



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MÉXICO

MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS
AGROPECUARIAS Y RECURSOS NATURALES

CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA Y GENOTÍPICA DE
AISLAMIENTOS DE *Aeromonas* spp. OBTENIDOS DE
TRUCHA ARCOÍRIS (*Oncorhynchus mykiss*)

T E S I S

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

PRESENTA:

M. en C. VICENTE VEGA SÁNCHEZ

El Cerrillo Piedras Blancas, Toluca, Estado de México. Agosto 2014

RESUMEN

El desarrollo de cultivos en condiciones intensivas conlleva el riesgo de aparición de enfermedades infecciosas, las cuales pueden generar importantes pérdidas económicas; las infecciones causadas por bacterias del género *Aeromonas* tienen una distribución mundial, particularmente en patologías de peces en numerosos países. En México se ha reportado una prevalencia del 48.77% para este género bacteriano. El objetivo del presente trabajo fue identificar al nivel de especie, aislamientos de *Aeromonas* spp. utilizando métodos moleculares, conocer el patrón de sensibilidad antimicrobiana a diversos antimicrobianos e identificar genes que codifican para la resistencia antimicrobiana en los aislamientos. Las especies identificadas fueron *A. veronii* (29.2%), *A. bestiarum* (20.8%), *A. hydrophila* (16.7%), *A. sobria* (10.4%), *A. media* (8.3%), *A. popoffii* (6.2%), *A. allosaccharophila* (2.1%), *A. caviae* (2.1%), *A. salmonicida* (2.1%) y “*Aeromonas lusitana*” (2.1%), la cual está pendiente su reporte como especie nueva. Se observó una correcta identificación entre métodos bioquímicos y secuenciación de genes *housekeeping* del 12% (6/50) y del 70% (35/55) entre la identificación por RFLP del gen 16S DNAr y genes que codifican para proteínas esenciales o *housekeeping*. Se detectó la presencia de patrones atípicos obtenidos por RFLP del gen 16S DNAr los cuales complican la correcta identificación. Un total de 50 aislamientos estudiados presentaron resistencia a la ampicilina (98%) y cefalotina (100%), pero resistencia baja a los nitrofuranos (4%), cloranfenicol (4%), trimetoprim-sulfametoxazol (2%) y cefotaxima (8%). Al determinar las características fenotípicas de los aislamientos se detectó que el 8% de los aislamientos produjeron ácido a partir de m-inositol, la cual es considerada negativa en este género. Sólo 38% (19/50) de los aislamientos mostraron la presencia de uno o más genes de resistencia. El gen *bla*_{CphA/IMIS} se detectó en 28% de los aislamientos, seguido por la *int11* (6%) y *bla*_{SHV} (4%). Se secuenció la región variable de integrones de clase 1 de 3 aislamientos positivos, revelando la presencia de la cassette del gen *aadA1* (aminoglucósido transferasa) que confiere resistencia a la espectinomicina.

ABSTRACT

The development to culture of fish in intensive production system cause the risk of infectious diseases, of which cause significant economic losses. *Aeromonas* infection has a worldwide distribution, particularly in fish diseases in many countries. Mexico has reported prevalence of 48.77% for the genus *Aeromonas*. The aim of this study was to identify the species of isolates of *Aeromonas* spp. with molecular methods, know the antimicrobial susceptibility with different antimicrobials and to identify genes that codify for antimicrobial resistance. The species identified were *A. veronii* (29.2%), *A. bestiarum* (20.8%), *A. hydrophila* (16.7%), *A. sobria* (10.4%), *A. media* (8.3%), *A. popoffii* (6.2%), *A. allosaccharophila* (2.1%), *A. caviae* (2.1%), *A. salmonicida* (2.1%) and "*Aeromonas lusitana*" (2.1%), of which is expect its report a new species. Correct identification was observed between biochemical methods and sequencing of housekeeping genes 12% (6/50) and 70% (35/55) between RFLP of the 16S rDNA identification and housekeeping genes. The presence of atypical RFLP patterns obtained by the 16S rDNA gene complicated the correct identification. The 50 isolates studied were resistant to ampicillin (98%) and cephalothin (100%) but low resistance to nitrofurantoin (4%), chloramphenicol (4%), trimethoprim-sulfamethoxazole (2%) and cefotaxime (8%). The determine the phenotypic characteristics of isolates found that 8% of the isolates produced acid from m-inositol, of which is considered negative in this genus. Only 38% (19/50) of the isolates showed the presence of one or more resistance genes. The *bla_{CphA/IMIS}* gene was detected in 28% of the isolates, followed by *int11* (6%) and *bla_{SHV}* (4%). The variable region of class 1 integrons were sequenced in the positive isolates and found the presence of the gene cassette *aadA1* (aminoglycoside transferase) that play important role in the resistance to spectinomycin.

AGRADECIMIENTOS

A mi director de tesis el Dr. Edgardo Soriano Vargas por permitirme formar parte de su grupo de trabajo, por su valiosa asesoría y amistad.

A mis asesores: Dra. Graciella Castro Escarpulli por permitirme trabajar en su laboratorio (Laboratorio de Bacteriología Médica, Departamento de Microbiología, Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, Instituto Politécnico Nacional) y enriquecer este trabajo y por aquellos consejos personales que fueron de gran ayuda, al Dr. Jorge Pablo Acosta Dibarrat por sus consejos y ayuda en la elaboración del trabajo.

A la Dra. Figueras por permitirme realizar una estancia en su laboratorio (Unidad de Microbiología, Departamento de Ciencias Médicas Básicas, Facultad de Medicina y Ciencias de la Salud, Universidad Rovira & Virgili)

Al Centro de investigación y Estudios Avanzados en Salud Animal de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Autónoma del Estado de México (CIESA-FMVZ-UAEM) por permitirme realizar este trabajo en sus instalaciones.

A los compañeros y amigos del grupo de Microbiología Aviar que convivimos día a día

A todos los amigos y compañeros que conocí durante la elaboración del trabajo en la CIEASA-FMVZ-UAEM, FMVZ-UAEM, FM-UAEM, ENCB-IPN, FMCS-URV.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) y a la Universidad Autónoma del Estado de México (UAEM) por las beca brindadas.

FINANCIAMIENTO

El presente trabajo formó parte del proyecto **de investigación** “**Caracterización** fenotípica, genotípica y mecanismos de patogenicidad de aislamientos de *Aeromonas* spp. obtenidos de trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*).” **con clave UAEM UAEM1900/2010C.**

CONTENIDO

RESUMEN	I
ABSTRACT	II
AGRADECIMIENTOS	III
FINANCIAMIENTO	IV
CONTENIDO	V
INDICE DE CUADROS	VII
I. INTRODUCCIÓN GENERAL	1
II. REVISIÓN DE LITERATURA	3
a. Historia	3
b. Características del género <i>Aeromonas</i>	4
c. Taxonomía del género <i>Aeromonas</i>	4
d. Fenoespecies y grupos de hibridación	4
e. Gen 16S RNAr en la taxonomía del género <i>Aeromonas</i>	5
f. Polimorfismo de longitud de los fragmentos de restricción	6
g. Genes que codifican proteínas esenciales (<i>housekeeping</i>)	9
h. Tipificación molecular	10
i. Hábitat	10
j. Factores de virulencia	11
k. Productos extracelulares	13
l. Sistemas de secreción	13
m. Resistencia antimicrobiana	14
III. JUSTIFICACIÓN	15
IV. HIPÓTESIS	16
V. OBJETIVOS	17
VI. MATERIAL Y MÉTODO	18
a. Aislamiento bacteriano y condiciones de cultivo	18
b. Extracción de DNA	18
c. Extracción de DNA plasmídico	19

d.	PCR específico de género	20
e.	Determinación de características bioquímicas	20
f.	Polimorfismo de longitud de los fragmentos de restricción (RFLP) del gen RNA ribosómico 16S (RFLP del gen 16S DNAr)	21
g.	Secuenciación de los genes <i>gyrB-rpoD</i>	22
h.	Genotipificación ERIC-PCR	24
i.	Detección de factores de virulencia	24
j.	Sensibilidad antimicrobiana	27
k.	Detección de los genes <i>bla</i> _{TEM} , <i>bla</i> _{SHV} , <i>bla</i> _{IMP} , <i>bla</i> _{C_{phA}/IMIS} y el integrón clase 1	27
VII.	RESULTADOS	30
a.	<i>Phenotypical characteristics, genetic identification, and antimicrobial sensitivity of Aeromonas species isolated from farmed rainbow trout (Onchorynchus mykiss) in Mexico.</i>	31
b.	<i>Re-identification of Aeromonas isolates from rainbow trout and incidence of class 1 integron and β-lactamase genes.</i>	45
c.	<i>Biochemical characterization, identification of putative virulence genes and antibiotic susceptibility of Aeromonas lusitana isolates.</i>	67
VIII.	DISCUSIÓN GENERAL	87
IX.	CONCLUSIONES	94
X.	REFERENCIAS	96
XI.	ANEXOS	114

ÍNDICE DE CUADROS

No.	Título	Página
1	Especies que integran el género <i>Aeromonas</i>	7
2	Iniciadores y temperaturas programadas del ensayo de PCR para la amplificación del gen <i>gcat</i> .	20
3	Iniciadores y temperaturas programadas del ensayo de PCR para la amplificación del gen 16S DNAr	22
4	Iniciadores y temperaturas programadas del ensayo de PCR para la amplificación de los genes <i>housekeeping</i> .	23
5	Iniciadores y temperaturas programadas del ensayo de ERIC-PCR.	24
6	Iniciadores y temperaturas programadas para los genes de virulencia incluidos en el estudio.	25
7	Iniciadores y temperaturas programadas para los genes de resistencia.	28

I. INTRODUCCIÓN GENERAL

El género *Aeromonas* pertenece a la familia *Aeromonadaceae* y comprende un grupo de bacterias Gram negativas ampliamente distribuidas en ambientes acuáticos, causantes de enfermedad en humanos y peces, principalmente. La taxonomía del género es compleja y existen controversias (Janda y Abbott, 2010). Mediante el análisis filogenético multilocus, a la fecha se incluyen al menos 27 especies y una candidata a especie nueva: “*A. lusitana*” (Martínez-Murcia *et al.*, 2011).

La especie *A. salmonicida* es el agente etiológico de una condición septicémica en peces, llamada furunculosis. Es una enfermedad importante en salmónidos silvestres y de cultivo, entre otras especies de peces, y puede tener un impacto económico en granjas trutícolas (Noga, 2010). Algunas *Aeromonas* móviles causan septicemia en diversas especies de peces (Beaz-Hidalgo *et al.*, 2013a), entre éstas, *A. hydrophila* (Pridgeon y Klesius, 2011; Hossain *et al.*, 2013).

En México, se ha aislado e identificado el género *Aeromonas* con base en las características fenotípicas mediante pruebas bioquímicas de rutina. La especie *A. hydrophila* se ha identificado en trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) y tilapia (*Oreochromis aureus*) destinadas para consumo humano (Constantino *et al.*, 1997), truchas arcoíris enfermas (*Oncorhynchus mykiss*) (Fuente y Pérez, 1998), peces dorados de ornato enfermos (*Carassius auratus*) (Negrete *et al.*, 2004), charales (*Chirostoma humboldtianum*) (Paniagua *et al.*, 2006), cocodrilos (*Crocodylus actus* y *C. moreletii*) (Charruau *et al.*, 2012). En 2006–2007, investigadores del Centro de Investigación y Estudios Avanzados en Salud Animal (CIESA) FMVZ-JAEM, realizaron un estudio bacteriológico a partir de truchas arcoíris procedentes de granjas de siete estados de la República Mexicana, entre ellos el Estado de México, considerado el principal productor nacional de esta especie acuática (Salgado-Miranda *et al.*, 2010). Los resultados mostraron que los aislamientos de *Aeromonas* representaron el 48% de un total de 371 aislamientos bacterianos obtenidos a partir de 563 peces incluidos en el estudio. Un total de 84 (22.25%) aislamientos fueron

identificados como *A. hydrophila* y 7 (1.88%) como *A. salmonicida*. No fue posible la identificación de especie de 90 aislamientos (24.25%), registrados como *Aeromonas* spp.

