IV. RESULTADOS

4.1. TAXONOMÍA

4.1.1. Identificación por métodos bioquímicos y moleculares

Objetivo concreto:

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

Artículo:

4.1.1.1. FIGUERAS M.J., SOLER L., CHACÓN M.R., GUARRO J. y MARTÍNEZ-MURCIA A.J. (2000c). Extended method for discrimination of *Aeromonas* spp by 16S rDNA-RFLP. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 50: 2069-2073.

Resumen:

El protocolo de RFLP del gen 16S rRNA propuesto en 1997 por Borrell y cols. para identificar las especies del género *Aeromonas* permitía identificar todas las especies del género a excepción de *A. bestiarum*, *A. salmonicida* y *A. popoffii*, esta última publicada también en 1997. Para ampliar éste protocolo y hacer posible la identificación de éstas tres especies, se simuló informáticamente la digestión de las secuencias del gen 16S rRNA de sus cepas tipo con diversas endonucleasas y se analizaron los patrones de restricción con el objeto de seleccionar aquellas endonucleasas capaces de producir patrones especie-específicas para estas especies. Inicialmente se seleccionaron las endonucleasas *Nar*I, *Sfa*NI, *Pst*I, *Hae*III y *Alw*NI para evaluarlas experimentalmente en 30 cepas de *A. bestiarum*, 20 cepas de *A. salmonicida* y 16 cepas de *A. popoffii*, obteniéndose para todas el patrón esperado. Las especies *A. bestiarum* y *A. salmonicida* se separaron utilizando las endonucleasas *Nar*I y *Sfa*NI o *Pst*I, mientras que para separar la especie *A. popoffii* se utilizaron las endonucleasas *Nar*I, *Hae*III y *Alw*NI, proponiéndose por lo tanto, ésta ampliación del

protocolo de Borrrell y cols. (1997) para la identificación de todas las especies del género.

Objetivo concreto:

2. *Evaluar comparativamente la eficacia de los métodos bioquímicos miniaturizados BBL Crystal y MicroScan para la identificación de las especies de Aeromonas, comparando sus resultados con los obtenidos por la técnica de los RFLP del gen 16S rRNA.*

Artículo:

4.1.1.2. SOLER L., MARCO F., VILA J., CHACÓN M.R., GUARRO J. y FIGUERAS M.J. Evaluation of two miniaturized systems, MicroScan W/A and BBL Crystal E/NF, for the identification of clinical isolates of *Aeromonas* spp. (En preparación).

Resumen:

Se han evaluado dos sistemas de identificación bacteriana (BBL Crystal E/NF y MicroScan W/A) comúnmente utilizados en clínica para la identificación de *Aeromonas* spp. Ésta evaluación se realizó con 22 cepas tipo y de referencia que incluían todas las especies del género y 52 cepas clínicas pertenecientes a las especies *A. hydrophila*, *A. bestiarum*, *A. salmonicida*, *A. caviae*, *A. media*, *A. veronii* y *A. jandaei*, todas ellas previamente identificadas con la técnica de los RFLP del gen 16S rRNA. Se demostró que el sistema MicroScan W/A sólo era capaz de identificar correctamente a nivel de especie el 19.3% de las cepas y el sistema BBL Crystal el 26.9%. Además, el BBL Crystal y el MicroScan, respectivamente, identificaron incorrectamente el 71.4% y el 85.7% de las cepas como *A. hydrophila*. También es importante destacar que el MicroScan y el BBL Crystal confundieron respectivamente el 21.6% y el 8.1% de las cepas de *Aeromonas* con otros géneros, y en especial con el género *Vibrio*. El MicroScan confundió un 10.8% de las cepas con *Vibrio fluvialis*, y el BBL Crystal el 2.7% de estas con *Vibrio cholerae*.

Objetivo concreto:

3. *Diseñar una sonda especifica para la identificación de las colonias de Aeromonas en cultivos primarios.*

Artículo:

4.1.1.3. CHACÓN M.R., CASTRO-ESCARPULLI G., SOLER L., GUARRO J. y FIGUERAS M.J. (2002). A DNA probe specific for *Aeromonas* colonies. *Diagnostic Microbiology and Infectious Diseases*, 44: 221-225.

Resumen:

Se ha diseñado una sonda de DNA específica para el género *Aeromonas* basada en un fragmento de 237 pb del gen que codifica para la glicerofosfolipido-colesterol aciltransferasa. Esta sonda, marcada con digoxigenina, se ensayó inicialmente en 13 cepas de *Vibrio* spp. y en tres cepas de *Aeromonas* mediante la técnica del *colony blot* a distintas temperaturas (56ºC, 58ºC, 60ºC, 62ºC y 65ºC). Con este experimento se pretendía establecer la temperatura óptima de hibridación, ya que hasta los 58ºC se obtenía señal positiva para la mayoría de cepas de *Vibrio*, aunque dos cepas produjeron señal hasta los 60ºC y una hasta los 62ºC. La temperatura de 65ºC fue por lo tanto la elegida como más específica. Estas condiciones se ensayaron frente a 16 cepas tipo y de referencia de *Aeromonas* sp. y 20 cepas tipo y de referencia de los géneros *Vibrio*, *Escherichia*, *Pseudomonas*, *Salmonella*, *Shigella*, *Plesiomonas* y *Yersinia*, y se comprobó que la sonda sólo hibridaba con las especies del género *Aeromonas* pero no con cepas de otras bacterias enteropatógenas. Estos resultados eran coincidentes en cualquiera de los medios de cultivo ensayados (MacConkey, SS, agar sangre y Hecktoen).

4.1.2. Estudio de especies taxonómicamente complejas

Objetivos concretos:

4. *Intentar esclarecer la taxonomía de las especies del complejo fenotípico "A. hydrophila" y en especial de A. bestiarum, A. salmonicida y A. popoffii mediante métodos fenotípicos y moleculares.*

Artículo:

4.1.2.1. SOLER L., YÁNEZ M.A., CHACÓN M.R., GUARRO J., MARTÍNEZ-MURCIA A. J. y FIGUERAS M. J. (2003). A molecular and phenotypic approach to the taxonomy of the "Aeromonas hydrophila" complex. *Journal of Applied Microbiology* (Sometido).

Resumen:

El complejo fenotípico "A. hydrophila" incluye a las especies *A. hydrophila* (HG1), *A. bestiarum* (HG2), *A. salmonicida* (HG3) y *A. popoffii*. La especie *A. bestiarum* se describió en 1996 (Ali y cols., 1996) a pesar del elevado porcentaje de hibridación DNA-DNA que esta presenta respecto a las especies *A. hydrophila* y *A. salmonicida* (78% y 71% a 60ºC, 65% y 62% a 75ºC respectivamente). Además *A. bestiarum* presenta una secuencia del gen 16S idéntica a la de las secuencias de *A. salmonicida* subsp. masoucida y *A. salmonicida* subsp. achromogenes (Martinez-Murcia y cols., 1992a).

En el presente estudio se analizaron 116 cepas pertenecientes a las cuatro especies que integran el complejo fenotípico "A. hydrophila". El resultado de la identificación de las cepas mediante los patrones de RFLP del gen 16S rRNA puso de manifiesto que sólo un 40% de las cepas analizadas de las especies *A. bestiarum* y *A.*

salmonicida presentaban el patrón típico esperado (2 bandas de 1005 pb y 497 pb para *A. bestiarum* y 1 banda de 1502 pb para *A. salmonicida*), mientras que el 60% restante presentaban un patón que incluía las bandas esperadas de las dos especies simultáneamente (1502 pb, 1005 pb y 497 pb). La secuenciación de un fragmento de 560 pb que contiene las posiciones variables (1011 y 1018 pb) del gen 16S rRNA para ambas especies, ratificó estos resultados, observándose que dichas cepas compartían operones ribosómicos por lo que fueron identificadas como *A. bestiarum/A. salmonicida*.

Se investigó la relación filogenética de las cepas mediante el análisis de los patrones obtenidos con la técnica del 16S-23S ISR-RFLP. El dendograma obtenido puso de manifiesto la existencia de dos grandes grupos, el primero contenía las cepas pertenecientes a la especie *A. popoffii*, y el segundo se subdividía en dos grupos, uno con las cepas de la especie *A. hydrophila*, y otro con las cepas identificadas genéticamente cómo *A. bestiarum*, *A. bestiarum/A. salmonicida* y *A. salmonicida*.

La caracterización bioquímica de las cepas con 17 pruebas bioquímicas, indicó que la utilización del DL-lactato era capaz de diferenciar *A. popoffii* de *A. bestiarum* y *A. salmonicida*, pero no de *A. hydrophila*, y que ninguna de las pruebas bioquímicas era capaz de separar inequívocamente *A. bestiarum* de *A. salmonicida*. Tampoco la temperatura definida para estas dos últimas especies permitió separarlas, ya que la mayoría de cepas estudiadas crecían indistintamente a 21±1°C y a 30°C. La hidrólisis de la esculina también era una prueba útil para diferenciar a *A. popoffii* del resto de especies del complejo fenotípico “A. hydrophila”. Además se comprobó que la producción de pigmento marrón, el indol, la movilidad, así como ninguna de las pruebas bioquímicas recomendadas, eran características útiles para la diferenciación de las subespecies de *A. salmonicida*.

Artículo:

4.1.2.2. SOLER L., YAÑEZ A., CHACÓN M.R., AGUILERA-ARREOLA M.G., CATALAN V., FIGUERAS M.J. y MARTÍNEZ-MURCIA A.J. Phylogenetic analysis of the genus *Aeromonas* based on two housekeeping genes. (En preparación).

Resumen:

Actualmente el *Ad-hoc committee* requiere que para la definición de nuevas especies bacterianas se analicen, a parte del comportamiento bioquímico, el porcentaje de hibridación DNA-DNA, la secuenciación del gen 16S rRNA y las secuencias de cinco genes que codifiquen para funciones esenciales. Es por este motivo que se estudiaron los genes *gyr*B y *rpo*D para investigar las relaciones filogenéticas del género *Aeromonas* y en especial de *A. bestiarum* y *A. salmonicida*, ya que ninguno de los métodos utilizados permitió concluir si estas especies correspondían o no a un único taxón.

Para ello se secuenció un fragmento de ca. 820 pb del gen *rpo*D y ca. 1100 pb del gen *gyr*B (que representan respectivamente el 45.7% y el 45.8% de estos genes completos), en un total de 74 cepas, incluidas las cepas tipo, pertenecientes a todas las especies del género, y entre ellas, 7 cepas que en base a los RFLP del gen 16S rRNA habían sido identificadas como *A. bestiarum*, 8 que habían sido identificadas como *A. salmonicida* y 15 cepas que habían sido identificadas como *A. bestiarum/A. salmonicida*. El análisis filogenético, de las cepas tipo de todas las especies del género con el gen *rpo*D, concordó para la mayoría de especies con el obtenido con los genes 16S rRNA y *gyr*B. Cuando se analizaron las especies *A. bestiarum* y *A. salmonicida* se evidenció, que en base al gen *rpo*D, se formaban dos grupos bien diferenciados filogenéticamente. Un primer grupo englobaba la mayoría de cepas de *A. salmonicida*, las cepas de referencia de sus subespecies y un grupo de 15 cepas identificadas por la técnica de los RFLP del gen 16S rRNA mayoritariamente como *A. bestiarum/A. salmonicida* (n=13), una como *A. bestiarum* y otra como *A. salmonicida*. El segundo grupo incluía la cepa tipo de la especie *A. bestiarum* junto con dos de las cepas

incluidas en la descripción de esta especie y 4 cepas identificadas, dos como *A. bestiarum* y dos como *A. bestiarum/A. salmonicida*. Esta misma estructura se mantenía en el dendograma *gyr*B y en el dendograma combinado con ambos genes. Al intentar establecer si estas agrupaciones de *A. bestiarum* y *A. salmonicida* guardaban alguna relación con el comportamiento bioquímico de las cepas incluidas en cada uno de estos grupos, se comprobó que las cepas pertenecientes al grupo que incluía todas las cepas de referencia para *A. salmonicida* eran mayoritariamente negativas a la ramnosa (86.4%) y positivas para el sorbitol (63.6%), mientras que las cepas que se incluían en el grupo de *A. bestiarum* presentaban un comportamiento inverso (85.7% positivas a la ramnosa y 100% negativas al sorbitol).

4.2. SENSIBILIDAD A LOS AGENTES ANTIMICROBIANOS

Objetivo concreto:

5. *Determinar la sensibilidad a los agentes antimicrobianos de cepas de Aeromonas de origen clínico, ambiental y aisladas de peces.*

Artículo:

4.2.1. VILA J., MARCO F., SOLER L., CHACÓN M.R. y FIGUERAS M.J. (2002).In vitro antimicrobial susceptibility if clinical isoaltes of *Aeromonas caviae*, *Aeromonas hydrophila* and *Aeromonas veronii* biotype sobria. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 49: 701-702.

Resumen:

Se determinó la respuesta frente a 24 agentes antimicrobianos, utilizando el método comercial Dade-MicroScan con los paneles Combo Urine IS (Dade Behring), en 23 cepas de *Aeromonas* de origen intestinal y extraintestinal pertenecientes a las especies de mayor incidencia en clínica (*A. hydrophila*, *A. caviae* y *A. veronii*). Todas las cepas fueron resistentes a la ampicilina, observándose además que la piperacilina era más activa que la ticarcilina. Cuando se analizó la respuesta a las cefalosporinas, se observó que todas presentaban una buena actividad frente a las cepas ensayadas a excepción de la cefazolina, la cual fue más activa frente a *A. veronii* (79%) que frente a *A. caviae* (53%) y *A. hydrophila* (40%). En cuanto a los aminoglucósidos, la gentamicina y la amikacina fueron más activas que la tobramicina. Respecto a la respuesta a las quinolonas, se puso de manifiesto que todas las cepas ensayadas eran sensibles al ofloxacino y ciprofloxacino, sin embargo el 26% de las cepas de *A. caviae*, el 20% de las de *A. hydrophila* y el 88% de las de *A. veronii* eran resistentes al ácido nalidíxico y al ácido pipemídico.

Objetivo concreto:

6. *Estudiar retrospectivamente, en colaboración con la Unidad de Medicina Tropical del Hospital Clínico de Barcelona, la incidencia de las distintas especies de Aeromonas en la diarrea del viajero.*

Artículo:

4.2.2. VILA J., RUIZ J., GALLARDO F., VARGAS M., SOLER L., FIGUERAS M.J. y GASCON J. (2003). *Aeromonas* spp. and traveler's diarrhea: Clinical features and antimicrobial resistance. *Emerging Infectious Diseases*, 9: 552-555.

Resumen:

El análisis retrospectivo de los datos clínicos de 863 pacientes que presentaban diarrea del viajero (atendidos en la Unidad de Medicina Tropical del Hospital Clínico de Barcelona durante el periodo Enero de 1999 – Diciembre de 2001) indicó que poseían como síntomas comunes: presencia de diarrea acuosa y persistente, fiebre y calambres abdominales. También se evidenció que en 18 de los pacientes (2%), *Aeromonas* era el agente causante de la diarrea. Las 18 cepas correspondientes a estos pacientes, una vez identificadas genéticamente, se correspondieron a: *A. veronii* bt sobria (50%), *A. caviae* (38.8%), *A. jandaei* (5.6%) y *A. hydrophila* (5.6%). En tres de estos casos *Aeromonas* se aisló junto con otros enteropatógenos tales como *Shigella sonnei*, *Giardia lamblia* y *Salmonella typhimurium*. Además se observó que no existían diferencias entre el continente visitado (África, América o Asia) y la distribución de especies de *Aeromonas*, 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*).

Para dar respuesta al objetivo anterior (objetivo 5) se investigó la respuesta de estas cepas frente a siete agentes antimicrobianos. Se observó que todas las cepas eran resistentes a la ampicilina pero sensibles a la cefotaxima, ciprofloxacino y ácido nalidíxico. El 71% de las de *A. caviae* y el 66% de las cepas de *A. veronii* bt sobria fueron sensibles al cloramfenicol, mientras que respectivamente un 71% y un 55% de

las cepas de estas especies lo fueron a la tetraciclina. Un elevado número de cepas de estas especies fueron sensibles al trimetoprim-sulfametoxazol (100% de *A. caviae* y 77% de *A. veronii* bt sobria).

4.3.TÉCNICAS DE TIPADO MOLECULAR

Objetivo concreto:

7. *Evaluar comparativamente diversos métodos de tipado molecular (ERIC-PCR, REP-PCR y 16S-23S ISR-RFLP) para determinar cual de ellos es el más discriminativo y poder investigar la variabilidad genética intraespecífica en Aeromonas.*

Artículo:

4.3.1. SOLER L., FIGUERAS M.J., CHACÓN M.R., GUARRO J. y MARTINEZ-MURCIA A.J. (2003). Comparison of three molecular methods for typing *Aeromonas popoffii* isolates. *Antonie van Leeuwenhoek*, 83: 341-349.

Resumen:

Se evaluaron comparativamente tres técnicas de tipado molecular (16S-23S ISR-RFLP, ERIC y REP) en 26 cepas (todas las cepas de la especie descritas hasta la fecha) de la especie *A. popoffii* procedentes de cuatro orígenes geográficos (España, Bélgica, Escocia y Suiza).

Los resultados pusieron de manifiesto que tanto el REP como el 16S-23S ISR-RFLP producían patrones comunes para cepas no relacionadas, mientras que el ERIC era la técnica más discriminativa, ya que generaba patrones cepa-específicos para todas estas cepas. Cuando las tres técnicas se analizaron conjuntamente (dos a dos, o las tres a la vez), se observó que los resultados mejoraban considerablemente, ya que las cepas no relacionadas aparecían como distintas. Con la combinación del ERIC y el REP las cepas mostraban una tendencia a agruparse según su origen geográfico, resultado que se veía reforzado con la adición del 16S-23S ISR-RFLP. El análisis individual o conjunto de los resultados obtenidos demostró que los 6 aislamientos procedentes de una misma localidad de Suiza pertenecían únicamente a 1 cepa.

En este trabajo también se valoró la reproducibilidad de cada una de las técnicas. La mayor reproducibilidad (valor *r*) obtenida fue de 0.92-0.96 para el ERIC y 0.90-0.95 para el REP cuando la extracción del DNA y la PCR eran realizadas en el mismo experimento y la electroforesis en el mismo gel.

4.4. DISTRIBUCIÓN DE FACTORES DE VIRULENCIA

Objetivo concreto:

8. *Determinar la distribución de genes que codifican para factores de virulencia tales como aerolisina/hemolisina, lipasas, serina proteasa, DNasas, flagelo lateral y enterotoxinas citotónicas en cepas de Aeromonas de origen clínico y ambiental.*

Artículo:

4.4.1. CHACÓN M.R., FIGUERAS M.J., CASTRO-ESCARPULLI G., SOLER L. y GUARRO J. (2003). Distribution of virulence genes in clinical and environmental isolates of *Aeromonas* spp. *Antonie van Leeuwenhoek* (En prensa).

Resumen:

Se investigó la distribución por PCR de los genes que codifican para la aerolisina/hemolisina, lipasas, serina proteasa y DNasas y la actividad fenotípica asociada a cada gen en un total de 234 cepas de origen clínico y ambiental, que representan a todas las especies del género. Los genes que codifican para la aerolisina/hemolisina fueron detectados en el 72.6% de las cepas estudiadas, y se encontraron significativamente más presentes en las cepas de origen clínico que en las de origen ambiental ($p \leq 0.056$). La actividad fenotípica asociada a la aerolisina/hemolisina se determinó evaluando la β-hemólisis en agar sangre humana y sangre de carnero. Las cepas clínicas fueron significativamente más β-hemolíticas en sangre de carnero que en sangre humana ($p \leq 0.004$). Los genes que codifican para la GCAT y la serina proteasa se detectaron, respectivamente, en el 98% y 75% de las cepas ensayadas, así mismo las cepas de origen ambiental presentaron una mayor actividad serina proteasa (prueba de la azocaseina) que las cepas clínicas ($p<0.044$). Es importante destacar que todas las cepas β-hemolíticas presentaron conjuntamente los genes que codifican para la aerolisina/hemolisina y serina proteasa. El 95% de las cepas presentaron los genes que codifican para las lipasas y actividad lipolítica. Finalmente, los genes que codifican para las DNasas se encontraron significativamente más presentes ($p<0.001$) en cepas de *Aeromonas* de origen clínico

(88%) que ambiental (95%), aunque esta diferencia no se observó al ensayar la actividad DNasa.

Artículo:

4.4.2. SOLER L., FIGUERAS M.J., CHACÓN M.R., VILA J., MARCO F., MARTÍNEZ-MURCIA A.J. y GUARRO J. (2002). Potential virulence and antimicrobial susceptibility of *Aeromonas popoffii* recovered from freshwater and seawater. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, 32: 243-247.

Resumen:

A. popoffii es una de las especies de más reciente descripción de la cual apenas existen datos. Por este motivo se investigó la incidencia y distribución de *A. popoffii* en muestras de agua de distintos origenes. También se estudió la resistencia a los diferentes agentes antimicrobianos y su potencial virulento en las 11 cepas aisladas en nuestro laboratorio y las15 aisladas por otros autores.

La especie *A. popoffii* representó un 8% de las cepas aisladas en aguas dulces y un 6.8% de las de agua de mar, siendo la primera vez que dicha especie se aisló en este último hábitat.

Los ensayos de sensibilidad, de los 26 aislados de *A. popoffii* a los 26 agentes antimicrobianos ensayados, indicó que los más efectivos para esta especie son las cefalosporinas de tercera generación y las quinolonas.

El potencial virulento de *A. popoffii*, se determinó investigando los mismos genes y actividades fenotípicas que en el estudio anterior (4.4.1). Los resultados indicaron que todas las cepas poseían los genes que codifican para las DNasas, GCAT y lipasas, y además todas las cepas presentaron actividad DNasa y lipasa. Los genes que codifican para la aerolisina/hemolisina se encontraron presentes el 92% de las cepas de *A. popoffii*. La actividad β-hemolítica varió entre el 15 y el 73% dependiendo del tipo de sangre (humana o carnero) y la temperatura de incubación utilizada, por ejemplo, ninguna de las cepas de *A. popoffii* mostró actividad β-hemolítica cuando ésta fue ensayada a 37°C en agar sangre de cordero, pero el 73% de las cepas presentaron actividad β-hemolítica cuando se utilizó agar sangre humana a 20°C. El 96% de las cepas presentaron el gen que codifica para la serina proteasa, y el 69% presentaron actividad serina proteasa.

Los seis aislamientos de esta especie que tras el análisis del ERIC demostraron ser derivados del mismo clon (estudio 4.3.1) presentaron el mismo patrón de sensibilidad, siendo así mismo coincidentes los genes de virulencia detectados en estos aislamientos.

Artículo:

4.4.3. SOLER L., CHACÓN M.R., AGUILERA-ARREOLA G., JANDA J.M., ESTEVE C., GUARRO J. y FIGUERAS M.J. Presence of virulence markers on clinical and environmental isolates of *Aeromonas jandaei*. (En preparación).

Resumen:

En este trabajo se investigó la distribución de los genes que codifican para la enterotoxina termolábil (*alt*), enterotoxina termoestable (*ast*), aerolisina/hemolisina y flagelo lateral (*laf*A) en 32 cepas de *A. jandaei* mediante las técnicas de PCR y *dot blot*. Se seleccionó esta especie porque representó el 2.6% de las cepas de *Aeromonas* spp. aisladas a partir de heces y el 5.6% de las aisladas a partir de muestras extraintestinales, y ha sido poco estudiada hasta la fecha. Se ha estudiado también la proximidad genética de estas cepas mediante la técnica del ERIC, ya que éstas procedían de distintos orígenes (clínico, ambiental y animal), y zonas geográficas (14 de ellas habían sido aisladas en nuestro laboratorio y 18 habían sido recibidas de colecciones personales e internacionales de distintos países). El dendograma obtenido de éste estudio mostró que las cepas tendían a agruparse por su origen geográfico, y se observó que 6 de las cepas recibidas de los diferentes autores se agrupaban como iguales.

Los genes mencionados fueron estudiados mediante las técnicas de PCR y *dot blot*, a excepción del gen *alt* que tras comprobarse que presentaba una elevada homología a nivel de nucleótidos con otros genes que codifican para lipasas en *Aeromonas* (ej.: 94% de similitud con el gen *pla*; 90% con el *lip*H3; 85% con el *plc*; 84% con el *lip*) sólo fue estudiado por PCR. Ninguna de las cepas estudiadas presentó simultáneamente los cuatro genes estudiados, y únicamente una cepa presentó simultáneamente los genes *alt* y *ast*, y una cepa presentó los genes aerolisina/hemolisina y *alt*. Así mismo un 34.7% de las cepas, independientemente de su origen, presentaron simultáneamente los genes *laf*A y aerolisina/hemolisina. El gen *alt* sólo fue detectado en el 11.5% de las cepas estudiadas. Cuando se estudió la presencia del gen *laf*A, 12 cepas fueron negativas para la presencia de éste gen cuando se utilizó la técnica de la PCR, pero positivas por *dot blot*, siendo por lo tanto consideradas positivas, con lo cual el gen *laf*A estuvo presente en el 61.5% de las

cepas estudiadas. Los resultados obtenidos por PCR y *dot blot* para los genes que codifican para la aerolisina/hemolisina y el gen *ast* fueron idénticos, y correspondieron respectivamente al 42.3% y 3.8% de las cepas. Sólo el 40% de las cepas de origen ambiental presentaron alguno de los genes estudiados, frente a un 72.2% de las cepas clínicas.

Objetivo concreto:

9. *Establecer la incidencia de las diferentes especies de Aeromonas en muestras de pescado destinado al consumo humano y determinar las características fenotípicas y virulentas de las cepas aisladas.*

Artículo:

4.4.4. CASTRO-ESCARPULLI G., FIGUERAS M.J., AGUILERA-ARREOLA G., SOLER L., FERNÁNDEZ-RENDÓN E., APARICIO G.O., GUARRO J. y CHACÓN M.R. (2003). Characterisation of *Aeromonas* spp. isolated from frozen fish intended for human consumption in Mexico. *International Journal of Food Microbiology*, 84: 41-49.

Resumen:

En este estudio se aislaron 82 cepas, identificadas bioquímicamente como pertenecientes al género *Aeromonas*, procedentes de 250 muestras de pescado congelado (Tilapia, *Oreochromis niloticus niloticus*) adquiridas en mercados locales de México D.F. Todas estas cepas fueron identificadas bioquímica y genéticamente con la técnica del 16S rDNA-RFLP. La distribución de especies en base a la identificación bioquímica fue: 35.4% *A. salmonicida*, 20.7% *A. hydrophila*, 17.1% *A. caviae*, 13.4% *A. veronii* bt sobria y 13.4% *A. eucrenophila*. La identificación genética evidenció que 5 de las cepas identificadas como *Aeromonas* en base a los métodos bioquímicos no pertenecían a este género. La distribución de especies en base a las 77 cepas de *Aeromonas* identificadas genéticamente fue: 67.5% a *A. salmonicida*, 20.9% a *A. bestiarum*, 5.2% a *A. veronii*, 3.9% a *A. encheleia* y 2.6% a *A. hydrophila*. Únicamente 22 cepas (28.6%) se identificaron correctamente con los métodos bioquímicos.

Para dar respuesta al objetivo 5 se realizaron estudios de sensibilidad a 23 agentes antimicrobianos observando que todas las cepas eran resistentes a la ampicilina, carbenicilina, cefalotina, clindamicina y penicilina. Así mismo el 85.7% de las cepas eran resistentes a la polimixina B, el 75.3% a la estreptomicina, el 58.4% a la gentamicina, el 57.1% a la rifampicina y el 54.5% a la eritromicina. Además todas las

cepas fueron sensibles al ácido nalidíxico, cefotaxima, cefuroxima y nitrofurantoina, siendo por tanto las quinolonas y las cefalosporinas de segunda y tercera generación las que presentan una mejor actividad frente a estas cepas.

Para dar respuesta al objetivo 8, también se investigó por PCR la presencia de los genes de virulencia descritos anteriormente (aerolisina/hemolisina, GCAT, lipasas, serina proteasa y DNasas), observándose que todas las cepas presentaban el gen que codifica para la GCAT. Los genes que codifican para la aerolisina/hemolisina, lipasas, serina proteasa y DNasa estaban presentes en el 96%, 97%, 96% y 90% de las cepas respectivamente. En cuanto a la actividad fenotípica asociada a estos genes, se observó que todas las cepas presentaban la misma actividad lipasa con los tres métodos ensayados (1% L-α-lecitina, 0.5% tributirina y agar resarsurina-mantequilla). Sí se observaron diferencias en la actividad proteasa cuando esta se ensayó con el método de la caseina (61%), el de la gelatina (96%) o la azocaseina (96%), teniendo en cuenta que aunque los porcentajes globales para la azocaseina y la gelatina son idénticos, las cepas con respuesta positiva para un carácter no son las mismas que para el otro. Todas las cepas demostraron tener la capacidad de captar el rojo congo y presentaban adherencia agregativa en células HEp-2.

Artículo:

4.4.5. KOZIŃSKA A., FIGUERAS M.J., CHACON M.R. y SOLER L. (2002). Phenotypic characteristics and pathogenicity of *Aeromonas* genomospecies isolated from common carp (*Cyprinus carpio* L.). *Journal of Applied Microbiology*, 93: 1-8.

Resumen:

En este trabajo se investigaron 34 cepas de *Aeromonas* aisladas de carpas (*Cyprinus carpio* L.) sanas o enfermas, 2 cepas aisladas de los tanques de agua de la piscifactoría, y una cepa inicialmente identificada como *Chromobacterium violaceum*, todas ellas aisladas en Polonia durante un periodo de 10 años. La distribución de especies en base a la identificación bioquímica fue: 51.4% *A. sobria*, 37.8% *A. hydrophila*, 8.1% *Aeromonas spp.* y 2.7% *C. violaceum*. La identificación genética evidenció que la cepa identificada como *C. violaceum* en base a los métodos bioquímicos era en realidad *A. veronii*. La distribución de especies en base a las 37 cepas de *Aeromonas* identificadas genéticamente fue: 35.2% *A. salmonicida*, 29.7% *A. veronii*, 16.2% *A. sobria*, 13.5% *A. bestiarum* y 5.4% *A. encheleia*.

El ensayo *in vivo* del potencial virulento en carpas sanas se realizó con las 37 cepas aisladas y puso de manifiesto una respuesta distinta dependiendo de la especie. El mayor número de cepas virulentas pertenecieron a las especies *A. bestiarum* (4 de 5, 80%) y *A. salmonicida* (10 de 13, 76.9%). Los síntomas que provocaban en las carpas fueron septicemias, hemorragias, necrosis y úlceras. De las 11 cepas de *A. veronii* ensayadas, 1 resultó ser extremadamente virulenta, provocando lesiones internas y externas, acumulación de líquido ascítico en la cavidad peritoneal, hemorragias en el hígado y riñón con un 100% de mortalidad, 6 cepas produjeron la misma sintomatología que *A. bestiarum*, pero con acumulaciones de líquido ascítico en los tejidos subcutáneos y 4 no fueron virulentas. Sólo 1 de las 6 cepas de *A. sobria* ensayadas provocó lesiones cutáneas localizadas en un 30% de los peces, y el resto no fueron virulentas. Ninguna de las 2 cepas de *A. encheleia* ensayadas resultó virulenta.

4.5. MECANISMOS DE PATOGENICIDAD

Objetivos concretos:

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

Artículos:

4.3.2.1. CHACÓN M.R., SOLER L., GROISMAN E.A., GUARROJ. y FIGUERAS M.J. First evidence of the existence of Type III secretion system in clinical strains of *Aeromonas* (En preparación).

Resumen:

Para demostrar la existencia del TTSS en cepas clínicas de *Aeromonas* se procedió en primer lugar al análisis de las secuencias de nucleótidos de los genes *sct*V, *sct*R, *sct*T y *sct*J-L del TTSS (genes conservados en otros géneros bacterianos), para diseñar cebadores con diana en las regiones conservadas de dichos genes. Se seleccionaron estos genes por encontrarse ubicados en las regiones extremas y en la región central del tándem de genes que codifican para el TTSS en otras bacterias. En la Tabla 4.1 se detallan las características y los cebadores diseñados para estos genes.

Dichos cebadores se utilizaron, para un cribado preliminar, en un grupo de 12 cepas clínicas de origen extraintestinal pertenecientes a las especies *A. hydrophila*, *A. bestiarum*, *A. salmonicida* y *A. veronii*. De los cuatro genes investigados, sólo se consiguió amplificar los genes *sct*V y *sct*J-L, en 7 cepas de las especies *A. veronii*, *A. caviae*, *A. bestiarum* y *A. salmonicida*. La identidad de estos genes fue corroborada tras la secuenciación de los fragmentos amplificados.

Tabla 4.1. Características de los genes conservados del TTSS estudiados y cebadores diseñados para su amplificación

Genes*	Tipo de proteína	Secuencias alineadas	% de homología	Cebadores diseñados Secuencia (5' → 3')	Tamaño esperado del amplificado
*sct*V	Proteína de membrana interna	*Yersinia enterocolitica* AF074612 *Pseudomonas aeruginosa* AE004597	68	SctV-F: ATGGACGGCGCCATGAAGTT SctV-R: TATTCGCCTTCACCCATCCC	710 pb
*sct*R	Proteína de membrana interna	*Shigella flexneri* AF386526 *Y. enterocolitica* AF336309 *Salmonella typhimurium* AE008761	46-54	SctR-F: TACGAAATGCACTTGGTTT SctR-R: TCACTTAGCGCATATGCAGGCA	327 pb
*sct*T	Proteína de membrana interna	*S. flexneri* AF386526 *S. typhimurium* (SPI-1) X73525	50	SctT-F: GGGGCAACGCTTAGTAGT SctT-R: GCATTCATCTGCGGAGCAAA	314 pb
*sct*J-L	Lipoproteína, debe unir las membranas interna y externa Proteína citoplasmática	*Y. enterocolitica* M74011 *P. aeruginosa* U56077	55	SctJ-F: ATGGGCGATGTGTCA CTGTCA SctL-R: TCAGGCGTCATCCTCCTCGC	1773 pb

*según la nomenclatura consensus designada por Hueck (1998).

Para localizar el fragmento del genoma de *Aeromonas* que contiene todos los genes del TTSS se construyó una genoteca en cósmidos a partir del DNA de la cepa de *A. veronii* 283c, aislada de un hemocultivo y que había resultado positiva para los genes anteriores en el cribado preliminar. El cribado de esta genoteca (utilizando como sonda el fragmento obtenido del gen *sct*V) permitió obtener un clon que contenía dicho gen. Este clon fue hibridado por *dot blot* con la sonda correspondiente al fragmento de los genes *sct*J-L, los cuales se encuentran en la región opuesta del tándem, obteniéndose una hibridación positiva. Para poder secuenciar dicho clon, se subclonó un fragmento de aproximadamente 10 Kb en el plásmido pBR322. La parcial caracterización por secuenciación de éste subclon permitió identificar 4 genes no conocidos hasta la fecha en *Aeromonas*. Tras comparar las secuencias de nucleótidos de éstos genes con todas las secuencias de proteínas depositadas en la base de datos GenBank (blastx), se comprobó que éstos genes codificaban para proteínas homólogas a las YscF, YscG, YscL e YscJ de *Yersinia enterocolitica*. Con el fin de mantener la nomenclatura utilizada para designar los genes que codifican para el TTSS de *A. salmonicida*, designamos a dichos genes como: *asc*F, *asc*G, *asc*J y *asc*L

(la primera letra hace referencia al género *Aeromonas* y *sc* a secreción). Es importante destacar que los genes *asc*J y *asc*L se corresponden a los previamente amplificados por PCR (*sct*J-L). Dado que los genes *asc*F y *asc*G se encuentran codificados en tándem en el genoma de *Aeromonas* y que su secuencia ha sido ya completada, esta ha sido depositada a la base de datos GenBank bajo el número de accesión AY289195. La secuencia de los genes *asc*J y *asc*L no ha sido depositada en las bases de datos, dado que todavía no ha sido completada.

La presencia de los genes *asc*F-G y *asc*V, genes que codifican para el TTSS, y el gen *aex*T, que codifica para una toxina secretada por dicho sistema en *A. salmonicida*, fue investigada mediante la técnica del *dot blot* en 84 cepas clínicas intestinales y extraintestinales de las especies *A. hydrophila*, *A. caviae* y *A. veronii*, y en dos cepas extraintestinales de *A. jandaei*. Dichos genes fueron detectados en todas las especies, aunque con distinta incidencia. Todas las cepas de origen extraintestinal de *A. veronii* presentaron los genes estudiados, frente a un 86% de las de *A. hydrophila*. En *A. caviae*, ninguna cepa de origen intestinal, y sólo el 14% de las cepas de origen extraintestinal presentaban los genes estudiados. Los genes que codifican para el TTSS se detectaron con menor frecuencia en las cepas de origen intestinal, ya que el 77% de las cepas de *A. hydrophila* intestinales presentaron los genes *asc*F-G y *asc*V, mientras que sólo el 66% presentaron el gen *aex*T. En el caso de *A. veronii*, el 69% de las cepas intestinales presentaron los genes *asc*F-G y *asc*V, el 63% presentó el gen *aex*T. Una de las cepas de *A. jandaei* (aislada de bilis), presentó todos los genes estudiados, mientras que la otra cepa (aislada de un hemocultivo), no presentó ninguno de estos genes.