y *A. salmonicida*, ya sea porque se trata de una única especie o porque las técnicas seleccionadas en nuestro trabajo (4.1.2.1) no son suficientemente discriminativas.

Como ya hemos mencionado, actualmente el *Ad-hoc committee* requiere que para la definición de nuevas especies bacterianas se secuencien cinco genes que codifiquen para funciones esenciales (*housekeeping*) de las cepas estudiadas (Stackebrandt y cols., 2002). Entre estos genes se encuentra el gen *gyr*B, que codifica

para la subunidad B de la DNA girasa (Stackebrandt y cols., 2002). Recientemente se ha demostrado, en *Aeromonas*, que el análisis de la secuencia del gen *gyr*B es un buen cronómetro molecular para realizar estudios filogenéticos en el género, obteniéndose resultados congruentes con los obtenidos con el análisis del gen 16S rRNA (Yañez y cols., 2003). Otro gen estructural de interés es el *rpo*D, que codifica para el factor σ^{70} de la RNA polimerasa, y del cual hasta la fecha no existen datos para el género *Aeromonas*. Se ha descrito que en *Pseudomonas* el gen *rpo*D evoluciona más rápido que el gen 16S rRNA, y además se demostró que el análisis conjunto de los genes *rpo*D y *gyr*B permite establecer la filogenia de este género con mayor precisión (Yamamoto y cols., 2000). Por este motivo, y con ánimo de clarificar de forma más precisa la posición taxonómica de *A. bestiarum* se procedió a la secuenciación de los genes *gyr*B y *rpo*D en un grupo representativo de cepas identificadas como *A. bestiarum*, *A. bestiarum/A. salmonicida* y *A. salmonicida* mediante la técnica del 16S rDNA-RFLP junto con las cepas tipo y otras cepas de referencia de todas las especies del género (estudio 4.1.2.2). Los resultados derivados del análisis filogenético basado en las secuencias del gen *rpo*D de todas las especies del género demostró ser también bastante congruente con los obtenidos con el análisis del gen 16S rRNA y *gyr*B (Martínez-Murcia y cols., 1992a; Martínez-Murcia, 1999; Yañez y cols., 2003). Los resultados del análisis filogenético basado en el gen *gyr*B de las especies *A. bestiarum* y *A. salmonicida* demostraron que el porcentaje de sustitución de nucleótidos entre estas especies era de entre un 2.2 y un 3.3%, considerándose este valor en el límite establecido, en base a este gen, para establecer diferencias intra e inter-específicas (Yañez y cols., 2003). A pesar de que *A. bestiarum* y las subespecies de *A. salmonicida* poseen una secuencia del gen 16S rRNA idéntica (Martínez-Murcia y cols, 1992a; Martínez-Murcia, 1999), el análisis de la secuencia del gen *rpo*D demostró que las cepas de *A. bestiarum* incluidas en la definición de la especie formaban un grupo bien diferenciado y distante de *A. salmonicida* y sus subespecies. Esta observación se ratificó con el análisis combinado de los genes *gyr*B y *rpo*D (estudio 4.1.2.2). Es interesante destacar que la mejor resolución interespecífica para separar *A. bestiarum* de *A. salmonicida* del gen *rpo*D no se observó para las especies *Aeromonas* sp. (GH11)/*A. encheleia* y *A. veronii*/*A. culicicola*/*A. allosaccharophila*, que presentaron una mejor resolución con el gen *gyr*B. El análisis combinado de ambos genes resolvió mejor la filogenia de *Aeromonas*, tal y como sucede en *Pseudomonas* (Yamamoto y cols., 2000). El hecho de que en los

dendogramas obtenidos en base a los genes *rpo*D y *gyr*B, tanto el grupo que incluye todas las cepas de referencia de *A. salmonicida* y su cepa tipo, como el otro grupo que incluye la cepa tipo de *A. bestiarum* y dos cepas de referencia de esta especie, incluyan cepas identificadas como *A. bestiarum/A. salmonicida*, que comparten operones del gen 16S rRNA de ambas especies, evidencia la poca utilidad del gen 16S rRNA para diferenciar estas especies. También es interesante destacar que tanto las cepas del grupo de *A. salmonicida* como del grupo de *A. bestiarum*, tenían una respuesta a la ramnosa que coincidía con la descrita por diversos autores para diferenciar estas especies (Abbott y cols., 1992; Hänninen, 1994; Ali y cols., 1996). Los resultados obtenidos con los genes *rpo*D y *gyr*B contradicen los obtenidos utilizando el análisis de los RFLP del espaciador intergénico 16S-23S que indicaban que ambas especies podían corresponder a un mismo taxon (estudio 4.1.2.1). A pesar de que los resultados obtenidos con los genes *rpo*D y *gyr*B parecen apoyar la separación de las especies *A. bestiarum* y *A. salmonicida*, para llegar a una conclusión definitiva, sería necesario realizar estudios de hibridación DNA-DNA, tal como indica el comité de sistemática, entre las cepas incluidas en cada uno de los dos grupos. En colaboración con el Dr. Erko Stackebrandt (*DSMZ-German Collection of Microorganisms and Cell Cultures GMBH, Braunschweig, Alemania*) iniciamos ya hace unos meses los estudios de hibridación DNA-DNA entre cepas de estos dos grupos de microorganismos que permitirán obtener resultados más concluyentes. Además, creemos que para la completa clarificación de este conflicto sería necesario el análisis de otros genes que codifiquen para funciones esenciales tal y como recomienda el comité de sistemática.

5.2. Sensibilidad a los agentes antimicrobianos

La patología más comúnmente asociada al género *Aeromonas* es la diarrea; generalmente ésta es poco grave y se autolimita rápidamente, no siendo necesario el estudio bacteriológico (Monteil y Harf-Monteil, 1997). Sin embargo, el aumento de movilidad de personas entre los diferentes países y continentes, debido a la elevada facilidad para realizar viajes internacionales, ha conllevado un incremento de la denominada diarrea del viajero, como lo demuestran las numerosas publicaciones recientes que hacen referencia a esta patología (Ramzan, 2001; Kolars y Fischer, 2002; Diemert, 2002; Cheng y Thielman, 2002; Chen y Wilson, 2002; Rendi-Wagner y

Kollaritsch, 2002). Existen pocos estudios que investiguen la incidencia de *Aeromonas* en este tipo de diarrea (Gascón y cols., 1993; Hänninen y cols., 1995; Yamada y cols., 1997; Vila y cols., 2003). En el estudio retrospectivo (Enero de 1999 – Diciembre de 2001) llevado a cabo en colaboración con la Unidad de Medicina Tropical del Hospital Clínico de Barcelona hemos demostrado que un 2% de las diarreas del viajero fueron debidas a *Aeromonas*, siendo las especies más frecuentes: *A. veronii* bt sobria y *A. caviae* (Vila y cols, 2003), resultado coincidente con el obtenido por Hänninen y cols. (1995) cuando analizó las especies más frecuentes aisladas en pacientes que habían viajado a Marruecos. Así mismo, Yamada y cols. (1997), vieron que *A. veronii* bt sobria era la especie más frecuente aislada en pacientes japoneses que habían viajado a países en vías de desarrollo. Vila y cols. (2003) no encontraron diferencias entre las especies más aisladas y el continente de destino de los pacientes (África, América y Asia), aunque en los pacientes que habían visitado la India se aisló una mayor diversidad de especies (*A. veronii* bt sobria, *A. caviae*, *A. jandaei* y *A. hydrophila*). Hay que tener en cuenta, que *Aeromonas* es el patógeno causante del 1.8% de las diarreas en la India (Deodhar y cols., 1991) y además tanto en la India como en otros países *Aeromonas* spp. está significativamente asociada a episodios de diarrea (Ogunsanya y cols., 1994; Begue y cols., 1994; Kühn y cols., 1997a; Albert y cols., 2000).

Los síntomas más frecuentes asociados a la diarrea del viajero producidas por *Aeromonas* son la diarrea líquida persistente, fiebre y dolores abdominales (Hänninen y cols., 1995; Albert y cols., 2000; Vila y cols., 2003), y en la mayoría de casos se prescribe un tratamiento antimicrobiano. A pesar de que la resistencia a las quinolonas ha aumentado en los países desarrollados (Goñi-Urriza y cols., 2000b; Vila y cols., 2002), fueron los agentes antimicrobianos más utilizados para el tratamiento de los enfermos con diarrea del viajero, consiguiéndose la total recuperación de los mismos (Vila y cols., 2003). El análisis retrospectivo, de la resistencia a los agentes antimicrobianos, en éstas cepas, demostró que las quinolonas y las cefalosporinas de tercera generación eran las que presentaban mejor actividad, mientras que el porcentaje de cepas resistentes al cloramfenicol, tetraciclina o trimetoprim-sulfametoxazol varió entre el 23 y el 45% (Vila y cols., 2003). Este porcentaje se ha relacionado con el uso indiscriminado de estos agentes antimicrobianos en los países en vías de desarrollo (Vila y cols., 2003).

Aeromonas se asocia también a un amplio abanico de patologías (septicemia, síndrome urémico-hemolítico, meningitis, infección urinaria...) (Janda y Abbott, 1998; Janda, 2001), lo que justifica la necesidad de conocer cuales pueden ser las mejores terapias antimicrobianas para combatir estas infecciones. En este sentido, Vila y cols. (2002) estudiaron la respuesta a 24 agentes antimicrobianos de 43 cepas clínicas de *Aeromonas* identificadas por la técnica del 16S rDNA-RFLP (Borrell y cols., 1997; Figueras y cols., 2000c), pertenecientes a las especies *A. caviae*, *A. hydrophila* y *A. veronii* bt sobria, aisladas en hospitales españoles. Soler y cols. (2002) analizaron los patrones de sensibilidad de *A. popoffii* a 26 agentes antimicrobianos, diez de los cuales nunca se habían ensayado en esta especie con anterioridad (piperacilina-tazobactam, cefalotina, ceftibuteno, meropenem, fosfomicina, ácido pipemídico, colistina, ampicilina-sulbactam, amoxicilina-ácido clavulánico y trimetoprim-sulfametoxazol). Esta especie fue estudiada en profundidad ya que su sensibilidad a los agentes antimicrobianos sólo se han investigado con anterioridad en las 7 cepas utilizadas para la descripción de la especie (Huys y cols., 1997b; Kämpfer y cols., 1999). La sensibilidad a diferentes agentes antimicrobianos también ha sido investigada en esta tesis en 77 cepas de *Aeromonas* spp. identificadas genéticamente (Borrell y cols., 1997; Figueras y cols., 2000c) y aisladas en muestras de pescado congelado destinado al consumo humano en México D.F. (Castro-Escarpulli y cols., 2003). En todos estos estudios se ha demostrado, tal y como era de esperar, que todas las cepas de *Aeromonas* ensayadas eran resistentes a la ampicilina. Esta característica es específica del género, cumpliéndola todas las especies a excepción de *A. trota* (Carnahan y cols., 1991b), especie que nunca hemos aislado en los estudios mencionados. La piperacilina presentó una buena actividad frente a las cepas de *Aeromonas* aisladas de pescado congelado (Castro-Escarpulli y cols., 2003), resultado que concuerda con los previamente publicados (Morita y cols., 1994; Ko y cols., 1996). La combinación del ácido clavulánico con la ampicilina aumentó la actividad antimicrobiana, tanto en las cepas clínicas estudiadas como en *A. popoffii*, mientras que el tazobactam no incrementó la actividad de la piperacilina (Vila y cols., 2002; Soler y cols., 2002). Así mismo, el sulbactam también incrementó la actividad de la ampicilina en *A. popoffii* (Soler y cols., 2002). Estos resultados demostraron que la combinación de una penicilina con un inhibidor de β-lactamasas, es útil para reducir la resistencia de *Aeromonas* spp. a los antibióticos β-lactámicos, la cual en este género ha sido considerada dependiente de enzimas codificadas por el cromosoma de la

bacteria (β-lactamasas) (Shanon y cols., 1986; Bakken y cols., 1988; Iaconis y Sanders, 1990; Hayes y cols., 1994; Walsh y cols., 1995; Alksne y Rasmussen, 1997; Walsh y cols., 1997; Ko y cols., 1998). El 44.1% de las cepas de *Aeromonas* aisladas de pescado congelado fueron resistentes a la tetraciclina (Castro-Escarpulli y cols., 2003). La resistencia a la tetraciclina en piscifactorías ha sido atribuida a la transferencia de un plásmido R de alto peso molecular (Richards y cols., 1992; Inglis y cols., 1993; Sandaa y Enger, 1994; 1996) que es capaz de ser transferido a otras cepas clínicas y ambientales de la misma especie (Adams y cols., 1998; Rhodes y cols., 2000).

Las cefalosporinas, aminoglucósidos y fluoroquinolonas presentaron una buena actividad frente a las cepas ensayadas (Vila y cols., 2002; Soler y cols., 2002; Castro-Escarpulli y cols., 2003), resultado que es congruente los previamente descritos (Motyl y cols., 1985; Chang y Bolton, 1987; Morita y cols., 1994; Ko y cols., 1996; Kämpfer y cols., 1999). En cuanto a las cefalosporinas, cabe destacar que todas las especies ensayadas mostraron cierta resistencia (60% *A. hydrophila*, 54% *A. popoffii*, 47% *A. caviae* y 21% *A. veronii*) a la cefazolina (Vila y cols., 2002; Soler y cols., 2002). Estos resultados son coincidentes con los previamente descritos para estas especies (Janda y cols., 1995; Huys y cols., 1997b; Kämpfer y cols., 1999; Overman y Janda, 1999). Todas las cepas de *A. salmonicida* fueron resistentes a la cefalotina (Castro-Escarpulli y cols., 2003), resultado que contrasta con el obtenido por Dalsgaard y cols. (1994), ya que todas las cepas de esta especie ensayadas por estos autores fueron sensibles a la cefalotina.

En el caso de los aminoglucósidos, la gentamicina y la amikacina fueron más activas que la tobramicina en las cepas de origen clínico (Vila y cols., 2002), fenómeno que también ha sido observado en cepas aisladas en Australia, Taiwán y Estados Unidos (Janda y cols., 1995; Ko y cols., 1996; Overman y Janda, 1999). Sin embargo estas diferencias no se han observado en cepas de origen ambiental, como es el caso de la especie *A. popoffii* (Huys y cols., 1997b; Kämpfer y cols., 1999; Soler y cols., 2002).

Las quinolonas son consideradas el tratamiento antimicrobiano de elección para las infecciones producidas por *Aeromonas* spp. (Janda y cols., 1995; Sanford y cols., 1997; Overman y Janda, 1999), sin embargo, respectivamente, un 20%, 26% y 88% de las cepas de *A. hydrophila*, *A. caviae* y *A. veronii* fueron resistentes al ácido nalidíxico aunque sensibles al ciprofloxacino (Vila y cols., 2002). En estos casos, las

quinolonas no deberían elegirse como tratamiento, ya que la resistencia al ácido nalidíxico indica que ya existe una mutación en el gen *gyr*A, y que por lo tanto es fácil que se produzca una segunda mutación en este gen que convierta a la cepa en resistente al ciprofloxacino (Ruiz y cols., 2002). En cepas aisladas de pescado congelado se observó el efecto contrario, un 41.5% de las cepas eran sensibles al ácido nalidíxico y resistentes al ciprofloxacino (Castro-Escarpulli y cols., 2003).

Todas las cepas de *A. hydrophila*, *A. caviae*, *A. veronii* y *A. popoffii* fueron sensibles al imipenem (Vila y cols., 2002; Soler y cols., 2002), sin embargo Overman y Janda (1999) encontraron un 67% de cepas clínicas de *A. veronii* resistentes. Estos resultados son sin embargo comparables al 50% encontrado para cepas de esta especie aisladas de peces congelados destinados al consumo humano y fue común para la especie *A. hydrophila* (50%), encontrándose menos resistencia al imipenem para las otras especies: 19% de *A. bestiarum* y el 3.8% de *A. salmonicida* (Castro-Escarpulli y cols., 2003).

Las cepas de *A. salmonicida* se han descrito como sensibles al cloramfenicol, neomicina, polimixina B y rifampicina (Dalsgaard y cols., 1994), sin embargo en el estudio realizado por Castro-Escarpulli y cols. (2003), esta especie presentó una resistencia variable a estos agentes antimicrobianos que osciló entre el 9% y el 85.7%.

Los estudios realizados por Vila y cols. (2002), Soler y cols. (2002) y Castro-Escarpulli y cols. (2003) muestran que las cefalosporinas de tercera generación son las más activas frente a *Aeromonas* spp., las cuales ya han sido recomendadas para el tratamiento de infecciones producidas por estas bacterias (Sanford y cols., 1997). No se observaron diferencias importantes en cuanto a la resistencia a los diferentes agentes antimicrobianos y la especie estudiada, fenómeno que ya había sido previamente descrito (Kämpfer y cols., 1999), ni tampoco se observaron diferencias en cuanto al origen geográfico de las cepas, las cuales si habían sido descritas por Ko y cols. (1996). En general si se ha observado una mayor resistencia a los agentes antimicrobianos en las cepas aisladas en pescado (Castro-Escarpulli y cols., 2003) que en el resto de cepas estudiadas (Vila y cols., 2002; Soler y cols., 2002). Otros autores que han investigado la resistencia a los agentes antimicrobianos en cepas aisladas de pescado procedente de piscifactorías a lo largo de varios años han indicado que esta ha aumentado (Schmidt y cols., 2000). Este hecho se ha correlacionado con el incremento en el uso indiscriminado de éstos agentes

antimicrobianos en las piscifactorías (DePaola y cols., 1988; McPhearson y cols., 1991; Spanggaard y cols., 1993; Guardabassi y cols., 2000).

5.3. Técnicas de tipado molecular

Tal y como se ha comentado en la introducción, existen numerosos trabajos que han tratado de determinar las relaciones epidemiológicas de las cepas de *Aeromonas*, habiéndose utilizado para ello un gran número de técnicas diferentes, ya sean de carácter fenotípico o molecular. De estas, merece la pena destacar el PFGE, ya que ha sido considerada la mejor técnica para tipar cepas bacterianas (Maslow y cols., 1993), y ha sido recientemente aplicada con éxito en *Aeromonas* spp. (Hänninen y Hirvelä-Koski, 1999; García y cols., 2000; Bonadonna y cols., 2002; Villari y cols; 2003; Borchardt y cols., 2003). A pesar de ello, Talon y cols. (1998) evaluaron el PFGE en comparación con la técnica de los RAPDs en *A. hydrophila* y comprobaron que los RAPDs eran más fáciles, rápidos y baratos de realizar, y por lo tanto más idóneos para el tipado epidemiológico de *Aeromonas*. Sin embargo, también existen trabajos que han criticado el uso de los RAPDs, por ser una técnica que amplifica al azar regiones del genoma, pudiéndose obtener bandas de igual peso molecular que en realidad se correspondan a regiones del genoma diferentes (Oakey y cols., 1998). Las técnicas de ERIC y REP-PCR, descritas por Stern y cols. (1984), son una alternativa a los RAPD's debido a que se basan en la amplificación por PCR de secuencias de DNA repetitivas y conservadas del genoma denominadas de forma global como rep-PCR (Stern y cols., 1984; Hulton y cols., 1991), y por lo tanto no son técnicas arbitrarias (Versalovic y cols., 1991). Estas técnicas han sido aplicadas, en numerosas ocasiones, con finalidades epidemiológicas en otros géneros bacterianos (Vila y cols., 1996; Sander y cols., 1998; Marshall y cols., 1999). En el género *Aeromonas* el ERIC fue utilizado con éxito para trazar una infección nosocomial producida por *A. hydrophila* (Davin-Regli y cols., 1998). Sin embargo, hasta la fecha el REP no había sido aplicado a cepas de *Aeromonas* spp. En el presente trabajo se ha presentado el primer estudio en *Aeromonas* donde se evalua el REP, sólo y conjuntamente con el ERIC (Soler y cols., 2003) en todas las cepas de *A. popoffii* descritas hasta la fecha (Huys y cols., 1997b; Demarta y cols., 1999; Soler y cols., 2002). Además, éstas técnicas también las hemos evaluado comparativamente en estas mismas cepas con la técnica del 16S-23S ISR-

RFLP. Ésta última técnica fue elegida porque el 16S-23S ISR es una región del genoma que no se transcribe ni codifica, por lo que no tiene presión evolutiva y puede presentar variaciones tanto de tamaño como de secuencia (Zavaleta y cols., 1996). Es por este motivo que ha sido utilizada con éxito para tipar cepas implicadas en brotes epidemiológicos, en los que se han encontrado involucradas bacterias pertenecientes a distintos géneros bacterianos (Kostman y cols., 1995; Abed y cols., 1995; Cartwright y cols., 1995; García-Martínez y cols., 1996) entre ellos *Aeromonas*. En concreto se aplicó al estudio de cepas de origen clínico y ambiental pertenecientes a la especie *A. veronii*, pudiéndose demostrar la colonización de una red de distribución de agua potable por una misma cepa (Martínez-Murcia y cols., 2000).

En *A. popoffii* el ERIC produjo patrones cepa-específicos para todas las cepas no relacionadas, sin embargo tanto el REP como el 16S-23S ISR-RFLP produjeron patrones idénticos para algunas cepas para las que se había obtenido un patrón cepa-específico con el ERIC (Soler y cols., 2003). Algunos autores han indicado que cuando los resultados obtenidos mediante diferentes métodos de tipado son combinados, la resolución es mayor que cuando estos son analizados por separado (Vinuesa y cols., 1998; Metha y cols., 2001). En nuestro estudio combinamos dos a dos los resultados obtenidos del 16S-23S ISR-RFLP, ERIC y REP, y también los analizamos los tres conjuntamente. Observamos que mediante cualquier combinación dos a dos de éstas técnicas conseguíamos patrones cepa-específicos para cepas que parecían idénticas al utilizar el 16S-23S ISR-RFLP o REP por separado. Nuestros resultados indican que cuando se utilizan las técnicas del 16S-23S ISR-RFLP o REP para tipar cepas de *Aeromonas* spp., es necesario combinar los resultados de ambas técnicas entre sí o con los resultados del ERIC, para poder obtener resultados fiables (Soler y cols., 2003). Además se observó que cuando se analizaba el ERIC sólo, o conjuntamente con el REP, existía una tendencia de las cepas a agruparse según su origen geográfico, tendencia que se veía reforzada por la adición del 16S-23S ISR-RFLP (Soler y cols., 2003). Recientemente, se ha demostrado en *Aeromonas* spp. que los patrones de ERIC de las cepas ambientales de distintos origenes eran más similares entre sí que los de las cepas clínicas (Sechi y cols., 2002).

Con las tres técnicas utilizadas, seis de los ocho aislados de *A. popoffii* procedentes de Suiza, presentaron patrones idénticos, así mismo estos aislados también presentaron idéntica respuesta bioquímica, sensibilidad a los agentes antimicrobianos y poseían los mismos genes de virulencia, sugiriendo todos estos

resultados que estos seis aislados pertenecían a un mismo grupo clonal. Por esta razón consideramos que los ocho aislados descritos por Demarta y cols. (1999) representan en realidad tres cepas (Soler y cols., 2003). Las cepas de *A. popoffii* aisladas en España fueron las que presentaron una mayor diversidad genética, lo cual puede ser atribuido a la gran diversidad de las muestras de donde provenían (embalses, ríos y agua de mar), además se demostró que en un mismo lugar podían coexistir dos clones diferentes de una misma especie (Soler y cols., 2003). Utilizando la técnica del ribotipado, cuatro de las cepas de *A. popoffii* utilizadas en nuestro estudio producían patrones idénticos (Huys y cols., 1997b; Demarta y cols., 1999), sin embargo, estas cepas demostraron ser diferentes con las técnicas del 16S-23S ISR-RFLP, ERIC y REP (Soler y cols., 2003). Estos datos confirman los resultados obtenidos por otros autores en (Maslow y cols., 1993; Demarta y cols., 2000) en el sentido de que el ribotipado no es suficientemente discriminativo para ser utilizado como herramienta epidemiológica en *Aeromonas*.

A pesar de que generalmente, un único método no es suficiente para estudiar las relaciones epidemiológicas entre cepas (Marshall y cols., 1999), nuestros resultados indican que el ERIC es suficientemente resolutivo en *Aeromonas* como para poderse utilizar sólo. En caso de poderse utilizar dos métodos, la mejor combinación es el ERIC y el REP, por ser los más resolutivos, rápidos y sencillos de realizar, además, aunque su reproducibilidad ha sido puesta en duda (Tyler y cols., 1997), si se estandariza la extracción del DNA, las condiciones de PCR y electroforesis, la tasa de reproducibilidad es muy elevada, tal y cómo hemos demostrado (Soler y cols., 2003).

La utilidad de la técnica del ERIC también ha sido demostrada en cepas de la especie *A. jandaei* (estudio 4.4.3). En este trabajo, la utilización del ERIC permitió poner de manifiesto que diez de las cepas recibidas de colecciones personales e internacionales representaban sólo cuatro cepas distintas, aspecto que se confirmó después de investigar minuciosamente su procedencia real a través de las diferentes colecciones internacionales. El dendograma resultante del análisis de los patrones de ERIC de esta especie reveló que las cepas tendían a agruparse según su origen geográfico (estudio 4.4.3), aspecto que coincidía con el obtenido para *A. popoffii* (Soler y cols., 2003).

5.4. Distribución de los factores de virulencia

La enteropatogenicidad de *Aeromonas* spp. se ha atribuido a la producción de enzimas extracelulares, exotoxinas y adhesinas, entre ellos se incluyen la aerolisina/hemolisina, serina proteasa, lipasas extracelulares (*lip*, *plc*, *pla*, *lip*H3), GCAT, DNasas, enterotoxinas citotónicas (*alt* y *ast*) y flagelo lateral, sin embargo no se ha establecido la importancia y mecanismo exacto por el que cada factor de virulencia está asociado a la patogenicidad (Pemberton y cols., 1997).

Aunque existen datos acerca de la distribución de algunos factores de virulencia como la aerolisina (Granum y cols., 1998; Kingombe y cols., 1999; Heuzenroeder y cols., 1999; González-Serrano y cols., 2002; González-Rodríguez y cols., 2002; Sechi y cols., 2002; Wang y cols., 2003) la GCAT y la serina proteasa (Austin y cols., 1998; Høie y cols., 1999) estos nunca han sido analizados de forma conjunta, ni junto a otros factores de virulencia en representantes de todas las especies del género *Aeromonas* identificadas utilizando métodos genéticos. En este sentido, Chacón y cols. (2003) han reportado el primer estudio que evalúa, en cepas de origen clínico y ambiental de todas las especies del género identificadas genéticamente, la distribución de los genes que codifican para cinco factores de virulencia (aerolisina/hemolisina, serina proteasa, lipasas extracelulares (*lip*, *plc*, *pla*, *lip*H3), GCAT y DNasas) estudiando también la actividad fenotípica asociada a dichos genes. La distribución de éstos mismos genes ha sido también estudiada de forma específica en *A. popoffii*, con el fin de esclarecer si esta especie de origen ambiental de la que se conocía poco, poseía un potencial virulento comparable al de especies típicamente clínicas (Soler y cols., 2002). Los mismos factores de virulencia se han investigado en un grupo de 77 cepas aisladas de pescado congelado destinado al consumo humano en México D.F. (Castro-Escarpulli y cols., 2003). A continuación se discutirán los aspectos más importantes referentes a estos trabajos.

En el género *Aeromonas* se han descrito diversas β-hemolisinas, sin embargo su caracterización se ha visto dificultada por la identificación imprecisa de las cepas en las que se han estudiado y por la terminología múltiple con la que se las ha descrito, aerolisina (Howard y Buckley, 1987), hemolisina (Hirono y cols., 1992) o enterotoxina citotóxica (Chopra y cols., 1993). Este hecho ha generado cierta controversia, ya que algunos autores consideran que muchas de ellas son muy similares o incluso idénticas (Buckley y Howard, 1999). La aerolisina es probablemente el factor de virulencia más

conocido en el género *Aeromonas*. Además algunas cepas de *Aeromonas* poseen más de un gen que codifica para hemolisinas en su genoma (Hirono y cols., 1992), por lo que es muy difícil saber exactamente el número y tipo de hemolisinas características del género. Es por estos motivos, y por el hecho de que su elevada homología hace prácticamente imposible diseñar cebadores para caracterizarlas individualmente, que en el presente trabajo se han diseñado cebadores para amplificar regiones homólogas a todas estas toxinas y se ha denominado al amplificado obtenido como aerolisina/hemolisina (Soler y cols., 2002; Castro-Escarpulli y cols., 2003; Chacón y cols., 2003). Se ha demostrado que la aerolisina está directamente implicada en la virulencia de las cepas, ya que los mutantes de delección para este gen son menos virulentos que las cepas salvajes (Chackraborty y cols., 1987). En nuestro estudio, los genes que codifican para la aerolisina/hemolisina fueron detectados en todas las cepas tipo, a excepción de *A. media*, *A. allosaccharophila* y *A. schubertii* (Chacón y cols., 2003), sin embargo, en un estudio previo la aerolisina/hemolisina tampoco fue detectada en las cepas tipo de estas especies ni en las de *A. caviae*, *A. jandaei* y *A. trota* (Kingombe y cols., 1999). Estas diferencias pueden ser atribuidas a que Kingombe y cols. (1999) utilizaron una mezcla de ocho cebadores que aparentemente tenían un grado de especificidad menor que los cebadores utilizados por Chacón y cols. (2003). Cuando los genes de la aerolisina/hemolisina se investigaron en las 234 cepas, pertenecientes a todas las especies del género, un 72.6% de las cepas los presentaron, y se encontraron significativamente más presentes en cepas clínicas que ambientales (Chacón y cols., 2003). En *A. caviae*, la presencia de la aerolisina/hemolisina, así como la actividad ß-hemolítica se encontró en menor proporción (40% y 37.5%, respectivamente) que en otras especies como *A. veronii* (94% y 85.7%, respectivamente) clásicamente también aislada en muestras clínicas (Chacón y cols., 2003). Este fenómeno también ha sido observado por otros autores (Granum y cols., 1998; Kingombe y cols., 1999; Heuzenroeder y cols., 1999; Wang y cols., 2003). En *A. popoffii* la aerolisina/hemolisina se detectó en un 92% de las cepas (Soler y cols., 2002), resultado comparable al de especies de origen clínico, como por ejemplo *A. veronii*, o al de especies consideradas patógenas de peces como *A. salmonicida*. Además, la presencia de la aerolisina/hemolisina en *A. popoffii* es mayor que en otras especies de origen ambiental, como *A. sobria*, en la que la prevalencia de este gen fue sólo del 50% (Kingombe y cols., 1999). En otros estudios estos genes se han detectado en todas las cepas de *A. hydrophila* estudiadas (González-Serrano y

cols., 2002; González-Rodríguez y cols., 2002), aunque otros autores sólo los detectan en el 45% (Sechi y cols., 2002). La incidencia de la aerolisina/hemolisina en *A. hydrophila* en nuestros estudios fue del 58% (Chacón y cols., 2003) y 100% (Castro-Escarpulli y cols., 2003), la diferencia entre ambos estudios puede ser debida a que en el estudio de Castro-Escarpulli y cols. (2003) sólo se investigaron 2 cepas de esta especie. Cabe destacar que en los estudios mencionados de otros autores las cepas habían sido sólo identificados bioquímicamente y no genéticamente como en nuestros estudios. La aerolisina/hemolisina se detectó en el 96% de las cepas aisladas de pescado en México (Castro-Escarpulli y cols., 2003), resultado comparable al obtenido por Rahman y cols. (2002) quien encontró este gen en todas las cepas aisladas en peces enfermos. En *A. jandaei*, el gen se detectó en el 40.7% de las 26 cepas que estudiamos (estudio 4.4.3). Éste resultado contrasta con la no detección para la misma especie por Kingombe y cols. (1999) cuando estudió 3 cepas y Chacón y cols. (2003) que obtuvo un 83.3% cuando estudió sólo 6 cepas.

Cuando se analizó la actividad fenotípica asociada a la aerolisina (ß-hemólisis), se observaron diferencias según el tipo de sangre utilizada (humana o de carnero) y la temperatura empleada (Soler y cols., 2002; Chacón y cols., 2003). Estos resultados concuerdan con los de otros trabajos donde también se ha demostrado que la actividad β-hemolítica depende del tipo de sangre utilizada (Brenden y Janda, 1987; Gossling, 1996; Santos y cols., 1999). Ninguna de las cepas de *A. popoffii* mostró β-hemólisis cuando fue ensayada a 37ºC en agar sangre de carnero, lo cual concuerda con los resultados de la descripción original de la especie (Huys y cols., 1997b). Sin embargo, el 73% de las cepas mostraron β-hemólisis cuando se utilizó agar sangre humana a 20ºC, aspecto desconocido hasta la fecha (Soler y cols., 2002). Es interesante destacar que ninguna cepa de *A. encheleia* presentó actividad ß-hemolítica, aunque todas demostraron poseer el gen que codifica para la aerolisina/hemolisina (Castro-Escarpulli y cols., 2003; Chacón y cols., 2003).

La serina proteasa ha sido implicada en la activación de la pre-pro-aerolisina (Abrami y cols., 1998) y la pro-GCAT (Eggset y cols., 1994; Vipond y cols., 1998). En concreto, la aerolisina se transcribe como una pre-pro-aerolisina que contiene una región N-terminal que es eliminada durante el paso por la membrana interna dando lugar a una pro-aerolisina (Husslein y cols., 1988; Chopra y cols., 1993; van der Goot y cols., 1994), proceso que está mediado por la serina proteasa (Abrami y cols., 1998). Así mismo esta pro-aerolisina es secretada al exterior de la célula por un proceso

durante el cual se elimina la región C-terminal de la proteína convirtiéndola en una aerolisina activa (Howard y cols., 1996). En cuanto a la GCAT, esta es secretada por la bacteria como pro-GCAT, la cual debe sufrir un corte en el extremo C-terminal para convertirse en la GCAT activa (Hilton y cols., 1990; Ausio y cols., 1993). Este corte es producido por la serina proteasa (Eggset y cols., 1994; Vipond y cols., 1998). Chacón y cols. (2003) han encontrado significativamente más presencia de los genes que codifican para la aerolisina/hemolisina y serina proteasa en cepas β-hemolíticas, lo cual apoya los resultados de Abrami y cols. (1998). Sin embargo, no se ha encontrado una asociación estadísticamente significativa entre la presencia de los genes que codifican para la GCAT y la serina proteasa en cepas lipolíticas, esto ha sido debido a que prácticamente todas las cepas presentaban simultáneamente actividad lipolítica y el gen que codifica para la GCAT (Chacón y cols., 2003). Los resultados publicados por otros autores indicaban que cuando la GCAT y la serina proteasa se inyectaban simultáneamente e intramuscularmente en salmónidos, se producía furunculosis (Ellis, 1997), sin embargo posteriormente se publicaron resultados contradictorios sobre la importancia de ambos enzimas para la virulencia de *A. salmonicida* (Vipond y cols., 1998). Hasta la fecha la distribución de los genes que codifican para la GCAT y la serina proteasa sólo habían sido investigados en cepas de *A. salmonicida*, demostrándose que entre el 92% y el 100% de las cepas poseían la GCAT, y entre el 32% y el 40% la serina proteasa (Austin y cols., 1998; Høie y cols., 1999). En el presente trabajo tal y cómo hemos indicado anteriormente, se ha demostrado que los genes que codifican para la GCAT se encuentran presentes en todas las cepas del género (Soler y cols., 2002; Castro-Escarpulli y cols., 2003; Chacón y cols., 2003). Éste resultado nos ha permitido diseñar una sonda, correspondiente a un fragmento de éste gen, para la detección de colonias de *Aeromonas* spp. (Chacón y cols., 2002). Además, también hemos demostrado que el gen que codifica para la serina proteasa se encuentra en todas las especies del género con porcentajes que oscilan entre el 75 y el 96% (Soler y cols., 2002; Castro-Escarpulli y cols., 2003; Chacón y cols., 2003). Al investigar la actividad fenotípica que se asocia a la serina proteasa, evaluando la actividad azocaseina, se observó que esta era significativamente mayor en cepas de origen ambiental que en cepas clínicas (Chacón y cols., 2003). En el estudio de los factores de virulencia en cepas aisladas de pescado, la actividad proteasa también fue estudiada en paralelo mediante las técnicas de la azocaseina, gelatinasa y la caseinasa. Las pruebas de la gelatinasa y la azocaseina proporcionaron resultados

similares, sin embargo, la prueba de la caseinasa proporcionó un elevado número de falsos negativos, siendo por lo tanto ésta última la de menor utilidad para determinar la actividad proteasa en *Aeromonas* spp. (Castro-Escarpulli y cols., 2003).

Las lipasas tienen función nutricional en las bacterias (Pemberton y cols., 1997), sin embargo en *A. hydrophila* se ha demostrado que mutantes de inserción para el gen *plc*, que codifica para la lipasa Plc, reducen la DL_{50} en ratones y peces, demostrándose así su implicación en la virulencia (Merino y cols., 1999). Hasta la fecha no existían estudios que determinasen la incidencia de los genes que codifican para las lipasas *lip*H3 (Anguita y cols., 1993), *lip* (Chuang y cols., 1997), *apl*-1 (Ingham y Pemberton, 1995) y *plc* (Merino y cols., 1999) en *Aeromonas*. En la presente tesis se ha demostrado que estos genes se encuentran presentes en todas las especies del género, y su presencia se correlaciona con la actividad lipolítica de las cepas, no encontrándose diferencias entre la presencia de lipasas y el origen clínico o ambiental de las cepas (Soler y cols., 2002; Chacón y cols., 2003; Castro-Escarpulli y cols., 2003). Castro-Escarpulli y cols. (2003) evaluaron tres métodos diferentes para determinar la actividad lipolítica de las cepas (medio mantequilla-resarsurina, α-lecitina y agar tributirina), no encontrándose diferencia entre ellos y recomendándose el uso del agar tributirina por ser más fácil y rápido de interpretar.

Otro factor de virulencia de interés son las DNasas, las cuales son consideradas de gran importancia en bacterias de otros géneros como *Streptococcus* para producir la infección de las células huéspedes humanas y hacer que ésta progrese (Podbielski y cols., 1996; Ericksson y cols., 1999). En *Aeromonas*, hasta la fecha los únicos estudios realizados sobre las DNasas han sido los de la descripción y caracterización de los tres genes publicados hasta la fecha (Chang y cols., 1992; Dodd y Pemberton, 1996; 1999), pero se desconoce la distribución de éstas en las especies del género. Chacón y cols. (2003) han demostrado que estos genes se encuentran significativamente más presentes en cepas de *Aeromonas* de origen clínico (95%) que ambiental (85%), aunque esta diferencia no se observó a nivel de expresión fenotípica del gen. Por otro lado todas las cepas de *A. popoffii* estudiadas presentaban los genes de las DNasas y la actividad fenotípica que las caracteriza (Soler y cols., 2002). Este gen se encontró presente en el 83% de las cepas procedentes de pescado congelado, aunque todas las cepas presentaron actividad DNasa (Castro-Escarpulli y cols., 2003).

La habilidad de captar el rojo congo ha sido utilizada como marcador de virulencia de muchas bacterias enteropatógenas como *Yersinia enterocolitica* (Farmer

y cols., 1992), *Edwarsiella tarda* (Ling y cols., 2000), *Vibrio cholerae* (Nataro y Kaper, 1998), *Escherichia coli* enteroinvasiva y *Shigella flexneri* (Rico-Martinez, 1995; Nataro y Kaper, 1998). Así mismo, Ishiguro y cols. (1985) sugirieron que este era un buen marcador del potencial virulento de *A. salmonicida*, mientras que Ellis y cols. (1988) lo pusieron en duda. Se ha sugerido que los responsables de la captación del rojo congo en *Aeromonas* spp. son los sideróforos (Santos y cols., 1999), cuya función se asocia a la captación del hierro de la hemoglobina del huésped (Janda, 2001). Castro-Escarpulli y cols. (2003) demostraron que todas las cepas aisladas de pescado congelado eran capaces de captar el rojo congo, resultado que coincidía con otros estudios (Statner y George, 1987; Palumbo y cols., 1989; Paniagua y cols., 1990).

La adherencia agregativa a células HEp-2, se ha asociado a la presencia de pilis tipo IV en la bacteria (Thornley y cols., 1994; Kirov y cols., 2000). Se demostró que todas las cepas aisladas de pescado congelado presentaban una adherencia agregativa a células HEp-2 independiente de la especie de *Aeromonas* de que se tratara (Castro-Escarpulli y cols., 2003). Este patrón de adherencia a estas células se ha descrito también para todas las cepas de *A. caviae* estudiadas por otros autores (Thornley y cols., 1994).

Todos estos datos demuestran que las cepas de origen ambiental presentan una carga genética de factores de virulencia similar a la de las cepas de origen clínico, sugiriendo por lo tanto que el ambiente es un reservorio de cepas de *Aeromonas* spp. con capacidad patógena. Además se sugiere que las cepas procedentes de pescado pueden actuar como vehículo de transmisión de *Aeromonas*, si se tiene en cuenta que este tipo de pescado se consume crudo en México (Castro-Escarpulli y cols., 2003). También se ha considerado importante conocer que cepas o especies de las aisladas de peces enfermos pueden producir patología en peces sanos. En el presente estudio se ha demostrado por primera vez, realizando estudios *in vivo* en carpa común (*Cyprinus carpio*), la patogenicidad de la especie *A. bestiarum* y de las cepas mesófilas y móviles de *A. salmonicida* (Kozińska y cols., 2002). A pesar de que *A. bestiarum* había sido aislada de peces enfermos (Huys y cols., 1996b), no existían datos hasta la fecha sobre sus características patógenas. Además se ha demostrado que no todas las cepas de *A. sobria* son patógenas, tal y cómo habían indicado estudios anteriores, realizados también en carpas (Kozińska, 1996) y en otras especies de pez (Santos y cols, 1988; Toranzo y cols., 1989). En estos estudios, sin embargo, las cepas no habían sido identificadas genéticamente. Sólo una de las cepas

de *A. sobria* de las 6 que se ensayaron demostró ser capaz de provocar lesiones cutáneas localizadas en un 30% de los peces (Kozińska y cols., 2002). La especie *A. encheleia* demostró no ser patógena en las carpas, tal y cómo se había descrito previamente para las anguilas (Esteve y cols., 1995c).

Además de los factores de virulencia mencionados, se han descrito otros en el género, entre ellos el flagelo lateral, responsable de la movilidad rápida o pululante "*swarming*" implicada en adherencia y colonización (Gavín y cols., 2002). Así mismo, una enterotoxina termolábil codificada por el gen *alt* (Chopra y cols., 1986) y una enterotoxina termoestable codificada por el gen *ast* (Chopra y cols., 1994) han sido recientemente implicadas de forma directa en la producción de diarrea, ya que mutantes defectuosos para estos dos genes reducen en un 36% la secreción de fluido en un modelo experimental de diarrea en ratón (Sha y cols., 2002). Además, la presencia simultánea de éstos genes en las cepas aisladas en niños con cuadros diarreicos, se ha asociado a la producción de diarrea líquida o severa (Albert y cols., 2000), aunque esta asociación se realizó en base a un número muy reducido de casos (11 pacientes). El gen *act* codifica para una enterotoxina citotóxica que presenta una homología del 79-93% con la aerolisina/hemolisina a nivel de aminoácidos (Chopra y cols., 1993) y de hasta un 96% a nivel de nucleótidos, siendo por lo tanto imposible diferenciar ambos genes por PCR. Además ambas toxinas han sido recientemente consideradas la misma (Buckley y Howard, 1999). Mutantes dobles para los genes *act* y *ast*, *act* y *alt* reducen en un 62% y 73% respectivamente la secreción de fluidos en un modelo experimental de ratón, mientras que un triple mutante para los genes *act*, *alt* y *ast* reduce esta secreción en un 100% (Sha y cols., 2002). En nuestro estudio (4.4.3) se investigó la presencia de los genes *laf*A (codifica para el flagelo lateral), *alt*, *ast* y aerolisina/hemolisina por PCR y *dot blot* (excepto para el gen *alt*) en un grupo de 32 cepas de *A. jandaei* de origen ambiental, clínico y animal. El 63% de las cepas de *A. jandaei* presentaron el gen *laf*A, que sólo había sido estudiado y encontrado hasta la fecha en la cepa tipo de esta especie (Kirov y cols., 2002). En nuestro estudio no se observaron diferencias entre la presencia de éste gen y el origen de las cepas, lo cual no es de extrañar, ya que la presencia del flagelo lateral es beneficiosa tanto en cepas de origen ambiental (formación de biofilms), como en cepas de origen clínico (colonización y adherencia). La detección de este gen por PCR fue menos efectiva que su detección por *dot blot*, ya que 12 de las cepas fueron negativas por PCR pero positivas por *dot blot*. Dado que el gen *laf*A no presenta homología (por análisis

BLAST) con otros genes, la detección de falsos positivos es muy poco probable. Probablemente la baja efectividad de la detección por PCR sea debida a variaciones en la secuencia en las dianas de unión de los cebadores, tal y cómo ha sido sugerido en otros estudios donde se detectó por PCR el gen que codifica para la GCAT (Chacón y cols., 2002; Chacón y cols., 2003). En nuestro estudio el gen *ast* sólo fue detectado en una cepa aislada de un niño con diarrea, esta cepa también presentaba los genes *alt* y *laf*A, sin embargo un 92.3% de las cepas de *A. jandaei* aisladas de diarrea no presentaron ninguna asociación entre los genes *ast* y *alt* (estudio 4.4.3). Este resultado no concuerda con la hipótesis formulada por Albert y cols. (2000), de que la combinación de ambos genes sería responsable de la diarrea líquida. Para clarificar este último punto sería necesario investigar la presencia de estos genes en un número mayor de cepas y procedentes de pacientes con diarrea con una historia clínica clara y completa. En nuestro estudio ninguna de las cepas de *A. jandaei* procedente de diarrea presentó simultáneamente los genes *alt*, *ast* y aerolisina/hemolisina. Los genes *laf*A y aerolisina/hemolisina se detectaron simultáneamente en un 34.7% de las cepas independientemente de su origen, y únicamente una cepa con origen animal, presentó simultáneamente los genes *alt* y aerolisina/hemolisina.

Consideramos que los factores de virulencia estudiados en *A. jandaei*, deben jugar un papel importante en la patogenicidad de esta especie, ya que al menos uno de ellos (*alt*, *ast*, aerolisina/hemolisina o *laf*A) se encontró mucho más presente (73.7%) en las cepas clínicas, que en las cepas ambientales (40%) (estudio 4.4.3).

5.5. Mecanismos de patogenicidad

Cómo se ha demostrado, los diferentes factores de virulencia se encuentran ampliamente presentes en cepas de *Aeromonas* de diferentes especies, tanto clínicas como ambientales (Soler y cols., 2002; Castro-Escarpulli y cols., 2003; Chacón y cols., 2003; estudio 4.4.3). Recientemente, se han aportado evidencias de la existencia del sistema de secreción tipo III (TTSS) en una cepa de *A. salmonicida* subsp. salmonicida aislada de peces enfermos, describiéndose ocho genes que forman parte del TTSS (Burr y cols., 2002), y una toxina (AexT) secretada por este sistema (Braun y cols., 2002). Este mecanismo de secreción está especializado en hacer llegar directamente

al citoplasma de las células huésped toxinas que la destruyen, al mismo tiempo que inhiben la actividad de las células fagocíticas e inducen su apoptosis (Hueck, 1998; Muller y cols., 2001; Ramamurthy y Schneewind, 2002).

En el presente trabajo se describen dos nuevos genes, obtenidos a partir de una cepa clínica de *A. veronii*, que codifican para proteínas homólogas del TTSS de *Yersinia* spp. entre otros microorganismos, y que han sido designados cómo *asc*F y *asc*G (estudio 4.5.1). Así mismo también se han identificado otros dos nuevos genes, *asc*J y *asc*L, que codifican para proteínas homólogas a las YscJ e YscL de *Yersinia enterocolitica*, aunque no se dispone todavía de su secuencia completa, y por tanto su caracterización queda pendiente para futuros trabajos. Las proteínas AscF y AscG, codificadas por los genes ya caracterizados, presentan un punto isoeléctrico y peso molecular similar al de sus homólogas en *Yersinia enterocolitica*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Protorhabdus luminescens*, lo cual sugiere que la función de éstas proteínas en *Aeromonas* será parecida a la descrita en estas bacterias. Se ha sugerido que en *Yersina pestis* estas proteínas (YscF e YscG) están involucradas en la regulación de la expresión y secreción de proteínas de respuesta a la baja concentración de calcio (Plano y Straley, 1995). También se ha sugerido que la proteína YscG es una chaperona *Syc-like* que se une directamente la componente citoplasmático YscE del TTSS (Day y cols., 2000).

La detección de factores de virulencia por PCR en *Aeromonas* es un método válido para determinar el potencial virulento de las cepas del género (Soler y cols., 2002; Casto-Escarpulli y cols., 2002; Chacón y cols., 2003). Sin embargo, la presencia de TTSS es una característica de virulencia que se correlaciona bien con la patogenicidad de las cepas, por lo que se ha sugerido que su presencia puede ser utilizada como un indicador general de virulencia (Winstanley y Hart, 2000; Stuber y cols., 2003). Es en este sentido que hemos evaluado (estudio 4.5.1) la presencia de tres genes que codifican para el TTSS (*asc*F-G y *asc*V) y uno que codifica para una toxina secretada por el mismo (*aex*T), en un grupo representativo de cepas de origen clínico de las especies *A. hydrophila*, *A. caviae* y *A. veronii*. En este estudio se demostró que los genes investigados de éste sistema de secreción, se encuentran en la mayoría de cepas de *A. veronii* y *A. hydrophila*, siendo predominantes (100% y 86% respectivamente) en cepas de origen extraintestinal. En *A. caviae*, sin embargo, dichos genes no se detectaron en las cepas de origen intestinal, mientras que si se detectaron, aunque en baja proporción (14%), en las cepas extraintestinales. La baja

presencia del TTSS en cepas de *A. caviae* estaría en concordancia con la menor presencia de factores de virulencia descrita en cepas de ésta especie en numerosos estudios (Granum y cols., 1998; Kingombe y cols., 1999; Heuzenroeder y cols., 1999; Wang y cols., 2003). En la presente tesis también se ha evaluado la presencia de éstos genes en dos cepas de origen extraintestinal de *A. jandaei*, habiéndose encontrado que una de ellas también posee dichos genes, demostrándose por lo tanto que el TTSS es un mecanismo común en cepas con capacidad patógena de diversas especies del género.

Uno de los objetivos a alcanzar mediante el estudio del TTSS en *Aeromonas*, es la identificación de toxinas que sean secretadas por este sistema. Hasta la fecha sólo se conoce la toxina AexT, la cual fue aislada de *A. salmonicida* subsp. salmonicida y demostró poseer una elevada similitud con las toxinas ExoS y ExoT (secretadas vía TTSS en *Pseudomonas aeruginosa*) y fue capaz de producir toxicidad en cultivos de células de gónadas de pez RTG-2 (Braun y cols., 2002). En nuestro estudio se ha demostrado la presencia del gen que codifica para la toxina AexT en cepas de *Aeromonas* de origen clínico, siendo importante destacar que a excepción de dos cepas intestinales de *A. hydrophila* y una de *A. veronii*, todas las cepas que presentaron los genes *asc*F-G y *asc*V, también presentaron el gen que codifica para la toxina AexT.

A pesar de que hasta la fecha sólo se han podido secuenciar dos nuevos genes completos del TTSS de *Aeromonas*, es importante destacar que en la actualidad disponemos de un clon que contiene un fragmento de un tamaño aproximado de 10 Kb que contiene por lo menos los genes *asc*V, *asc*F, *asc*G, *asc*J y *asc*L. El gen *asc*V se encuentra en uno de los extremos del tándem de genes que codifican para el TTSS en otras bacterias, mientras que los genes *asc*F y *asc*G se encuentran en la parte central, y los genes *asc*J y *asc*L se encuentran en el extremo opuesto (Hueck, 1998). El TTSS en otras bacterias está formado por unos 20 genes de un tamaño aproximado de entre 300 y 800 pb cada uno (Hueck, 1998), lo cual implica que el tamaño total aproximado del tándem que codifica para el TTSS es de unos 8-12 Kb. Es por este motivo que creemos que cuando el clon que hemos aislado sea completamente secuenciado, dispondremos de todos o prácticamente todos los genes que codifican para el TTSS en *Aeromonas*. En la actualidad dicho trabajo se está llevando a cabo en colaboración con el Dr. J. Tomás y Dra. S. Merino del Departamento Microbiología de la Facultad de Biología de la Universidad de

Barcelona. Además esta información permitirá estudiar detalladamente la función de cada uno de los genes, mediante la generación de mutantes de delección y ensayo de dosis letales en animales de experimentación, y así establecer el grado de implicación real del TTSS en la virulencia de *Aeromonas* y ayudará a descubrir nuevas toxinas secretadas por este sistema.

El hecho de que por primera vez se haya demostrado la presencia del sistema de secreción tipo III en la mayoría de cepas clínicas de *Aeromonas*, demuestra que dichas cepas poseen un potencial virulento comparable al de otros patógenos tales como *Escherichia coli*, *Yersinia* spp. y *Salmonella* spp.