Otros autores identifican el género utilizando métodos moleculares mediante RFLP (por sus siglas en inglés *Restriction Fragment Length Polymorphism*) del gen 16S RNAr. Castro-Escarpulli *et al.* (2003) identificaron *A. salmonicida* (67.5%), *A. bestiarum* (20.9%), *A. encheleia* (3.9%) y *A. hydrophila* (2.6%) en un total de 80 aislamientos obtenidos de 250 muestras de tilapia (*Oreochromis niloticus*) congelada procedentes de mercados del Distrito Federal. Soriano-Vargas *et al.* (2010) identificaron *A. bestiarum* inmóvil en carpa común. Recientemente Soto-Rodríguez *et al.* (2013) identificaron las especies *A. allosaccharophila*, *A. dhakensis*, *A. popoffii* y *A. veronii* en granjas de tilapia.

Los trabajos mencionados emplean métodos de identificación basados en propiedades fenotípicas o utilizando el gen 16S RNAr. Actualmente se conoce que estos métodos de identificación del género *Aeromonas* no son confiables, por lo que se recomienda la utilización de otros marcadores moleculares, como los genes codificantes de proteínas esenciales o *housekeeping*. En México se identificaron las especies *A. veronii* (44.5%), *A. hydrophila* (15.6%), *A. salmonicida* (13.3%), *A. caviae* (11.1%), *A. allosaccharophila* (4 8.9%), *A. media* (4.4%) y *A. sobria* (2.2%) en muestras de carpa (*Ciprinus carpio*) procedentes de mercados del Distrito Federal utilizando el gen *rpoD* (Sarria-Guzmán *et al.*, 2014). Sin embargo se desconocen las especies de *Aeromonas* que infectan la trucha arcoíris de cultivo destinadas para consumo humano.

II. REVISIÓN DE LITERATURA

a. Historia

Sanarelli (1981) reportó el aislamiento de la bacteria *Bacillus hydrophilus fuscus* asociado a septicemia en ranas, posteriormente se reportó el aislamiento a partir de agua, leche, pero el primer reporte de la asociación del género *Aeromonas* con trucha fue por Emmerich y Weibel en 1984 asociado a furunculosis (Farmer *et al.*, 2006). Entre 1920 a 1935, el género *Aeromonas* por mucho tiempo fue confundido con otros géneros tales como: *Bacillus*, *Bacterium*, *Aerobacter*, *Proteus*, *Pseudomonas*, *Escherichia*, *Achromobacter*, *Flavobacterium*, *Necromonas* y *Vibrio* (Farmer *et al.*, 2006). La definición del género es atribuida a Stainer en 1946 por la descripción de *A. hydrophila* (Janda y Abbott, 2010). Durante el periodo de los años 70's dos grandes grupos fueron establecidos con base en la temperatura de crecimiento y la capacidad de movilidad: el primer grupo es amplio y genéticamente heterogéneo, asociado principalmente a infecciones en humanos, éste es considerado móvil y la temperatura óptima de crecimiento es de 35–37 °C (grupo mesofílicas) y está representado por *A. hydrophila* (Janda y Duffey, 1988). El segundo grupo es genéticamente homogéneo y se refiere a las especies no móviles. La temperatura óptima de crecimiento es de 22–25 °C (grupo psicrófilico) y está representado por *A. salmonicida* (Janda y Abbott, 2010). Sin embargo hoy en día se conoce que algunas cepas de la especie *A. salmonicida* pueden crecer a 37 °C pero las cepas consideradas atípicas solo pueden crecer hasta los 30 °C (Martínez-Murcia *et al.*, 2005). Posteriormente estos grupos fueron relacionados mediante pruebas de hibridación de DNA–DNA, estableciendo 8 grupos de hibridación (HG por sus siglas en inglés *Hybridation Groups*) (Popoff *et al.*, 1981) y ampliado a 12 en 1986 (Martin–Carnahan y Jospheh, 2005). El último grupo de hibridación reportado fue el de *A. popoffii* (HG17) (Huys *et al.*, 1997). Actualmente se tiende a nombrar sólo la especie y abandonar la nomenclatura de grupos de hibridación.

Durante algún tiempo, el género *Aeromonas* se agrupó en la familia *Vibrionaceae*. Sin embargo, estudios realizados por Colwell *et al.* (1986) con base en el análisis de las secuencias de los genes 16S y 5S RNAr, en el género *Aeromonas* demostraron una

evolución filogenética distinta al de las familias *Enterobacteriaceae* y *Vibrionaceae*, apoyando la propuesta de elevar al nivel de género a la familia *Aeromonadaceae*.

b. Características del género *Aeromonas*

Los miembros del género *Aeromonas* se caracterizan por ser bacilos Gram negativos que miden de 0.3 por 1.0 a 3.5 μm , agrupados en pares o en cadenas cortas (Martin–Carnahan y Josph, 2005). La mayoría de las especies son móviles por un flagelo polar, pueden formar flagelos peritricos en cultivos jóvenes y algunas especies presentan el flagelo lateral. Generalmente son oxidasa y catalasa positivos, capaces de degradar nitratos a nitritos, fermentadores de la glucosa y generalmente resistentes al factor vibriostático O/129 (2,4-Diamino-6,7-di-iso-propilpteridina fosfato). Puede crecer en un rango amplio de temperaturas (0 a 45 °C), pero la temperatura óptima de crecimiento es entre 22 y 37 °C (Abbott *et al.*, 2003; Martin–Carnahan y Josph, 2005; Martínez–Murcia *et al.*, 2005).

c. Taxonomía del género *Aeromonas*

El nombre del género deriva de las palabras griegas *aer*, que significa aire o gas y *monas*, que significa unidad, es decir unidades productoras de gas. Actualmente el género *Aeromonas* pertenece a la Clase *Gammaproteobacterias*, Orden *Aeromonadales*, Familia *Aeromonadaceae*, e incluye 3 géneros: *Aeromonas*, *Oceanimonas* y *Tulomonas* (Martin–Carnahan y Josph, 2005). El género *Aeromonas* comprende 27 especies y una candidata a especie nueva, “*A. lusitana*” (**Cuadro 1**). La taxonomía del género es compleja y ha experimentado diversos cambios por la reclasificación de varias especies y la incorporación nuevas especies, principalmente con la utilización de marcadores genéticos (Yañez *et al.*, 2003; Soler *et al.*, 2004; Figueras *et al.*, 2011c; Martínez–Murcia *et al.*, 2011).

d. Fenopecies y grupos de hibridación

Las primeras clasificaciones del género se llevaron a cabo mediante características fenotípicas con base en pruebas bioquímicas y se asignaron como fenopecies,

posteriormente la incorporación de métodos genotípicos y el establecimiento de grupos de hibridación o geno-especies mediante pruebas de hibridación DNA-DNA (Janda y Abbott, 2010). La asociación de estos dos grandes grupos seguía suponiendo un problema debido a que existían discrepancias entre los grupos fenotípicos y genotípicos (Miñana-Calbis *et al.*, 2002). Abbott *et al.* (2003) describieron una amplia heterogeneidad en 62 pruebas bioquímicas, solo el 14% de las pruebas utilizadas presentaban uniformidad en los resultados. Abbott *et al.* (2003) reportaron características bioquímicas atípicas del género que complicaron la identificación, sin embargo propusieron un esquema de identificación fenotípica de 14 especies (15 HG) basándose en 3 pruebas bioquímicas: arginina dehidrolasa, descarboxilación de la lisina y ornitina, las cuales permitieron agrupar las 14 especies estudiadas en 5 grupos. La correlación que existe entre la identificación bioquímica (feno-especies) y genética utilizando RFLP del gen 16S DNAr son bajas y se reportan rangos entre 18.8% a 30.5% (Castro-Escarpulli *et al.*, 2003; Beaz-Hidalgo *et al.*, 2010). Sin embargo estudios realizados por Ormen *et al.* (2005), evaluaron la correlación entre la identificación fenotípica y genotípica utilizando aislamientos clínicos y ambientales y observaron porcentajes inferiores de correlación entre ambas técnicas en aislamientos ambientales (5%) que en clínicos (55%).

e. Gen 16S RNAr en la taxonomía del género *Aeromonas*

El gen RNA ribosómico es considerado un marcador molecular estable para la identificación de especies bacterianas, ya que su distribución es universal y permite la comparación de microorganismos (Woo *et al.*, 2008). Estos genes se encuentran entre 2 a 13 copias en el genoma bacteriano y se describen diferencias nucleotídicas intragenómicas entre las copias con rangos de 1 a 19 nucleótidos diferentes (polimorfismos o microheterogeneidades). Estas diferencias ocurren principalmente en la región variable 1, 2 y 6 (Coenye y Vandamme, 2003). En el género *Aeromonas*, el gen 16S RNAr presenta un rango de similitud interespecie del 96.7 al 100%, lo cual dificulta la separación de las especies altamente relacionadas (Martínez-Murcia *et al.*, 2007), aunado a la presencia de microheterogeneidades en el 8.1% (81/999) con un rango de 1 a 10 cambios nucleotídicos (0.06 – 0.66%) localizados principalmente en las regiones V3 y V6 del gen y que causan

errores en la identificación de especies (Alperi *et al.*, 2008). La presencia de esta microheterogeneidad se ha reportado en las especies *A. popoffii* (Demarta *et al.*, 1999), *A. veronii* (Huys *et al.*, 2005), *A. bestiarum*, *A. salmonicida* (Martínez-Murcia *et al.*, 2005), *A. hydrophila* (Seshadri *et al.*, 2006), *A. allosacharophila* (Saavedra *et al.*, 2007), *A. encheleia*, *A. molluscorum* (Miñana-Galbis *et al.*, 2004), *A. fluvialis* (Alperi *et al.*, 2010b), *A. taiwanensis*, *A. sanarelli* (Alperi *et al.*, 2010a) y *A. rivuli* (Figueras *et al.*, 2011b).

f. Polimorfismo de longitud de los fragmentos de restricción.

Borrell *et al.* (1997) desarrollaron un protocolo basado en el análisis de los patrones de restricción (RFLP) amplificando un fragmento de 1503 pb del gen 16S ADNr y utilizando 2 endonucleasas AluI y MboI, el cual permitía la identificación de 11 especies. Posteriormente, el protocolo fue ampliado por Figueras *et al.* (2000) permitiendo la identificación de las 14 especies aceptadas en el momento de su publicación. Otros protocolos descritos incluyen: la amplificación (953 pb) del gen ARNr 16S y las endonucleasas AluI, CfoI, PvuII y XhoI (Lee *et al.*, 2002). Sin embargo, este protocolo no discrimina *A. bestiarum* de *A. salmonicida*; pero sí con el protocolo propuesto por Borrell *et al.* (1997) y Figueras *et al.* (2000). La aparición de patrones atípicos a causa de las microheterogeneidades (Alperi *et al.*, 2008) y la incorporación de nuevas especies estrechamente relacionadas (*A. salmonicida/A. bestiarum/A. piscicola*) (Beaz-Hidalgo *et al.*, 2009) permitió la incorporación de los genes *housekeeping* principalmente el gen *rpoD* para la correcta identificación de especie en el género (Beaz-Hidalgo *et al.*, 2010).

Cuadro 1. Especies que integran el género *Aeromonas*

Especie	HG	Cepa tipo	Equivalencias en otras colecciones	Origen	Referencia
<i>A. hydrophila</i>	1	ATCC 7966 ^T	CECT839 ^T , LMG 2844 ^T , TCTC 8049 ^T	Lata de leche con olor a pescado	Stainer (1943)
<i>A. bestiarum</i>	2	ATCC 51108 ^T	CECT 4227 ^T , CDC 9533 ^T , LMG 3751 ^T	Pez enfermo	Ali <i>et al.</i> (1996)
<i>A. salmonicida</i>	3	ATCC 33658 ^T	CECT 894 ^T , CIP 103210 ^T , LMG 3782 ^T	Salmón común	Griffin <i>et al.</i> (1953)
<i>A. caviae</i>	4	ATCC 15468 ^T	CECT 838 ^T , LMG 3775 ^T	Epizootia en jóvenes cobayos	Schubert y Hegazi (1988)
<i>A. media</i>	5	ATCC 33907 ^T	CECT 4232 ^T , LMG 9073 ^T , NCIMB 2237 ^T	Agua en granja de peces	Allen <i>et al.</i> (1983)
<i>A. eucrenophila</i>	6	ATCC 23309 ^T	CECT 4224 ^T , LMG 3774 ^T , NCIMB 74 ^T	Carpa con ascitis	Schubert y Hegazi (1988)
<i>A. sobria</i>	7	ATCC 43979 ^T	CECT 4245 ^T , CIP 7433 ^T , LMG 3783 ^T	Pez	Popoff <i>et al.</i> (1981)
<i>A. veronii</i>	10	ATCC 35624 ^T	CECT 4257 ^T , LMG 9075 ^T	Esputo de víctima de ahogamiento	Hickman-Brenner <i>et al.</i> (1987)
<i>A. jandaei</i>	9	ATCC 49568 ^T	CECT 4228 ^T , LMG 12221 ^T	Heces humanas	Carnahan <i>et al.</i> (1991a)
<i>A. schubertii</i>	12	ATCC 43700 ^T	CECT 4240 ^T ; NCIMB 13161 ^T	Absceso de la frente	Hickman-Brenner <i>et al.</i> (1988)
<i>A. trota</i>	14	ATCC 49657 ^T	CECT 4255 ^T ; LMG 12223 ^T	Heces humanas	Carnahan <i>et al.</i> (1991b)
<i>A. allosaccharophila</i>	15	ATCC 51208 ^T	CECT 4199 ^T , CCUG 31218 ^T , LMG 14059 ^T	Anguila	Martínez-Murcia <i>et al.</i> (1992)
<i>A. encheleia</i>	16	ATCC 51929 ^T	CECT4342 ^T , NCIMB 13442 ^T	Anguila	Esteve <i>et al.</i> (1995)
<i>A. popoffii</i>	17	ATCC BAA- 243 ^T	CECT 5176 ^T , LMG 17541 ^T , CCM 4708 ^T , CIP 105493 ^T , NCIMB 13618 ^T	Agua potable	Huys <i>et al.</i> (1997b)
<i>A. simiae</i>		CIP 107798 ^T	CCUG47378 ^T , DSM 16559 ^T , LMG	Heces de mono	Harf-Monteil <i>et al.</i> (2004)

		22269 ^T		
<i>A. molluscorum</i>		CECT 5864 ^T	CCUG 50741 ^T , LMG 22214 ^T	Moluscos bivalvos
<i>A. bivalvium</i>		CECT 7113 ^T	LMG 23376 ^T	Moluscos bivalvos
<i>A. tecta</i>		CECT 7082 ^T	CCM7605 ^T , DSM 17300 ^T , LMG 24874 ^T	Heces de niño con diarrea
<i>A. dhakensis</i>		CECT 5744 ^T	DSM 18362 ^T , CIP 107500 ^T , DSM 17689 ^T , LMG 19562 ^T	Heces de niño con diarrea
<i>A. piscícola</i>		CECT 7443 ^T	LMG 24783 ^T , CCM 7715 ^T	Salmon enfermo (<i>Salmo salar</i>)
<i>A. fluvialis</i>		CECT 7401 ^T	CIP 110205 ^T , LMG 24681 ^T	Agua de río
<i>A. sanarellii</i>		CECT 7402 ^T	CIP 110203 ^T , LMG 24682 ^T	Herida, mujer de 70 años
<i>A. taiwanensis</i>		CECT 7403 ^T	CIP 110204 ^T , LMG 24683 ^T	Herida por quemadura, hombre 40 años
<i>A. diversa</i>	13	ATCC 43946 ^T	CECT 4254 ^T , CCM 7325 ^T , LMG 17321 ^T	Herida en la pierna (Humano)
<i>A. rivuli</i>		CECT 7518 ^T	DSM 22539 ^T , MDC 2511 ^T	Agua dulce
<i>A. cavernicola</i>		CECT 7862 ^T	CCM 7641 ^T , DSM 24474 ^T ,	Agua de arroyo en una caverna
<i>A. australiensis</i>		CECT 8023 ^T	CCM 8484 ^T , LMG 26707 ^T	Sistema de riego
<i>“A. lusitana”</i>		CECT 7828 ^T	DSM 24095 ^T	Agua termal

Modificado de Martin-Carnahan y Jospheh, 2005; Farmer *et al.*, 2006; Janda y Abbott, 2010; Martínez-Murcia *et al.*, 2011.

g. Genes que codifican proteínas esenciales (*housekeeping*)

Los genes que codifican proteínas con funciones esenciales para la supervivencia de la bacteria y para ser utilizados en el análisis filogenético; tienen que cumplir algunas características, como no estar influenciados por la transferencia horizontal de genes, estar presentes en todas las bacterias, preferentemente tener solo una copia del gen en el genoma de la bacteria, presentar al menos dos regiones conservadas para el diseño de iniciadores (Harayama y Kasai, 2006). Estos genes, llamados también *housekeeping*, tienen una mayor resolución para la diferenciación de especies estrechamente relacionadas (Figueras *et al.*, 2011c). Estos genes se han descrito en la tipificación de secuencias multilocus (MLST por sus siglas en inglés *Multilocus Sequences Typing*), posteriormente modificado a análisis de secuencias multilocus (MLSA por sus siglas en inglés *Multilocus Sequence Analysis*) (Figueras *et al.*, 2011c). Las secuencias de estos genes son utilizadas en un análisis filogenético mediante árboles filogenéticos, por lo que proponen el nombre análisis filogenético multilocus (MLPA por sus siglas en inglés *Multilocus Phylogenetic Analysis*) (Alperi *et al.*, 2010a; Alperi *et al.*, 2010b; Figueras *et al.*, 2011c; Martínez-Murcia *et al.*, 2011).

En el género *Aeromonas* se ha realizado el análisis filogenético multilocus incluyendo 7 genes concatenados (*gyrB*, *rpoD*, *recA*, *dnaJ*, *gyrA*, *dnaX* y *atpD*) (Martínez-Murcia *et al.*, 2011). Roger *et al.* (2012) utilizaron 6 genes diferentes (*dnaK*, *gltA*, *gyrB*, *radA*, *rpoB*, *tsf* y *zipA*). Sin embargo los genes *gyrB* y *rpoD* son una excelente herramienta para la identificación y el reconocimiento de nuevas especies (Soler *et al.*, 2004; Alperi *et al.*, 2010a, 2010b; Beaz-Hidalgo *et al.*, 2010; Figueras *et al.*, 2011b, 2011c). Dentro de la taxonomía del género, el análisis filogenético multilocus es considerado una alternativa para la identificación de nuevas especies, pudiendo sustituir las hibridación DNA-DNA (Figueras *et al.*, 2011c).

h. Tipificación molecular

Las técnicas de tipificación molecular más utilizadas son aquellas que utilizan el DNA total de la bacteria. Destacan la electroforesis en gel de campo pulsado (PFGE por sus siglas en inglés *Pulsed-Field Gel Electrophoresis*), Amplificación al azar de fragmentos polimórficos de DNA (RAPD por sus siglas en inglés *Random Amplification of Polymorphic DNA*), amplificación por PCR de secuencias palindrómicas repetitivas (REP-PCR por sus siglas en inglés *Repetitive Extragenic Palindromic PCR*), amplificación las secuencias intergénicas consenso repetidas de Enterobacterias (ERIC por sus siglas en inglés *Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus*) (Harayama y Kasai, 2006). Son protocolos basados en PCR de punto final, utilizadas para identificar relaciones genéticas: diversidad y clonalidad (Harayama y Kasai, 2006; Figueras *et al.*, 2011c). Se han realizado evaluaciones entre las diferentes técnicas. Soler *et al.* (2003) reportaron un mayor poder discriminatorio utilizando ERIC-PCR. Aunque la combinación de 2 técnicas produce mejores resultados ERIC y REP-PCR (Soler *et al.*, 2003) con la capacidad de agrupar los aislamientos en cuanto a su origen (clínico o ambiental) (Aguilar-Arreola *et al.*, 2005). Otros autores mencionan la utilización de estos métodos para estudios epidemiológicos (Aguilar-Arreola *et al.*, 2005; Godoy *et al.*, 2010; Ndi y Barton *et al.*, 2011; Fontes *et al.*, 2011).

i. Hábitat.

El género *Aeromonas* presenta una distribución mundial y es autóctono de medios acuáticos. Se ha aislado a partir de aguas superficiales, subterráneas, potable, embotelladas, residuales y de riego (Janda y Abbott, 2010; Egorov *et al.*, 2011), así como de frutas, verduras, productos lácteos, carnes, embutidos, pescados y marisco (Borrell *et al.*, 1998; Janda y Abbott, 2010; Fontes *et al.*, 2011). Particularmente se ha aislado de muestras clínicas como heces, heridas, procesos septicémicos, colangitis, endoftalmitis, infecciones intrahospitalarias, infecciones respiratorias, infecciones del tracto urogenital, enfermedades pancreáticas o hepatobiliares, peritonitis, como agente causal del síndrome urémico hemolítico (SUH) (Figueras *et al.*, 2007; Figueras *et al.* 2009; Tena *et al.*, 2009; Janda y

Abbott, 2010; Hernández *et al.*, 2011). En el ámbito veterinario tiene una mayor importancia en la acuicultura y puede afectar una amplia gama de peces de importancia económica (Beaz-Hidalgo *et al.*, 2013a). La especie *A. salmonicida* se considera la más importante y es el agente causal de la furunculosis, una enfermedad que afecta alevines, crías y adultos. Se describen cuatro formas de presentación: hiperaguda, aguda, crónica e intestinal; sin embargo en las dos primeras formas se registran mortalidades elevadas principalmente (Figueras *et al.*, 2011a). Factores tales como estrés (aumento de la temperatura, aumento en los niveles de amonio, nitratos y bajos niveles de oxígeno) pueden aumentar la tasa de mortalidad (90%) (Dror *et al.*, 2006). Con el uso de genes *housekeeping* se han identificado otras especies en peces enfermos o clínicamente sanos: *A. bestiarum*, *A. caviae*, *A. encheleia*, *A. eucrenophila*, *A. hydrophila*, *A. media*, *A. piscicola*, *A. sobria*, *A. schubertii* y *A. tecta* (Beaz-hidalgo *et al.*, 2010; Liu y Li, 2012; Beaz-Hidalgo *et al.*, 2013a). Las *Aeromonas* mesofílicas están emergiendo como patógenos importantes causando pérdidas económicas en Estados Unidos de América, particularmente produciendo septicemia en el pez gato (*Ictalurus punctatus*) (Pridgeon y Klesius *et al.*, 2011).

j. Factores de virulencia

Las infecciones producidas por *Aeromonas* presenta una gran variedad de manifestaciones clínicas y se consideran multifactoriales (Noga, 2010). Los principales factores de virulencia en el género *Aeromonas* se pueden clasificar en 3 grupos: componentes estructurales, productos extracelulares y sistemas de secreción (Beaz-Hidalgo *et al.*, 2013a; Dallaire-Dufresne *et al.*, 2014). En los componentes estructurales se encuentran principalmente las adhesinas que pueden ser de tipo fimbriales (flagelos, fimbrias) y no fimbriales (lipopolisacáridos, cápsula, proteínas de membrana externa) (Beaz-Hidalgo *et al.*, 2013a). El género *Aeromonas* presenta flagelo polar y lateral (Merino *et al.*, 1997; Merino *et al.*, 2003) los cuales están involucrados en la adherencia y la formación de biofilm (Kirov *et al.*, 2004; Canals *et al.*, 2007). Estudios realizados por Quin *et al.* (2014) sugieren que la expresión del flagelo en el género es de importancia en la invasividad y la resistencia a la fagocitosis ya que, al utilizar cepas mutantes que no

expresan el flagelo, sobreviven menos tiempo dentro de los macrófagos a diferencia de una cepa no mutante.

En el género *Aeromonas* se han detectado las fimbrias tipo I y IV: el primero participa en la adhesión y facilitan el proceso de colonización (Figueras *et al.*, 2011c), el segundo (IV) está implicado en la adherencia, colonización, invasión, formación de biofilm y virulencia (Masada *et al.*, 2002; Boyd *et al.*, 2008; Beaz-Hidalgo *et al.*, 2013a). Las proteínas de membrana externa están implicadas en la protección contra los factores de defensa del hospedero y participan en los procesos de osmoregulación y obtención de nutrientes (Janda y Abbott, 2010; Figueras *et al.*, 2011; Beaz-Hidalgo *et al.*, 2013a). La capa A es la más caracterizada y las proteínas de membrana externa está implicada en la adherencia a los macrófagos, por lo que facilita la colonización y confieren protección contra el sistema del complemento (Dallaire-Dufresne *et al.*, 2014). Las proteínas de membrana externa son importantes estructuras inmunogénicas (porina de 40 kDa) (Merino *et al.*, 2005). También se han descrito endopeptidasas de membrana externa (PepO) las cuales están implicadas en la formación de úlceras (Albolghait *et al.*, 2010).

El lipopolisacárido (LPS) está compuesto por tres subunidades: el polisacárido O (antígeno O), el núcleo del LPS (polisacárido central) y el lípido A, que los ancla a la membrana externa de la bacteria; Estas juegan un papel importante en la organización y el mantenimiento de la membrana externa y es responsable de producir una respuesta inflamatoria no específica (Beaz-Hidalgo *et al.*, 2013a). Se sugiere que el LPS podría estar implicado en la translocación de la bacteria en el intestino de los peces, ya que la exposición de LPS purificado en células del intestino aumentaron la translocación de la bacteria (Jutfelt *et al.*, 2008).

La cápsula es una estructura polisacarídica que recubre la membrana externa de la bacteria, con lo cual le confiere resistencia a la fagocitosis y al sistema del complemento. También juega un papel importante en la adherencia a líneas celulares de peces (Figueras *et al.*, 2011a).

k. Productos extracelulares

En *Aeromonas*, varios productos extracelulares, entre los cuales destacan las enterotoxinas citotóxicas (*act*) y citotónicas (*ast* y *alt*), las aerolisinas y hemolisinas (*aerA*), las proteasas (*ser* y *ahyB*), las lipasas (*lip*), las fosfolipasas (*gcat*), y las DNAsas (*exu*) (Janda y Abbott, 2010; Soler *et al.*, 2002; Kimgombe *et al.*, 1999; Aguilera-Arreola *et al.*, 2005; Chacón *et al.*, 2003). Las aerolisinas/hemolisinas causan un efecto citolítico creando poros en la membrana de las células, provocando su lisis (Beaz-Hidalgo *et al.*, 2013a) y son encontrados con mayor frecuencia en aislamientos obtenidos de peces (Castro-Escarpulli *et al.*, 2003). Las proteasas son consideradas de mayor importancia en el género, ya que son las responsables de la lisis del moco y producir daño en el tejido, facilitando la invasión de la bacteria (Dallaire-Dufresne *et al.*, 2014). Las lipasas tienen un efecto hidrolítico en la membrana de las células del hospedero (Figueras *et al.*, 2011a). Chacón *et al.* (2003) identificaron el gen *gcat* en todos los aislamientos pertenecientes al género *Aeromonas*, por lo cual fue utilizado como un gen para la identificación de miembros del género. Sin embargo, Yi *et al.* (2013) reportaron la ausencia del gen *gcat* 2.8% (2/70) en las especies *A. veronii* y *A. trota*.

l. Sistemas de secreción

Existen seis sistemas de secreción en las bacterias Gram negativas. En el género *Aeromonas* se han descrito los sistemas tipo II (T2SS), III (T3SS), IV (T4SS) y VI (T6SS). El T2SS es el sistema general de secreción y se utiliza para transportar proteínas extracelulares (Maltz y Graf, 2011). El T3SS es uno de los sistemas de secreción por los que las toxinas o proteínas efectoras pueden ser inyectadas directamente desde el protoplasma de la célula bacteriana al citoplasma de la célula del hospedero, causando la lisis o apoptosis de la célula, de forma similar al T6SS (Chacón *et al.*, 2004; Braun *et al.*, 2002; Fehr *et al.*, 2006; Beaz-Hidalgo *et al.*, 2013) y juega un papel muy importante en la virulencia y en la respuesta inmune (Burr *et al.*, 2005; Carvalho-Castro *et al.*, 2010; Bergh *et al.*, 2013; Vanden y Frey, 2013). El T4SS es reconocido como el único capaz de realizar transferencia genética entre bacterias y pueden mediar la resistencia a los antibióticos y los

factores de virulencia entre las poblaciones bacterianas (Rangrez *et al.*, 2010; Ruiz-Ruiz *et al.*, 2012; Beaz-Hidalgo *et al.*, 2013).

m. Resistencia antimicrobiana

Los antimicrobianos son la principal herramienta para controlar los brotes de furunculosis ocasionados por *A. salmonicida* y por especies móviles del género *Aeromonas* (Noga, 2010). Antes de iniciar un tratamiento es necesario evaluar las condiciones de estrés que favorecen la presencia de la enfermedad, ya que muchos de los brotes producidos por *Aeromonas* móviles pueden autolimitarse sin tratamiento antimicrobiano (Noga, 2010). En caso de ser necesario un tratamiento es indispensable determinar el patrón de sensibilidad del aislamiento, lo que permite orientar el tratamiento (Austin y Austin, 2007; Noga, 2010). En 82 aislamientos obtenidos en tilapia destinados para consumo humano en México, se observó resistencia a ampicilina (100%), penicilina (100%), carbencilina (100%), cefalotina (100%), clindamicina (100%), polimixin B (86%), estreptomina (75%), gentamicina (58.4%), rifampicina (57%), eritromicina (55%), trimetoprim-sulfametoxazol (49%), tetraciclinas (44%), ciprofloxacina (42%), neomicina (40.2%), kanamicina (28.5%), amikacina (23%), piperacilina (19%), imipenem (10%) y cloranfenicol (9%) (Castro-Escarpulli *et al.*, 2003). La resistencia a los agentes antimicrobianos es una respuesta genético-evolutiva y está mediada por la presencia de genes, algunos de los cuales se localizan en plásmidos, integrones o en el genoma de la bacteria. Ndi y Barton (2011) reportaron un incremento de la resistencia a los antimicrobianos beta-lactámicos por la presencia de genes que codifican para la producción de beta-lactamasas. Las beta-lactamasas de espectro extendido, metalo beta lactamasas son comúnmente reportados en el género (Janda y Abbott, 2010) y particularmente en la acuicultura (Jacobs y Chenia, 2007). Los integrones son capaces de capturar los genes *cassettes* del medio ambiente e incorporarlos utilizando un sitio específico de recombinación (Fluit y Schmitz, 2004). El integrón clase 1 es el más común reportado en el género (Perez-Valdespino *et al.*, 2009; Ndi y Barton, 2011).

III. JUSTIFICACIÓN

En México se ha informado una alta prevalencia del género *Aeromonas* en trucha arcoíris de cultivo destinadas para consumo humano. Sin embargo, la identificación se ha realizado con base en las características fenotípicas de los aislamientos, lo cual puede dar falsos positivos a nivel de género e identificar incorrectamente las especies, por lo que es necesario identificar de manera precisa las especies presentes en estos organismos acuáticos. Así mismo, se desconoce la sensibilidad antimicrobiana de aislamientos obtenidos de la trucha arcoíris y los genes que pueden favorecer la resistencia a los antimicrobianos, lo cual es de importancia para establecer las estrategias de control mediante una terapéutica antimicrobiana racional.

IV. HIPÓTESIS

En México se han identificado las especies *A. veronii*, *A. hydrophila*, *A. salmonicida* como las más prevalentes en peces destinados para consumo humano. En la trucha arcoíris las especies identificadas son *A. hydrophila*, *A. salmonicida* y *Aeromonas* spp. es posible que estas especies y otras raramente asociadas con la trucha arcoíris sean identificadas genéticamente en esta especie acuática.

Con base en la observación de que los aislamientos de *Aeromonas* obtenidos a partir de peces destinados para consumo humano muestran una mayor multiresistencia antimicrobiana y la presencia de genes que favorecen la resistencia de los antimicrobianos, es muy posible que se observe un patron similar al informado en granjas de trucha arcoíris.

V. OBJETIVOS

Identificar y caracterizar fenotípicamente y molecularmente aislamientos de *Aeromonas* spp. obtenidos de trucha arcoíris de cultivo.

a. Objetivos específicos

- Aislar y caracterizar fenotípicamente aislamientos presuntivos de *Aeromonas* a partir de branquias, intestino, hígado, bazo y riñón de la trucha arcoíris.
- Confirmar los aislamientos presuntivos de *Aeromonas* utilizando el PCR específico de género.
- Determinar ampliamente las características fenotípicas de los aislamientos confirmados como *Aeromonas*.
- Determinar la sensibilidad antimicrobiana de los aislamientos incluidos en el estudio.
- Identificar los aislamientos a nivel de especie mediante el RFLP de gen 16S ADNr.
- Secuenciar y analizar los genes *gyrB* y *rpoD* de los aislamientos.
- Determinar la presencia de los genes *bla_{TEM}*, *bla_{SHV}*, *bla_{CphA}* y *bla_{IMP}* en los aislamientos de *Aeromonas* incluidos en el estudio.
- Detectar el gen de la integrasa y los *cassettes* genéticos de la región variable del integrón clase 1 en los aislamientos de *Aeromonas*.

VI. MATERIAL Y MÉTODO

a. Aislamiento bacteriano y condiciones de cultivo.

Durante el periodo comprendido entre Enero de 2011 a Enero de 2012 fueron remitidos al Centro de Investigación y Estudios Avanzados en Salud Animal (CIESA). 100 casos de trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*) como parte del programa de vigilancia epidemiológica establecido por los Comités de Sanidad Acuícola del Estado de México, Hidalgo, Michoacán y Veracruz.

Fueron incluidos al azar en el estudio bacteriológico un organismo clínicamente sano de cada caso. Así mismo se incluyeron los organismos que mostraban lesiones macroscópicas. A los organismos incluidos en el estudio bacteriológico se practicó la eutanasia por contusión craneal y decapitación (OIE, 2013).

Se obtuvieron muestras de branquias, hígado, bazo, intestino, riñón y lesión o lesiones macroscópicas de cada organismo. Las muestras fueron cultivadas en placas con medio gelosa soya y tripticaseina (TSA, por sus siglas en inglés *Trypticase Soy Agar*) y base de agar con 10% de sangre de ovino. Las placas inoculadas fueron incubadas a 30 °C durante 24–72 horas. Las colonias sospechosas mostraron las siguientes características: Gram negativas y positivas para las pruebas de oxidasa, catalasa, ONPG (Ortonitrofenil galactopiranosido), reducción de nitratos, hidrólisis de la gelatina y DNasa (detección de enzima desoxirribonucleasa) fueron consideradas presuntivamente como *Aeromonas* spp. y se conservaron -80 °C en criotubos que contenían caldo soya y tripticaseina (TSB por sus siglas en inglés *Tryptic Soy Broth*) con 20% de glicerol, hasta su uso (Estudio VII.a).

b. Extracción de DNA

El DNA total se obtuvo utilizando el kit comercial InstaGene Matrix (Bio-Rad). Una colonia de un cultivo de 24 horas de incubación fue resuspendida en un Microtubo con 1.0 mL de agua destilada estéril y mezclada en vortex por 10 segundos, posteriormente fue

centrifugado a **16'128 x g** durante 1 minuto. El sobrenadante fue eliminado y el botón bacteriano fue resuspendido con 200 μL de la matriz de purificación Insta Gene Matrix e incubados durante 30 minutos a 56 °C y posteriormente mezclado durante 10 segundos en vortex a velocidad máxima, el microtubo fue colocado en agua a punto de ebullición durante 8 minutos y mezclado durante 10 segundos en vortex a velocidad máxima. Finalmente el microtubo fue centrifugado a **13' 400 x g**, durante 5 minutos y la fase líquida fue transferida a un microtubo estéril y almacenada a -20 °C hasta su uso (Estudio VII.a, b, c).

c. Extracción de DNA plasmídico

Se realizó utilizando el kit comercial QIAprep Spin Miniprep Kit (Hilden, Alemania), siguiendo las recomendaciones del fabricante. Para ello las bacterias fueron inoculadas e incubadas a 25 °C durante 24 horas en caldo de Luria-Bertani. Se tomó 1 mL de la suspensión bacteriana y se centrifugó durante 1 minuto a **16'128 x g**, eliminando totalmente el medio realizando 3 lavados por centrifugación utilizando una solución salina de fosfatos. El paquete bacteriano fue resuspendido en 250 μL de una solución reguladora (suspensión regulador P1) hasta conseguir una suspensión celular homogénea a la que se adicionaron 250 μL de una solución de lisis (lisis regulador P2). Se mezcló por inversión en seis ocasiones y se adicionaron 325 μL de una solución neutralizante (neutralización regulador N3). Inmediatamente la mezcla se homogenizó por inversión en seis ocasiones y fue centrifugada a **16'128 x g** durante 10 minutos. El sobrenadante fue transferido a una columna de filtrado (QIAprep spin column) y se centrifugó a **16'128 x g** por 30 segundos. Se eliminó el sobrenadante del tubo colector y se filtró en la columna 500 μL de una solución de unión (binding regulador PB) y se centrifugó a **16'128 x g** durante 1 minuto. Se eliminó el líquido del tubo colector y se colocó sobre el filtro de la columna 750 μL de una solución de lavado (wash regulador PE) y se centrifugó a **16'128 x g** durante 1 minuto. Se eliminó el líquido del tubo colector y se centrifugó a **16'128 x g** durante 1 minuto para eliminar completamente la solución de lavado del filtro. Finalmente la columna fue transferida a un microtubo de 1.5 mL estéril, se agregó sobre el filtro de la columna 50 μL de agua destilada

estéril y se dejó incubar a temperatura ambiente por un minuto y se centrifugó a **16'128 x g** durante 1 minuto, recuperando el filtrado que contenía el DNA plasmídico (Estudio VII.c).

d. PCR específico de género

Los aislamientos sospechosos de *Aeromonas* spp. fueron confirmados utilizando el PCR del gen glicerofosfolípido-colesterol aciltransferasa (*gcat*) utilizando los iniciadores y las condiciones descritas por Chacón *et al.* (2002). La reacción de PCR incluyó 5 µL regulador de PCR 10x (50 mM KCl, 75 mM Tris-HCl (pH 9.0), 1.5 mM MgCl₂, 1 µL 10 mM mezcla de dNTP's, 0.5 µL de Taq DNA polimerasa (5U/µL), 1 µL 10 mM de cada iniciador, 5 µL de DNA, se ajustó a un volumen final de 50 µL. Se incluyeron controles positivos y negativos. Se verificó la presencia del amplicón en geles de agarosa al 1.5% (Estudio VII.a).

Cuadro 2. Iniciadores y temperaturas programadas del ensayo de PCR para la amplificación del gen *gcat*.

Secuencia de los iniciadores (5'-3')	Tamaño del fragmento (pb)	Condiciones PCR		Ciclos
		°C	Minutos	
		95	3	1
GCAT-F: CTCCTGGAATCCCAAGTATCAG	237	94	1	
GCAT-R: GGCAGGTTGAACAGCAGTATCT		56	1	35
		72	1	
		72	5	1

e. Determinación de las características bioquímicas

Se determinaron las características bioquímicas de todos los aislamientos utilizando las pruebas bioquímicas convencionales en placa y tubo (Abbott *et al.*, 2003; Beaz-Hidalgo *et al.*, 2010), que incluyeron un total de 32 pruebas: motilidad, oxidasa, catalasa, indol, ONPG, reducción de nitratos, voges-proskauer (VP), rojo de metilo (RM), utilización de citrato, descarboxilación de la lisina y ornitina, arginina dehidrolasa, producción de DNasa, y producción de gas en glucosa. Asimismo, la hidrolisis de esculina, gelatina y urea,

producción de ácido de: L-arabinosa, celobiosa, m-inositol, lactosa, D-manitol, L-ramnosa, sacarosa, salicina, D-sorbitol y sucrosa. También la presencia de beta hemólisis en base de agar con 10% de sangre de ovino, resistente al agente vibriostático (0/129), crecimiento en concentraciones 0% y 6% de NaCl y crecimiento a 42 °C (Estudio VII.a).

Para el estudio VII.c se realizaron pruebas bioquímicas complementarias (Abbott *et al.*, 2003; Martínez-Murcia *et al.*, 2014) que incluyeron la hidrólisis de dodecilsulfato sódico (SDS), almidón, producción de ácido de glicerol, utilización de DL-lactato, L-arabinosa y crecimiento a concentraciones de 4.5% de NaCl. Los resultados obtenidos de las bioquímicas convencionales fueron comparados con el sistema automatizado MicroScan WalkAway-40 System.

f. Polimorfismo de longitud de los fragmentos de restricción (RFLP) del gen RNA ribosómico 16S (RFLP del gen 16S DNAr)

Los aislamientos confirmados como *Aeromonas* spp. fueron caracterizados con base en el patrón de RFLP del gen RNAr 16S mostrado, de acuerdo a lo descrito por Borrel *et al.* (1997) y Figueras *et al.* (2000). La amplificación del gen 16S DNAr se realizó empleando las condiciones e iniciadores descritos por Borrel *et al.* (1997). La reacción de PCR incluyó 5 µL regulador de PCR 10× (50 mM KCl, 75 mM Tris-HCl (pH 9.0), 1.8 mM MgCl₂, 1 µL 10 mM mezcla de dNTP's, 0.5 µL de Taq DNA polimerasa (5U/µL), 1 µL 10 mM de cada iniciador, 5 µL de DNA, se ajustó a un volumen final de 50 µL, se verificó la presencia de un amplicón de 1503 pb en geles de agarosa al 1.5%. Se incluyeron controles positivos y negativos. Previamente a la digestión se procedió a la purificación del amplificado empleando el kit comercial PureLink® PCR Purification (Life Technologies). El producto obtenido de la purificación fue sometido a una digestión enzimática doble (AluI y MboI) y los productos obtenidos de la digestión fueron analizados por electroforesis en geles de poliacrilamida al 17% y comparados con los patrones específicos de especie reportados (Borrel *et al.*, 2002; Figueras *et al.*, 2000; Beaz-Hidalgo *et al.*, 2010). Los patrones comunes fueron sometidos a digestión con las enzimas NarI, HaeIII y AlwNI, siguiendo el protocolo establecido por Figueras *et al.* (2000). La digestión enzimática fue

realizada en un volumen final de 20 μL , utilizando 5 μL del producto amplificado del gen 16S DNAr, 5U de cada enzima, 2 μL del regulador de la enzima 10X correspondiente (regulador A para la digestión doble AluI y MboI) y se aforó al volumen final con agua destilada estéril (Estudio VII.a).

Cuadro 3. Iniciadores y temperaturas programadas del ensayo de PCR para la amplificación del gen 16S DNAr.

Secuencia de los iniciadores (5'-3')	Tamaño del fragmento (pb)	Condiciones PCR		Ciclos
		°C	Minutos	
F:AGAGTTTGATCATGGCTCAG R: GGTTACCTTGTTACGACTT	1502	93	3	1
		94	1	
		56	1	35
		72	2	
		72	10	1

g. Secuenciación de los genes *gyrB-rpoD*

La correcta identificación a nivel de especie se realizó mediante el análisis de las secuencias de los genes *gyrB* (subunidad β de la girasa de DNA) y *rpoD* (factor sigma de la polimerasa de RNA) con base en el porcentaje de similitud con las cepas tipo para cada uno de los genes y la posición de las secuencias concatenadas (*gyrB-rpoD*) en el análisis filogenético. La amplificación del gen *gyrB* se realizó con los iniciadores y condiciones descritos por (Yañez *et al.*, 2003). La amplificación del gen *rpoD* se realizó con los iniciadores descritos por Yamamoto *et al.* (2000) utilizando las condiciones descritas por Soler *et al.* (2004) utilizando la técnica de *Touch Down PCR* (Cuadro 4). La reacción de PCR incluyó 5 μL regulador de PCR 10x (50 mM KCl, 75 mM Tris-HCl (pH 9.0), 2 mM MgCl₂, 1 μL 10 mM mezcla de dNTP's, 0.5 μL de Taq DNA polimerasa (5U/ μL), 1 μL 10 mM de cada iniciador, 5 μL de DNA, se ajustó a un volumen final de 50 μL . Se verificó la presencia del amplicón en geles de agarosa al 1.5% y controles positivos y negativos fueron incluidos. Se realizó la purificación del amplificado empleando el kit Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega) y se secuenciaron utilizando el método de Sanger en la empresa MacroGen Service Center (Korea) (Estudio VII.b).

Las secuencias obtenidas fueron ensambladas con el programa informático DNASTar SeqMan (Lasergene). Las secuencias de nucleótidos fueron alineadas utilizando el programa Clustal W incluyendo las secuencias publicadas de todas las cepas de referencia de las especies de *Aeromonas* actualmente identificadas (Martínez-Murcia *et al.*, 2011; Aravena-Román *et al.*, 2013; Beaz-Hidalgo *et al.*, 2013). Las distancias genéticas se obtuvieron mediante el modelo de dos parámetros de Kimura (Kimura, 1980) y los árboles filogenéticos se construyeron utilizando el método de Neighbor-Joining (Saitou y Nei, 1987) empleando el software MEGA 5.2 (Molecular Evolutionary Genetics Analysis) (Tamura *et al.*, 2011) (Estudio VII.b).

Cuadro 4. Iniciadores y temperaturas programadas del ensayo de PCR para la amplificación de los genes *housekeeping*.

Secuencia de los iniciadores (5'-3')	Tamaño del fragmento (pb)	Condiciones PCR		Ciclos
		°C	Minutos	
gyrB3F:TCCGGCGGTCTGTCACGGCGT gyrB14R:TTGTCCGGGTTGTACTIONGTC	1100	94	3	1
		94	0.5	
		55	05	35
		72	1	
		72	5	1
rpoD 70Fs: ACGACTGACCCGGTACGCATGTA rpoD 70Rs: ATAGAAATAACCCAGACGTAAGTT	820	95	5	1
		94	1	
		63	1	2
		72	1	
		94	1	
		61	1	2
		72	1	
		94	1	
		59	1	2
		72	1	
94	1			
58	1	30		
72	1			

h. Genotipificación ERIC-PCR.

Se realizó la prueba de reacción en cadena de la polimerasa de consenso intergénico de secuencias repetitivas de enterobacterias (ERIC-PCR). Esta técnica se empleó para obtener el genotipo de cada aislamiento, comparando los patrones de amplicones mostrados por cada aislamiento y comparándolos entre sí. Patrones de amplicones idénticos fueron considerados el mismo genotipo. Se utilizaron los iniciadores y las condiciones descritas por Versalovic *et al.* (1991). La reacción de PCR incluyó 5 µL regulador de PCR 10x (50 mM KCl, 75 mM Tris-HCl (pH 9.0), 3.0 mM MgCl₂, 1 µL 10 mM mezcla de dNTP's, 0.5 µL de Taq DNA polimerasa (5U/µL), 1 µL 10 mM de cada iniciador, 5 µL de DNA, se ajustó a un volumen final de 50 µL (Estudio VII.b).

Cuadro 5. Iniciadores y temperaturas programadas del ensayo de ERIC-PCR

Secuencia de los iniciadores (5'-3')	Tamaño del fragmento (pb)	Condiciones PCR		Ciclos
		°C	Minutos	
ERIC1R: ATGTAAGCTCCTGGGGATTAC ERIC2: AAGTAAGTGACTGGGGG	Variable	94	1	30
		52	1	
		65	8	
		65	16	

i. Detección de genes de virulencia

Se evaluó la presencia de diversos factores de virulencia (Estudio VII.c) mediante la detección de genes reportados en el género *Aeromonas*: flagelo lateral *lafA* (Merino *et al.*, 2003), aerolisina/haemolisina *aerA* (Soler *et al.*, 2002) enterotoxina citotóxica *act* (Kimgombe *et al.*, 1999), enterotoxina citotónica termoestable *ast* (Aguilera-Arreola *et al.*, 2005), enterotoxina citotónica termolábil *alt* (Chopra *et al.*, 1996), lipasas *lip*, *lipH3*, *pla*, *plc* (Chacón *et al.*, 2003), proteasas *aspA*, *ahe2* (Chacón *et al.*, 2003), T3SS *ascF-G* and *ascV* (Chacón *et al.*, 2004), proteína efectoras *aexT* (Braun *et al.*, 2002) y *aopP* (Fehr *et al.*, 2006) y toxinas Shiga *stx1* (Wang *et al.*, 2002) y *stx2* (Muniesa *et al.*, 2003). Los ensayos se realizaron por triplicado y se incluyeron controles positivos y negativos. Se verificó la

presencia del amplicón en geles de agarosa al 1.5%. La reacción de PCR incluyó 5 µL regulador de PCR 10x (50 mM KCl, 75 mM Tris-HCl (pH 9.0), 1.5 mM MgCl₂, 1 µL 10 mM mezcla de dNTP's, 0.5 µL de Taq DNA polimerasa (5U/ µL), 1 µL 10 mM de cada iniciador, 5 µL de DNA (para la toxinas stx 1 y stx 2 se utilizo el DNA plamidico de todos los aislamientos), se ajustó a un volumen final de 50 µL.

Cuadro 6. Iniciadores y temperaturas programadas para los genes de virulencia incluidos en el estudio.

Gen	Secuencia de los iniciadores (5'-3')	Tamaño del fragmento (pb)	Condiciones PCR		Ciclos
			°C	minutos	
<i>lafA</i>	Laf1-F: GGTCTGCGCATCCAATC Laf2-R: GCTCCAGACGGTTGATG	550	94	5	1
			94	1	
			50	1	35
			72	1	
			72	10	1
<i>aerA</i>	Aer-F: CCTATGGCCTGAGCGAGAAG Aer-R: CCAGTTCCAGTCCCACCACT	431	95	3	1
			94	1	
			56	1	35
			72	1	
			72	5	1
<i>Act</i>	AHC-F1: GAGAAGGTGACCACCAAGAACA AHC-R1: AACTGACATCGGCCTTGAATC	232	95	10	1
			94	15s	
			66	0.5	30
			72	0.5	
			72	10	1
<i>Ast</i>	Ast-F: ATCGTCAGCGACAGCTTCTT Ast-R: CTCATCCCTTGGCTTGTTGT	504	94	5	1
			94	1	
			50	1	35
			72	1	
			72	10	1
Lipasas	Lip-F: CAYCTGGTKCCGCTCAAG Lip-R: GTRCCGAACCAAGTCGGAGAA	247	95	3	1
			94	1	
			56	1	35
			72	1	

			72	5	1
			95	3	1
Proteasas	Ser-F: CACCGAAGTATTGGGTCAGG ser-R: GGCTCATGCGTAACTCTGGT	350	94 60 72 72	1 1 1 5	35
			95	5	1
<i>ascF-G</i>	ASCF-G-F: ATGAGGTCATCTGCTCGCGC ASCF-G-R: GGAGCACAACCATGGCTGAT	600	94 59 72 72	1 0.5 1 7	36
			95	5	1
<i>ascV</i>	ASCV-F: ATGGACGGCGCCATGAAGTT ASCV-R: TATTCGCCTTCACCCATCCC	700	94 59 72 72	1 0.5 1 7	36
			95	3	1
<i>aexT</i>	RASEXOS-F: GGCGCTTGGGCTCTACAC RASEXOS-R: GAGCCCGCGCATCTTCAG	535	94 60 72 72	1 1 1 7	35
			95	5	1
<i>aopP</i>	AopP-F: GAGAGTTGGCTAGCGGTGAG AopP-R: TCCTCATGGAGCGCATCCAG	334	94 57 72 72	1 1 1 4	30
			95	8	1
<i>stx1</i>	Stx1a: TCTCAGTGGGCGTTCTTATG Stx1b: TACCCCTCAACTGCTAATA	338	95 58 72 72	0.5 0.5 0.5 7	30
			94	5	1
<i>stx2</i>	S2AUP: ATGAAGTGTATATTATTTA S2ALP: TTCTTCATGCTTAACTCCT	979	94 45 72 72	45s 1 1.5 7	30

j. Sensibilidad antimicrobiana

Se realizó la prueba de sensibilidad a 10 antimicrobianos por el método de difusión con discos a las siguientes concentraciones: **amikacina (30 µg)**, **ampicilina (10 µg)**, cefalotina (30 µg), **cefotaxima (30 µg)**, **ceftriaxona (30 µg)**, **cloranfenicol (30 µg)**, **gentamicina (100 µg)**, **netilmicina (30 µg)**, **nitrofurantoína (300 µg)** y **trimetoprim-sulfametoxazol (25µg)**. Se emplearon las recomendaciones del Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorio (CLSI, por su siglas en inglés de *Clinical and Laboratory Standards Institute*) (CLSI, 2012) (Estudio VII.a).

Se determinaron las concentraciones mínimas inhibitorias utilizando el sistema automatizado MicroScan WalkAway-40 System para los siguientes antimicrobianos: amikacina, ampicilina, amoxicilina-ácido clavulanico, aztreonam, ceftazidima, cefalotina, cefotaxima, cefoxitina, ciprofloxacino, cefepime, cefuroxima, ertapenem, gentamicina, imipenem, ácido nalidíxico, piperacilina, piperacilina-tazobactam, trimetoprim-sulfametoxazol, tigeciclina y tobramicina. También se realizó el método de difusión con discos para los siguientes antimicrobianos: **ceftriaxona (30 µg)**, **ciprofloxacina (5 µg)** y **piperacilina (100 µg)** (CLSI 2012). (Estudio VII.c).

La sensibilidad antimicrobiana fue determinada por triplicado en ambas técnicas. Los criterios utilizados para la clasificación de la susceptibilidad de los aislamientos con respecto a cada antimicrobiano fue: sensible (S), intermedio (I) o resistente (R) (CLSI, 2005, 2012a) (Estudio VII.a, c).

k. Detección de los genes bla_{TEM} , bla_{SHV} , bla_{IMP} , $bla_{CphA/IMIS}$ y el integrón clase 1

Utilizando la técnica de PCR fueron detectados los genes que codifican para metalo- β -lactamasas (bla_{IMP} , $bla_{CphA/IMIS}$) utilizando los iniciadores y condiciones descritos por Migliavacca *et al.* (2002) y Henriques *et al.* (2006) respectivamente. Las β -lactamasas de espectro extendido (bla_{TEM} , bla_{SHV}) fueron detectadas utilizando los iniciadores y condiciones descritos por Navarro *et al.* (2001) y Nüesch-Hnderbine *et al.* (1996), el gen

int1 fue detectado utilizando los primer y las condiciones reportadas por Henriques *et al.* (2006). Los aislamientos en los que se detectó el gen *int1* fueron analizados para determinar la presencia de *cassettes* genéticos, utilizando los iniciadores y condiciones para la región variable del integrón (Henriques *et al.*, 2006). Los productos amplificados de la región variable del integrón clase 1 fueron purificados empleando el kit Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega) y se secuenciaron utilizando el método de Sanger en la empresa Macrogen Service Center (Korea).

La reacción de PCR para todos los genes incluyó 5 µL regulador de PCR 10x (50 mM KCl, 75 mM Tris-HCl (pH 9.0), 1.5 mM MgCl₂, 1 µL 10 mM mezcla de dNTP's, 0.5 µL de Taq DNA polimerasa (5U/ µL), 1 µL 10 mM de cada iniciador, 5 µL de DNA, se ajustó a un volumen final de 50 µL. Se incluyeron controles positivos y negativos. Se verificó la presencia del amplicón en geles de agarosa al 1.5% (Estudio VII.b).

Cuadro 7. Iniciadores y temperaturas programadas para los genes de resistencia

Gen	Secuencia de los iniciadores (5'-3')	Tamaño del fragmento (pb)	Condiciones PCR		Ciclos
			°C	minutos	
<i>bla_{IMP}</i>	IMP-F: GGAATAGAGTGGCTTAATTCTC IMP-R: GTGATGCGTCYCCAAYTTCCT	361	94	5	1
			94	1	
			52	1	30
			72	1.5	
			72	10	1
<i>bla_{CphA/IMS}</i>	AER-F: GCCTTGATCAGCGCTTCGTAGTG AER-R: GCGGGGATGTCGCTGACGCAG	670	94	5	1
			94	0.5	
			60	1	30
			72	3	
			72	10	1
<i>bla_{TEM}</i>	TEM-3: AGTGTCTGACTTACCAATGCTTAATCAGT TEM-4: AAAGAATTCTAAATACATTCAAATATG	938	94	5	1
			94	1	
			48	1	30
			72	1.5	
			72	10	1
<i>bla_{SHV}</i>	SHV-A: CGCCGGGTTATTCTTATTTGTCGC	361	94	5	1

SHV-B: TCTTTCCGATGCCGCCGCCAGTCA			94	1	
			68	1	30
			72	1.5	
			72	10	1
<hr/>					
			94	5	1
<i>Int1</i>	Int11-F: CCTCCCGCACGATGATC	280	94	1	
	Int11-R: TCCACGCATCGTCAGGC		57	1.5	30
			72	1	
			72	10	1
<hr/>					
RV	RVI-IF: GGCATCCAAGCAGCAAG	150-3129	94	0.5	
	RVI-IR: AAGCAGACTTGACCTGA		59	1	30
			72	3	
			72	10	1

RV: Región variable del integron clase 1

VII. RESULTADOS

a. Artículo publicado

Acta Tropica



Acta Tropica, es una revista internacional que abarca las ciencias biomédicas y de la salud, con especial énfasis en los temas relevantes para la salud humana y animal en los trópicos y los subtrópicos.

Factor de impacto 2.787

Factor de impacto en 5 años 2.511



Phenotypical characteristics, genetic identification, and antimicrobial sensitivity of *Aeromonas* species isolated from farmed rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) in Mexico



Vicente Vega-Sánchez^a, Jorge Acosta-Dibarrat^a, Fernando Vega-Castillo^a, Graciela Castro-Escarpulli^b, Ma. Guadalupe Aguilera-Arreola^b, Edgardo Soriano-Vargas^{a,*}

^a Centro de Investigación y Estudios Avanzados en Salud Animal, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Autónoma del Estado de México, Toluca 50200, Mexico

^b Laboratorio de Bacteriología Médica, Escuela Nacional de Ciencias Biológicas (ENCB), Instituto Politécnico Nacional (IPN), Mexico

ARTICLE INFO

Article history:

Received 21 August 2013

Received in revised form 24 October 2013

Accepted 29 October 2013

Available online 6 November 2013

Keywords:

Aeromonas

Oncorhynchus mykiss

Rainbow trout

Mexico

ABSTRACT

In the present study, *Aeromonas* isolates from diseased and healthy farmed rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) in Mexico, were characterized phenotypically and identified to species level by using 16S rDNA RFLP-PCR. A total of 50 isolates were included in the study and 10 *Aeromonas* species identified. The species *A. veronii* biovar *sobria* (22%), *A. hydrophila* (20%) and *A. bestiarum* (20%) were the most predominant. All isolates (100%) were resistant to cephalothin.

© 2013 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

The genus *Aeromonas* of the family *Aeromonadaceae* include pathogenic species to fish and other animal species including humans beings and are the etiologic agent responsible for a variety of infections in both immunocompetent and immunocompromised individuals (Janda and Abbott, 2010).

Up to date, at least 26 species have been reported in the genus *Aeromonas* (Beaz-Hidalgo et al., 2013). In a previous study, an isolation frequency of 48.78% was reported for *Aeromonas* in farmed rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) in Mexico (Salgado-Miranda et al., 2010). However, in the latter study only the species *Aeromonas hydrophila*, *Aeromonas salmonicida* were identified using miniaturized identification systems. Infection of Mexican farmed rainbow trout by other *Aeromonas* species is unknown. Hence, the aim of the current study was the biochemical and genetic identification of *Aeromonas* isolates obtained from farmed healthy and diseased rainbow trout from Mexico and the evaluation of their antimicrobial sensitivity.

2. Materials and methods

2.1. Bacteria

A total of 50 isolates of *Aeromonas* obtained from farmed rainbow trouts from 4 Mexican states (Hidalgo, México, Michoacán, and Veracruz) were included in the study. One fish sample was obtained from each of the 100 rainbow trout farms studied across a year at the Centro de Investigación y Estudios Avanzados en Salud Animal (CIESA). Fishes were euthanatized and examined externally and internally. Samples from gills, intestine, spleen, liver, and kidney were taken for bacteriological analysis as elsewhere reported (Salgado-Miranda et al., 2010). Also, samples from skin or external lesions were included when observed. The details of the isolates are shown in Table 1.

2.2. Bacteriology

Colonies suspected of *Aeromonas* were Gram stained and identified by conventional biochemical tube and plate tests as elsewhere reported (Abbott et al., 2003; Beaz-Hidalgo et al., 2010). Isolates positive for oxidase, catalase, ONPG, nitrate reduction, gelatine hydrolysis, DNase, and growth with 0% NaCl and negative urea and

* Corresponding author. Tel.: +52 722 296 5555; fax: +52 722 296 5555.
E-mail addresses: soriano@uamex.mx, soriano_v_e@yahoo.com
(E. Soriano-Vargas).

1 Short communication

2

3 Phenotypical characteristics, genetic identification, and antimicrobial sensitivity of
4 *Aeromonas* species isolated from farmed rainbow trout (*Onchorynchus mykiss*) in
5 Mexico

6

7 Vicente Vega-Sánchez^a, Jorge Acosta-Dibarrat^a, Fernando Vega-Castillo^a, Graciela Castro-
8 Escarpullí^b, Ma. Guadalupe Aguilera-Arreola^b, Edgardo Soriano-Vargas^{a,*}.

9

10 ^aCentro de Investigación y Estudios Avanzados en Salud Animal, Facultad de Medicina
11 Veterinaria y Zootecnia, Universidad Autónoma del Estado de México, Toluca, 50200,
12 México

13

14 ^bLaboratorio de Bacteriología Médica, Escuela Nacional de Ciencias Biológicas (ENCB),
15 Instituto Politécnico Nacional (IPN), México

16

17 * Corresponding author. Telephone/Fax: + 52 722 296 5555. *E-mail address*:

18 soriano@ugemex.mx (E. Soriano-Vargas)

19

1 ABSTRACT

2

3 In the present study, *Aeromonas* isolates from diseased and healthy farmed rainbow
4 trout (*Oncorhynchus mykiss*) in Mexico, were characterized phenotypically and identified
5 to species level by using *16S rDNA* RFLP-PCR. A total of 50 isolates were included in the
6 study and 10 *Aeromonas* species identified. The species *A. veronii* biovar *sobria* (22%), *A.*
7 *hydrophila* (20%) and *A. bestiarum* (20%) were the most predominant. All isolates (100%)
8 were resistant to cephalothin.

9

10 *Keywords:*

11 *Aeromonas*

12 *Oncorhynchus mykiss*

13 Rainbow trout

14 Mexico

15

1 1. Introduction

2 The genus *Aeromonas* of the family *Aeromonadaceae* include pathogenic species to
3 fish and other animal species including humans beings and are the etiologic agent
4 responsible for a variety of infections in both immunocompetent and immunocompromised
5 individuals (Janda and Abbott, 2010).

6

7 Up to date, at least 26 species have been reported in the genus *Aeromonas* (Beaz-
8 Hidalgo et al., 2013). In a previous study, an isolation frequency of 48.78% was reported
9 for *Aeromonas* in farmed rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) in Mexico (Salgado-
10 Miranda et al., 2010). However, in the latter study only the species *Aeromonas hydrophila*,
11 *Aeromonas salmonicida* were identified using miniaturized identification systems.
12 Infection of Mexican farmed rainbow trout by other *Aeromonas* species is unknown.
13 Hence, the aim of the current study was the biochemical and genetic identification of
14 *Aeromonas* isolates obtained from farmed healthy and diseased rainbow trout from Mexico
15 and the evaluation of their antimicrobial sensitivity

16

17 2. Materials and Methods

18 2.1. Bacterial

19 A total of 50 isolates of *Aeromonas* obtained from farmed rainbow trouts from 4
20 Mexican states (Hidalgo, México, Michoacán, and Veracruz) were included in the study.
21 One fish sample was obtained from each of the 100 rainbow trout farms studied across a
22 year the *Centro de Investigación y Estudios Avanzados en Salud Animal* (CIESA). Fishes
23 were euthanatized and examined externally and internally. Samples from gills, intestine,
24 spleen, liver, and kidney were taken for bacteriological analysis as elsewhere reported

1 (Salgado-Miranda et al., 2010). Also, samples from skin or external lesions were included
2 when observed. The details of the isolates are shown in Table 1.

3

4 2.2. Bacteriology

5 Colonies suspected of *Aeromonas* were Gram stained and identified by conventional
6 biochemical tube and plate tests as elsewhere reported (Abbott et al., 2003; Beaz-Hidalgo et
7 al., 2010). Isolates positive for oxidase, catalase, ONPG, nitrate reduction, gelatine
8 hydrolysis, DNase, and growth with 0% NaCl and negative urea and unable to growth with
9 6.0% NaCl were regarded as presumptive *Aeromonas* (Table2).

10

11 2.3. Genus-specific polymerase chain reaction (PCR)

12 Presumptive colonies were confirmed as belonging to the *Aeromonas* genus by
13 amplifying the *gcat* gene by PCR as described by Chacón et al. (2002).

14

15

16 2.4. Genetic identification

17 The genetic identification of *Aeromonas* species was performed with the *16S rDNA*
18 gene restriction fragment length polymorphism (16S rDNA-RFLP) as previously reported
19 (Figueras et al., 2000). Briefly, the amplified product (1502 bp) was purified by using
20 PureLink PCR Purification kit and double-digested with Alu-I and Mbo-I enzymes.
21 Products of digestion were electrophoresed on 17% polyacrylamide. Common patterns
22 were digested with Nar-I, Pst-I, Hae-III, and AlwNI enzymes and the final identification
23 was performed by comparing the obtained RFLP patter with the ones described for the

1 different species (Borrell et al., 1997; Figueras et al., 2000; Beaz-Hidalgo et al., 2009,
2 2010).

3

4 2.5. Antimicrobial sensitivity testing

5 The antimicrobial sensitivity of all isolates was determined by the disk diffusion
6 method using the CLSI criteria (CLSI 2012). The antimicrobials included in the study were
7 nitrofurantoin (300 µg), chloramphenicol (30 µg), sulphamethoxazole + trimethoprim (25
8 µg), netilmicin (30 µg), amikacin (30 µg), gentamicin (10 µg), cefotaxime (30 µg),
9 ceftriaxone (30 µg), cephalotin (30 µg), and ampicillin (10 µg). Reference and type strains
10 of *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Aeromonas bestiarum* (CECT 4227^T), and *A.*
11 *salmonicida* (CECT 894^T) were included in the study.

12

13 3. Results

14 A total of 50 isolates were phenotypically identified as *Aeromonas* and 10 species
15 were identified (Table 1). Four isolates showed atypical reactions in inositol fermentation
16 and five isolates showed sensitivity to O/129 (150 µg) tests (Table 2). A total of 44
17 *Aeromonas* isolates were obtained from clinically healthy fish and six isolates were from
18 skin lesions (Table 1). The GCAT-PCR assays, an amplicon of approximately 237 bp was
19 observed from all 50 *Aeromonas* isolates as *Aeromonas* type strains in agarose gel
20 electrophoresis. A total of 10 *Aeromonas* species were identified from the 50 isolates with
21 the 16S rDNA-RFLP assays (Table 1). In the antimicrobial sensitivity tests, all isolates
22 (100%) were resistant to cephalothin and 98% of isolates resistant to ampicillin (Table 3).
23 Two (20%) *A. bestiarum* isolates were resistant to nitrofurantoin, chloramphenicol,
24 sulphamethoxazole + trimethoprim, and cefotaxime. One *A. sobria* isolate was resistant to

1 cefotaxime. All isolates showed sensitivity to amikacin, gentamicin, ceftriaxone, and
2 netilmicin (Table 3).

3

4 4. Discussion

5 The genus *Aeromonas* included species regarded as important pathogens in
6 aquaculture (Figueras et al., 2011). Under stress conditions, *Aeromonas* causes hemorrhagic
7 septicaemia and furunculosis, resulting in significant economic losses (Figueras et al.,
8 2011). In trout culturing, *A. hydrophila*, *A. bestiarum*, *A. salmonicida*, *A. sobria*, and *A.*
9 *piscicola* are associated to clinical outbreaks (Beaz-Hidalgo et al., 2010). Particularly in
10 Mexico, *Aeromonas* has been isolated with a high frequency (49.78%) from farmed
11 rainbow trout (Salgado-Miranda et al., 2010). The use of basic phenotypical tests and
12 miniaturized commercial systems identify a limited number of *Aeromonas* species (Castro-
13 Escarpulli et al., 2003; Beaz-Hidalgo et al., 2010), as in the case of the Mexican study
14 (Salgado-Miranda et al., 2010). In the current study, the use of a broad panel of
15 phenotypical tests (Janda and Abbott, 2010) allowed the identification of a greater number
16 of species of this genus. The GCAT-PCR was of great value for confirming *Aeromonas*
17 isolates included in the study as reported by Beaz-Hidalgo et al. (2010).

18

19 Of the 10 *Aeromonas* species identified with 16S rDNA-RFLP assays from the 50
20 isolates (Table 1) only 28% match the phenotypical identification. This low concordance is
21 in agreement with the results reported by Beaz-Hidalgo et al. (2010). This finding
22 reinforces the use of further genetic markers or broader phenotypical tests for the correct
23 identification of *Aeromonas* species as recommended (Beaz-Hidalgo et al., 2010; Nagar et
24 al., 2013).

1

2 In the current study, apart of the typical ampicillin resistance characteristic of this
3 genus, a high antimicrobial resistance to cephalothin was observed among the isolates as
4 reported in other studies (Abbott et al., 2003). In fact, *Aeromonas* isolates obtained from
5 frozen fish intended for human consumption in Mexico showed resistance to cephalothin
6 (100%), amikacin (23%), gentamicin (58.4%), chloramphenicol (9%), and sulfametoazol
7 + trimethoprim (49.3%) as reported by Castro-Escarpulli et al. (2003). Resistance
8 mechanisms maybe acquired by environmental strains from clinical strains as suggested by
9 Aravena-Román et al. (2012).

10

11 In conclusion, it appears that this is the first study that using genetically tools for the
12 identification *Aeromonas* species recognises up to 10 species from farmed rainbow trout in
13 Mexico. This study also highlights the need for monitoring the antimicrobial resistance of
14 the *Aeromonas* isolates.

15

16 Acknowledgements

17 This work was funded by Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT),
18 project CB-2008-01-103142 (UAEM 1900/2010C) and grants 20120652 and 20130601
19 from SIP-IPN, Mexico City. Ma. Guadalupe Aguilera-Arreola and Graciela Castro-
20 Escarpulli received COFAA and EDI support. Vicente Vega-Sánchez held a scholarship
21 from CONACYT.

22 We gratefully acknowledge the critical reading of this manuscript by Dra. M. J.
23 Figueras, Unitat de Microbiologia, Departament de Ciències Mèdiques Bàsiques, Facultat
24 de Medicina i Ciències de la Salut. IISPV. Universitat Rovira i Virgili, Reus, Spain.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23

References

Abbott, S.L., Cheung, W.K., Janda, J.M., 2003. The genus *Aeromonas*: biochemical characteristics, atypical reactions, and phenotypic identification schemes. *J. Clin. Microbiol.* 41: 2348–2357.

Aravena-Román, M., Inglis, T.J., Henderson, B., Riley, T.V., Chang, B.J., 2012. Antimicrobial susceptibilities of *Aeromonas* strains isolated from clinical and environmental sources to 26 antimicrobial agents. *Antimicrob. Agents Chemother.* 56: 1110–1112.

Beaz-Hidalgo, R., Alperi, A., Figueras, M.J., Romalde, J.L., 2009. *Aeromonas piscicola* sp. nov., isolated from diseased fish. *Syst. Appl. Microbiol.* 32: 471–479.

Beaz-Hidalgo, R., Alperi, A., Buján, N., Romalde, J.L., Figueras, M.J., 2010. Comparison of phenotypical and genetic identification of *Aeromonas* strains isolated from diseased fish. *Syst. Appl. Microbiol.* 33: 149–153.

Beaz-Hidalgo, R., Martínez-Murcia, A., Figueras M.J., 2013. Reclassification of *Aeromonas hydrophila* subsp. *dhakensis* Huys et al. 2002 and *Aeromonas aquariorum* Martínez-Murcia et al. 2008 as *Aeromonas dhakensis* sp. nov. comb nov. and emendation of the species *Aeromonas hydrophila*. *Syst. Appl. Microbiol.* 36: 171–176.

Borrell, N., Acinas, S.G., Figueras, M.J., Martínez-Murcia, A., 1997. Identification of *Aeromonas* clinical isolates by restriction fragment length polymorphism of PCR-amplified 16S rRNA genes. *J. Clin. Microbiol.* 35:1671–1674.

- 1 Castro-Escarpulli, G., Figueras, M.J., Aguilera-Arreola, G., Soler, L., Fernández-Rendón,
2 E., Aparicio, G.O., Guarro, J., Chacón, M.R., 2003. Characterisation of *Aeromonas*
3 spp. isolated from frozen fish intended for human consumption in Mexico. *Int. J.*
4 *Food Microbiol.* 84: 41-49.
- 5 Chacón, M. R., Castro-Escarpulli, G., Soler, L., Guarro, J., Figueras, M.J., 2002. A DNA
6 probe specific for *Aeromonas* colonies. *Diagn. Microbiol. Infect Dis.* 44:221-225.
- 7 Clinical and Laboratory Standards Institute, 2012 Performance standards for antimicrobial
8 disk susceptibility test; approved standard-eleventh edition. CLSI document M02-
9 A11. Wayne, PA.
- 10 Figueras, M.J., Soler, L., Chacón, M.R., Guarro, J., Martínez-Murcia, A.J., 2000. Extended
11 method for discrimination of *Aeromonas* spp. by 16S rDNA RFLP analysis. *Int. J.*
12 *Syst. Evol. Microbiol.* 50: 2069-2073.
- 13 Figueras, M.J., Beaz-Hidalgo, R., Paredes, K., 2011. Furunculosis y otras infecciones
14 producidas por *Aeromonas*. In: Avendaño-Herrera, R. (Ed.), *Enfermedades*
15 *infecciosas del cultivo de Salmónidos en Chile y el Mundo*. Niva Chile S.A., Puerto
16 Varas, Chile, pp. 285-374.
- 17 Janda, J.M., Abbott, S.L., 2010. The genus *Aeromonas*: taxonomy, pathogenicity, and
18 infection. *Clin. Microbiol. Rev.* 23: 35-73.
- 19 Nagar, V., Shashidhar, R., Bandekar, J.R., 2013. Characterization of *Aeromonas* strains
20 isolated from Indian foods using *rpoD* gene sequencing and whole cell protein
21 analysis. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 29: 745-752.
- 22 Salgado-Miranda, C., Palomares, E., Jurado, M., Marín, A., Vega, F., Soriano-Vargas, E.,
23 2010. Isolation and distribution of bacterial flora in farmed rainbow trout from
24 Mexico. *J. Aquat. Anim. Health.* 22: 244-247.

1 Table 1. Genetic (16S rDNA-RFLP) and phenotypic identification of the 50 *Aeromonas*
 2 isolates obtained from different anatomic site of rainbow trout include in the study.

16S rDNA-RFLP	Phenotypic identification	Anatomic site
<i>A. allosaccharophila</i> (n=1)	<i>A. eucrenophila</i>	Kidney
	<i>A. bestiarum</i>	Gills (4)
	<i>A. erucorenophila</i>	Liver
<i>A. bestiarum</i> (n=10)	<i>A. hydrophila</i> (5)	Spleen (2)
	<i>A. sobria</i> (2)	Kidney (2)
	<i>A. veronii</i> bv <i>sobria</i>	Skin lesion
<i>A. encheleia</i> (n=1)	<i>A. salmonicida</i>	Gills
	<i>A. bestiarum</i>	Gills (6)
	<i>A. caviae</i>	Spleen (2)
<i>A. hydrophila</i> (n=10)	<i>A. hydrophila</i> (6)	Intestine
	<i>A. sobria</i>	Skin lesion
	<i>A. media</i>	
<i>A. media</i> (n=2)	<i>A. caviae</i>	Intestine (2)
	<i>A. salmonicida</i>	
<i>A. popoffii</i> (n=3)	<i>A. popoffii</i>	Gills
	<i>A. salmonicida</i> (2)	Intestine
		Kidney
<i>A. salmonicida</i> (n=2)	<i>A. salmonicida</i>	Liver
	<i>A. sobria</i>	Skin lesion
	<i>A. hydrophila</i>	Gills (4)
<i>A. sobria</i> (n=7)	<i>A. salmonicida</i> (3)	Liver
	<i>A. sobria</i> (3)	Intestine (2)
		Gills (2)
<i>A. veronii</i> bv. <i>sobria</i> (11)		Liver
		Spleen
		Intestine (3)
		Kidney
<i>A. veronii</i> bv. <i>veronii</i>		Skin lesion (3)
	<i>A. sobria</i>	Gills

3
 4
 5

1 Table 2. Biochemical response of the 50 *Aeromonas* isolates identified by the 16S rDNA-
 2 RFLP.

3 1. *A. allosaccharophila* (n=1); 2. *A. bestiarum* (n=10); 3. *A. encheleia* (n=2); 4. *A.*
 4 *eucrenophila* (n=1); 5. *A. hydrophila* (n=11); 6. *A. media* (n=2); 7. *A. popoffii* (n=3); 8. *A.*
 5 *salmonicida* (n=2); 9. *A. sobria* (n=7); 10. *A. veronii* bv. *sobria* (n=11); 11. *A. veronii* bv.
 6 *veronii* (n=1).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Motility	+	100	50	+	90	100	100	0	100	100	+
Oxidase	+	100	100	+	100	100	100	100	100	100	+
Catalase	+	100	100	+	100	100	100	100	100	100	+
Indole	+	100	50	-	100	100	67	100	100	100	+
ONPG	+	100	100	+	100	100	100	100	100	100	+
Urea	-	0	0	-	0	0	0	0	0	0	-
Citrate	+	50	100	-	70	50	100	0	29	100	+
Nitrate reduction	+	100	100	+	100	100	100	100	100	100	+
VP	-	90	0	-	70	0	100	100	86	91	+
MR	+	0	100	+	30	100	67	0	43	0	-
LDC	+	90	50	-	80	0	0	100	71	100	+
ODC	-	0	0	-	0	0	0	0	0	0	+
ADH	+	90	50	+	100	100	100	100	86	100	+
Gelatin	+	100	100	+	100	100	100	100	100	100	+
DNase	+	100	100	+	100	100	100	100	100	100	+
Glucose (gas)	-	100	50	+	80	50	67	100	43	100	+
Acid from:											
L-Arabinose	-	90	100	-	90	100	33	100	43	18	-
Cellobiose	+	50	0	+	20	50	33	50	71	18	+
<i>m</i> -Inositol	-	10	0	-	10	0	33	0	0	0	+
Lactose	-	10	50	-	20	50	0	0	29	0	-
D-Mannitol	+	60	100	+	90	50	100	50	86	91	+
L-Rhamnose	-	30	0	-	0	0	0	100	0	0	-
Sacarose	+	60	100	+	80	50	0	50	100	91	+
Salicin	-	80	50	-	70	50	33	100	57	0	-
D-Sorbitol	-	10	0	-	0	0	0	0	0	0	-
Sucrose	+	100	50	+	90	100	0	100	57	100	+
Esculin	-	70	100	-	90	100	33	100	57	0	-
β -Hemolysis	+	100	50	-	80	0	0	100	43	91	+
Resistance to O/129 ^a (150 μ g)	-	90	100	+	90	100	67	100	71	100	+
Growth in:											
0% NaCl	+	100	100	+	100	100	100	100	100	100	+
6% NaCl	-	0	0	-	0	0	0	0	0	0	-
Growth at 42°C	-	10	50	-	70	100	0	0	29	82	+

7 Result are percentages of isolates positives. VP: Voges-Proskauer, MR: Methyl Red, LDC: Lysine decarboxylase, ODC: Ornithine
 8 decarboxylase, ADH: Arginine dihydrolase.
 9 ^a Vibriostatic agent (2,4-diamino-6,7-diisopropylpteridine) (150 μ g / disk).

1 Table 3. Antimicrobial resistance of 50 *Aeromonas* isolates included in the study.

	Percentage of <i>Aeromonas</i> isolates with resistance to*					
	Nitrofurantoin	Chloramphenicol	Sulphamethoxazole + trimethoprim	Cefotaxime	Cephalothin	Ampicillin
<i>A. allosaccharophila</i>	0	0	0	0	100	100
<i>A. bestiarum</i> (n=10)	20	20	10	20	100	100
<i>A. encheleia</i> (n=2)	0	0	0	0	100	100
<i>A. eucrenophila</i>	0	0	0	0	100	100
<i>A. hydrophila</i> (n=10)	0	0	0	0	100	100
<i>A. media</i> (n=2)	0	0	0	0	100	100
<i>A. popoffii</i> (n=3)	0	0	0	0	100	66.7
<i>A. salmonicida</i> (n=2)	0	0	0	0	100	100
<i>A. sobria</i> (n=7)	0	0	0	28.6	100	100
<i>A. veronii</i> bv. <i>sobria</i> (n=11)	0	0	0	0	100	100
<i>A. veronii</i> bv. <i>veronii</i>	0	0	0	0	100	100
Total number of resistant isolates	2	2	1	4	50	49

2 * All isolates (n=50) showed resistance to amikacin, gentamicin, ceftriaxone and netilmicin

b. Artículo publicado

Veterinary Microbiology



Veterinary Microbiology, está interesado en las enfermedades producidas por microorganismos (bacterias, hongos, virus) de los animales vertebrados domésticos (ganado, animales de compañía, animales deportivos, aves, peces) como fuente de alimento, otros productos o compañeros. Además, las enfermedades microbianas de los animales salvajes en cautiverio, miembros de la fauna silvestre animales domésticos y zoonosis. También se incluyen los estudios de resistencia a los antimicrobianos, a condición de que los resultados representen un avance sustancial en el conocimiento.

Factor de impacto 3.127

Factor de impacto en 5 años 3.248



Contents lists available at ScienceDirect

Veterinary Microbiology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/vetmic

Re-identification of *Aeromonas* isolates from rainbow trout and incidence of class 1 integron and β -lactamase genes



Vicente Vega-Sánchez^a, Fadia Latif-Eugenín^b, Edgardo Soriano-Vargas^a,
Roxana Beaz-Hidalgo^b, María José Figueras^{b,**}, Ma. Guadalupe Aguilera-Arreola^c,
Graciela Castro-Escarpullí^{c,*}

^a Centro de Investigación y Estudios Avanzados en Salud Animal, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Autónoma del Estado de México, Toluca, Mexico

^b Unitat de Microbiologia, Departament de Ciències Mèdiques Bàsiques, Facultat de Medicina i Ciències de la Salut, IISPV, Universitat Rovira i Virgili, Reus, Spain

^c Laboratorio de Bacteriología Médica, Escuela Nacional de Ciencias Biológicas (ENCB), Instituto Politécnico Nacional (IPN), Mexico

ARTICLE INFO

Article history:

Received 27 April 2014

Received in revised form 7 June 2014

Accepted 14 June 2014

Keywords:

Aeromonas

gyrB

rpoD

ESBLs

Integrans

Rainbow trout

ABSTRACT

Forty-eight *Aeromonas* isolates from rainbow trout previously identified by the 16S rDNA-RFLP technique were re-identified using 2 housekeeping genes (*gyrB* and *rpoD*). After sequencing the prevalences of the species were *A. veronii* (29.2%), *A. bestiarum* (20.8%), *A. hydrophila* (16.7%), *A. sobria* (10.4%), *A. media* (8.3%), *A. popoffii* (6.2%), *A. allosaccharophila* (2.1%), *A. caviae* (2.1%), *A. salmonicida* (2.1%) and one isolate (2.1%) belongs to a candidate new species "*Aeromonas lusitana*". Coincident identification results to the 16S rDNA-RFLP technique were only obtained for 68.8% of the isolates. PCR amplification of the enterobacterial repetitive intergenic consensus (ERIC-PCR) indicated that the 48 isolates belonged to 33 different ERIC genotypes. Several genotypes were isolated from different farms and organs in the same fish, indicating a systemic dissemination of the bacteria. The presence of genes (*bla*_{IMP}, *bla*_{CphA/IMI5}, *bla*_{TEM}, *bla*_{SHV} and *intI1*) that encode extended-spectrum beta-lactamases (ESBLs), metallo-beta-lactamases (MBLs) and class 1 integrons were studied by PCR. Only 39.6% (19/48) of the strains showed the presence of one or more resistance genes. The gene *bla*_{CphA/IMI5} was detected in 29.2% of the isolates, followed by the *intI1* (6.2%) and *bla*_{SHV} (4.2%) genes. The variable region of class 1 integrons of the 3 positive isolates was sequenced revealing the presence of the gene cassette *aadA1* (aminoglycoside transferase) that plays a role in streptomycin/spectinomycin resistance.

© 2014 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

The genus *Aeromonas* belongs to the class *Gammaproteobacteria*, order *Aeromonadales*, family *Aeromonadaceae*

and includes species implicated in human and animal infections being contaminated water and food the major sources of infection (Janda and Abbott, 2010; Figueras and Beaz-Hidalgo, 2014). In aquaculture the species *Aeromonas salmonicida* is regarded as one of the main pathogenic fish species and is the causal agent of furunculosis, a hemorrhagic and ulcerative disease that affects trout, salmonids and other fish species (Beaz-Hidalgo and Figueras, 2013; Dallaire-Dufresne et al., 2014). However, studies using housekeeping genes have demonstrated that up to 10 *Aeromonas* species (*A. bestiarum*, *A. caviae*, *A. encheleia*, *A. eucrenophila*,

* Corresponding author. Tel.: +52 55 57296300x62374;

fax: +52 55 57296207.

** Corresponding author. Tel.: +34 977759321; fax: +34 977759322.

E-mail addresses: mariajose.figueras@urv.cat (M.J. Figueras),
chelacastro@hotmail.com, gcastro@encb.ipn.mx (G. Castro-Escarpullí).

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20

Re-identification of *Aeromonas* isolates from rainbow trout and incidence of class 1
integron and β -lactamase genes.

Vicente Vega-Sánchez^a, Fadua Latif-Eugenín^b, Edgardo Soriano-Vargas^a, Roxana Beaz-Hidalgo^b, María José Figueras^{b,*}, Ma. Guadalupe Aguilera-Arreola^c, Graciela Castro-Escarpullí^{c,*}

^aCentro de Investigación y Estudios Avanzados en Salud Animal, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Autónoma del Estado de México, Toluca, México.

^bUnitat de Microbiologia, Departament de Ciències Mèdiques Bàsiques, Facultat de Medicina i Ciències de la Salut, IISPV, Universitat Rovira i Virgili, