





**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MÉXICO**

**MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS  
AGROPECUARIAS Y RECURSOS NATURALES**

**“ACTIVIDAD HEMOAGLUTINANTE DE DIFERENTES ESPECIES  
DEL GÉNERO *AEROMONAS*”**

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRA EN CIENCIAS  
AGROPECUARIAS Y RECURSOS NATURALES**

**PRESENTA:**

**MARICRUZ GONZÁLEZ GÓMEZ**

El Cerrillo Piedras Blancas, Toluca, Estado de México, Noviembre 2020.



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MÉXICO**

**MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS  
AGROPECUARIAS Y RECURSOS NATURALES**

**“ACTIVIDAD HEMOAGLUTINANTE DE DIFERENTES ESPECIES  
DEL GÉNERO *AEROMONAS*”**

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRA EN CIENCIAS  
AGROPECUARIAS Y RECURSOS NATURALES**

**PRESENTA:**

**MARICRUZ GONZÁLEZ GÓMEZ**

**COMITÉ DE TUTORES**

**Dr. Edgardo Soriano Vargas**

**Dra. Celene Salgado Miranda**

**Dr. Vicente Vega Sánchez**

El Cerrillo Piedras Blancas, Toluca, Estado de México. Noviembre 2020



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MÉXICO**

**MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS  
AGROPECUARIAS Y RECURSOS NATURALES**

**“ACTIVIDAD HEMOAGLUTINANTE DE DIFERENTES ESPECIES  
DEL GÉNERO *AEROMONAS*”**

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRA EN CIENCIAS  
AGROPECUARIAS Y RECURSOS NATURALES**

**PRESENTA:**

**MARICRUZ GONZÁLEZ GÓMEZ**

**COMITÉ DE TUTORES**

**Director de Tesis: Dr. Edgardo Soriano Vargas**

**Co-Directores: Dra. Celene Salgado Miranda**

**Dr. Vicente Vega Sánchez**

El Cerrillo Piedras Blancas, Toluca, Estado de México. Noviembre 2020.

## DEDICATORIA

Remar mar adentro sin dudar, ni la tormenta, ni el rugir del mar te harán caer y desertar... ¡NO DUDES MAS!

Yo soy la calma a la tempestad, juntos por siempre en este viaje hasta el final.  
REMA, REMA, REMA MAR ADENTRO.

Eres una mujer que simplemente me llena de orgullo, te amo y no habrá manera de regresar tanto que has hecho y dejado de hacer por mí, incluso desde antes de nacer. Este logro es uno más que sin lugar a duda ha sido gracias a ti, con tu ejemplo has forjado en mí a esa persona que lucha y que no se queda con ganas de hacer lo que quiere. Es inexplicable lo que siento cuando escucho como hablas de mí y le cuentas a los demás de tu hija. A pesar de todo lo difícil que hemos pasado siempre me tranquiliza escucharte decir que todo estará bien y que saldremos adelante, solo tu y yo sabemos todo lo que nos ha costado llegar hasta aquí mamá y agradezco a la vida, a Dios y al Universo por tenerte y porque seas tú en mi vida. TE AMO MOM.

A mi familia, por su apoyo y cariño, por todo lo que son y significan en mi vida.

Sigue tus sueños, ellos saben el camino.

## RESUMEN

El género *Aeromonas* pertenece a la familia Aeromonadaceae y comprende un grupo de bacterias Gramnegativas ampliamente distribuidas de manera natural en ambientes acuáticos. Sin embargo, también se han aislado de diferentes hábitats y productos alimenticios. Hasta el momento, el género *Aeromonas* incluye 36 especies. A partir de la producción de antígeno inactivado empleado en la técnica de hemoaglutinación, se determinó la actividad hemoaglutinante mediante el método de microdilución en placa de 28 aislamientos que comprendieron 9 especies de *Aeromonas* previamente identificadas (obteniendo antígeno a partir de caldo y de placa). Con los datos obtenidos después de haber realizado una curva patrón (18 h) para las especies incluidas (*A. caviae*, *A. bestiarum*, *A. hydrophila*, *A. media*, *A. lusitana*, *A. salmonicida*, *A. veronii*, *A. sobria* y *A. poppoffii*), se identificaron las fases de crecimiento de los cultivos bacterianos (fase de latencia, exponencial y estacionaria). Otros autores destacan el estado de activación de los diferentes factores de virulencia en diferentes fases del crecimiento bacteriano, la expresión de algunos disminuye significativamente de la fase de crecimiento exponencial a la estacionaria, mientras que la expresión de algunas enzimas (proteasas, lipasas, quitinasas, entre otros) aumenta. Los resultados obtenidos en este estudio nos llevan a concluir que la actividad hemoaglutinante y la especie de *Aeromonas* son variables independientes, indicando que la actividad hemoaglutinante en bacterias del género *Aeromonas* no es dependiente de la especie.

## ABSTRACT

The genus *Aeromonas* belongs to the Aeromonadaceae family and comprises a group of Gram-negative bacteria distributed naturally in aquatic environments. However, they have also been isolated from different habitats and food products. Currently, the genus *Aeromonas* includes 36 species. From the production of inactivated antigen used in the hemagglutination technique, the hemagglutination activity was determined by the microdilution plate method of 28 isolates that comprised 9 previously identified *Aeromonas* species (obtaining antigen from broth and plate). With the data obtained after making a standard curve (18 h) for the species (*A. caviae*, *A. bestiarum*, *A. hydrophila*, *A. media*, *A. lusitana*, *A. salmonicida*, *A. veronii*, *A. sobria* and *A. poppoffii*), the growth phases of the bacterial cultures (latency, exponential and stationary phase) were identified. Other authors highlight the state of activation of the different virulence factors in different phases of bacterial growth, the expression of some decreases significantly from the exponential to the stationary growth phase, while the expression of some enzymes (proteases, lipases, chitinases, among others) increases. The results of this study lead us to conclude that the hemagglutinating activity and the *Aeromonas* species are independent variables, indicating that the hemagglutinating activity in bacteria of the genus *Aeromonas* is not species dependent.

## **AGRADECIMIENTO**

Doy gracias por las noches que se hicieron mañanas, los amigos que se hicieron familia y por el sueño que se hace realidad...GRACIAS.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), por la beca otorgada.

A la Universidad Autónoma del Estado de México, la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia y al Centro de Investigación y Estudios Avanzados en Salud Animal, por permitirme usar sus instalaciones durante todo este proceso.

Al laboratorio de Genética y Genómica Investigación del AAMVZ-ICAp-UAEH y a las personas que forman parte de este, por darme la oportunidad de realizar actividades referentes a mi trabajo de investigación.

Agradezco al Doctor Edgardo Soriano Vargas por su valioso conocimiento y su compromiso con la investigación. De igual manera gracias al Doctor Vicente Vega y la Doctora Celene Salgado, por su tiempo dedicado y gracias a todos por darme la oportunidad de seguir formando parte de su equipo de trabajo, cada uno ha sido fundamental en mi formación. Reconozco sus enseñanzas y consejos.

También quiero mostrar mi agradecimiento a mis compañeros y amigos pues hacían amenas esas horas de trabajo y dedicación.

Gracias familia, amor de mi vida por esa compañía incondicional.

Insistir, persistir y nunca desistir.



# ÍNDICE

DEDICATORIA.....	I
RESUMEN.....	II
ABSTRACT.....	III
AGRADECIMIENTO.....	IV
ÍNDICE.....	V
CUADROS.....	VII
INTRODUCCIÓN.....	1
REVISIÓN DE LITERATURA.....	3
<b>Género <i>Aeromonas</i>: pasado y presente</b> .....	3
<b>Ecología y Epidemiología</b> .....	7
<b><i>Aeromonas</i> en ambientes acuáticos</b> .....	7
<b><i>Aeromonas</i> en alimentos</b> .....	9
<b><i>Aeromonas</i> en animales</b> .....	11
<b><i>Aeromonas</i> en humanos</b> .....	13
<b>Factores de virulencia</b> .....	17
<b>Componentes estructurales</b> .....	18
<b>Sistemas de unión de hierro</b> .....	20
<b>Productos extracelulares</b> .....	21
<b>Sistemas de secreción</b> .....	22
<b>La detección de quórum (QS)</b> .....	24
<b>Fases de crecimiento bacteriano</b> .....	25
<b>Cinética microbiana</b> .....	26
<b>Adhesión bacteriana en la patogénesis</b> .....	27
<b>Mecanismo de adherencia bacteriana</b> .....	27
<b>Adhesinas filamentosas: fimbrias / pili</b> .....	28
<b>Adhesinas no filamentosas</b> .....	29
<b>Actividad hemoaglutinante</b> .....	29
JUSTIFICACIÓN.....	34
HIPÓTESIS.....	35

<b>OBJETIVOS</b> .....	36
<b>OBJETIVO GENERAL</b> .....	36
<b>OBJETIVOS ESPECÍFICOS</b> .....	36
<b>MATERIAL Y MÉTODO</b> .....	37
<b>Diseño experimental</b> .....	37
<b>Aislamientos bacterianos</b> .....	37
<b>Medio de cultivo</b> .....	38
<b>Antígeno hemoaglutinante</b> .....	39
<b>Eritrocitos fijados con glutaraldehído</b> .....	39
<b>Solución Alsever</b> .....	40
<b>PBS con timerosal</b> .....	40
<b>Curvas de crecimiento</b> .....	40
<b>Prueba de hemoaglutinación</b> .....	41
<b>Análisis estadístico</b> .....	41
<b>RESULTADOS</b> .....	42
<b>Curvas de Crecimiento</b> .....	43
.....	48
<b>Análisis estadístico</b> .....	50
<b>DISCUSIÓN GENERAL</b> .....	52
<b>CONCLUSIONES</b> .....	56
<b>REFERENCIAS</b> .....	57
<b>ANEXOS</b> .....	80

## CUADROS

<b>Cuadro 1.</b> Especies reconocidas pertenecientes al género <i>Aeromonas</i> y fuente de aislamiento de la cepa de referencia.....	5
<b>Cuadro 2.</b> <i>Aeromonas</i> spp. en diferentes productos destinados al consumo humano.....	10
<b>Cuadro 3.</b> Especies de <i>Aeromonas</i> (identificadas por rpoD y gyrB) reportadas en algunas especies animales.....	13
<b>Cuadro 4.</b> Distribución de <i>Aeromonas</i> spp identificadas con métodos moleculares y recuperadas de diferentes sitios en asociación con infección humana.....	14
<b>Cuadro 5.</b> Especies de <i>Aeromonas</i> spp. a empleadas en el estudio.....	38
<b>Cuadro 6.</b> Cuadro de contingencia para evaluar dependencia de la actividad hemoaglutinante de especie en <i>Aeromonas</i> spp. mediante el análisis de la distribución de porcentajes.....	42
<b>Cuadro 7.</b> Actividad hemoaglutinante de aislamientos de <i>Aeromonas</i> spp.....	47
<b>Cuadro 8.</b> Relación entre actividad hemoaglutinante y especie de valores observados... 50	
<b>Cuadro 9.</b> Relación entre actividad hemoaglutinante y especie de frecuencias esperadas.....	50

## FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Relación filogenética de las 36 especies de <i>Aeromonas</i> con base en la secuencia del gen 16S rRNA (1498 pb).....	6
<b>Figura 2.</b> Curva del crecimiento bacteriano.....	25
<b>Figura 3.</b> Placa con colonias de <i>Aeromonas caviae</i> .....	43
<b>Figura 4.</b> Curva de crecimiento <i>Aeromonas veronii</i> .....	44

## INTRODUCCIÓN

El género *Aeromonas* (del griego *aer*, gas y *monas*, unidades, significa unidades productoras de gas) (Martin-Carnahan y Joseph, 2005), pertenece a la familia Aeromonadaceae. Actualmente comprende más de treinta especies bacterianas que se caracterizan por ser bacilos Gram negativos, anaerobios facultativos, oxidasa y catalasa generalmente positivos, capaces de degradar nitritos a nitratos, fermentadores de glucosa y resistentes en su mayoría al factor vibriostático O/129 (2,4-Diamino-6,7-di-isopropilpteridina fosfato) (Janda y Abbott, 2010).

El aislamiento del género *Aeromonas* de muestras de agua depende de diversos factores, algunos de ellos son: la estación del año, la concentración de materia orgánica, el oxígeno disponible, los niveles de cloro y la salinidad (McClure *et al.*, 1994). Teniendo en cuenta lo anterior se consideran autóctonas de ambientes acuáticos, sin embargo, su capacidad de adaptación ha permitido su aislamiento a partir de alimentos destinados al consumo humano, organismos acuáticos y procesos infecciosos en humanos (Borrell *et al.*, 1998; Martin-Carnahan y Joseph, 2005, Figueras *et al.*, 2005, Figueras y Beaz-Hidalgo, 2015). Tomando gran importancia en el ámbito veterinario, la salud pública, además de relacionarse con enfermedades transmitidas por alimentos.

La literatura muestra en bacterias de este género el establecimiento de posibles mecanismos de patogenicidad (multifactorial); que a través de la identificación de una gama de factores de virulencia (Beaz-Hidalgo y Figueras, 2013; Atkinson y Trust, 1980) van a permitirle adherirse, invadir y destruir a las células del hospedero, superando así su respuesta inmune.

La actividad hemoaglutinante se ha utilizado para determinar la presencia de adhesinas bacterianas en bacterias como *Aeromonas*, por lo cual se sugiere como medio útil para su detección preliminar. Se han sugerido patrones de hemaglutinación dependientes de azúcares como un medio para tipificar *Aeromonas* (Adams *et al.*, 1983), pues la tipificación serológica es difícil de aplicar al género, pues la heterogeneidad de especies de *Aeromonas* requieren muchos

sueros (Sakazaki y Shimada, 1984) provocando que una alta proporción de cepas pueden no ser tipificables (Leblanc *et al.*, 1981). A través del método de micro dilución en placa, utilizando antígeno inactivado y eritrocitos de pollo fijados, conoceremos la actividad hemoaglutinante de nueve especies del género *Aeromonas* en un intento por determinar la probable utilidad de este como un medio para diagnóstico previo, además de proporcionar información relevante de su actividad hemoaglutinante, pues este trabajo parece ser el primero en integrar nueve especies identificadas por medio de genes *rpoD* y *gyrB*, así como sus curvas de crecimiento.

## REVISIÓN DE LITERATURA

### Género *Aeromonas*: pasado y presente

Fueron Kluyver y van Niel en 1936, quienes propusieron el término *Aeromonas* agrupando a bacterias productoras de gas. El primer reporte de una especie del género *Aeromonas* se remonta a 1981 y 1984 cuando las bacterias *Bacillus hydrophillus fuscus* (ahora *Aeromonas hydrophila*) y *Bacillus de Forellenseuche* (ahora *Aeromonas salmonicida*) se vincularon a ranas y truchas enfermas, respectivamente. Sin embargo, la descripción formal del género, por Stanier, se realizó hasta 1943 (Figueras y Beaz-Hidalgo, 2014). La primera asociación de *Aeromonas salmonicida* con la forunculosis fue en 1894 por Emmerich y Weibel (Farmer *et al.*, 2006).

A mediados de los años 70 se agrupaba a la mayoría de las especies dentro de dos grupos, con base a la temperatura de crecimiento, además de características como motilidad, producción de pigmento en TSA o producción de indol: cepas mesófilas con crecimiento óptimo a 35-37 °C (bajo el nombre de *A. hydrophila*) y cepas psicrófilas con crecimiento óptimo a 22-28 °C (*A. salmonicida*). Estos grupos se reclasificaron posteriormente por estudios de re-asociación ADN-ADN (MacInnes *et al.*, 1979; Popoff y Veron, 1981).

El género *Aeromonas* se incluía en la familia Vibrionaceae desde 1965 junto a los géneros *Vibrio* y *Plesiomonas*. Sin embargo, resultados como los de Colwell *et al.*, 1986, con base en el análisis de secuencias de los genes del ARNr 5S y 16S, demostraban que el género *Aeromonas* tenía una divergencia evolutiva equidistante con la familia Vibrionaceae y Enterobacteriácea justificando así la creación de la familia Aeromonadaceae, actualmente *Aeromonas* forman parte de la clase Gammaproteobacteria, orden Aeromonadales y comparte la familia Aeromonadaceae con otros dos géneros: *Tolumonas* y *Oceanimonas* (Martin-Carnahan y Joseph, 2005).

Sin embargo, es importante mencionar que, la identificación fenotípica basada en características clásicas del género (fisiológicas, morfológicas y

bioquímicas) (Janda y Abbott, 2010; Abbott *et al.*, 2003) y los sistemas de identificación comercial (API 20E, Vitek, BBL Crystal, MicroScan W/A, etc.) poseen limitaciones (Lamy *et al.*, 2010) y no son precisos al momento de la identificación a nivel de especie debido al comportamiento variable de las cepas. Existen discrepancias basadas en la taxonomía del género que llevaron a varias reclasificaciones y cuya razón principal es la organización de *Aeromonas* en varios complejos de especies, grupos heterogéneos de cepas relacionadas, pero genéticamente distintas. El enfoque taxonómico en un complejo de especies generalmente conduce a la delimitación de nuevas especies de los grupos más homogéneos dentro del complejo. En consecuencia, se describe un número creciente de nuevas especies en el género, pero algunas de estas descripciones conducen a controversias posteriores sobre su delimitación y robustez (Talagrand-Reboul *et al.*, 2017b). Los estudios de población son un medio poderoso para investigar la heterogeneidad dentro de un complejo de especies (Vandamme y Dawyndt, 2011). El enfoque integrativo y poblacional se consideran de manera amplia para conciliar la delimitación de especies taxonómicas y la estructura poblacional en géneros bacterianos organizados en complejos de especies (Talagrand-Reboul *et al.*, 2017b).

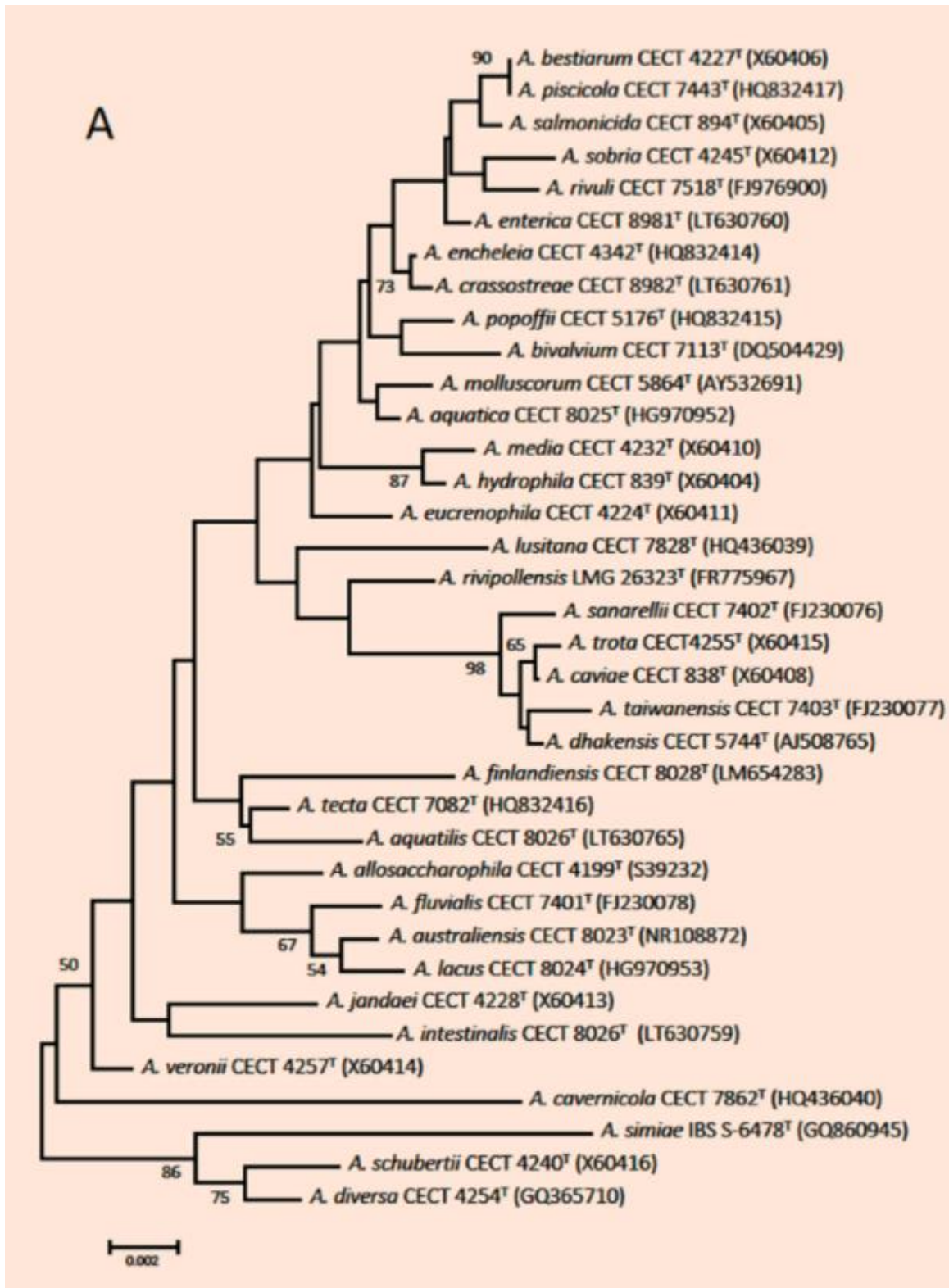
El género *Aeromonas* en la actualidad comprende 36 especies reconocidas (Cuadro 1, Figura 1) que han sido descritas desde 1943: *A. allosaccharophila* (Martínez-Murcia *et al.*, 1992), *A. aquatica*, *A. lacus* y *A. finlandiensis* (Beaz-Hidalgo *et al.*, 2015b), *A. aquatilis*, *A. crassostreae*, *A. entérica* y *A. intestinalis* (Figueras *et al.*, 2017), *A. australiensis* (Aravena-Román *et al.*, 2013), *A. bestiarum* (Ali *et al.*, 1996), *A. bivalvium* (Miñana-Galbis *et al.*, 2007), *A. cavernicola* (Martínez-Murcia *et al.*, 2013), *A. caviae* y *A. eucrenophila* (Schubert *et al.*, 1988), *A. dhakensis* (Beaz-Hidalgo *et al.*, 2013), *A. diversa* (Miñana-Galbis *et al.*, 2010), *A. encheleia* (Esteve *et al.*, 1995), *A. fluvialis* (Alperi *et al.*, 2010b), *A. hydrophila* (Stanier, 1943), *A. jandaei* (Carnahan *et al.*, 1991), *A. media* (Allen *et al.*, 1983), *A. molluscorum* (Miñana-Galbis, 2004), *A. lusitana* (Martínez-Murcia *et al.*, 2016), *A. piscicola* (Beaz-Hidalgo *et al.*, 2009), *A. popoffii* (Huys *et al.*, 1997), *A. rivopollensis* (Marti y Balcázar, 2015), *A. rivuli* (Figueras *et al.*, 2011), *A. salmonicida* (Griffin *et al.*, 1953), *A.*

*schubertii* (Hickman-Brenner *et al.*, 1988), *A. sanarellii* y *A. taiwanensis* (Alperi *et al.*, 2010c), *A. simiae* (Harf-Monteil *et al.*, 2004), *A. sobria* (Popoff y Veron, 1981), *A. tecta* (Demarta *et al.*, 2008), *A. trota* (Carnahan *et al.*, 1991) y *A. veronii* (Hickman-Brenner *et al.*, 1987). De las cuales 19 hasta ahora han estado implicadas en enfermedades humanas y se consideran patógenos oportunistas humanos (Figueras *et al.*, 2017).

<b>Especie</b>	<b>Fuente de Aislamiento</b>
<b><i>A. allosaccharophila</i></b>	Anguila (1992)
<i>A. aquatica</i>	Agua de lago (2015)
<i>A. lacus</i>	Agua de lago (2015)
<i>A. finlandiensis</i>	Agua de lago (2015)
<i>A. aquatilis</i>	Agua de lago (2017)
<i>A. crassostreae</i>	Ostra (2017)
<i>A. entérica</i>	Humano (heces diarreas) (2017)
<b><i>A. intestinalis</i></b>	Humano (heces diarreas) (2017)
<i>A. australiensis</i>	Agua (2013)
<i>A. bestiarum</i>	Pez enfermo (1996)
<i>A. bivalvium</i>	Moluscos bivalvos (2007)
<i>A. cavernicola</i>	Agua dulce (2013)
<b><i>A. caviae</i></b>	Conejillo de indias (1984)
<i>A. eucrenophila</i>	Pez de agua dulce (1998)
<b><i>A. dhakensis</i></b>	Agua de acuario (2008) / Humano (heces diarreas) (2002)
<i>A. diversa</i>	Humano (infección de la herida) (2010)
<i>A. encheleia</i>	Anguila (1995)
<i>A. fluvialis</i>	Agua de río (2010)
<b><i>A. hydrophila</i></b>	Leche (1943)
<b><i>A. jandaei</i></b>	Humano (Heces) (1991)
<b><i>A. media</i></b>	Agua (1983)
<i>A. molluscorum</i>	Moluscos bivalvos (2004)
<i>A. lusitana</i>	Agua (2012)
<i>A. piscicola</i>	Pez enfermo (salmón) (2009)
<i>A. popoffii</i>	Agua potable (1997)
<i>A. rivopollensis</i>	Sedimentos de río (2016)
<i>A. rivuli</i>	Riachuelo (2011)
<i>A. salmonicida</i>	Pez (salmon) (1953)
<i>A. schubertii</i>	Humano (1988)
<i>A. sanarellii</i>	Humano (infección de la herida) (2010)
<i>A. taiwanensis</i>	Humano (infección de la herida) (2010)
<i>A. simiae</i>	Heces de mono (2004)
<i>A. sobria</i>	Pez (1976)
<i>A. tecta</i>	Heces humanas (2008)
<b><i>A. trota</i></b>	Heces humanas (1991)
<b><i>A. veronii</i></b>	Humano (esputo) (1987)

**Cuadro 1.** Especies reconocidas pertenecientes al género *Aeromonas* y fuente de aislamiento de la cepa de referencia. Las especies en negrita representan las especies clínicas más prevalentes (Cuadro está adaptado y modificado de Hoel *et al.*, 2019).





**Figura 1.** Relación filogenética de las 36 especies de *Aeromonas* con base en la secuencia del gen 16S rRNA (1498 pb). Fuente: Fernández-Bravo y Figueras, 2020.

## **Ecología y Epidemiología**

Se considera a las *Aeromonas* como bacterias patógenas responsables de colonizar e infectar diferentes hospederos (Abu-Elala *et al.*, 2015), principalmente habitantes de ambientes acuáticos ampliamente conocidos en la acuicultura (potencialmente infecciosos) (Awan *et al.*, 2017) por causar enfermedades como la septicemia y la furunculosis (Vega-Sánchez *et al.*, 2014b). Se han aislado además de alimentos, vegetales, productos lácteos y carne, en humanos estos microorganismos son capaces de provocar problemas gastrointestinales que sin tratamiento adecuado podrían evolucionar y llegar a niveles sistémico provocando septicemia (Parker y Shaw, 2011). Algunas de las especies son consideradas patógeno emergente, capaces de afectar tanto a individuos inmunocompetentes como inmunodeprimidos (Janda y Abbott, 2010; Figueras y Beaz-Hidalgo, 2015).

### ***Aeromonas* en ambientes acuáticos**

Bacterias nativas del medio acuático aisladas con facilidad de aguas superficiales, subterráneas, potables, embotelladas, residuales tratadas y no tratadas, agua de mar, estuarios y de riego (Holmes *et al.*, 1996; Borrell *et al.*, 1998; Villari *et al.*, 2003; Pianetti *et al.*, 2004; Figueras *et al.*, 2005; Emekdas *et al.*, 2006; Razzolini *et al.*, 2008; Rahman *et al.*, 2009; Martone-Rocha *et al.*, 2010; Janda y Abbott *et al.*, 2010; Aravena-Román *et al.*, 2013; Igbiosa y Okoh, 2013). Araujo *et al.* (1990) establecieron que la concentración de *Aeromonas* puede ser similar a los efluentes de agua terrestre.

Latif-Eugenin *et al.* (2016a) mostraron la importancia de las condiciones de cultivo para la detección de *Aeromonas* en el agua. Los estudios de metagenómica de aguas residuales revelaron que *Aeromonas* es una de las bacterias predominantes probablemente debido a su capacidad de regeneración en el sistema de alcantarillado. La incidencia de *Aeromonas* en aguas residuales es alta; factores como el aumento de la población, alteración de los patrones pluviométricos y contaminación de las fuentes naturales de agua, han provocado que sea cada vez

un recurso más escaso, recurriendo a reutilizar el agua residual generando lo que se conoce como agua reciclada (McLellan *et al.*, 2010; Al-Jassim *et al.*, 2015; Varela *et al.*, 2016). Tras haberla sometido a distintos tratamientos convencionales para recuperar el agua en plantas de tratamiento de aguas residuales, con tratamiento primario, secundario o biológico, no reducen en gran medida la concentración de *Aeromonas*. Sin embargo, disminuyen considerablemente al realizar tratamientos terciarios adicionales, que pueden ser químico (ozono, cloración), físico (radiación ultravioleta) (Latif-Eugenin *et al.*, 2016a, 2016b; Latif-Eugenin *et al.*, 2017; Fernandez-Cassi *et al.*, 2016) y natural como el lagunaje (proceso de purificación, que se logra cuando el agua residual es almacenada temporalmente en balsas o lagunas de poca profundidad) (Boussaid *et al.*, 1991; Hassani *et al.*, 1992; Jjemba *et al.* 2010).

Con base en lo anterior estudios sugieren que, dependiendo de la calidad microbiológica del agua recuperada de sistemas de tratamiento, puede usarse para riego, pues este tipo de aguas en su mayoría pueden contaminar frutas y verduras (Pianetti *et al.*, 2004) y, por lo tanto, causar infección en humanos. Existe evidencia epidemiológica de que el agua actúa como vehículo para la diseminación de esta bacteria, ha sido posible identificar las mismas cepas de *Aeromonas* en muestras de agua potable y en las heces de individuos con diarrea (Khajanchi *et al.*, 2010; Pablos *et al.*, 2011). En otro estudio, las mismas cepas aisladas de lechuga y tomate se recuperaron del agua de riego (Latif-Eugenin *et al.*, 2017).

Existen numerosos estudios en los que se detectó la presencia de *Aeromonas* en el agua potable y las concentraciones están relacionadas con la capacidad de volver a crecer en el sistema (Salvat y Ashbolt, 2019; Montes *et al.*, 1999; Holmes *et al.*, 1996; Van Der Kooij *et al.*, 2015), que está influenciada por la cantidad de nutrientes disponibles, la temperatura y la concentración de cloro residual (Sisti *et al.*, 1998).

## ***Aeromonas* en alimentos**

Las *Aeromonas* se han aislado de una amplia variedad de alimentos, principalmente pescados, mariscos, productos cárnicos y embutidos, frutas, verduras y productos lácteos (Cuadro 2) (Chang *et al.*, 2008; Nagar *et al.*, 2011; Nagar *et al.*, 2013; Hoel *et al.*, 2017; Hoel *et al.*, 2019; Figueras y Beaz-Hidalgo, 2014; Hammad *et al.*, 2018). La temperatura, la salinidad y el pH son factores determinantes en la presencia y cantidad de *Aeromonas* en estos alimentos (Martin-Carnahan y Joseph, 2005). En el caso de la temperatura, varios autores informaron que *Aeromonas* sobrevive a bajas temperaturas (2-10 °C). Además, la sal o el cloruro de sodio (NaCl) es un conservante común para los productos cárnicos y el pescado crudo, sin embargo, *Aeromonas* puede crecer en concentraciones de NaCl de hasta el 4%. El pH es otro parámetro que controla el crecimiento bacteriano en los alimentos pues se ha demostrado que esta bacteria puede sobrevivir a pH = 5 (Figueras *et al.*, 2014; John *et al.*, 2019).

La radiación gamma es altamente efectiva en la eliminación de patógenos en alimentos como vegetales, carnes y pescado. Se ha demostrado que dosis equivalentes a 1.5 kiloGrays (kGy) eliminaban las altas concentraciones de *Aeromonas* (10<sup>5</sup> unidades formadoras de colonias (UFC) /g) presentes en brotes de vegetales, en pollo y en pescado (Figueras y Beaz-Hidalgo, 2014). También se ha demostrado que *Aeromonas* es capaz de sobrevivir a otras condiciones usadas para preservar los alimentos, como el vacío y modificación de los gases atmosféricos. Sin embargo, al modificar las condiciones atmosféricas del embalaje de un pez (*Etroplus suratensis*) autóctono de India, el crecimiento de *Aeromonas* fue inhibido, favoreciendo la duración del producto (Figueras y Beaz-Hidalgo, 2014).

Muchos estudios han investigado la presencia de *Aeromonas* en diferentes productos, según la secuenciación de genes *housekeeping* como *rpoD* y *gyrB* (identificación molecular) (Cuadro 2).

Especie	Productos			
	Cárnicos (vacuno, cerdo, pollo y conejo)	Peces destinados para consumo humano (tilapia y salmónidos) y mariscos (mejillones, ostras, camarones y berberechos)	Frutas y Verduras (zanahorias, tomates, lechugas, pepinos, papas, cebollas y apio)	Lácteos y sus derivados Leche y quesos
<i>A. veronii</i>	X	X		
<i>A. salmonicida</i>	X	X		
<i>A. jandaei</i>	X			
<i>A. simiae</i>	X			
<i>A. hydrophila</i>	X	X	X	X
<i>A. caviae</i>	X		X	X
<i>A. bestiarum</i>		X		
<i>A. encheleia</i>		X		
<i>A. allosaccharophila</i>		X		
<i>A. bivalvium</i>		X		
<i>A. trota</i>				X
<i>A. schubertii</i>				X
<b>Referencias</b>	Fontes <i>et al.</i> , 2010; Nagar <i>et al.</i> , 2013; Figueras y Beaz-Hidalgo, 2014; Praveen <i>et al.</i> , 2016; Shen <i>et al.</i> , 2018.	Figueras y Beaz-Hidalgo, 2014; Castro-Escarpulli <i>et al.</i> , 2003; Woodring <i>et al.</i> , 2012; Yano <i>et al.</i> , 2015.	Chang <i>et al.</i> , 2008; Nagar <i>et al.</i> , 2013.	Janda y Abbott, 2010; Palumbo <i>et al.</i> , 1985; Hammad <i>et al.</i> , 2018.

**Cuadro 2.** *Aeromonas* spp. en diferentes productos destinados al consumo humano.

## **Aeromonas en animales**

El género ha sido considerado patógeno animal desde su primer aislamiento de septicemia en ranas y peces enfermos (Beaz-Hidalgo *et al.*, 2010; Farmer *et al.*, 2006). Estudios han investigado la presencia de *Aeromonas* en diferentes animales, según la secuenciación de genes *housekeeping* como *rpoD* y *gyrB* (Cuadro 3). Especies patógenas importantes en peces son *A. salmonicida* y *A. hydrophila*, que afectan particularmente a salmónidos, causándoles úlceras, hemorragias, furunculosis y septicemias. Estas infecciones causan importantes pérdidas económicas en la industria acuícola (Janda y Abbott, 2010; Beaz-Hidalgo *et al.*, 2010; Reith *et al.*, 2008).

Rasmussen-Ivey *et al.* (2016) describieron una cepa hipervirulenta de *A. hydrophila* como agente causante de brotes mundiales en peces de aguas cálidas. Varios estudios han aislado otras especies de peces: *A. veronii* de bagre (Nawaz *et al.*, 2010); *A. piscicola* de salmónidos (Beaz-Hidalgo *et al.*, 2009); *A. sobria* de tilapia (Li y Cai *et al.*, 2011); *A. schubertii* del pez cabeza de serpiente (Chen *et al.*, 2012); *A. veronii*, *A. bestiarum*, *A. encheleia* y *A. sobria* de la carpa común; y *A. allosaccharophila*, *A. dhakensis*, *A. caviae*, *A. veronii*, *A. hydrophila*, *A. jandaei*, *A. media* y *A. trota* de anguila (Martínez-Murcia *et al.*, 1992; Esteve *et al.*, 1995a; 1995b; 2012; Yi *et al.*, 2013).

Este género también puede causar septicemia en aves de corral, aunque en gaviotas se definió como microbiota normal (Kinzelman *et al.*, 2008). Diversas publicaciones describen al género como microbiota normal de dípteros, en este sentido *A. caviae* se ha aislado del tracto digestivo de moscas comunes (Nayduch *et al.*, 2002) mientras que la especie *A. veronii* se aisló del intestino de mosquitos hembra de las especies *Culex quinquefasciatus* y *Aedes aegypti* en la India (Pidiyar *et al.*, 2002). En 2012 se identificaron cepas de *A. sanarellii* y *A. taiwanensis* a partir de masas de huevos de quironómidos, lo cual representó un nuevo hábitat ambiental para estas especies (Beaz-Hidalgo *et al.*, 2012).

*Aeromonas* también ha sido recuperada de mamíferos, como es el caso de *A. veronii* aislada de heces fecales de lobos marinos sudamericanos (*Otaria*

*flavescens*), *A. hydrophila* ha sido recuperada de ovinos, con antecedentes de aborto y retención de placenta (Ílhan *et al.*, 2006; Gonzalez *et al.*, 2009) y *A. dhakensis* fue aislada de un cetáceo neonato encontrado varado, y muerto un par de días después, mostrando neumonía y sepsis (Pérez *et al.*, 2015). Se aislaron también de brotes en granjas de conejos, se recuperaron también de las heces de perros y gatos domésticos (salud pública) y de procesos patológicos en equinos, como artritis séptica, enteritis y trastornos reproductivos (Ghenghesh *et al.*, 1999; Forga-Martel *et al.*, 2000; Waldrige *et al.*, 2011; Worthing *et al.*, 2019).

<b>Especies</b>	<b>Gen</b>	<b>Muestra</b>	<b>Enfermedad</b>	<b>Referencia</b>
<i>A. allosaccharophila</i> , <i>A. sobria</i> , <i>A. veronii</i> , <i>A. rivopollensis</i> , <i>A. piscicola</i> , <i>A. popoffii</i> .	<i>rpoD</i> y <i>gyrB</i>	Trucha arcoíris	Clínicamente sanas	Reyes-Rodríguez <i>et al.</i> , 2019.
<i>A. salmonicida</i> y <i>A. veronii</i>	<i>rpoD</i>	Carpa común y agua	Úlceras en la piel	Patil <i>et al.</i> , 2016.
<i>A. hydrophila</i>	<i>gyrB</i> y <i>rpoB</i> ,	Caracol	ND	Roger <i>et al.</i> , 2012.
<i>A. sobria</i> , <i>A. caviae</i> y <i>A. trota</i>	<i>gyrB</i>	Camarón importado	NA	Shakir <i>et al.</i> , 2012
<i>A. veronii</i> bv. <i>veronii</i>	<i>gyrB</i> y <i>rpoD</i>	Bagre chino de hocico largo	Síndrome ulcerativo (diferentes grados de úlceras hemorrágicas profundas en el cuerpo)	Cai <i>et al.</i> , 2012
<i>A. dhakensis</i> ( <i>aquariorum</i> )	<i>rpoD</i> y <i>gyrB</i>	Peces ornamentales	ND	Martínez-Murcia <i>et al.</i> , 2008.
<i>A. hydrophila</i>	<i>gyrB</i>	Bagre	Epidemias	Hossain <i>et al.</i> , 2014.
<i>A. crassostreae</i>	<i>rpoD</i> y <i>gyrB</i>	Ostras	ND	Figuera <i>et al.</i> , 2017.
<i>A. piscicola</i>	<i>rpoD</i> y <i>gyrB</i>	Salmon	Peces enfermos	Beaz-Hidalgo <i>et al.</i> , 2009.

<i>Aeromonas dhakensis</i>	<i>rpoD</i>	Delfín	Neumonía y sepsis hemorrágica necrosante	Pérez <i>et al.</i> , 2015.
----------------------------	-------------	--------	--	-----------------------------

ND: no determinado, NA: no aplica

**Cuadro 3.** Especies de *Aeromonas* (identificadas por *rpoD* y *gyrB*) reportadas en algunas especies animales.

### ***Aeromonas* en humanos**

Consideradas, patógenos oportunistas emergente aislándose como agente etiológico en diversos procesos infecciosos, principalmente gastroenteritis, septicemia e infecciones de heridas, así como en otras infecciones que afectan al sistema hepatobiliar, tracto respiratorio, huesos y articulaciones (Figueras y Beaz-Hidalgo, 2015). Evidencia de lo anterior el Cuadro 4 donde se muestra la distribución de algunas especies de este género asociadas a infecciones en humanos.



Espece	Heces	Herida	Sangre	Tracto respiratorio	Orina	Dializado peritoneal	Bilis	Ascitis	Absceso	Otro fluido	Total
<i>A. caviae</i>	446	43	147	11	12	11	11	2	3	4	690 (37.26)
<i>A. veronii</i>	231	49	125	12	1	1	6	7	1	2	435 (23.49)
<i>A. dhakensis</i>	111	133	111	4	6	11	11	2	1	9	399 (21.54)
<i>A. hydrophila</i>	69	96	45	9	5	8	3	1	2	4	242 (13.07)
<i>A. media</i>	32	3	6		1						42 (2.27)
<i>A. trota</i>	2	2					1			1	6 (0.27)
<i>A. taiwanensis</i>	2	3	1			1					7 (0.32)
<i>A. salmonicida</i>	1	2							1		4 (0.21)
<i>A. jandaei</i>	3	2	1		1					1	8 (0.43)
<i>A. sanarellii</i>	1	4									5 (0.27)
<i>A. allosaccharophila</i>	2		1								3 (0.16)
<i>A. tecta</i>	2										2 (0.11)
<i>A. diversa</i>		2									2 (0.11)
<i>A. schubertii</i>		1	1								2 (0.11)
<i>A. bestiarum</i>	1	1	1	1							4 (0.21)
<i>A. popoffii</i>					1						1 (0.05)
<i>A. intestinalis</i>	1										1 (0.05)
<i>A. enterica</i>	1										1 (0.05)
Total	905	341	439	37	27	32	32	12	8	20	1852

**Cuadro 4.** Distribución de *Aeromonas* spp identificadas con métodos moleculares y recuperadas de diferentes sitios en asociación con infección humana. Fuente: Fernández-Bravo y Figueras, 2020.

Mientras que las diarreas afectan principalmente a niños e individuos inmunocomprometidos, las infecciones de heridas afectan a la población sana y están asociadas a accidentes o traumas, incluso, pueden ser adquiridas en el hospital, después de una cirugía o de la aplicación de terapia con sanguijuelas (Figueras, 2005; Janda y Abbott, 2010; Igbinsosa *et al.*, 2012; Figueras y Beaz-Hidalgo, 2015; Baruah *et al.*, 2015). Se han descrito casos de bacteriemias e infecciones extraintestinales tales como meningitis, neumonía, queratitis y osteomielitis causadas por *Aeromonas* en paciente sanos e inmunocompetentes (Figueras, 2005; Dwivedi *et al.*, 2008; Gunasekaran *et al.*, 2009; Janda y Abbott, 2010; Figueras y Beaz-Hidalgo, 2015).

La incidencia de *Aeromonas* en infecciones humanas en todo el mundo no está clara, pero varios estudios nos han acercado a las estimaciones. Un estudio realizado en California en mayo de 1988 llevó a cabo el primer estudio epidemiológico poblacional de las infecciones por *Aeromonas*. Los resultados mostraron la incidencia anual de infecciones por *Aeromonas*, siendo de 10.5 casos por millón de personas (Janda y Abbott, 2010; King *et al.*, 1992). En Inglaterra Janda y Abbott (2004) informaron que la incidencia estimada de bacteriemia por *Aeromonas* era de 1,5 casos por millón de personas, mientras que, en Francia, se estimó 0,66 casos por millón de personas en 2006 (Lamy *et al.*, 2009). Wu *et al.* (2014) en Taiwán de 2008 a 2010 mostró que la incidencia de bacteriemia por *Aeromonas* fue de 76 casos por millón de personas. Por lo tanto, estos estudios indican que la incidencia de *Aeromonas* varía según la ubicación geográfica y puede estar relacionada con prácticas deficientes de higiene en áreas subdesarrolladas. (Figueras *et al.*, 2005; Figueras y Beaz-Hidalgo, 2015; Mathur *et al.*, 2016; Hochedez *et al.*, 2010; Su *et al.*, 2013).

*Aeromonas* fue el microorganismo más aislado después de desastres naturales como el tsunami en Tailandia el año 2001 (*Aeromonas* correspondió al 22,6% de todos los aislados) y el huracán Katrina en el sureste de Estados Unidos de América en 2005, asociada principalmente a infección de heridas (Hiransuthikul *et al.*, 2005; Presley *et al.*, 2006). Tanto las inundaciones como las sequías, se consideraron las principales repercusiones del cambio climático y hay evidencia de

que tanto el aumento como la disminución del volumen de lluvia, preceden los brotes de *Aeromonas* asociado al consumo de agua (Figueras y Borrego, 2010). Además, *Aeromonas* ha sido aislada junto con *Vibrio cholerae* en brotes ocurridos en Haití (Hasan *et al.*, 2012; Mendes-Marques *et al.*, 2012; Figueras y Beaz-Hidalgo, 2015).

Hasta hace poco tiempo, eran sólo tres especies, *A. caviae*, *A. veronii* y *A. hydrophila*, las predominantes en muestras clínicas, correspondiendo aproximadamente al 92% de los aislados en diversos estudios (Figueras, 2005; Janda y Abbott, 2010; Igbinosa *et al.*, 2012; Figueras y Beaz-Hidalgo, 2015). Sin embargo, desde la descripción de *A. dhakensis* esta especie ha resultado ser más prevalente en muestras clínicas; según la identificación molecular de 817 cepas obtenidas de diferentes estudios en todo el mundo, el 94.7% de las cepas asociadas a casos clínicos corresponden a cuatro especies: *A. caviae* (30.5%), *A. veronii* (23.1%), *A. dhakensis* (23%) y *A. hydrophila* (18.1%) (Figueras y Beaz-Hidalgo, 2015). Una actualización de los datos, agregando 1034 cepas en estudios más recientes, muestra que esas cuatro especies mencionadas representan el 95.4% (1766/1852) de las cepas de *Aeromonas* relacionadas con infecciones humanas. Sin embargo, la frecuencia de estas especies también varía según el país.

Hasta ahora *A. dhakensis* es la especie clínica más prevalente con importancia clínica en países como Malasia (Puthucheary *et al.*, 2012), Taiwán (Wu *et al.*, 2012; Chen *et al.*, 2014) y Australia (Aravena-Román *et al.*, 2011). *A. dhakensis* es la especie es más virulenta y muestra una mayor actividad citotóxica (Figueras y Beaz-Hidalgo, 2015; Chen *et al.*, 2014; Aravena-Román *et al.*, 2011; Puthucheary *et al.*, 2012).

Sedláček *et al.* (2012) publicaron un caso de diarrea aguda de 10 días de duración en un hombre de 25 años, atribuida a *A. dhakensis*, que regresaba a República Checa de un viaje a Egipto y concluyeron que se trataba de una enfermedad importada. Sin embargo, esta especie no ha sido notificada en Egipto, lo que no es raro, ya que en este país no se han publicado estudios en donde utilicen métodos moleculares de identificación. Un año más tarde, Shin *et al.* (2013) publicaron un caso de sepsis debida a *A. dhakensis* con desenlace fatal. Chen *et al.* (2014) demostraron la mayor virulencia de *A. dhakensis* y comprobaron que los

pacientes que sufrían bacteriemia atribuida a esta especie tenían mayor mortandad que la producida por otras especies.

Fernández-Bravo (2019) demostró que los monocitos humanos que presentan mayor daño celular resultan ser aquellas células que inducen una mayor expresión de genes relacionados con el sistema inmunológico, siendo *A. dhakensis*, *A. veronii* y *A. caviae* las especies prevalentes.

En la misma muestra clínica, la infección por *Aeromonas* generalmente involucra más de un tipo de bacteria, que se define como una infección polimicrobiana o mixta. (Figueras *et al.*, 2005; Figueras y Beaz-Hidalgo, 2015; Lamy *et al.*, 2009; Mathur *et al.*, 2016). En el caso de la diarrea, *Aeromonas* aparece simultáneamente con *Campylobacter* y *Salmonella*, mientras que *Staphylococcus aureus* predomina en las infecciones de heridas. (Janda y Abbott, 2010).

Se han descrito interacciones de dos cepas de *A. hydrophila* aisladas de un individuo inmunocompetente con fascitis necrotizante; sugiriendo la intervención del sistema de secreción tipo seis (T6SS) y la exotoxina A (ExoA) en esta compleja infección (Grim *et al.* 2014; Ponnusamy *et al.* 2016). Fernández-Bravo *et al.* (2019) utilizaron mutantes de T6SS y ExoA en las mismas cepas para dilucidar su papel en infecciones mixtas.

## **Factores de virulencia**

Las infecciones microbiológicas implican la interacción del hospedero y el patógeno. La virulencia en *Aeromonas* es compleja, especies de este género poseen una gama heterogénea de factores de virulencia. La expresión de componentes de la membrana, toxinas y enzimas, que al actuar de manera conjunta o individual contribuyen que estos microorganismos colonicen e infecten hospederos dando lugar a la patogenicidad bacteriana (Fernández-Bravo, 2019b).

Los principales factores patogénicos asociados con *Aeromonas* son los polisacáridos de superficie (cápsula, lipopolisacárido y glucano), capas S, sistemas de unión a hierro, exotoxinas y enzimas extracelulares, sistemas de secreción, fimbrias y otras adhesinas no filamentosas y flagelos (Zhou *et al.*, 2019).

## Componentes estructurales

Las bacterias se adhieren a los tejidos y células del hospedero y cambian sus mecanismos de defensa, comenzando así a colonizar. En *Aeromonas*, los componentes estructurales más estudiados involucrados en el proceso de colonización son flagelos, fimbrias, cápsula, capa S y lipopolisacárido (LPS) (Beaz-Hidalgo y Figueras, 2013).

El flagelo es el orgánulo responsable de la migración de bacterias, compuesto por un filamento, un gancho y el cuerpo basal. *Aeromonas* tiene flagelos polares y flagelos laterales. La presencia de flagelos laterales permite que las bacterias se muevan rápidamente sobre superficies sólidas y formen biopelículas. El flagelo polar permite el movimiento en entornos líquidos. (Tomas, 2012; Beaz-Hidalgo y Figueras, 2013; Lowry *et al.*, 2014).

Los *pili* son estructuras filamentosas que se encuentran en la superficie de las bacterias y tienen subunidades llamadas pilina. Además de ser un orgánulo adherente, la estructura también implica otras funciones, como la transferencia de ADN, la formación de biopelículas, la agregación celular y la invasión de la célula del hospedero. (Beaz-Hidalgo y Figueras, 2013).

El LPS exclusivo de bacterias Gram negativas, posee tres subunidades: el polisacárido O (antígeno O), el núcleo del LPS (polisacárido central) y el lípido A (Beaz-Hidalgo y Figueras, 2013; Nazarenko *et al.*, 2011; Heiss *et al.*, 2019). Los lipopolisacáridos desempeñan un papel importante en la organización y el mantenimiento de la membrana externa, son inductores clave de la respuesta inmune innata con la producción de una respuesta inflamatoria no específica y responsables de la virulencia. (Romero *et al.*, 2016; Beaz-Hidalgo y Figueras, 2013). Receptor tipo Toll (TLR); especialmente TLR4, es la proteína de membrana más conocida que reconoce LPS y puede inducir la respuesta inmune necesaria para activar las defensas antibacterianas (Su *et al.*, 2009).

La actividad más destacada de LPS es su potencia inmunoestimuladora que conduce al complejo síndrome clínico de sepsis gram negativa cuando la respuesta inicial del hospedero a una infección se desregula. La manifestación clínica de la

sepsis se caracteriza por fiebre, hipotensión, insuficiencia respiratoria y renal y coagulación diseminada intravascular (Cohen, 2002). Estos efectos no son el resultado de la toxicidad de LPS, sino más bien una consecuencia de la activación celular por LPS y una desregulación posterior de la respuesta inflamatoria del hospedero. La actividad biológica de LPS se encuentra en el ancla de lípidos de la molécula, denominada lípido A o "el principio endotóxico" de LPS (Lüderitz *et al.*, 1978). Las propiedades endotóxicas del LPS se derivan de la liberación del lípido A de las bacterias lisadas que pueden provocar una inflamación sistémica importante conocida como shock séptico o endotóxico.

Los LPS de *Aeromonas* son principalmente mezclas heterogéneas altas de moléculas de LPS en forma de S que contienen de 1 a más de 50 unidades de oligosacáridos repetitivas y contienen ubicuamente una proporción variable de moléculas en forma de R que carecen de la cadena específica de O. Muchas bacterias Gramnegativas clínicamente relevantes sintetizan este tipo de LPS. Los LPS son moléculas anfipáticas cuya hidrofobicidad disminuye al aumentar la longitud de la parte de azúcar (Caroff y Karibian, 2003).

La cápsula es una estructura de polisacárido que recubre la membrana externa de las bacterias que interactúan con el medio. Se describe como un factor de virulencia importante que es resistente a la fagocitosis y al sistema del complemento, facilita la interacción con otras bacterias y tejidos del hospedero actuando como una barrera contra las toxinas hidrófobas (Tomás, 2012; Beaz-Hidalgo y Figueras, 2013; Merino y Tomás, 2010).

La capa S es una capa de proteína de superficie paracristalina producida por un gran número de bacterias que forma la envoltura celular más externa. Además de poseer múltiples funciones relacionadas con la patogenicidad. Debido a su exposición en la superficie celular, desempeña un papel importante en diversas funciones biológicas: adhesión, protección contra el complemento y ataque de los fagocitos, propiedades antigénicas, sitio de anclaje para exoenzimas hidrolíticas, receptor de bacteriófagos, entre otros (Beveridge *et al.*, 1997; Tomás, 2012; Beaz-Hidalgo y Figueras, 2013).

La capa S de *Aeromonas* está compuesta por subunidades de autoensamblaje de una sola proteína que forma un complejo tetragonal que cubre toda la célula bacteriana y constituye el antígeno de superficie predominante (Chu *et al.*, 1991). La capa S de *A. salmonicida* promueve la asociación con las proteínas de la matriz extracelular y los macrófagos, uniéndose a las porfirinas (Kay *et al.*, 1985) e inmunoglobulinas (Phipps y Kay, 1988), y la protección contra las proteasas (Chu *et al.*, 1991) y la destrucción oxidativa (Garduño *et al.*, 1993). La presencia de *Aeromonas* spp. mesofílicas del serogrupo O:11 aumentan su capacidad de adherencia, lo que contribuye a la colonización de la mucosa intestinal y genera una gran resistencia a la opsonofagocitosis que podría facilitar la diseminación sistémica después de la invasión a través de la mucosa gastrointestinal (Kay *et al.*, 1981).

### **Sistemas de unión de hierro**

La baja disponibilidad de hierro libre hace que el crecimiento bacteriano y la patogenicidad sean más difíciles, pero no imposibles. Los microorganismos desarrollaron una serie de mecanismos para secuestrar el hierro de sus hospederos o de polímeros insolubles del medio ambiente. Si bien la evidencia directa de que los mecanismos de alta afinidad para la adquisición de hierro funcionan como determinantes de la virulencia bacteriana se ha proporcionado solo en un pequeño número de casos, es probable que muchos, si no todos, estos sistemas desempeñen un papel central en la patogénesis de la infección (Wooldridge y Williams, 1993).

Se conocen dos mecanismos de alta afinidad para adquirir hierro en las cepas de *Aeromonas*: mecanismos dependientes de sideróforos e independientes de sideróforos (Beyers *et al.*, 1991). La adquisición de hierro se reconoce como uno de los pasos clave en la supervivencia de los patógenos bacterianos dentro de sus hospederos, y contribuye significativamente a la virulencia (Barun, 2005). Las proteínas de *A. salmonicida* reguladas con hierro han demostrado ser antígenos protectores para los peces y son buenos candidatos para la mejora de vacunas (Hirst y Ellis, 1994).

## Productos extracelulares

La interacción entre bacterias patógenas como *Aeromonas* y las células del hospedero es causada por sus componentes extracelulares y toxinas secretadas en el espacio extracelular (proteasas, lipasas, enterotoxinas, hemolisinas y toxinas Shiga) (Janda y Abbott, 2010; Tomás, 2012; Beaz-Hidalgo y Figueras, 2013; Alperi y Figueras, 2010a; Chopra y Houston, 1999; Galindo *et al.*, 2006; Merino *et al.*, 1995; Janda, 2001; Palma-Martínez *et al.*, 2016).

Se han descritos para *Aeromonas* enterotoxinas citotónicas y citotóxicas. De las citotónicas hay dos tipos: termolábiles (Alt), que no reacciona con la antitoxina del cólera (56 °C durante 10 min) y termoestables (Ast), que sí reaccionan (100 °C durante 30 min) (Tomás, 2012; Beaz-Hidalgo y Figueras, 2013; Chopra y Houston, 1999). La enterotoxina citotóxica (act) inhibe la actividad fagocítica de las células del hospedero, produce hemólisis y aumenta los niveles de factor de necrosis tumoral alfa (TNF-alfa) e interleucina (IL-1beta) en la línea celular de macrófagos murinos RAW 264.7 (Chopra *et al.*, 2000).

Dos tipos de hemolisinas con diferencias fisiológicas y funcionales en *Aeromonas*: alfa y beta (Singh y Sanyal, 1992), capaces de formar poros en la membrana de la célula diana generando lisis osmótica (Galindo *et al.*, 2006). Siendo aerolisina el prototipo de hemolisina del género, codificado por el gen *aerA*. Secretada por el sistema de secreción tipo dos (T2SS) y transcrita como una pre-pro-aerolisina (Beaz-Hidalgo y Figueras, 2013).

*Aeromonas* produce al menos tres tipos de proteasas: metaloproteasa (ahp, aphB), acetilcolinesterasa y serin proteasa (aspA) (Seshadri *et al.*, 2006; Reith *et al.*, 2008). Las proteasas hacen que las *Aeromonas* persistan en varios hábitats y promueven su interacción con otros microorganismos. Contribuyen a la patogenicidad ya que promueven la invasión por daño directo al tejido del hospedero o por la activación proteolítica de toxinas (Tomás, 2012; Beaz-Hidalgo y Figueras, 2013).

Las *Aeromonas*, secretan lipasas al medio y actúan como hidrolasas en los lípidos de la membrana, y cuando interactúan con leucocitos humanos o al afectar



diversas funciones del sistema inmune, pueden proporcionar nutrientes o constituir factores de virulencia (Tomás, 2012; Beaz-Hidalgo y Figueras, 2013). Una lipasa importante en el género *Aeromonas* es el glicerolfosfolípido colesterol aciltransferasa (GCAT), que tienen la capacidad de digerir las membranas de los eritrocitos y producir su lisis. Además, el gen *gcat* se puede utilizar para la identificación a nivel de género (Chacón *et al.*, 2002; Beaz-Hidalgo y Figueras, 2013; Latif-Eugenin *et al.*, 2016b).

De acuerdo con la literatura, *A. hydrophila* expresa enzimas degradativas que pueden contribuir con su virulencia. La colagenasa tiene citotoxicidad en las células Vero (Sha *et al.*, 2009). La enolasa es un enzima glucolítica que se secreta y expresa en la superficie, se identificó como un factor de virulencia en *A. dhakensis* SSU, se observó que tiene funciones en la degradación de las proteínas del plasma sanguíneo (Huang *et al.*, 2015).

La toxina Shiga inactiva los ribosomas, frenando la síntesis de proteínas de las células endoteliales vasculares, lo que conduce a la muerte celular (Beaz-Hidalgo y Figueras, 2013; Alperi y Figueras, 2010a). Cuando se inicia el ciclo lítico, se liberan grandes cantidades de ellos capaces de infectar a otras bacterias, que actúan como vectores de transmisión horizontal del gen *stx* (Herold *et al.*, 2004). Recientemente, las toxinas Shiga solo se han detectado en cepas de *Aeromonas* recuperadas de los alimentos (Palma-Martinez *et al.*, 2016).

## **Sistemas de secreción**

Hoy en día, se han descrito seis sistemas de secreción en bacterias Gram-negativas (I, II, III, IV, V y VI), involucrados en el transporte de proteínas a la superficie celular o al espacio extracelular del hospedero. Los mecanismos implicados en el transporte de proteínas a través de la membrana citoplasmática, en todos los sistemas de secreción, se pueden dividir en dos grupos: dependientes de Sec e independientes de Sec. (Kostakioti *et al.*, 2005). La vía dependiente de Sec incluye el sistema de secreción tipo II y V, lo que significa que los factores de

virulencia secretados por estos mecanismos contienen péptidos señal que son reconocidos por las proteínas Sec que permiten su translocación.

Las vías independientes de Sec permiten la exportación del citoplasma al ambiente extracelular en un solo paso y no involucran intermedios periplásmicos. Estas vías incluyen sistemas de secreción tipo I, III, IV y VI, aunque el tipo IV también puede emplear la vía dependiente de Sec (Tseng *et al.*, 2009).

Se ha documentado que los T3SS y T6SS, desempeñan un papel crítico en la virulencia de muchas bacterias Gram negativas, a menudo se activan al entrar en contacto con las células diana y liberan sus proteínas de toxina (efectores), directamente en las células del hospedero del citosol.

El T3SS o inyector es uno de los sistemas de secreción por el cual se pueden inyectar proteínas directamente desde el protoplasma de células bacterianas al citoplasma de la célula objetivo o al espacio extracelular (Tomás, 2012; Beaz-Hidalgo y Figueras, 2013; Tseng *et al.*, 2009). Hasta hoy, la presencia de un T3SS funcional se ha descrito en *A. salmonicida* (Burr *et al.*, 2002) y en *A. hydrophila* (Yu *et al.*, 2004; Vilches *et al.*, 2004; Sha *et al.*, 2005). Además, se han identificado cuatro proteínas efectoras de T3SS en *A. salmonicida*; AexT, AopP, AopO y AopH (Burr *et al.*, 2003; Burr *et al.*, 2002; Fehr *et al.*, 2006; Fehr *et al.*, 2007).

El T3SS contiene tres tipos diferentes de proteínas: (a) componentes estructurales que forman estructuras con forma de aguja, llamadas inyectoras; (b) sustratos de secreción, llamados efectores; (c) chaperonas que ayudan y protegen las proteínas estructurales y efectoras durante el transporte. El inyector consta de aproximadamente 20 proteínas diferentes que se ensamblan para formar una estructura en forma de aguja con agujas huecas finas y rígidas que se extienden desde la superficie celular y están ancladas a la envoltura por estructuras basales que se asemejan a los cuerpos basales de los flagelos. Esta estructura generalmente se induce al contacto con las células del hospedero y permite la translocación de los efectores en el citosol eucariota (Galán y Collmer, 1999).

El T4SS juega un papel vital en la propagación de genes de resistencia y virulencia. Es el único con la capacidad de transportar ADN y proteínas; hace que

el sistema de conjugación bacteriano sea homólogo (Tomas, 2012; Beaz-Hidalgo y Figueras, 2013; Chen *et al.*, 2012).

El T6SS o Vas (secreción asociada a la virulencia) es capaz de inyectar efectores de proteínas directamente en el citosol de la célula (Bingle *et al.*, 2008). Altamente conservado y se puede encontrar en una o más copias en una variedad de bacterias Gram negativas, como *Vibrio cholerae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Yersinia pestis*, *E. coli* y *Salmonella enterica*. Entre las proteínas efectoras secretadas, las más conocidas son las proteínas de repetición G (VgrG) y la proteína co-regulada con hemolisina (Hcp) (Tomás, 2012; Beaz-Hidalgo y Figueras, 2013; Seshadri *et al.*, 2006).

Suarez *et al.* (2008) demostraron el papel funcional en la virulencia de este sistema de secreción en *A. hydrophila*. En los últimos años, se ha informado que el T6SS tiene un papel antibacteriano adicional en las infecciones polimicrobianas, eliminando las bacterias competidoras (English *et al.*, 2012). El T6SS se ha asociado con un papel en las infecciones mixtas por dos cepas de *A. hydrophila* (NF1-NF2) recuperadas de un caso de fascitis necrotizante. Los datos muestran que, en las dos cepas, la expresión de los efectores relacionados con T6SS puede estar regulada de manera diferencial, lo que lleva a infecciones mixtas que causan una progresión diferente de la enfermedad a partir de una sola infección. (Ponnusamy *et al.*, 2016; Fernández-Bravo *et al.*, 2019).

## **La detección de quórum (QS)**

Mecanismo que regula la expresión génica en respuesta a la densidad celular. Las células involucradas producen y secretan sustancias llamadas autoinductores, que actúan como señales químicas para inducir la expresión genética colectiva. Para bacterias Gram negativas la molécula señal es la N-acil homoserina-lactona (AHL), importante para regular el rango de funciones biológicas, la formación de biopelículas, la producción de antibióticos y la motilidad en el sistema QS con diferentes efectos. (Chan *et al.*, 2016; Ding *et al.*, 2017; Patel *et al.*, 2017; Talagrand-Reboul *et al.*, 2017a). En *Aeromonas* la AHL puede regular

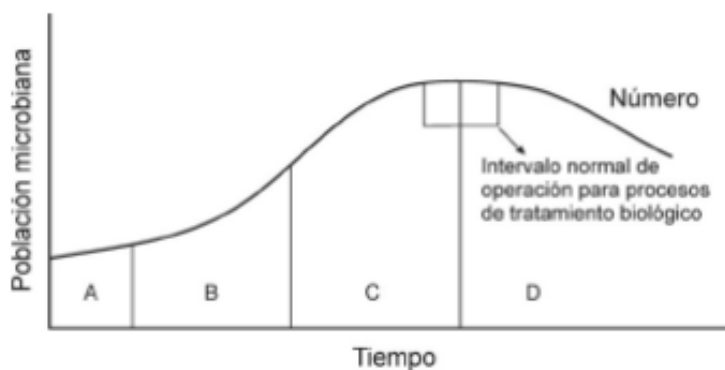
la respuesta inmune del hospedero (Beaz-Hidalgo y Figueras, 2013; Miller y Bassler, 2001; Grim *et al.*, 2014; Khajanchi *et al.*, 2011).

Chan *et al.* (2016) encontraron 159 secuencias de genes relacionados con QS en todo el genoma de una cepa de *A. veronii*, proporcionando un modelo para explorar su papel en la virulencia y como un objetivo potencial para el tratamiento de *Aeromonas*. Talagrand-Reboul *et al.* (2017a) centraron su revisión en la comprensión de la biopelícula y el QS en *Aeromonas*, y explicaron que la biopelícula proporciona alta densidad celular permitiendo la interacción entre las bacterias con el sistema QS en *Aeromonas*. Además de informar el posible papel de esta formación de biopelícula en infecciones mixtas.

## Fases de crecimiento bacteriano

Las curvas de crecimiento microbiano, de forma general, poseen cuatro fases en el tiempo (figura 2):

- A. fase de latencia o adaptación.
- B. fase de crecimiento exponencial o logarítmico.
- C. fase de crecimiento estacionaria o menguante.
- D. fase de muerte o endógena.



**Figura 2.** Curva del crecimiento bacteriano.  
Fuente: Modificado a partir de Henry, 1999.

## Cinética microbiana

Después de la inoculación de medio con una determinada cantidad de células, transcurre un período de tiempo (fase de latencia) antes de que se establezca una velocidad constante de crecimiento, debido a que el microorganismo tiene una intensa actividad metabólica para adaptarse al nuevo medio de cultivo antes de poder duplicarse. Cuando el cultivo alcanzó una velocidad constante de crecimiento se dice que está en la fase exponencial debido a que el número de células se puede expresar como función de  $2^n$ , donde n es el número de ciclos de duplicación experimentado por la población (Rose, 1977).

Finalmente, el cultivo entra en la fase estacionaria del crecimiento, en la que permanece constante el número de células. Dicha fase puede durar mucho tiempo, pero siempre será seguida, más temprano o más tarde, por la fase de muerte (Rose, 1977). En condiciones controladas (Nutrientes, pH, Temperatura, Disponibilidad de agua u oxígeno), en el laboratorio, se puede seguir la evolución del número de células a lo largo del tiempo de un cultivo microbiano en un sistema cerrado.

En el caso de *Aeromonas* y teniendo como ejemplo *Aeromonas salmonicida* la expresión de proteasas y lipasas es inducida por la detección de quórum a alta densidad celular y es importante para inducir la virulencia (Rasch *et al.*, 2007; Schwenteit *et al.*, 2011). Lo anterior en relación con la cinética de crecimiento, es respaldado por análisis proteómicos en la cepa de referencia de *A. salmonicida* JF5054, donde se muestra que la expresión del T3SS disminuye significativamente de la fase de crecimiento exponencial a la estacionaria, mientras que la expresión de algunas enzimas (proteasas, lipasas, quitinasas, entre otras) aumenta. Estas observaciones también destacan que además de las variaciones genéticas y la pérdida de los atributos de virulencia el estado de activación de T3SS en el cultivo bacteriano es un punto crítico para tener en cuenta para la preparación del inoculo en desafíos experimentales con *A. salmonicida* (Bergh y Frey, 2014).

## **Adhesión bacteriana en la patogénesis**

Para la mayoría de los microorganismos, la capacidad para adherirse (adhesinas) a la superficie epitelial de su hospedero es esencial para la colonización y el desarrollo subsecuente de la enfermedad (Ofek y Doyle, 1994). Las adhesinas son proteínas, lípidos o glicoconjugados generalmente localizadas en la superficie de la célula bacteriana, involucradas en la interacción entre la bacteria y la superficie celular del hospedero en las primeras etapas de la colonización. Para lograr lo anterior, además de las interacciones hidrofóbicas y las fuerzas electrostáticas no específicas, las bacterias utilizan proteínas de su superficie con afinidad específica por proteínas del plasma, por componentes de la matriz extracelular y por constituyentes de la mucosa epitelial. En algunos casos se ha demostrado que existe correlación entre la virulencia de las bacterias patógenas y su capacidad para adherirse a estas glicoproteínas (Westerlund y Korhonen, 1993; Carnoy *et al.*, 1994; Dubreuil *et al.*, 2002).

## **Mecanismo de adherencia bacteriana**

Se sabe que las bacterias se adhieren a la superficie epitelial vía receptores específicos y que los factores bacterianos involucrados en las interacciones bacteria-célula son diversos (Attridge y Rowley, 1983).

Las estructuras bacterianas hasta ahora conocidas responsables de la adherencia incluyen fimbrias, adhesinas no fimbriales, LPS, proteínas de membrana externa y la capsula; en general se asume que cualquier antígeno de la superficie bacteriana que tenga una conformación estereoquímica, perfil hidrofóbico y carga neta electrostática complementaria con las estructuras de membrana de su célula blanco puede funcionar como adhesinas (Finlay y Falkow, 1989). La presencia de receptores celulares para adhesinas bacterianas se encuentra determinada genéticamente, su expresión se relaciona con la edad del hospedero y varía en los diferentes niveles de los tractos mucosales; explicando las diferencias en el grado de colonización y la susceptibilidad o resistencia a la infección (Cohen *et al.*, 1988).

Los receptores mejor conocidos son las cadenas de oligosacáridos de glicoproteínas y glicolípidos de la superficie celular, los más importantes son las glicoproteínas, que además de localizarse en la superficie de la membrana, se secretan dentro del moco que cubre el epitelio mucosal de los tractos digestivo y respiratorio. Las típicas adhesinas bacterianas son las fimbrias que han sido ampliamente estudiadas por su capacidad para unirse a eritrocitos de manera específica, la unión o interacción entre la adhesina y los eritrocitos es casi idéntica a la que se establece entre esta estructura y su célula blanco (el hecho de que la proteína posea actividad hemoaglutinante, sugirió su participación en el mecanismo de adhesión de la bacteria). En *Aeromonas* se han descrito dos clases de adhesinas: las asociadas con estructuras filamentosas (fimbrias) y las asociadas con proteínas de la membrana externa (LPS, capa S, porinas que actúan como adhesinas de tipo lectinas) (Burke *et al.*, 1984).

### **Adhesinas filamentosas: fimbrias / pili**

Las fimbrias/pili son estructuras filamentosas en la superficie bacteriana, formadas por subunidades conocidas como pilina. Aunque los pilis a menudo se describen como orgánulos adhesivos, se han implicado en otras funciones, como la unión de fagos, la transferencia de ADN, la formación de biopelículas, la agregación celular, la invasión de la célula hospedera y la motilidad de contracción (Proft y Baker, 2009).

En aislamientos clínicos y ambientales de *Aeromonas* mesófilas, se han encontrado dos tipos distintos de fimbrias en función de su morfología: fimbrias cortas y rígidas (S/R) que se pueden encontrar en grandes cantidades en la célula bacteriana y fimbrias largas y onduladas (L/W) que se puede encontrar en números más pequeños. Las fimbrias S/R son epítopes comunes en diferentes especies analizadas; ampliamente distribuidos (más del 95% de las cepas) y pueden causar autoagregación, pero no hemaglutinación o unión a las células intestinales (Kirov *et al.*, 1995). Las fimbrias L/W son grandes, finas, flexibles y consideradas hemaglutininas, son el tipo predominante en cepas aisladas de peces. El análisis de

la secuencia de aminoácidos indica que corresponden a pilis de tipo IV (Pepe *et al.*, 1996), conocidas como estructuras importantes para la adhesión a las células epiteliales e involucradas en la formación de biopelículas y la motilidad de contracción. Se han descrito dos pilis de tipo IV diferentes en especies de *Aeromonas* asociadas con gastroenteritis: los pilis formadores de haces (Bfp) y los pilis de tipo IV (Tap) (Barnett *et al.*, 1997). Bfp pili están involucrados en la adhesión a las células intestinales (Kirov *et al.*, 2000) y exhiben homología de secuencia N-terminal con la hemaglutinina, sensible a manosa de *Vibrio cholerae*. Una de las proteínas de la familia Tap (TapD) es esencial para la secreción de aerolisina y proteasas, contribuyendo al sistema de secreción de tipo II (Pepe *et al.*, 1996). Se ha demostrado también que el pili formador de haces es necesario para la adhesión de *Aeromonas veronii* y la formación de biopelículas (Hadi *et al.*, 2012).

### **Adhesinas no filamentosas**

En la superficie de *Aeromonas* también hay otras macromoléculas consideradas adhesinas, como los monómeros de la capa S, el lipopolisacárido y las diferentes proteínas de la membrana externa. Entre las proteínas de la membrana externa, se ha descrito especialmente que las porinas actúan como una adhesina de tipo lectina, uniendo las bacterias a superficies ricas en carbohidratos como los eritrocitos y probablemente las células humanas intestinales (Quinn *et al.*, 1994).

### **Actividad hemoaglutinante**

El fenómeno de la hemoaglutinación fue descrito por Hirst en 1941, quien observó en un embrión de pollo la aglutinación de glóbulos rojos en un vaso sanguíneo roto, mientras realizaba pases de virus de influenza, y se define como la capacidad que tienen ciertos virus y bacterias para unir entre sí los glóbulos rojos, gracias a las proteínas que poseen en su capa externa (Neter, 1956).



Puesto que las bacterias provocan aglutinación de los eritrocitos, se han probado hasta 14 especies diferentes. Varios investigadores estudiaron la propiedad hemaglutinante de varias bacterias (Gupta *et al.*, 1958; Barua y Mukherjee, 1965). Se considera que la hemoaglutinación es característica especialmente de bacterias que pertenecen a la familia Enterobacteriaceae. David C. Old en su revisión mencionó que las bacterias con fimbrias de tipo I aglutinan fuertemente las células humanas y las de las ovejas débilmente (Old *et al.*, 1987). Debido a la presencia de fimbrias, muchas bacterias exhiben la propiedad de hemaglutinación y esto se ha utilizado como marcador epidemiológico junto con otros métodos de tipificación (Crichton y Old, 1980).

Sabemos que el primer paso de la infección es la adhesión de los microorganismos patógenos a las células del hospedero. Esta característica les permite no solo penetrar y desplegar las estrategias ofensivas para iniciar la colonización, si no contribuir a la protección y el resguardo de estos a los mecanismos de defensa tanto inmunológicos como mecánicos del hospedero; proceso que se lleva a cabo en gran medida por la interacción de adhesinas (Ofek y Doyle, 1994).

En el caso particular de *Aeromonas*, bacteria patógena oportunista, que inician la infección en barreras epiteliales susceptibles del hospedero, tanto en cepas de origen clínico como en las de procedencia ambiental se ha descrito dos tipos de fimbrias, las primeras rígidas y cortas; que suelen encontrarse en proporciones elevadas sobre la superficie celular y las segundas largas, onduladas y flexibles, en menor proporción. Estas últimas consideradas hemaglutininas con un papel importante en la adhesión bacteriana a células epiteliales, en la formación de biofilm y en la motilidad (Tomás, 2012). Al igual que se describe en las cepas enteropatógenas de *Escherichia coli*, las fimbrias con actividad hemaglutinante pueden ser inhibidas en presencia de algunos carbohidratos como manosa, fructosa o galactosa. La hemaglutinación mediada por fimbrias manosa-resistentes parece estar más relacionada a la enteropatogenicidad (Evans *et al.*, 1979).

Varios reportes sugieren que las cepas enterotoxigénicas de *Aeromonas* son potentes productoras de hemaglutininas; esta capacidad, juntamente con la

actividad hemolítica, podría servir como un indicador de la enterotoxigenicidad de las cepas que afectan al hombre (Obi *et al.*, 2007), pero al igual que la propiedad hemolítica, presenta resultados divergentes entre los estudios, en cuanto a frecuencia, especie que la expresa y procedencia de la cepa. La hemaglutinación se ha usado ampliamente para la caracterización de adhesinas; como antecedente, las hemaglutininas fimbriales asociadas a células se han reportado con un papel importante en la virulencia de *Escherichia coli* (Satterwhite *et al.*, 1978). Se han detectado patrones de hemaglutinación en cepas de *Aeromonas* spp. en medios sólidos (TSA, Agar nutritivo, Agar MacConkey, Agar BHI) (Atkinson y Trust, 1980; Burke *et al.*, 1984) evidenciando que las adhesinas de *Aeromonas* spp. pueden ser fimbriales (Atkinson y Trust, 1980) o no fimbriales (Chang *et al.*, 1985). A pesar de no conocer del todo su papel como posibles factores de virulencia, la hemaglutinación resistente a fucosa se correlacionaba bien con los aislados de origen clínicos (Burke *et al.*, 1984).

Como primer antecedente al género, las hemaglutininas solubles producidas por cepas de *Vibrio cholerae* cultivadas en medios líquidos se han informado como posibles factores de virulencia con importancia destacable (Finkelstein y Hanne, 1982).

Atkinson y Trust (1980), describieron la habilidad de hemoaglutinación producida por cepas de *A. hydrophila* de origen clínico. La hemaglutinación se correlacionó con la capacidad de adherirse a los eritrocitos humanos y las células epiteliales bucales, aunque hubo algunas diferencias aparentes en los mecanismos de unión. La hemaglutinación y la adherencia a células de origen humano se asociaron con la presencia de pilis (fimbrias). Además, estos autores también utilizaron la aglutinación de células de levadura para clasificar las adhesinas y realizaron experimentos para determinar las condiciones óptimas (pH, temperatura,  $\text{Ca}_2^+$ ,  $\text{Mg}_2^+$ , diferentes medios de cultivo) en la producción y detección de hemaglutininas, que podían ser inhibidas de manera específica por azúcares en concentraciones milimolares. La agudeza de esta especificidad se podía juzgar por la capacidad de la hemaglutinina bacteriana para reconocer diferencias estructurales bastante sutiles en el posicionamiento de grupos hidroxilo individuales

en hexosas, notando la rápida inactivación por calor (55 °C durante 5 min), indicando así que probablemente eran proteínas. Con lo anterior su sensibilidad, especificidad y la probable estructura proteica, se le atribuía una naturaleza similar a una lectina; registrando incluso que *A. hydrophila* elabora al menos dos lectinas diferentes capaces de reconocer L-fucosa o D-manosa.

Para 1984 Burke *et al.* informaron patrones de hemaglutinación de cepas de *Aeromonas* spp. en presencia de sacarosa, galactosa y manosa. Relacionaron sus resultados con la producción de enterotoxinas, el biotipo y la fuente de cada aislamiento; sugiriendo que las hemaglutininas debían considerarse factores de virulencia en bacterias de este género. Sin embargo, hasta este momento no existía un modelo experimental adecuado para definir factores de virulencia importantes en la patogénesis de la diarrea asociada a *Aeromonas*, reportando así los posibles factores de virulencia con enfermedades diarreicas mediante el uso de datos epidemiológicos.

Burke *et al.* (1986) a sus anteriores trabajos, agregaron a la relación de cepas de *A. hydrophila* aisladas de diferentes fuentes; la aglutinación de diferentes eritrocitos (humano, equino, rata y cobaya) y el efecto de los azúcares en la hemaglutinación, mencionando que la hemaglutinación de eritrocitos de humano, caballo, ratas y cobayas, particularmente era resistente a fucosa, esto sugería que lo anterior se debería considerar en la búsqueda como una característica que posiblemente contribuya a la virulencia de *Aeromonas* spp.

Posteriormente para 1985, Crichton y Walker en su esfuerzo por determinar la prevalencia y la complejidad de las hemaglutininas producidas por *Aeromonas*, realizaron pruebas de hemaglutinación con siete especies de eritrocitos frescos; enfatizando que para una identificación completa de hemaglutininas producidas por *Aeromonas* spp., las cepas deben cultivarse en una variedad de condiciones (diferentes medios de cultivo/caldo, temperatura, tiempo y pH) y analizarse con una amplia gama de especies de glóbulos rojos.

Trabajos como el de Elbashir y Millership (1989) determinaron la capacidad de aislamientos de *Aeromonas* spp. de diferentes fuentes para aglutinar eritrocitos de humano, caballo y/o cobaya y mencionaron que la capacidad de

hemoaglutinación se caracterizó además por reacciones en presencia de manosa, galactosa o fucosa. Asociando una baja concentración de sal con la falta de agregación e incapacidad de aglutinar células de levadura y eritrocitos humanos, pero no de caballo o cobaya.

Singh *et al.* (1993) sugieren que la adhesión probablemente esté mediada por una variedad de factores de virulencia (fimbrias) que pueden o no ser una hemaglutinina. La HA se probó utilizando eritrocitos fijados de pollo.

Se ha mencionado además que el mecanismo de la patogénesis de *Aeromonas* es multifactorial y que la distribución de cepas de este género productoras de enterotoxina, citotoxina y hemolisina no está relacionada con el origen del aislamiento. El propósito de realizar ensayos de hemaglutinación es determinar la adherencia de cepas de *Aeromonas* en la superficie de los eritrocitos y establecer si los patrones de inhibición de la hemaglutinación están correlacionados con cualquier fuente de aislamiento o con especies (Pal *et al.*, 1992).

## JUSTIFICACIÓN

Con base en lo anterior este trabajo surge de la necesidad de definir la actividad hemoaglutinante en especies del género *Aeromonas* (*A. allosaccharophila*, *A. bestiarum*, *A. caviae*, *A. hydrophila*, *A. lusitana*, *A. media*, *A. popoffi*, *A. salmonicida*, *A. sobria*, *A. veronii*). En este sentido adquiere importancia el estudio de los mecanismos por los cuales una bacteria causa enfermedad; especialmente de aquellos factores que le confieren adherencia y que mediante la capacidad de aglutinar eritrocitos pudieran representar indicadores del estado de salud de los animales. Todo ello provee información relevante de los fundamentos sobre los cuales se llevan a cabo los procesos biológicos a nivel celular. El estudio de estos factores y sus mecanismos de reconocimiento comienza a ser una herramienta útil para el diseño de mejores métodos de prevención y diagnóstico.

## HIPÓTESIS

De las nueve especies evaluadas del género *Aeromonas*, con base en la literatura científica al menos las especies *Aeromonas hydrophila*, *Aeromonas salmonicida*, *Aeromonas sobria*, *Aeromonas caviae* mostrarán actividad hemoaglutinante.

# OBJETIVOS

## OBJETIVO GENERAL

Determinar la actividad hemoaglutinante de aislamientos de nueve especies del género *Aeromonas*.

## OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Determinar actividad hemoaglutinante de aislamientos del género *Aeromonas*.

Determinar la relación entre la actividad hemoaglutinante y la especie de *Aeromonas*.

## MATERIAL Y MÉTODO

### Diseño experimental

El trabajo se realizó bajo un diseño experimental descriptivo, estudio que tuvo el propósito de determinar la actividad hemoaglutinante de aislamientos de *Aeromonas* spp., en una población de aislamientos de nueve especies de *Aeromonas* (*A. bestiarum*, *A. caviae*, *A. hydrophila*, *A. lusitana*, *A. media*, *A. popoffi*, *A. salmonicida*, *A. sobria* y *A. veronii*) previamente identificadas por Vega-Sánchez *et al.* (2014a). Se elaboró antígeno inactivado para ensayos de hemaglutinación.

### Aislamientos bacterianos

Para el desarrollo de la investigación, se analizaron 28 aislamientos de nueve especies de *Aeromonas* spp., previamente identificadas por Vega-Sánchez *et al.* (2014a), los cuales incluyen especies que se han aislado de muestras clínicas, ambientales y alimentos (Cuadro 5).

Espece	Aislamiento	Origen	Fuente de agua
<i>A. bestiarum</i>	ESV 375	Branquias	Río
	ESV 352	Riñón	
	ESV 353	Bazo	
	ESV 365	Lesión	
<i>A. caviae</i>	ESV 378	Branquias	Ojo de agua
<i>A. hydrophila</i>	ESV 399	Branquias	Manantial
	ESV 356		
	ESV 394	Lesión	
	ESV 380	Intestino	
<i>A. lusitana</i>	ESV 351	Branquias	Arroyo
	ESV 398	Bazo	



<i>A. media</i>	ESV 360	Riñón	Río
	ESV 382	Branquias	
	ESV 383	Intestino	
<i>A. popoffi</i>	ESV 354	Riñón	Arroyo
	ESV 358	Branquias	
	ESV 359	Intestino	
<i>A. salmonicida</i>	ESV 396	Lesión	Manantial
<i>A. sobria</i>	ESV 361	Branquias	Río
	ESV 369	Riñón	
	ESV 355	Intestino	
<i>A. veronii</i>	ESV 377	Branquias	Manantial
	ESV 400		
	ESV 373	Intestino	
	ESV 379		
	ESV 362		
	ESV 397		
	ESV 391		

**Cuadro 5.** Especies de *Aeromonas* spp. a empleadas en el estudio.

### Medio de cultivo

Para el aislamiento y mantenimiento de las cepas se inocularon placas de Agar tripticasa soya (TSA por sus siglas en inglés: trypticase soy agar, marca MCD LAB), 40 g diluido en 1 l de agua, calentando para disolver, y se incubaron durante 24 horas a 24 °C. Posteriormente se cultivaron en matraces con caldo infusión cerebro corazón (BHI por sus siglas en inglés: brain heart infusion, marca MCD LAB) 37 g diluido en 1 l de agua e incubaron a 24 °C por 24 horas.

## **Antígeno hemoaglutinante**

Se realizaron dos tratamientos para obtener antígeno hemoaglutinante. Primero, se inoculó cada aislamiento en placas de TSA a 24 °C durante 24 horas; con ayuda de un asa bacteriológica se colectó la bacteria y se resuspendió cada aislamiento en 1 ml de PBS con timerosal en tubo eppendorf estéril y se homogeneizó con ayuda del vortex durante 10 segundos, enseguida se centrifugó a 12,000 revoluciones por minuto durante 5 minutos para lavarlo, lo anterior entre dos y tres veces. Para el segundo antígeno también se inoculó cada aislamiento en placas de TSA a 24 °C durante 24 horas, las colonias se cosecharon con ayuda de un asa bacteriológica y se inocularon matraces de 250 ml con caldo BHI incubadas a 24 °C durante 24 horas para el primer experimento y más de 24 horas para el segundo experimento; posteriormente en cada experimento de este segundo tratamiento se inactivó con timerosal y se dejó una noche a 24 °C. El medio se centrifugó a 10,000 revoluciones por minuto (rpm) durante 20 min. Se decantó el sobrenadante y se agregó PBS con timerosal para resuspender el botón y lavar, lo anterior entre dos y tres veces. También se sonicaron (Sonifier 250, Branson, Emerson Electric Co., Ferguson, MO, USA) en hielo por dos ciclos de 5 segundos (60% pulsos output; potencia output 5) los antígenos obtenidos del primer tratamiento y del segundo experimento del segundo tratamiento.

## **Eritrocitos fijados con glutaraldehído**

Para obtener eritrocitos fijados se colectó sangre de pollo en solución Alsever a un volumen 50/50, se lavó con NaCl 0.15 M (2,000 rpm/5 min a 4 °C) y con agua destilada (2,000 rpm/5 min), se fijaron con una solución de glutaraldehído y solución de sales, con ligera agitación en intervalos de 10 minutos aproximadamente. Se resuspendió la solución de eritrocitos en PBS con 0.01% de timerosal a concentración no mayor del 30%. Se almacenaron en refrigeración (4 °C) hasta su utilización (Soriano-Vargas *et al.*, 2001).

## **Solución Alsever**

Contiene 2.05 g de dextrosa, 0.8g de citrato de sodio, 0.055 g de ácido cítrico, 0.42 g de cloruro de sodio (NaCl), por cada 100 ml de agua destilada, se filtró en un tubo estéril y almaceno a 4 °C hasta su utilización (Blackall *et al.*, 1990).

## **PBS con timerosal**

Contiene 8.00 g de NaCl, 0.2 g de KCl, 1.44 g de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.24 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, por cada 1,000 ml de agua destilada, se ajustará pH (7.2-7.4) y esterilizará. Después se agregará timerosal (0.01%) (Blackall *et al.*, 1990).

## **Curvas de crecimiento**

Con la finalidad de definir el mejor tiempo para la obtención del antígeno hemaglutinante se realizaron curvas de crecimiento, para lo cual, se inoculó la bacteria de cultivo fresco a una concentración del 1% en matraces de 250 ml, y se procedió a incubar a 24 °C por 18 horas. Se tomó una muestra de 10 ml cada periodo de tiempo desde cada hora, hasta concluir las 18 horas de incubación y se midió la turbidez con ayuda de un espectrofotómetro. Finalmente se realizó un conteo en placa de las muestras, para determinar el crecimiento bacteriano en el tiempo establecido.

Los datos obtenidos fueron tabulados y se procedió a la realización de las respectivas curvas de crecimiento, en las cuales se visualizaron los tiempos de crecimiento máximos necesarios para la realización de las pruebas de hemoaglutinación.

## **Prueba de hemoaglutinación**

La preparación de la prueba de hemoaglutinación de los antígenos se diluyó en serie doble en placas de microtitulación de fondo redondo. Los títulos de hemaglutinación de los antígenos se determinaron con volúmenes de 50 µl de antígeno en un método de microdilución en placa. Se realizaron diluciones dobles seriadas del antígeno con PBS (pH 7.2) diluido 1:10 con solución PBS que contenía 0.01% (peso/vol) de timerosal. Los eritrocitos fijados de pollo (2% v/v) se agregaron a cada dilución para después incubar las placas durante 20 minutos a temperatura ambiente. Los títulos hemoaglutinantes se expresaron como el recíproco de la máxima dilución en la que se observa completa hemoaglutinación de los eritrocitos (Eaves *et al.*, 1989; Honda *et al.*, 1989).

## **Análisis estadístico**

Para el análisis estadístico de los datos se aplicó la prueba de  $\chi^2$  (chi cuadrado) con un nivel de confiabilidad de 95% ( $p < 0.05$ ). Los datos se integraron en cuadros de frecuencia y cuadros de contingencia para su análisis, los mismos incluyeron las variables: actividad hemoaglutinante y especie de *Aeromonas* spp., para así determinar si las variables estaban relacionadas o no.

## RESULTADOS

Una vez que el cuadro de contingencia (Cuadro 6) que relaciona nuestras dos variables esta expresado en porcentajes podremos pasar a su lectura y decir que a más diferencia de porcentajes en cada fila (entre las categorías de la variable en columnas), más fuerte será la relación entre las variables. Si los porcentajes en una misma fila son muy similares no habrá relación entre las variables. Si hay diferencias entre los porcentajes habrá relación entre las variables.

### Especies de *Aeromonas* (%)

Hemoaglutina	<i>bestiarum</i>	<i>caviae</i>	<i>hydrophila</i>	<i>lusitana</i>	<i>media</i>	<i>popoffi</i>	<i>salmonicida</i>	<i>sobria</i>	<i>veronii</i>	Total
Si	50	100	75	100	100	67	0	33	86	71
No	50	0	25	0	0	33	100	67	14	29
<b>Total</b>										100

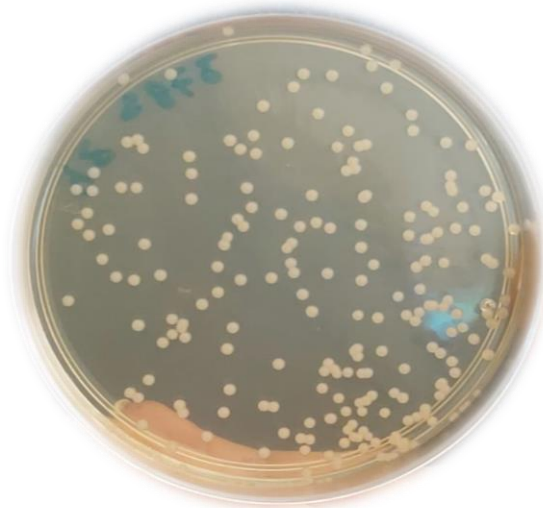
**Cuadro 6.** Cuadro de contingencia para evaluar dependencia de la actividad hemoaglutinante de especie en *Aeromonas* spp. mediante el análisis de la distribución de porcentajes.

## Curvas de Crecimiento

Se realizó una curva patrón (18 h) de cada especie (*A. caviae*, *A. bestiarum*, *A. hydrophila*, *A. media*, *A. lusitana*, *A. salmonicida*, *A. veronii*, *A. sobria* y *A. poppoffii*) con lo que pudimos identificar puntos críticos en las fases de crecimiento de los cultivos bacterianos; autores destacan el estado de activación de los diferentes factores de virulencia en diferentes fases del crecimiento bacteriano. La expresión de algunos factores de virulencia (T3SS) disminuye significativamente de la fase de crecimiento exponencial a la estacionaria, mientras que la expresión de algunas enzimas aumenta.

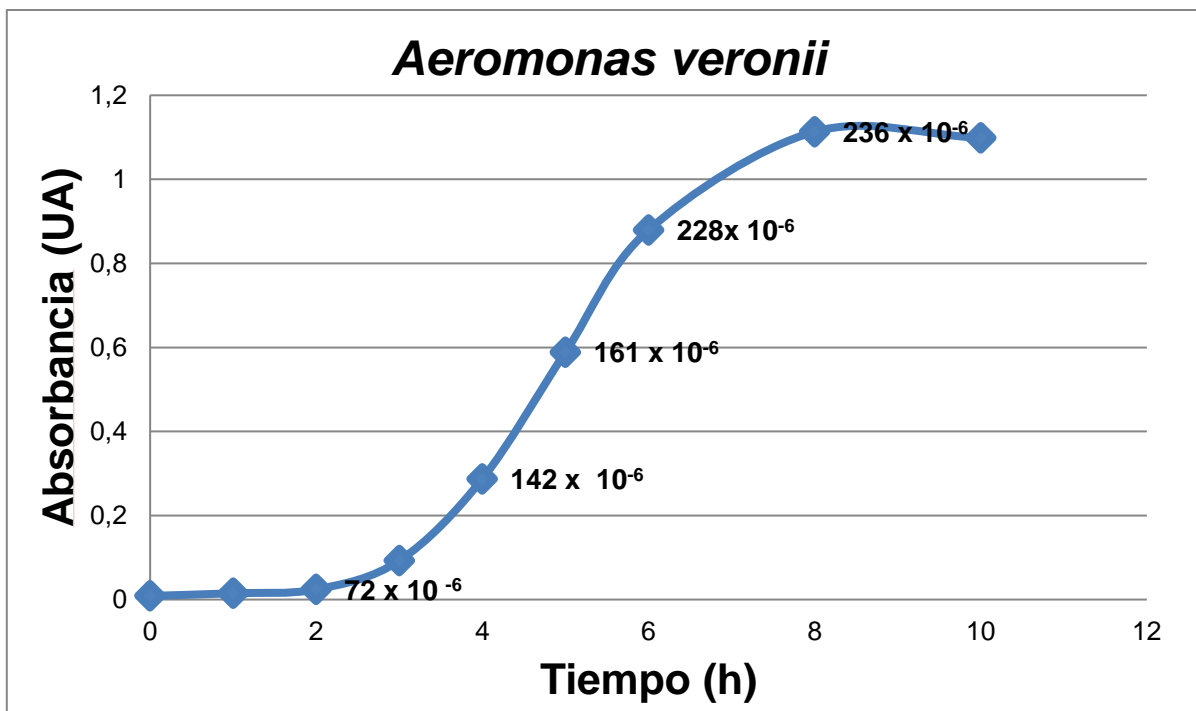
Al someter a las bacterias a condiciones de estrés; permaneciendo en un cultivo cerrado, están obligadas a desarrollar mecanismos de comunicación basados en la expresión y reconocimiento de moléculas señal que les permita sincronizar la expresión de genes con la densidad poblacional.

Una vez inoculados los matraces con las diferentes cepas, en intervalos de cada hora y tres horas hasta las 18, se tomaron muestras para realizar el conteo de colonias y medición de turbidez del caldo (Figura 3) para la elaboración de la curva de crecimiento, e identificación de las diferentes fases de crecimiento.



**Figura 3.** Placa con colonias de *Aeromonas caviae*.

En lo correspondiente a *A. veronii* (Figura 4) se pudo observar las diferentes fases de crecimiento, además de diferenciar el tiempo de crecimiento máximo que va de la hora 4 a la 8, iniciando en esta ultima la fase estacionaria.



**Figura 4.** Curva de crecimiento *Aeromonas veronii*.

Lo anterior y los resultados registrados en el Cuadro 7 reflejan la variedad existente entre especies de *Aeromonas* en cuanto a la actividad hemoaglutinante reportada, incluso entre aislamientos de la misma especie no se visualiza similitud en los títulos HA, pues aun dentro de la misma especie bajo las mismas condiciones de crecimiento (tiempo, temperatura y concentración) esta propiedad no es particular de la misma.

El hecho de haber realizado una curva patrón de las seis especies nos dio la oportunidad en primer punto de monitorear el comportamiento de esta bacteria en su crecimiento; así al momento de realizar la prueba de HA conocimos la cantidad de bacteria en el antígeno al momento de realizar la técnica. Como segundo punto, aunque no es algo totalmente contundente pues se requieren más estudios; la

lectura de los títulos HA obtenidos de antígenos de cultivos de más de 24 horas son más altos, que los títulos registrados de antígenos cultivados durante 24 horas.

Si bien no todos los aislamientos de la misma especie mostraron actividad hemoaglutinante al menos un aislamiento de *A. bestiarum* (365), *A. sobria* (369), *A. veronii* (373), *A. hydrophilla* (399), *A. caviae* (378), *A. lusitana* (351) y *A. media* (398) registraron títulos HA más altos al realizar la técnica con antígeno obtenido de medio de cultivo de más de 24 horas de incubación. Es importante lo anterior pues pudiera sugerirnos que al momento de someter a las bacterias a condiciones de estrés; permaneciendo en un cultivo cerrado, estamos obligándolas a desarrollar mecanismos de comunicación basado en la expresión y reconocimiento de moléculas señal que les permita sincronizar la expresión de genes con la densidad poblacional y en este caso la hemoaglutinación pudiera ser más evidente en este momento.

De manera adicional el antígeno obtenido del aislamiento 396 de *A. salmonicida* a partir de un cultivo incubado a 37 °C por más de 24 horas sin tratamiento previo (lavados), mostro actividad hemoaglutinante (16 UH) pero a temperatura ambiente el titulo fue más alto (32 UH).



		Sonicado					
	Origen	Caldo (24 h)	Caldo (>72 h)	Placa (24 h)	Caldo (>72 h)	Placa (24 h)	
550 nm, [1.6] ,10 <sup>6</sup> (bacterias/ml)							
Aislamiento		UH	UH	UH	UH	UH	
375		0	0	0	0	0	
352	<i>Aeromonas bestiarum</i>	0	0	0	0	0	
353	Lesión	16	4	0	0	0	
365		0	32	2	0	0	
354		2	8	0	0	0	
358	<i>Aeromonas popoffi</i>	8	2	0	0	2	
359		0	0	0	0	2	
361		0	0	0	0	0	
369	<i>Aeromonas sobria</i>	Riñón	2	4	2	32	0
355		0	0	4	0	0	
377	Branquias	0	4	16	2	0	
373	Intestino	64	16	2	8	2	
379	<i>Aeromonas veronii</i>	0	8	0	2	0	
362		2	0	16	0	0	

400		Branquias	8	8	2	2	0
391			0	8	0	4	0
397			0	0	0	0	0
399		Branquias	0	16	2	16	0
394	<i>Aeromonas hydrophila</i>		0	0	0	2	2
356			0	32	0	0	0
380		Intestino	8	8	2	0	0
378	<i>Aeromonas caviae</i>		0	16	0	0	0
351	<i>Aeromonas lusitana</i>	Branquias	2	8	8	0	0
398		Bazo	0	2	64	8	0
360	<i>Aeromonas media</i>	Riñón	0	32	4	8	2
382			0	4	0	0	2
383			0	16	0	0	0
396	<i>Aeromonas salmonicida</i>	Lesión	0	0	0	0	0

**Cuadro 7.** Actividad hemoaglutinante de aislamientos de *Aeromonas* spp.

Al preparar antígeno inactivado de los aislamientos 396 (*A. salmonicida*), 351 (*A. lusitana*) y 373 (*A. veronii*) que como muestra la tabla fueron los aislamientos que bajo diferentes condiciones siguen mostrando títulos significativos para el análisis del estudio, observamos que al no lavar y realizar directamente la prueba de HA los títulos aumentaron (Anexo 2).

Para: maricruzgonzalezgomez@gmail.com, Celene Salgado Miranda,  
vicentevgsa@yahoo.com.mx, Edgardo Soriano Vargas

ocultar

Responder a: jvms@ipecc-pub.co.jp

The Journal of Veterinary Medical Science - Manuscript ID JVMS-20-0661



18-Nov-2020

Dear Dr Soriano-Vargas:

Your manuscript entitled "Hemagglutinating activity of Aeromonas isolates obtained from farmed rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) in Mexico" has been successfully submitted online and is presently being given full consideration for publication in The Journal of Veterinary Medical Science.

Your manuscript ID is JVMS-20-0661.

\*\*\*\*\*

Please be aware that there may be delays processing and reviewing manuscripts due to disruptions caused by the COVID-19 pandemic.

Thank you for your understanding and patience during this time.

\*\*\*\*\*

Please mention the above manuscript ID in all future correspondence or when calling the office for questions. If there are any changes in your street address or e-mail address, please log in to ScholarOne Manuscripts at <https://mc.manuscriptcentral.com/jvms> and edit your user information as appropriate.

You can also view the status of your manuscript at any time by checking your Author Center after logging in to <https://mc.manuscriptcentral.com/jvms>.

Thank you for submitting your manuscript to The Journal of Veterinary Medical Science.

Sincerely,  
Editorial Office  
The Journal of Veterinary Medical Science



**Hemagglutinating activity of *Aeromonas* isolates obtained from farmed rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) in Mexico**

Journal:	<i>The Journal of Veterinary Medical Science</i>
Manuscript ID	Draft
Manuscript Type:	Note
Date Submitted by the Author:	n/a
Complete List of Authors:	Gómez-González, Maricruz; UAEM Salgado-Miranda, Celene; Universidad Autonoma del Estado de Mexico, Centro de Investigación y Estudios Avanzados en Salud Animal Vega-Sánchez, Vicente; Universidad Autonoma del Estado de Hidalgo, ICAP-AAMVZ Soriano-Vargas, E.; Universidad Autonoma del Estado de Mexico, Centro de Investigación y Estudios Avanzados en Salud Animal
Keywords:	Bacterial infection, erythrocytes, Fish, Virulence factor, diagnosis
Category:	Bacteriology

SCHOLARONE™  
Manuscripts

## Análisis estadístico

### Valores observados

Aislamiento de <i>Aeromonas</i>	Actividad hemoaglutinante		Total
	SI	NO	
<i>A. bestiarum</i>	2	2	4
<i>A. popoffi</i>	2	1	3
<i>A. sobria</i>	1	2	3
<i>A. veronii</i>	6	1	7
<i>A. hydrophila</i>	3	1	4
<i>A. caviae</i>	1	0	1
<i>A. lusitana</i>	1	0	1
<i>A. media</i>	4	0	4
<i>A. salmonicida</i>	0	1	1
<b>Total</b>	20	8	28

**Cuadro 8.** Relación entre actividad hemoaglutinante y especie de valores observados.

### Frecuencias esperadas

Aislamiento de <i>Aeromonas</i>	Actividad hemoaglutinante		Total
	SI	NO	
<i>A. bestiarum</i>	2.85	1.14	4
<i>A. popoffi</i>	2.14	0.86	3
<i>A. sobria</i>	2.14	0.86	3
<i>A. veronii</i>	5	2	7
<i>A. hydrophila</i>	2.86	1.14	4
<i>A. caviae</i>	0.71	0.29	1
<i>A. lusitana</i>	0.71	0.29	1
<i>A. media</i>	2.86	1.14	4
<i>A. salmonicida</i>	0.71	0.29	1
<b>Total</b>	20	8	28

**Cuadro 9.** Relación entre actividad hemoaglutinante y especie de frecuencias esperadas.

$$\alpha = 0.05$$

$$\chi^2_{\text{calculado}} = 8.63$$

$$\text{Grados de libertad}(gl) = 8$$

$$\chi^2_{\text{critico}} = 15.51$$

Teniendo en cuenta los valores obtenidos y considerando lo siguiente:

**H0 (nula)** = Parámetros independientes

**Se cumple cuando:**  $\chi^2_{\text{calculado}} < \chi^2_{\text{critico}}$

**H1 (alternativa)** = Parámetros dependientes

**Se cumple cuando:**  $\chi^2_{\text{calculado}} > \chi^2_{\text{critico}}$

Por lo que tenemos:

$$\chi^2_{\text{calculado}} = 8.632 < \chi^2_{\text{critico}} = 15.507$$

Cumpléndose entonces la H0, la actividad hemoaglutinante y la especie en *Aeromonas* son variables independientes por lo tanto la actividad hemoaglutinante en bacterias del género *Aeromonas* no es dependiente de especie.

## DISCUSIÓN GENERAL

A partir de los hallazgos encontrados, rechazamos la hipótesis alternativa general que establece que existe relación de dependencia entre la actividad hemoaglutinante y especie en *Aeromonas* spp.

El presente estudio es la primera investigación que determina la actividad hemaglutinante de *Aeromonas* spp. utilizando la técnica de microdilución en placa con eritrocitos de pollo fijados sin la intervención de azúcares y con más de tres especies del género. Observamos así las diferencias en la capacidad de aglutinar los eritrocitos fijados de pollo fijados por los 28 aislamientos que incluían las nueve especies de *Aeromonas*, evidenciando que algunas de las cepas estudiadas tienen la capacidad de aglutinar eritrocitos de aves sin seguir patrones específicos dependientes por especie. Con lo anterior lo reportado por Hashimoto *et al.* (1971), donde mencionan que al fijar con formaldehído se incrementaba la actividad hemoaglutinante de *Aeromonas hydrophila*, mediada por fimbrias (constantes en longitud y ancho) del tipo manosa resistente, nos sirve como antecedente para evidenciar la importancia de nuestra investigación, pues es necesario considerar lo diverso que es el género y a pesar de contar con sus resultados, en la actualidad se necesitan incluir más de una especie para aplicar las técnicas y no limitar los resultados. Pues en nuestra investigación a pesar de utilizar eritrocitos fijados de pollo con glutaraldehído aislamientos de la misma especie (*Aeromonas hydrophila*) no mostraron aglutinación evidente.

Nuestros resultados guardan relación con lo que sostienen Elbashir y Millership (1989), para la actividad hemaglutinante de aislamientos de *Aeromonas* spp. de diferentes fuentes; quienes registraron ocho patrones de hemaglutinación utilizando tres tipos de eritrocitos (humano, caballo y conejillo de indias), los cuales mostraron que no existía asociación estadísticamente significativa entre el patrón de hemaglutinación y la especie en este género bacteriano. De igual manera Singh y Sanyal (1993) mencionan que la actividad hemaglutinante causada por aislamientos de *Aeromonas* spp., no estaba relacionada con la fuente del aislamiento, pero se dio con mayor proporción en aislamientos de *A. hydrophila* que

en *A. sobria* o *A. caviae*. Mostrando una correlación parcial entre su actividad hemaglutinante o sensibilidad al suero y enterotoxigenicidad, pero las propiedades probablemente no estaban genéticamente vinculadas (especie y fuente). Por tanto, su observación de aislamientos resistentes al suero y el potencial enterotoxigénico de los hemaglutinantes, sugiere que estas dos propiedades pueden mejorar la virulencia de este género. Sin embargo, no se observó correlación entre hemaglutinación o sensibilidad al suero y especies o fuente del microorganismo.

Además, con el objetivo de determinar la presencia de actividad citotóxica y hemaglutinante en aislamientos de *Aeromonas* spp. de carne de cordero procesada y corderos sacrificados, Majeed y Macrae (1994) mostraron también que la actividad hemaglutinante se encontró con frecuencia en *Aeromonas* móviles, independientemente de su especie. Pal *et al.* (1992) quienes investigaron los rasgos de virulencia de aislamientos de *Aeromonas* en relación con la especie y fuente; reportaron que la hemaglutinación de los eritrocitos (humanos), no estaba relacionada con la fuente de aislamiento o producción de enterotoxinas, citotoxinas o hemolisinas, pero sí parecía estar relacionada con la especie. Sin embargo, finalmente concluyen que el mecanismo de patogénesis de *Aeromonas* es multifactorial y evidentemente no está relacionado con la fuente de aislamiento ni con la especie.

Es importante mencionar el antecedente donde Atkinson y Trust (1980) declararon que las cepas enterotoxigénicas de *A. hydrophila* aglutinan fuertemente las células sanguíneas humanas, y Burke *et al.* (1984) correlacionaron el patrón de hemaglutinación con la fuente de *Aeromonas*, sin mencionar relación con el género. Sin embargo, debemos destacar la importancia de estudios que difieren con nuestros resultados, tal es el caso de Nishikawa y Kishi en 1988, quienes identificaron el patrón de hemaglutinación por el método de Burke, pero sus resultados sugerían que sus patrones de hemoaglutinación no se correlacionaron con la fuente, aunque sí con la especie.

En cuanto al método para este trabajo al igual que el de Singh *et al.* (1993), la actividad hemaglutinante se probó utilizando eritrocitos de pollo fijados, teniendo como antecedente el método de Atkinson y Trust (1980). Singh *et al.* (1993),



registraron para la mayoría de sus aislamientos ambientales de eritrocitos humanos hemaglutinados inhibición por manosa o fucosa o por ambos (independientemente); sin embargo, la mayoría de los aislamientos clínicos no causaron aglutinación bajo las mismas condiciones. También muestran que los aislados no hemaglutinantes y hemaglutinantes de *Aeromonas* son capaces de adherirse y multiplicarse en el intestino. Por lo tanto, sugieren que la actividad de hemaglutinación no es un criterio esencial para la adhesión y multiplicación del microorganismo. Sin embargo, para este momento, nuestro estudio sugiere que, si es importante para el mecanismo de patogenicidad que poseen estas bacterias, pues a través del tiempo y numerosos esfuerzos y cada vez más evidencias muestran el potencial patogénico que ha desarrollado *Aeromonas* y su capacidad para adaptarse a numerosos ambientes.

Para el experimento de la cinética de crecimiento con la curva patrón para seis especies de *Aeromonas* mostró la posible dependencia de la expresión de hemaglutininas (adhesinas) y la interacción con los receptores de eritrocitos en las diferentes fases de crecimiento (después de las primeras horas de haber inoculado nuestros matraces), pues se reporta que la expresión de ciertos factores de virulencia disminuye significativamente de la fase de crecimiento exponencial a la estacionaria, mientras que la expresión de algunas enzimas aumenta.

Se realizaron los tratamientos con la finalidad de obtener condiciones óptimas de producción de antígeno hemoaglutinante, sin embargo, demostramos que nos es suficiente para el género, pues la hemoaglutinación ocurre de igual manera tanto en placa como en caldo (24 h) para algunos aislamientos de especies como *A. sobria*, *A. veronii*, *A. hydrophila* y *A. lusitana*, solo que con diferentes títulos HA, caso contrario de *A. bestiarum* y *A. popoffii*, con títulos HA más altos en caldo y no en placa. El tiempo establecido en el segundo tratamiento no fue determinante pues solo incrementaron los títulos HA en los mismos aislamientos de las mismas especies.

A pesar de poseer la información anterior, se desconoce con exactitud cómo es que estos antígenos hemaglutinantes particularmente de este género bacteriano intervienen en la patogenicidad e inmunogenicidad de *Aeromonas*, como se ha demostrado previamente para otras bacterias patógenas. Lo anterior nos deja con

la posibilidad de seguir realizando trabajos que nos permitan conocer de manera precisa la intervención de estos mecanismos y factores.

## CONCLUSIONES

- La actividad hemoaglutinante en bacterias del género *Aeromonas* no fue dependiente de especie.
- A pesar de establecer condiciones óptimas de crecimiento para *Aeromonas*, su diversidad (especie) hace complejo el empleo de un único tratamiento para obtener antígeno y que sea suficiente para conocer su actividad hemoaglutinante.
- Según la información actual sobre la patogenicidad del género *Aeromonas*, debemos suponer que las infecciones que producen estas bacterias tanto en humanos como en animales seguirán siendo un gran problema de salud en el futuro. La distribución ubicua de estas bacterias y la creciente población, facilitarán este problema.

## REFERENCIAS

- Abbott SL, Cheung WKW, Janda JM. The genus *Aeromonas*: Biochemical characteristics, atypical reactions, and phenotypic identification schemes. *J Clin Microbiol* 2003; 41: 2348–2357.
- Abu-Elala N, Abdelsalam M, Marouf S, Setta A. Comparative analysis of virulence genes, antibiotic resistance and *gyrB*-based phylogeny of motile *Aeromonas* species isolates from Nile tilapia and domestic fowl. *Lett Appl Microbiol* 2015; 61: 429–436.
- Adams D, Atkinson HM, Woods WH. *Aeromonas hydrophila* typing scheme based on patterns of agglutination with erythrocytes and yeast cells. *J Clin Microbiol* 1983; 17: 422–427.
- Ali A, Carnahan A, Altwegg M, Luthy-Hottenstein J, Josep SW. *Aeromonas bestiarum* sp. nov. (formely genomospecies DNA group 2 *Aeromonas hydrophila*), a new species isolated from non-human sources. *Med Microbiol Lett* 1996; 5: 156–165.
- Al-Jassim N, Ansari MI, Harb M, Hong PY. Removal of bacterial contaminants and antibiotic resistance genes by conventional wastewater treatment processes in Saudi Arabia: Is the treated wastewater safe to reuse for agricultural irrigation?. *Water Res* 2015; 73: 277–290.
- Allen DA, Austin B, Colwell RR, Gavini F, Ferragut C, Izard D, Trinel PA, Leclerc H, Lefebvre B, Mossel DAA. *Aeromonas media*, a new species isolated from river water. *Int J Syst Bacteriol* 1983; 33: 599–604.
- Alperi A, Figueras MJ. Human isolates of *Aeromonas* possess Shiga toxin genes (*stx1* and *stx2*) highly similar to the most virulent gene variants of *Escherichia coli*. *Clin Microbiol Infect* 2010a; 16: 1563–1567.
- Alperi A, Martínez-Murcia AJ, Ko WC, Monera A, Saavedra MJ, Figueras MJ. *Aeromonas taiwanensis* sp. nov. and *Aeromonas sanarellii* sp. nov., clinical species from Taiwan. *Int J Syst Evol Microbiol* 2010c; 60: 2048–2055.
- Alperi A, Martínez-Murcia AJ, Monera A, Saavedra MJ, Figueras MJ. *Aeromonas fluvialis* sp. nov., isolated from a Spanish river. *Int J Syst Evol Microbiol* 2010b; 60: 72-77.
- Araujo RM, Parés R, Lucena F. The effect of terrestrial effluents on the incidence of *Aeromonas* spp. in coastal waters. *J Appl Bacteriol* 1990; 69: 439–444.

- Aravena-Román M, Beaz-Hidalgo R, Inglis TJJ, Riley TV, Martínez-Murcia AJ, Chang BJ, Figueras MJ. *Aeromonas australiensis* sp. nov., isolated from irrigation water. *Int J Syst Evol Microbiol* 2013; 63: 2270–2276.
- Aravena-Román M, Chang BJ, Riley TV, Inglis TJ. Phenotypic characteristics of human clinical and environmental *Aeromonas* in Western Australia. *Pathology* 2011; 43: 350–356.
- Atkinson HM, Trust TJ. Hemagglutination Properties and Adherence Ability of *Aeromonas hydrophila*. *Infect Immun* 1980; 27:938–946.
- Attridge SR, Rowley D. The role of the flagellum in the adherence of *Vibrio cholerae*. *J. Infect Dis* 1983; 147: 864–872.
- Awan F, Dong Y, Wang N, Liu J, Ma K, Liu Y. The fight for invincibility: environmental stress response mechanisms and *Aeromonas hydrophila*. *Microb Pathog* 2017; 116: 135–145.
- Barnett TC, Kirov SM, Strom MS, Sanderson K. *Aeromonas* spp. possess at least two distinct type IV pilus families. *Microb Pathog* 1997; 23: 241–247.
- Barua D, Mukherjee AC. Haemagglutinating activity of eltor vibrios and its nature. *Indian J Med Res* 1965; 53: 399–404.
- Baruah FK, Ahmed NH, Grover RK. Surgical site infection caused by *Aeromonas hydrophila* in a patient with underlying malignancy. *J Clin Diagn Res* 2015; 9: 1–2.
- Beaz-Hidalgo R, Alperi A, Buján N, Romalde JL, Figueras MJ. Comparison of phenotypical and genetic identification of *Aeromonas* strains isolated from diseased fish. *Syst Appl Microbiol* 2010, 33: 149–153.
- Beaz-Hidalgo R, Alperi A, Figueras MJ, Romalde JL. *Aeromonas piscicola* sp. nov., isolated from diseased fish. *Syst Appl Microbiol* 2009; 32: 471–479.
- Beaz-Hidalgo R, Figueras MJ. *Aeromonas* spp. whole genomes and virulence factors implicated in fish disease. *J Fish Dis* 2013; 36: 371–388.
- Beaz-Hidalgo R, Hossain MJ, Liles MR, Figueras MJ. Strategies to avoid wrongly labelled genomes using as example the detected wrong taxonomic affiliation for *Aeromonas* genomes in the genbank database. *PLoS One* 2015a; 10: 1–13.
- Beaz-Hidalgo R, Latif-Eugenin F, Hossain M, Berg K, Niemi R, Rapala J, Lyra C, Liles M, Figueras MJ. *Aeromonas aquatica* sp. nov., *Aeromonas finlandiensis* sp. nov. and

- Aeromonas lacus* sp. nov. isolated from Finnish waters associated with cyanobacterial blooms. *Syst Appl Microbiol* 2015b; 38: 161–168.
- Beaz-Hidalgo R, Martinez-Murcia A, Figueras MJ. Reclassification of *Aeromonas hydrophila* subsp. *dhakensis* and *Aeromonas aquariorum* as *Aeromonas dhakensis* sp. nov. comb nov. and emendation of the species *Aeromonas hydrophila*. *Syst Appl Microbiol* 2013; 36: 171–176.
- Beaz-Hidalgo R, Shakèd T, Laviad S, Halpern M, Figueras MJ. Chironomid egg masses harbour the clinical species *Aeromonas taiwanensis* and *Aeromonas sanarellii*. *FEMS Microbiol Lett* 2012; 337: 48–54.
- Bergh PV, Frey J. *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida* in the light of its type-three secretion system. *Microb Biotechnol* 2014; 7: 381–400.
- Bernheimer AW, Avigad LS. Partial characterization of aerolysin, a lytic exotoxin from *Aeromonas hydrophila*. *Infect Immun* 1974; 9: 1016–1021.
- Beveridge TJ, Pouwels HP, Sara M, Kotiranta A, Lounatmaa K, Karia K, Kerosuo E, Haapasalo M, Egelseer EM, Schocher I, Sleytr UB, Morelli L, Callegari ML, Nomellini JF, Bingle WH, Smit J, Leibovitz E, Lemaire M, Miras I, Salamitou S, Béguin P, Ohayon H, Gounon P, Matuschek M, Sahm K, Bahl H, Grogono-Thomas R, Dworkin J, Blaser MJ, Woodland RM, Newell DG, Kessel M, Koval SF. Function of S-layers. *FEMS Microbiol* 1997; 20: 99–149.
- Beyers BR, Massad G, Barghouthi S, Arceneaux JEL. Iron Acquisition and Virulence in the Motile *Aeromonads*: Siderophore-Dependent and Independent Systems. *Experientia* 1991; 47: 416–418.
- Bingle LE, Bailey CM, Pallen MJ. Type VI secretion: A beginner's guide. *Curr Opin Microbiol* 2008; 11: 3–8.
- Blackall PJ, Eaves LE, Rogers DG. Proposal of a new serovar and altered nomenclature for *Haemophilus paragallinarum* in the Kume hemagglutinin scheme. *J Clin Microbiol* 1990; 28: 273–275.
- Borrell N, Figueras MJ, Guarro J. Phenotypic identification of *Aeromonas* genomospecies from clinical and environmental sources. *Can J Microbiol* 1998; 44: 103–108.

- Boussaid A, Baleux B, Hassani L, Lesne J. *Aeromonas* species in stabilization ponds in the arid region of Marrakesh, Morocco, and relation to fecal pollution and climatic factors. *Microb Ecol* 1991; 21: 11–20.
- Burke V, Cooper M, Robinson J. Haemagglutination patterns of *Aeromonas* spp. related to species and source of strains. *Aust J Exp Biol Med Sci* 1986; 64: 563–570.
- Burke V, Cooper M, Robinson J. Hemagglutination patterns of *Aeromonas* spp. in relation to biotype and source. *J Clin Microbiol* 1984;19: 39–43.
- Burr SE, Stuber K, Frey J. The ADP-ribosylating Toxin, AexT, From *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida* Is Translocated via a Type III Secretion Pathway. *J Bacteriol* 2003; 185: 6583–6591.
- Burr SE, Stuber K, Wahli T, Frey J. Evidence for a Type III Secretion System in *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida*. *J Bacteriol* 2002; 184: 5966–5970.
- Cai SH, Wu ZH, Jian JC, Lu YS, Tang JF. Characterization of pathogenic *Aeromonas veronii* bv. *veronii* associated with ulcerative syndrome from chinese long snout catfish (*Leiocassis longirostris* Günther). *Braz J Microbiol* 2012; 43: 382–388.
- Carnahan AM, Chakraborty T, Fanning GR, Verma D, Ali A, Janda JM, Joseph SW. *Aeromonas trota* sp. nov., an ampicillin-susceptible species isolated from clinical specimens. *J Clin Microbiol* 1991; 29: 1206–1210.
- Carnoy C, Scharfman A, Van Brussel E, Lamblin G, Ramphal R, Raussel P. *Pseudomonas aeruginosa* outer membrane adhesins for human respiratory mucus glycoproteins. *Infec Immun* 1994; 62: 1896–1900.
- Caroff M, Karibian D. Structure of bacterial lipopolysaccharide. *Carbohydr Res* 2003; 338: 2431–2447.
- Castro-Escarpulli G, Figueras MJ, Aguilera-Arreola G, Soler L, Fernández-Rendón E, Aparicio GO, Guarro J, Chacón MR. Characterisation of *Aeromonas* spp. isolated from frozen fish intended for human consumption in Mexico. *Int J Food Microbiol* 2003; 84: 41–49.
- Chacón MR, Castro-Escarpulli G, Soler L, Guarro J, Figueras MJ. A DNA probe specific for *Aeromonas* colonies. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2002; 44: 221–225.

- Chan XY, How KY, Yin WF, Chan KG. N-Acyl homoserine lactone-mediated quorum sensing in *Aeromonas veronii* biovar *sobria* strain 159: Identification of LuxRI homologs. *Front Microbiol* 2016; 6: 1–6.
- Chang YC, Wang JY, Selvam A, Kao SC, Yang SS, Shih DYC. Multiplex PCR detection of enterotoxin genes in *Aeromonas* spp. from suspect food samples in northern Taiwan. *J Food Prot* 2008; 71: 2094–2099.
- Chen PL, Wu CJ, Chen CS, Tsai PJ, Tang HJ, Ko WC, Cutler S. A comparative study of clinical *Aeromonas dhakensis* and *Aeromonas hydrophila* isolates in southern Taiwan: *Aeromonas dhakensis* is more predominant and virulent. *Clin Microbiol Infect* 2014; 20: 428–434.
- Chen YF, Liang RS, Zhuo XL, Wu XT, Zou JX. Isolation and characterization of *Aeromonas schubertii* from diseased snakehead, *Channa maculata* (*Lacepède*). *J Fish Dis* 2012; 35: 421–430.
- Chopra AK, Houston CW. Enterotoxins in *Aeromonas*-associated gastroenteritis. *Microbes Infect* 1999; 1: 1129–1137.
- Chopra AK, Xu XJ, Ribardo D, Gonzalez M, Kuhl K, Peterson JW, Houston CW. The cytotoxic enterotoxin of *Aeromonas hydrophila* induces proinflammatory cytokine production and activates arachidonic acid metabolism in macrophages. *Infect Immun* 2000; 68: 2808–2818.
- Chu S, Cavaignac S, Feutrier J, Phipps BM, Kostrzynska M, Kay WW, Trust TJ. Estructura de la proteína de matriz de virulencia de superficie tetragonal y gen de *Aeromonas salmonicida*. *J Biol Chem* 1991; 266: 15258–15265.
- Cohen J. La inmunopatogénesis de la sepsis. *Nature* 2002; 420: 885–891.
- Cohen M, Guarino A, Shukla R, Giannella R. Age-related differences in receptors for *Escherichia coli* heat stable enterotoxin in the small and large intestine of children. *Gastroenterology* 1988; 94: 367–373.
- Colwell RR, Mac Donell MR, De Ley J. Proposal to recognize the family *Aeromonadaceae* fam. nov. *Int J Syst Bacteriol* 1986; 36: 473–477.
- Crichton PB, Old DC. Differentiation of strains of *Escherichia coli*: multiple typing approach. *J Clin Microbiol* 1980; 11: 635–640.



- Crichton PB, Walker JW. Methods for the Detection of haemagglutinins in *Aeromonas*. J Med Microbiol 1985; 19: 273–277.
- Demarta A, Küpfer M, Riegel P, Harf-Monteil C, Tonolla M, Peduzzi R, Monera A, Saavedra MJ, Martínez-Murcia A. *Aeromonas tecta* sp. nov., isolated from clinical and environmental sources. Syst Appl Microbiol 2008; 31: 278–286.
- Ding T, Li T, Wang Z, Li J. Curcumin liposomes interfere with quorum sensing system of *Aeromonas sobria* and in silico analysis. Sci Rep 2017; 8612:1–16
- Dubreuil JD, Giudice GD, Rappuoli R. *Helicobacter pylori* interactions with host serum and extracellular matrix proteins: potential role in the infectious process. Microbiol Mol Biol 2002; 66: 617–629.
- Dwivedi M, Mishra A, Prasad A, Azim A, Singh RK, Baronia AK, Prasad KN, Dwivedi UN. *Aeromonas caviae* septicemia in immunocompetent gastrointestinal carriers. Braz J Infect Dis 2008; 12: 547–548.
- Eaves LE, Rogers DG, Blackall PJ. Comparison of hemagglutinin and agglutinin schemes for the serological classification of *Haemophilus paragallinarum* and proposal of new hemagglutinin serovar. J Clin Microbiol 1989; 27: 1510–1513.
- Elbashir AM, Millership SE. Haemagglutinating activity of *Aeromonas* spp. from different sources; attempted use as a typing system. Epidemiol Infect 1989; 102: 221–229.
- Emekdas G, Aslan G, Tezcan S, Serin MS, Yildiz C, Ozturhan H, Durmaz R. Detection of the frequency, antimicrobial susceptibility, and genotypic discrimination of *Aeromonas* strains isolated from municipally treated tap water samples by cultivation and AP-PCR. Int J Food Microbiol 2006; 107: 310–314.
- English G, Trunk K, Rao VA, Srikannathasan V, Hunter WN, Coulthurst SJ. New secreted toxins and immunity proteins encoded within the type VI secretion system gene cluster of *Serratia marcescens*. Mol Microbiol 2012; 86: 921–936.
- Esteve C, Alcaide E, Blasco MD. *Aeromonas hydrophila* subsp. *dhakensis* isolated from feces, water, and fish in Mediterranean Spain. Microbes Environ 2012; 27: 367–373.
- Esteve C, Gutierrez MC, Ventosa A, Verdonck L, Mergaert J, Rijckaert C, Swings J, Kersters K, De Ley J. *Aeromonas encheleia* sp. nov., isolated from European eels. Int J Syst Bacteriol 1995a; 45: 462–466.

- Esteve C, Gutiérrez MC, Ventosa A. DNA Relatedness among *Aeromonas allosaccharophila* strains and DNA hybridization groups of the genus *Aeromonas*. *Int J Syst Bacteriol* 1995b; 45: 390–391.
- Evans DJ Jr., Evans DG, Dupont HL. Hemagglutination patterns of enterotoxigenic and enteropathogenic *Escherichia coli* determined with human, bovine, chicken, and guinea pig erythrocytes in the presence and absence of mannose. *Infect Immun* 1979; 23: 336–346.
- Farmer JJ, Arduino MJ, Hickman-Brenner FW. (2006). The genera *Aeromonas* and *Plesiomonas*. In *The Prokaryotes*; Springer Science and Business Media: Berlin/Heidelberg. Germany. pp. 564–596.
- Fehr D, Burr SE, Gibert M, D'Alayer J, Frey J, Popoff MR. *Aeromonas* exoenzyme T de *Aeromonas salmonicida* es una proteína bifuncional que se dirige al citoesqueleto del huésped. *J Biol Chem* 2007; 282: 28843–28852.
- Fehr D, Casanova C, Liverman A, Blažková H, Orth K, Dobbelaere D, Frey J, Burr SE. AopP, a type III effector protein of *Aeromonas salmonicida*, inhibits the NF-κB signalling pathway. *Microbiol* 2006; 152: 2809–2818.
- Fernández-Bravo A, Figueras MJ. An update on the genus *Aeromonas*: Taxonomy, epidemiology, y pathogenicity. *Microorganisms* 2020; 8: 129.
- Fernández-Bravo A, Kilgore PB, Andersson JA, Blears E, Figueras MJ, Hasan NA, Colwell RR, Sha J, Chopra AK. T6SS and ExoA of flesh-eating *Aeromonas hydrophila* in peritonitis and necrotizing fasciitis during mono- and polymicrobial infections. *Proc Natl Acad Sci* 2019; 116: 24084–24092.
- Fernández-Bravo A. Epidemiology and pathogenic characterization of species of the genus *Aeromonas*. Universidad Rovira Virgili: Tarragona. Spain 2019.
- Fernandez-Cassi X, Silvera C, Cervero-Aragó S, Rusiñol M, Latif-Eugeni F, Bruguera-Casamada C, Civit S, Araujo RM, Figueras MJ, Gironés R, Bofill-Mas S. Evaluation of the microbiological quality of reclaimed water produced from a lagooning system. *Environ Sci Pollut Res* 2016; 23: 16816–16833.
- Figueras MJ, Beaz-Hidalgo R, Hossain MJ, Liles MR. Taxonomic affiliation of new genomes should be verified using average nucleotide identity and multilocus phylogenetic analysis. *Genome Announc* 2014; 2: e00927.

- Figueras MJ, Beaz-Hidalgo R. *Aeromonas* infections in humans. In *Aeromonas*; Academic Press: Norfolk. UK 2015.
- Figueras MJ, Beaz-Hidalgo R. *Aeromonas*: Introduction, detection by cultural and modern techniques. *Encyclopedia of Food Microbiology*. 2014.
- Figueras MJ, Borrego JJ. New perspectives in monitoring drinking water microbial quality. *J Environ Res Public Health* 2010; 7: 4179–4202.
- Figueras MJ, Latif-Eugenin F, Ballester F, Pujol I, Tena D, Berg K, Hossain MJ, Beaz-Hidalgo R, Liles MR. *Aeromonas intestinalis* and *Aeromonas enterica* isolated from human faeces, *Aeromonas crassostreae* from oyster and *Aeromonas aquatilis* isolated from lake water represent novel species. *New Microbes New Infect* 2017; 15: 74–76.
- Figueras MJ, Suarez-Franquet A, Chacon MR, Soler L, Navarro M, Alejandre C, Grasa B, Martínez-Murcia AJ, Guarro J. First record of the rare species *Aeromonas culicicola* from a drinking water supply. *Appl Environ Microbiol* 2005; 71: 538–541.
- Figueras MJ, Alperi A, Beaz-Hidalgo R, Stackebrandt E, Brambilla E, Monera A, Martínez-Murcia AJ. *Aeromonas rivuli* sp. nov., isolated from the upstream region of a karst water rivulet. *Int J Syst Evol Microbiol* 2011; 61: 242–248.
- Finkelstein RA, Hanne LF. Purification and Characterization of the Soluble Hemagglutinin (Cholera Lectin) Produced by *Vibrio cholerae*. *Infect Immun* 1982; 36: 1199–1208.
- Finlay BB, Falkow S. Common themes in microbial pathogenicity. *Microbiol Rev* 1989; 53:210–230.
- Fontes MC, Saavedra MJ, Monera A, Martins C, Martínez-Murcia A. Phylogenetic identification of *Aeromonas simiae* from a pig, first isolate since species description. *Vet Microbiol* 2010; 142: 313–316.
- Forga-Martel J, Gonzalez-Valle F, Weinzierl J. Infectious abortion associated with *Aeromonas hydrophila* in a mare. *Equine Pract* 2000; 22: 22–24.
- Galán JE, Collmer A. Type III secretion machines: bacterial devices for protein delivery into host cells *science* 1999; 284: 1322–1328.
- Galindo CL, Gutierrez C Jr, Chopra AK. Potential involvement of galectin-3 and SNAP23 in *Aeromonas hydrophila* cytotoxic enterotoxin-induced host cell apoptosis. *Microb Pathog* 2006; 40: 56–68.

- Garduño RA, Thornton JC, Kay WW. *Aeromonas salmonicida* grown in vivo. *Infect Immun* 1993; 61: 3854–3862.
- Ghenghesh KS, Abeid SS, Jaber MM, Ben-Taher SA. Isolation and haemolytic activity of *Aeromonas* species from domestic dogs and cats. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* 1999; 22: 175–179.
- González MJ, Villanueva M, Latif F, Fernández F, Fernández H. Aislamiento de *Plesiomonas shigelloides* y *Aeromonas veronii* biotipo sobria en heces de lobo marino común sudamericano, *Otaria flavescens* (Shaw, 1800). *Rev Biol Mar Oceanogr* 2009; 44: 763–765.
- Griffin PJ, Snieszko SF, Friddle SB. Pigment formation by *Bacterium salmonicida*. *J Bacteriol* 1953; 65: 652–659.
- Grim CJ, Kozlova EV, Ponnusamy D, Fitts EC, Sha J, Kirtley ML, Van Lier CJ, Tiner BL, Erova TE, Joseph SJ, Read TD, Shak JR, Joseph SW, Singletary E, Felland T, Baze WB, Horneman AJ, Chopra AK. Functional genomic characterization of virulence factors from necrotizing fasciitis-causing strains of *Aeromonas hydrophila*. *Appl Environ Microbiol* 2014; 80: 4162–4183.
- Gunasekaran L, Ambalkar S, Samarji RA, Qamruddin A. Posttraumatic osteomyelitis due to *Aeromonas* species. *Indian J Med Microbiol* 2009; 27: 163–165.
- Gupta NP, Gupta SP, Barua D. Haemagglutination by strains of *Escherichia coli* isolated from cases of urinary infection. *Indian J Med Res* 1958; 46:147–151.
- Hadi N, Yang Q, Barnett TC, Tabei SMB, Kirov SM, Shaw JG. Pilus locus formador de paquetes de *Aeromonas veronii* bv. *sobria*. *Infect Immun* 2012; 80: 1351–1360.
- Hammad AM, Moustafa AEH, Mansour MM, Fahmy BM, Hamada MG, Shimamoto T, Shimamoto T. Molecular and phenotypic analysis of hemolytic *Aeromonas* strains isolated from food in Egypt revealed clinically important multidrug resistance and virulence profiles. *J Food Prot* 2018; 81: 1015–1021.
- Harf-Monteil C, Le Flèche A, Riegel P, Prévost G, Bermond D, Grimont PAD, Monteil H. *Aeromonas simiae* sp. nov., isolated from monkey faeces. *Int J Syst Evol Microbiol* 2004; 54: 481–485.
- Hasan NA, Choi SY, Eppinger M, Clark PW, Chen A, Alam M, Haley BJ, Taviani E, Hine E, Su Q, Tallon LJ, Prosper JB, Furth K, Hoq MM, Li H, Fraser-Liggett CM, Cravioto A,

- Huq A, Ravel J, Cebula TA, Colwell RR. Genomic diversity of 2010 Haitian cholera outbreak strains. *Proc Natl Acad Sci USA* 2012; 109: 2010–2017.
- Hashimoto M, Horiuchi S, Kosugi J, Koohara W, Nakane M, Uchikawa K. Morphological studies on fimbriae of *Pseudomonas aeruginosa* and *Aeromonas hydrophila* with special reference to their biological functions. *Bull Tokyo Med Dent Univ* 1971; 18: 105–122.
- Hassani L, Imziln B, Boussaid A, Gauthier MJ. Seasonal incidence of antibiotic resistance among *Aeromonas* species isolated from domestic wastewater before and after treatment in stabilization ponds. *Microb Ecol* 1992; 23: 227–237.
- Heiss C, Wang Z, Thurlow C, Hossain MJ, Sun D, Liles MR, Saper MA, Azadi P. Structure of the capsule and lipopolysaccharide O-antigen from the channel catfish pathogen, *Aeromonas hydrophila*. *Carbohydr Res* 2019; 486: 1–9.
- Henry G. Contaminación del agua. En: Henry, G. & G. Heinke (eds.), *Ingeniería Ambiental*. Pearson. México DF 1999.
- Herold S, Karch H, Schmidt H. Shiga toxin-encoding bacteriophages-genomes in motion. *Int J Med Microbiol* 2004; 294: 115–121.
- Hickman-Brenner F, Fanning GR, Arduino MJ, Brenner DJ, Farmer JJ. *Aeromonas schubertii*, a new mannitol-negative species found in human clinical specimens. *J Clin Microbiol* 1988; 26: 1561–1564.
- Hickman-Brenner FW, Macdonald KL, Steigerwalt AG, Fanning GR, Brenner DJ, Farmer JJ. *Aeromonas veronii*, a new ornithine decarboxylase-positive species that may cause diarrhea. *J Clin Microbiol* 1987; 25: 900–906.
- Hiransuthikul N, Tantisiriwat W, Lertutsahakul K, Vibhagool A, Boonma P. Skin and soft tissue infections among tsunami survivors in Southern Thailand. *Clin Infect Dis* 2005; 41: 93–96.
- Hirst ID, Ellis AE. Iron-regulated outer membrane proteins of *Aeromonas salmonicida* are important protective antigens in Atlantic salmon against furunculosis. *Fish Shellfish Immun* 1994; 4: 29–45.
- Hochedez P, Hope-Rapp E, Olive C, Nicolas M, Beaucaire G, Cabie A. Bacteremia caused by *Aeromonas* species [corrected] complex in the Caribbean Islands of Martinique and Guadeloupe. *Am J Trop Med Hyg* 2010; 83: 1123–1127.

- Hoel S, Vadstein O, Jakobsen AN. Species distribution and prevalence of putative virulence factors in mesophilic *Aeromonas* spp. isolated from fresh retail sushi. *Front Microbiol* 2017; 8: 1–11.
- Hoel S, Vadstein O, Jakobsen AN. The significance of mesophilic *Aeromonas* spp. in minimally processed ready-to-eat seafood. *Microorganisms* 2019; 7: 1–25.
- Holmes P, Nicolls LM, Sartory DP. The ecology of mesophilic *Aeromonas* in the aquatic environment. In *The Genus Aeromonas*; John Wiley & Sons Ltd.: West Sussex. UK 1996.
- Honda T, Lertpocasombat K, Hata A, Miwatani T, Finkelstein RA. Purification and characterization of a protease produced by *Vibrio cholerae* non-O1 and comparison with a protease of *V. cholerae* O1. *Infect Immun* 1989; 57: 2799–2803.
- Hossain MJ, Sun D, Mc Garey DJ, Wrenn S, Alexander LM, Martino ME, Xing Y, Terhune JS, Liles MR. An Asian Origin of Virulent *Aeromonas hydrophila* Responsible for Disease Epidemics in United States-Farmed Catfish. *J mBio* 2014; 5: 848-814.
- Huang L, Qin Y, Yan Q, Lin G, Huang L, Huang B, Huang W. MinD plays an important role in *Aeromonas hydrophila* adherence to *Anguilla japonica* mucus. *Gene* 2015; 565: 275–281.
- Huys G, Kampfer P, Altwegg M, Kersters I, Lamb A, Coopman R, Lüthy-Hottenstein J, Vancanneyt M, Janssen P, Kersters K. *Aeromonas popoffii* sp. nov., a mesophilic bacterium isolated from drinking water production plants and reservoirs. *Int J Syst Bacteriol* 1997; 47: 1165–1171.
- Igbinosa IH, Igumbor EU, Aghdasi F, Tom M, Okoh AI. Emerging *Aeromonas* species infections and their significance in public health. *Sci World J* 2012; 2012: 1–13.
- Igbinosa IH, Okoh AI. Detection and distribution of putative virulence associated genes in *Aeromonas* species from freshwater and wastewater treatment plant. *J Basic Microbiol* 2013; 53: 895–901.
- İlhan Z, Gülhan T, Aksakal A. *Aeromonas hydrophila* associated with ovine abortion. *Small Rumin Res* 2006; 61: 73–78.
- Janda JM, Abbott SL. The genus *Aeromonas*: Taxonomy, pathogenicity and infection. *Clin Microbiol Rev* 2010, 23: 35–73.

- Janda JM. *Aeromonas* and *Plesiomonas*. In Molecular Medical Microbiology ed. Sussman, Academic Press, M. San Diego 2001.
- Jjemba PK, Weinrich LA, Cheng W, Giraldo E, Lechevallier MW. Regrowth of potential opportunistic pathogens and algae in reclaimed-water distribution systems. *Appl Environ Microbiol* 2010; 76: 4169–4178.
- John N, Vidyalakshmi V, Hatha AM. Effect of pH and salinity on the production of extracellular virulence factors by *Aeromonas* from food sources. *J Food Sci* 2019; 84: 2250–2255.
- Kay WW, Buckley JT, Ishiguro EE, Phipps BM, Monette JP, Trust TJ. Purification and disposition of a surface protein associated with virulence of *Aeromonas salmonicida*. *J Bacteriol* 1981;147: 1077–1084.
- Kay WW, Phipps BM, Ishiguro EE, Trust TJ. Porphyrin binding by the virulence protein of the surface matrix of *Aeromonas salmonicida*. *J Bacteriol* 1985; 164: 1332–1336.
- Khajanchi BK, Fadl AA, Borchardt MA, Berg RL, Horneman AJ, Stemper ME, Joseph SW, Moyer NP, Sha J, Chopra AK. Distribution of virulence factors and molecular fingerprinting of *Aeromonas* species isolates from water and clinical samples: Suggestive evidence of water-to-human transmission. *Appl Environ Microbiol* 2010; 76: 2313–2325.
- Khajanchi BK, Kirtley ML, Brackman SM, Chopra AK. Immunomodulatory and protective roles of quorum-sensing signaling molecules N-Acyl homoserine lactones during infection of mice with *Aeromonas hydrophila*. *Infect Immun* 2011; 79: 2646–2657.
- King GE, Werner SB, Kizer KW. Epidemiology of *Aeromonas* infections in California. *Clin Infect Dis* 1992; 15: 449–452.
- Kinzelman J, McLellan SL, Amick A, Preedit J, ScopeL CO, Olapade O, Gradus S, Singh A, Sedmak G. Identification of human enteric pathogens in gull feces at Southwestern Lake Michigan bathing beaches. *Can J Microbiol* 2000; 54: 1006–1015.
- Kirov SM, Barnett TC, Pepe CM, Strom MS, Albert MJ. Investigation of the role of type IV *Aeromonas pilus* (Tap) in the pathogenesis of *Aeromonas* gastrointestinal infection. *Infect Immun* 2000; 68: 4040–4048.
- Kirov SM, Jacobs I, Hayward LJ, Hapin RH. Electron microscopic examination of factors influencing the expression of filamentous surface structures on clinical and

environmental isolates of *Aeromonas veronii* biotype *sobria*. Microbiol Immunol 1995; 39: 329–338.

Kluyver AJ, van Neill CB. Prospects for a natural system of classification of bacteria. Zentralbl Bakteriell Parasitenkd Infektionskr Hyg Abt 1936; 94: 369–403.

Kostakioti M, Newman CL, Thanassi DG, Stathopoulos C. Mechanisms of protein export across the bacterial outer membrane. J Bacteriol 2005; 187: 4306–4314.

Lamy B, Kodjo A, Laurent F. Prospective nationwide study of *Aeromonas* infections in France. J Clin Microbiol 2009; 47: 1234–1237.

Lamy B, Laurent F, Verdier I, Decousser JW, Lecaillon E, Marchandin H, Roger F, Tigaud S, De Montclos H, Kodjo A. Accuracy of 6 commercial systems for identifying clinical *Aeromonas* isolates. Diagn Microbiol Infect Dis 2010; 67: 9–14.

Latif-Eugenin F, Beaz-Hidalgo R, Figueras MJ. Evaluation of different conditions and culture media for the recovery of *Aeromonas* spp. from water and shellfish samples. J Appl Microbiol 2016a; 12: 883–891.

Latif-Eugenin F, Beaz-Hidalgo R, José FM. A culture independent method for the detection of *Aeromonas* sp. from water samples. J Food Saf 2016b; 5: 54–89.

Latif-Eugenin F, Beaz-Hidalgo R, Silvera-Simón C, Fernandez-Cassi X, Figueras MJ. Chlorinated and ultraviolet radiation-treated reclaimed irrigation water is the source of *Aeromonas* found in vegetables used for human consumption. Environ Res 2017; 154: 190–195.

Leblanc D, Mittal KR, Olivier G, Lallier R. Serogrouping of motile *Aeromonas* species isolated from healthy and moribund fish. Appl Environ Microb 1981; 42: 56–60.

Li Y, Cai SH. Identification, and pathogenicity of *Aeromonas sobria* on tail-rot disease in juvenile tilapia *Oreochromis niloticus*. Curr Microbiol 2011; 62: 623–627.

Lowry R, Balboa S, Parker JL, Shaw JG. *Aeromonas* flagella and colonisation mechanisms. Adv Microb Physiol 2014; 65: 203–256.

Lüderitz O, Galanos C, Lehmann V, Mayer H, Rietschel ET, Weckesser J. Chemical structure and biological activities of lipids A of various bacterial families. Sci Nat 1978; 65: 578–585.

MacInnes JI, Trust TJ, Crosa JH. Deoxyribonucleic acid relationship among members of the genus *Aeromonas*. Can J Microbiol 1979; 25: 579–586.



- Majeed KN, Macrae IC. Cytotoxic and haemagglutinating activities of motile *Aeromonas* species. *J Med Microbiol* 1994; 40: 188-193.
- Marti E, Balcázar JL. *Aeromonas rivipollensis* sp. nov., a novel species isolated from aquatic samples. *J Basic Microbiol* 2015; 55: 1435–1439.
- Martin-Carnahan A, Joseph SW. Order XII. *Aeromonadales* ord. nov. In *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*; Brenner, D.J., Krieg, N.R., Staley, J.T., Garrity, G.M., Eds.; Williams & Wilkins: Philadelphia, PA. USA 2005.
- Martínez-Murcia A, Beaz-Hidalgo R, Navarro A, Carvalho MJ, Aravena-Román M, Correia A, Figueras MJ, Saavedra MJ. *Aeromonas lusitana* sp. nov., isolated from untreated water and vegetables. *Curr Microbiol* 2016; 72: 795–803.
- Martínez-Murcia A, Beaz-Hidalgo R, Svec P, Saavedra MJ, Figueras MJ, Sedlacek I. *Aeromonas cavernicola* sp. nov., isolated from fresh water of a brook in a cavern. *Curr Microbiol* 2013; 66: 197–204.
- Martínez-Murcia A, Garay E, Collins M, Esteve C. *Aeromonas allosaccharophila* sp. nov., a new mesophilic member of the genus *Aeromonas*. *FEMS Microbiol Lett* 1992; 91: 199–205.
- Martínez-Murcia AJ, Saavedra MJ, Mota VR, Maier T, Stackebrandt E, Cousin S. *Aeromonas aquariorum* sp. nov., isolated from aquaria of ornamental fish. *Int J Syst Evol Microbiol* 2008; 58: 1169–1175.
- Martone-Rocha S, Piveli RP, Matté GR, Dória MC, Dropa M, Morita M, Peternella FA, Matté MH. Dynamics of *Aeromonas* species isolated from wastewater treatment system. *J Water Health* 2010; 8: 703–711.
- Mathur P, Batra P, Misra MC. *Aeromonas* spp.: An emerging nosocomial pathogen. *J Lab Physicians* 2016; 8: 1–4.
- McClure PJ, Cole MB, Davies KW. An example of the stages in the development of a predictive mathematical model for microbial growth: the effects of NaCl, pH and temperature on the growth of *Aeromonas hydrophila*. *Int J Food Microbiol* 1994; 23: 359–75.
- McLellan SL, Huse SM, Mueller-Spitz SR, Andreishcheva EN, Sogin ML. Diversity and population structure of sewage-derived microorganisms in wastewater treatment plant influent. *Environ Microbiol* 2010; 12: 378–392.

- Mendes-Marques CL, Nascimento LM, Theophilo GN, Hofer E, Melo Neto OP, Leal NC. Molecular characterization of *Aeromonas* spp. and *Vibrio cholerae* O1 isolated during a diarrhea outbreak. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 2012; 54: 299–304.
- Merino S, Rubires X, Knøchel S, Tomás JM. Emerging pathogens: *Aeromonas* spp. *Int J Food Microbiol* 1995; 28: 157–168.
- Merino S, Tomás JM. Bacterial Capsules and Evasion of Immune Responses. *ELS* 2010: 1-9.
- Miller MB, Bassler BL. Quorum sensing in bacteria. *Annu Rev Microbiol* 2001; 55: 165–199.
- Miñana-Galbis D, Farfán M, Fusté MC, Lorén JG. *Aeromonas bivalvium* sp. nov., isolated from bivalve molluscs. *J Syst Evol Microbiol* 2007; 57: 582–587.
- Miñana-Galbis D, Farfán M, Lorén JG, Fusté MC. Proposal to assign *Aeromonas diversa* sp. nov. as a novel species designation for *Aeromonas* group 501. *Syst Appl Microbiol* 2010; 33: 15–19.
- Miñana-Galbis D. *Aeromonas molluscorum* sp. nov., isolated from bivalve molluscs. *Int J Syst Evol Microbiol* 2004; 54: 2073–2078.
- Montes M, Pérez MJ, Nieto TP. Numerical taxonomy of gram-negative, facultative anaerobic bacteria isolated from skin of turbot (*Scophthalmus maximus*) and surrounding water. *Syst Appl Microbiol* 1999; 22: 604–618.
- Nagar V, Shashidhar R, Bandekar JR. Characterization of *Aeromonas* strains isolated from Indian foods using rpoD gene sequencing and whole cell protein analysis. *World J Microbiol Biotechnol* 2013; 29: 745–752.
- Nagar V, Shashidhar R, Bandekar JR. Prevalence, characterization, and antimicrobial resistance of *Aeromonas* strains from various retail food products in Mumbai, India. *J Food Sci* 2011; 76: 486–492.
- Nawaz M, Khan SA, Khan AA, Sung K, Tran Q, Kerdahi K, Steele R. Detection, and characterization of virulence genes and integrons in *Aeromonas veronii* isolated from catfish. *Food Microbiol* 2010; 27: 327–331.
- Nayduch D, Noblet GP, Stutzenberger FJ. Vector potential of houseflies for the bacterium *Aeromonas caviae*. *Med Vet Entomol* 2002; 16: 193–198.

- Nazarenko EL, Crawford RJ, Ivanova EP. The structural diversity of carbohydrate antigens of selected gram-negative marine bacteria. *Mar Drugs* 2011; 9: 1914–1954.
- Neter E. Bacterial hemagglutination and hemolysis. *Bacteriol Rev* 1956; 20: 166–188.
- Nishikawa Y, Kishi T. Isolation and characterization of motile *Aeromonas* from human, food and environmental specimens. *Epidem Inf* 1988; 101: 2013-223.
- Obi CL, Ramalivhana J, Samie A, Igumbor EO. Prevalence, pathogenesis, antibiotic susceptibility profiles, and in-vitro activity of selected medicinal plants against *Aeromonas* isolates from stool samples of patients in the Venda Region of South Africa. *J Health Popul Nutr* 2007; 25: 428–435.
- Ofek I, Doyle RJ. Bacterial adhesion to cells and tissues. Chapman & Hall, New York 1994.
- Old DC, Yakubu DE, Crichton PB. Demonstration by immuno-electronmicroscopy of antigenic heterogeneity among P fimbriae of strains of *Escherichia coli*. *J Med Microbiol* 1987; 23: 247–253.
- Pablos M, Huys G, Cnockaert M, Rodríguez-Calleja JM, Otero A, Santos JA, García-López ML. Identification and epidemiological relationships of *Aeromonas* isolates from patients with diarrhea, drinking water and foods. *Int J Food Microbiol* 2011; 147: 203–210.
- Pal A, Ramamurthy T, Ghosh AR, Pal SC, Takeda Y, Balakrish Nair G. Virulence Traits of *Aeromonas* Strains in Relation to Species and Source of Isolation. *Zbl Bakt* 1992; 276: 418–428.
- Palma-Martínez I, Guerrero-Mandujano A, Ruiz-Ruiz MJ, Hernández-Cortez C, Molina-López J, Bocanegra-García V, Castro-Escarpulli G. Active Shiga-like toxin produced by some *Aeromonas* spp., isolated in México City. *Front Microbiol* 2016; 7: 1–7.
- Palumbo SA, Maxino F, Williams AC, Buchanan RL, Thayer DTW. Starch-ampicillin agar for the quantitative detection of *Aeromonas hydrophila*. *Appl Environ Microbiol* 1985; 50:1027–1030.
- Parker JL, Shaw JG. *Aeromonas* spp. clinical microbiology and disease. *J Infect* 2011; 62: 109–118.
- Patel B, Kumari S, Banerjee R, Samanta M, Das S. Disruption of the quorum sensing regulated pathogenic traits of the biofilm-forming fish pathogen *Aeromonas hydrophila* by tannic acid, a potent quorum quencher. *Biofouling* 2017; 33: 1–11.

- Patil HJ, Benet-Perelberg A, Naor A, Smirnov M, Ofek T, Nasser A, Minz D, Cytryn E. Evidence of increased antibiotic resistance in phylogenetically-diverse *Aeromonas* isolates from semi-intensive fishponds treated with antibiotics. *Front Microbiol* 2016; 7: 1875.
- Pepe CM, Eklund MW, Strom MS. Cloning of an *Aeromonas hydrophila* type IV pilus biogenesis gene cluster: complementation of pilus assembly functions and characterization of a type IV leader peptidase/N-methyltransferase required for extracellular protein secretion. *Mol Microbiol* 1996; 19: 857–869.
- Pérez L, Abarca ML, Latif-Eugenín F, Beaz-Hidalgo R, Figueras MJ, Domingo M. *Aeromonas dhakensis* pneumonia and sepsis in a neonatal Risso's dolphin *Grampus griseus* from the Mediterranean Sea. *Dis Aquat Organ* 2015; 116: 69–74.
- Phipps BM y Kay WW. Immunoglobulin binding by the regular surface array of *Aeromonas salmonicida*. *J Biol Chem* 1988; 263: 9298–9303.
- Pianetti A, Bruscolini F, Sabatini L, Colantoni P. Microbial characteristics of marine sediments in bathing area along Pesaro-Gabicce coast (Italy): A preliminary study. *J Appl Microbiol* 2004; 97: 682–689.
- Pidiyar V, Kaznowski A, Narayan NB, Patole M, Shouche YS. *Aeromonas culicicola* sp. nov., from the midgut of *Culex quinquefasciatus*. *Int J Syst Evol Microbiol* 2002; 52: 1723–1728.
- Ponnusamy D, Kozlova EV, Sha J, Erova TE, Azar SR, Fitts EC, Kirtley ML, Tiner BL, Andersson JA, Grim CJ, Isom RP, Hasan NA, Colwell R, Chopra AK Cross-talk among flesh-eating *Aeromonas hydrophila* strains in mixed infection leading to necrotizing fasciitis. *Proc Natl Acad Sci* 2016; 113: 722–727.
- Popoff M, Veron M. Validation of the new names and new combinations previously effectively published outside the IJSB. *Int J Syst Bacteriol* 1981; 31: 215.
- Praveen PK, Debnath C, Shekhar S, Dalai N, Ganguly S. Incidence of *Aeromonas* spp. infection in fish and chicken meat and its related public health hazards: A review. *Vet World* 2016; 9: 6–11.
- Presley SM, Rainwater TR, Austin GP, Platt SG, Zak JC, Cobb GP, Marsland EJ, Tian K, Zhang B, Anderson TA, Cox SB, Abel MT, Leftwich BD, Huddleston JR, Jeter

- RM, Kendall RJ. Assessment of pathogens and toxicants in New Orleans, LA following Hurricane Katrina. *Environ Sci Technol* 2006; 40: 468–474.
- Proft T, Baker EN. Pili in Gram-negative and Gram-positive bacteria — structure, assembly, and their role in disease. *Cell Mol Life Sci* 2009; 66: 613–635.
- Puthucheary SD, Puah SM, Chua KH. Molecular characterization of clinical isolates of *Aeromonas* species from Malaysia. *PLoS ONE* 2012; 7: 1–7.
- Quinn DM, Atkinson HM, Bretag AH, Tester M, Trust TJ, Wong CY, Flower RL. Carbohydrate-Reactive, Pore-forming outer membrane proteins of *Aeromonas hydrophila*. *Infect Immun* 1994; 62: 4054–4058.
- Rahman M, Huys G, Kühn I, Rahman M, Möllby R. Prevalence and transmission of antimicrobial resistance among *Aeromonas* populations from duckweed aqua culture based hospital sewage water recycling system in Bangladesh. *Antonie Van Leeuwenhoek* 2009; 96: 313–321.
- Rasch M, Kastbjerg VG, Bruhn JB, Dalsgaard I, Givskov M, Gram L. Quorum sensing signals are produced by *Aeromonas salmonicida* and quorum sensing inhibitors can reduce production of a potential virulence factor. *Dis Aquat Org* 2007; 78: 105–113.
- Rasmussen-Ivey CR, Hossain MJ, Odom SE, Terhune JS, Hemstreet WG, Shoemaker CA, Zhang D, Xu DH, Griffin MJ, Liu YJ, Figueras MJ, Santos SR, Newton JC, Liles MR. Classification of a hypervirulent *Aeromonas hydrophila* pathotype responsible for epidemic outbreaks in warm-water fishes. *Front Microbiol* 2016; 7: 1–16.
- Razzolini MT, Di Bari M, Sanchez PS, Zanolli MA. *Aeromonas* detection and their toxins from drinking water from reservoirs and drinking fountains. *J Water Health* 2008; 6: 117–123.
- Reith ME, Singh RK, Curtis B, Boyd JM, Bouevitch A, Kimball J, Munholland J, Murphy C, Sarty D, Williams J, Nash JH, Johnson SC, Brown LL. The genome of *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida* A449: Insights into the evolution of a fish pathogen. *BMC Genomics* 2008; 9: 1–15.
- Reyes-Rodríguez N, Salgado-Miranda C, Flores-Valle IT, González-Gómez M, Soriano-Vargas E, Peláez-Acero A, Vega-Sanchez V. Molecular identification and virulence Potential of the genus *Aeromonas* isolated from wild Rainbow Trout (*Onchorhynchus mykiss*) in Mexico. *J Food Prot* 2019; 82: 1706–1713.

- Roger F, Marchandin H, Jumas-Bilak E, Kodjo A, the colBVH study group, Lamy B. Multilocus genetics to reconstruct aeromonad evolution. *BMC Microbiol* 2012; 12: 62.
- Romero A, Saraceni PR, Merino S, Figueras A, Tomás JM, Novoa B. The animal model determines the results of *Aeromonas* virulence factors. *Front Microbiol* 2016; 7: 1–11.
- Rose AH. *Microbiología química*. 3<sup>o</sup> edición. Madrid, Alhambra, cap. 3. 1977
- Sakazaki R, Shimada T. O-serogrouping scheme for mesophilic *Aeromonas* strains. *J Med Sci Biol* 1984; 37: 247–255.
- Salvat MJF, Ashbolt N. *Aeromonas*. In *Global Water Pathogen Project*; University of Alberta: Edmonton. AB. Canada 2019.
- Satterwhite TK, DuPont HL, Evans DG, Evans DJ Jr. Role of *Escherichia coli* colonization factor antigen in acute diarrhoea. *Lancet* 1978; 312: 181–184.
- Schubert RH, Hegazi M. *Aeromonas eucrenophila* species nova *Aeromonas caviae* a later and illegitimate synonym of *Aeromonas punctata*. *Zent Bakteriol Mikrobiol Hyg Ser A Med Microbiol Infect Dis Virol Parasitol* 1988; 268: 34–39.
- Schwenteit J, Gram L, Nielsen KF, Fridjonsson OH, Bornscheuer UT, Givskov M, Gudmundsdottir BK. Detección de quórum en *Aeromonas salmonicida* subsp. *achromogenes* y el efecto del autoinductor sintasa Asal sobre la virulencia bacteriana. *Vet Microbiol* 2011; 147: 389–397.
- Sedláček I, Krejčí E, Andělová A, Sedláčková M, Porazilová I, Holočová P. *Aeromonas hydrophila* subsp. *dhakensis* a causative agent of gastroenteritis imported into the Czech Republic. *Ann Agric Environ Med* 2012; 19: 409–413.
- Seshadri R, Joseph SW, Chopra AK, Sha J, Shaw J, Graf J, Haft D, Wu M, Ren Q, Rosovitz MJ, Madupu R, Tallon L, Kim M, Jin S, Vuong H, Stine OC, Ali A, Horneman AJ, Heidelberg JF. Genome sequence of *Aeromonas hydrophila* ATCC 7966T: Jack of all trades. *J Bacteriol* 2006; 188: 8272–8282.
- Sha J, Erova TE, Alyea RA, Wang S, Olano JP, Pancholi V, Chopra AK. Surface-expressed enolase contributes to the pathogenesis of clinical isolate SSU of *Aeromonas hydrophila*. *J Bacteriol* 2009; 191: 3095–3107.

- Sha J, Pillai L, Fadl AA, Galindo CL, Erova TE, Chopra AK. The Type III secretion system and cytotoxic enterotoxin alter the virulence of *Aeromonas hydrophila*. *Infect Immun* 2005; 73: 6446–6457.
- Shakir Z, Khan S, Sung K, Khare S, Khan A, Steele R, Nawaz M. Molecular Characterization of fluoroquinolone-resistant *Aeromonas* spp. isolated from imported shrimp. *Appl Environ Microbiol* 2012; 78: 8137–8141.
- Shen Y, Xu C, Sun Q, Schwarz S, Ou Y, Yang L, Huang Z, Eichhorn I, Walsh TR, Wang Y, Zhang R, Shen J. Prevalence and genetic analysis of *mcr-3*-positive *Aeromonas* species from humans, retail meat, and environmental water samples. *Antimicrob Agents Chemother* 2018; 62:1-10.
- Shin GW, You MJ, Cho HS, Yi SW, Lee CS. Severe sepsis due to *Aeromonas aquariorum* in a patient with liver cirrhosis. *J Infect Dis* 2013; 66: 519–522.
- Singh DV, Dubey RS, Sanyal SC. Adherence of haemagglutinating and non-haemagglutinating clinical and environmental Isolates of *Aeromonas*. *J Diarrhoea Dis Res* 1993; 3: 157–160.
- Singh DV, Sanyal SC. Haemagglutinating activity, serum sensitivity and enterotoxigenicity of *Aeromonas* spp. *J Med Microbiol* 1993; 38: 49–53.
- Singh DV, Sanyal SC. Haemolysin and enterotoxin production by *Aeromonas caviae* isolated from diarrhoeal patients, fish, and environment. *J Diarrhoeal Dis Res* 1992; 10: 16–20.
- Sisti M, Albano A, Brandi G. Bactericidal effect of chlorine on motile *Aeromonas* spp. in drinking water supplies and influence of temperature on disinfection efficacy. *Lett Appl Microbiol* 1998; 26: 347–351.
- Soriano-Vargas E, Blackall PJ, Dabo S, Tellez G, García G, Fernandez RP. Serotyping of *Haemophilus paragallinarum* isolates from Mexico by the Kume hemagglutinin scheme. *Avian Dis* 2001; 45: 680–683.
- Stanier RY. A note on the taxonomy of *P. hydrophilus*. *J Bacteriol* 1943; 46: 213–214.
- Su J, Yang C, Xiong F, Wang Y, Zhu Z. Toll-like receptor 4 signaling pathway can be triggered by grass carp reovirus and *Aeromonas hydrophila* infection in rare minnow *Gobiocypris rarus*. *Fish Shellfish Immunol* 2009; 27: 33–39.

- Su SY, Chao CM, Lai CC. *Aeromonas* bacteremia in southern Taiwan. *Scand J Infect Dis* 2013; 45: 728.
- Suarez G, Sierra JC, Sha J, Wang S, Erova TE, Fadl AA, Foltz SM, Horneman AJ, Chopra AK. Molecular characterization of a functional type VI secretion system from a clinical isolate of *Aeromonas hydrophila*. *Microb Pathog* 2008; 44: 344–361.
- Talagrand-Reboul E, Jumas-Bilak E, Lamy B. The social life of *Aeromonas* through biofilm and quorum sensing systems. *Front Microbiol* 2017 a; 8: 1–19.
- Talagrand-Reboul T, Roger F, Kimper JL, Colston SM, Graf J, Latif-Eugenín F, Figueras MJ, Petit F, Marchandin H, Jumas-Bilak E, Lamy B. Delineation of taxonomic species within complex of species: *Aeromonas media* and related species as a test case. *Front Microbiol* 2017 b; 8: 621.
- Tomás, JM. The main *Aeromonas* pathogenic factors. *J ISRN Microbiol* 2012; 2012: 256–261.
- Tseng TT, Tyler BM, Setubal JC. Protein secretion systems in bacterial-host associations, and their description in the Gene Ontology. *BMC Microbiol* 2009; 9 S2: 1–9.
- Van Der Kooij D, Martijn B, Schaap PG, Hoogenboezem W, Veenendaal HR, Van Der Wielen PW. Improved biostability assessment of drinking water with a suite of test methods at a water supply treating eutrophic lake water. *Water Res* 2015; 87: 347–355.
- Vandamme P, Dawyndt P. Classification and identification of the *Burkholderia cepacia* complex: past, present and future. *Syst Appl Microbiol* 2011; 34: 87–95.
- Varela AR, Nunes OC, Manaia CM. Quinolone resistant *Aeromonas* spp. as carriers and potential tracers of acquired antibiotic resistance in hospital and municipal wastewater. *Sci Total Environ* 2016; 542: 665–671.
- Vega-Sanchez V, Acosta-Dibarrat J, Vega-Castillo F, Castro-Escarpulli G, Aguilera-Arreola MG, Soriano-Vargas E. Phenotypical characteristics, genetic identification, and antimicrobial sensitivity of *Aeromonas* species isolated from farmed rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) in Mexico. *Acta Trop* 2014a; 130: 76–79.
- Vega-Sánchez V, Latif-Eugenín F, Soriano-Vargas E, Beaz-Hidalgo R, Figueras MJ, Aguilera-Arreola MG, Castro-Escarpulli G. Re-identification of *Aeromonas* isolates

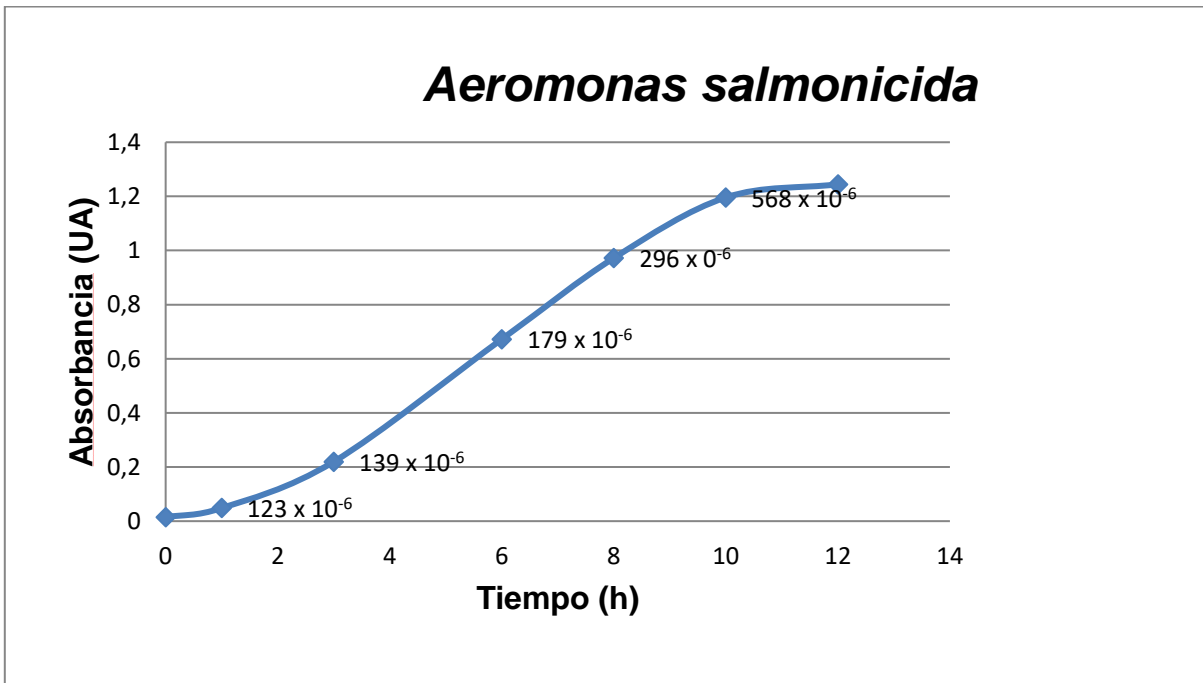
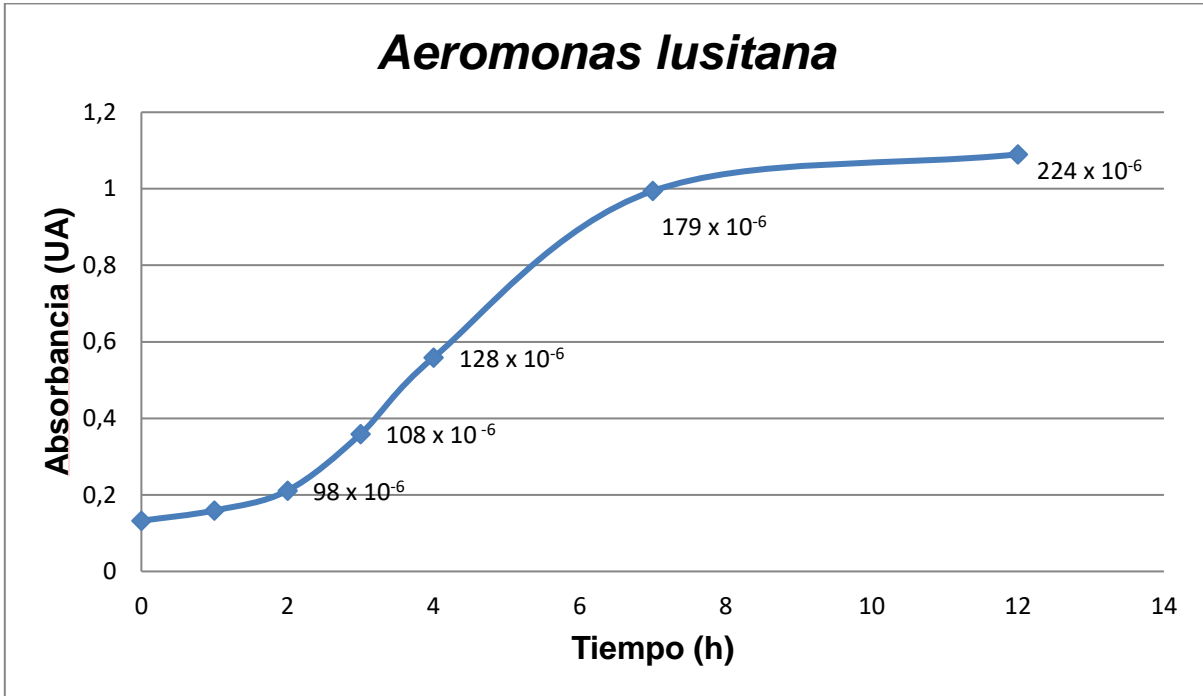


- from rainbow trout and incidence of class 1 integron and  $\beta$ lactamase genes. *Vet Microbiol* 2014b; 172: 528–533.
- Vilches S, Urgell C, Merino S, Chacón MR, Soler L, Castro-Escarpulli G, Figueras MJ, Tomás JM. Complete Type III secretion system of a mesophilic *Aeromonas hydrophila* strain. *Appl Environ Microbiol* 2004; 70: 6914–6919.
- Villari P, Crispino M, Montuori P, Boccia S. Molecular typing of *Aeromonas* isolates in natural mineral waters. *Appl Environ Microbiol* 2003; 69: 697–701.
- Waldridge BM, Stewart AJ, Taylor DC, Saville WJ. The incidence of *Aeromonas* species in the feces of nondiarrheic horses. *J Equine Vet Sci* 2011; 31: 700–702.
- Westerlund B, Korhonen TK. Bacterial proteins binding to the mammalian extracellular matrix. *Mol Microbiol* 1993; 9: 687–694.
- Woodring J, Srijan A, Puripunyakom P, Oransathid W, Wongstitwilairoong B, Mason C. Prevalence and antimicrobial susceptibilities of *Vibrio*, *Salmonella*, and *Aeromonas* isolates from various uncooked seafoods in Thailand. *J Food Prot* 2012; 75: 41–47.
- Wooldridge KG, Williams PH. Iron uptake mechanisms of pathogenic bacteria. *FEMS Microbiol* 1993; 12: 325–348.
- Worthing KA, Norris JM, Briscoe KA. Severe acute cellulitis and sepsis caused by *Aeromonas* spp. in a dog on immunosuppressive therapy. *J Veter Emerg Crit Care* 2019; 29: 444–449.
- Wu CJ, Chen PL, Tang HJ, Chen HM, Tseng FC, Shih HI, Hung YP, Chung CH, Ko WC. Incidence of *Aeromonas* bacteremia in southern Taiwan: *Vibrio* and *Salmonella* bacteremia as comparators. *J Microbiol Immunol Infect* 2012; 47: 145–148.
- Wu CJ, Chen PL, Tang HJ, Chen HM, Tseng FC, Shih HI, Hung YP, Chung CH, Ko WC. Incidence of *Aeromonas* bacteremia in southern Taiwan: *Vibrio* and *Salmonella* bacteremia as comparators. *J Microbiol Immunol Infect* 2014; 47: 145–148.
- Yano Y, Hamano K, Tsutsui I, Aue-Umneoy D, Ban M, Satomi M. Occurrence, molecular characterization, and antimicrobial susceptibility of *Aeromonas* spp. in marine species of shrimps cultured at inland low salinity ponds. *Food Microbiol* 2015; 47: 21–27.

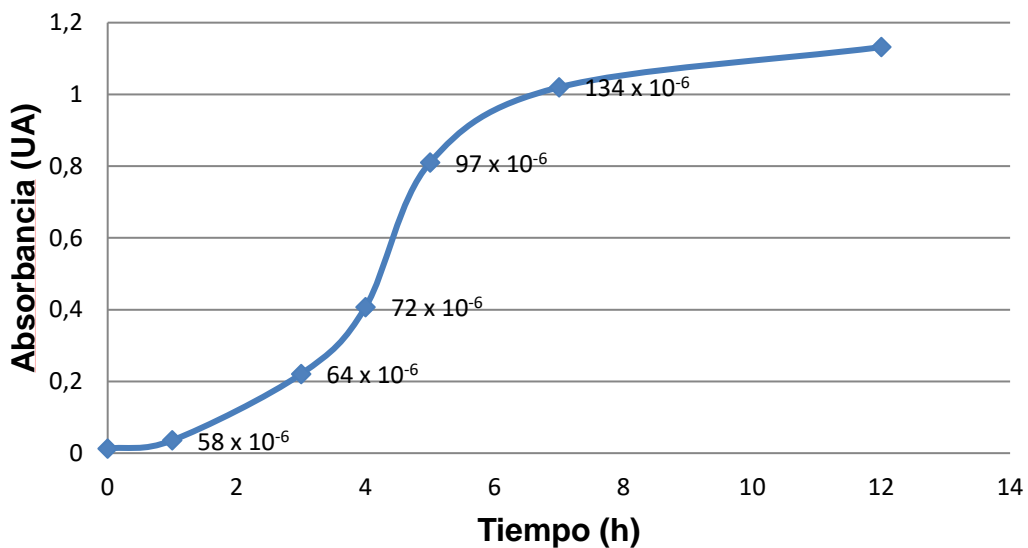
- Yi SW, You MJ, Cho HS, Lee CS, Kwon JK, Shin GW. Molecular characterization of *Aeromonas* species isolated from farmed eels (*Anguilla japonica*). *Vet Microbiol* 2013; 164: 195–200.
- Yu HB, Rao PSS, Lee HC, Vilches S, Merino S, Tomas JM, Leung KY. A Type III secretion system is required for *Aeromonas hydrophila* AH-1 pathogenesis. *Infect Immun* 2004; 72: 1248–1256.
- Zhou Y, Yu L, Nan Z, Zhang P, Kan B, Yan D, Su J. Taxonomy, virulence genes and antimicrobial resistance of *Aeromonas* isolated from extra-intestinal and intestinal infections. *BMC Infect Dis* 2019; 19: 158.

## ANEXOS

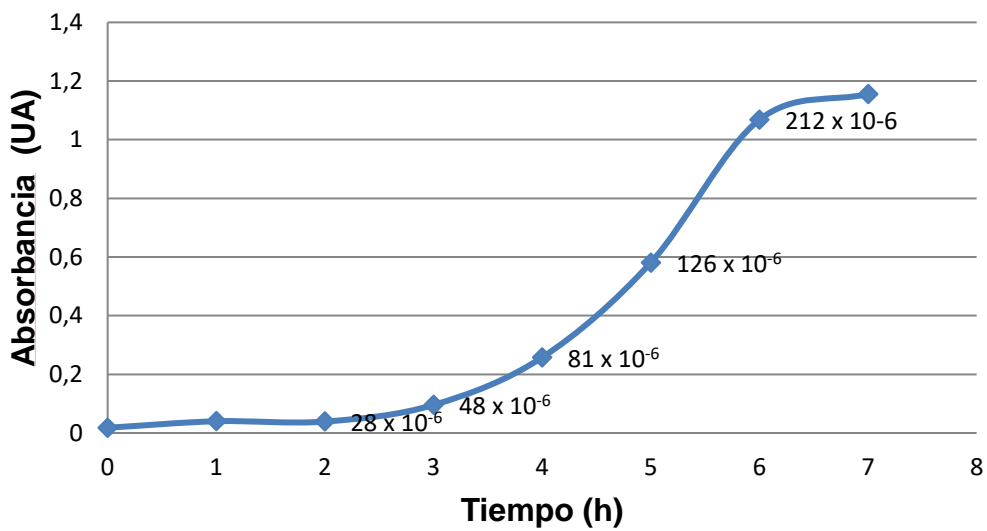
Anexo 1. Curvas de crecimiento de especies de *Aeromonas*.

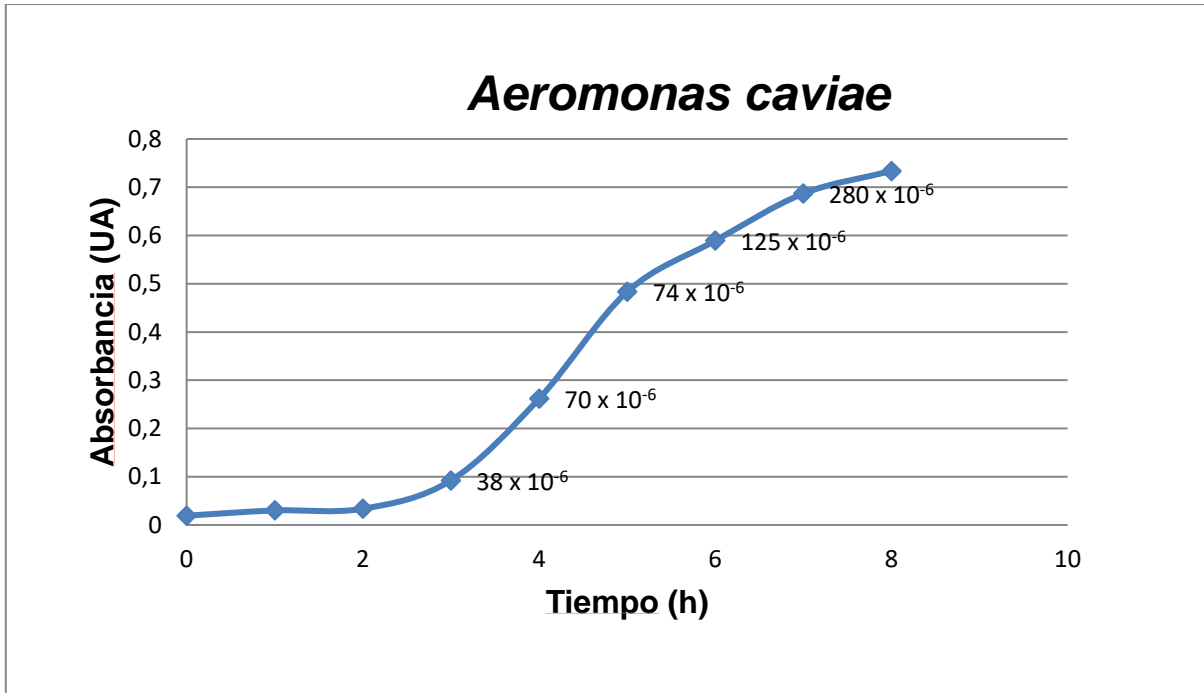


### *Aeromonas hydrophilla*



### *Aeromonas popoffii*





**Anexo 2.** Títulos HA de tres aislamientos de *Aeromonas*.

Títulos HA de aislamientos representativos, a temperatura ambiente (más de 24h), sin lavados previos para HA.

<b>Aislamiento</b>	<b>Especie</b>	<b>Unidades hemaglutinantes (UH)</b>
<b>373</b>	<i>Aeromonas veronii</i>	256
<b>351</b>	<i>Aeromonas lusitana</i>	512
<b>396</b>	<i>Aeromonas salmonicida</i>	32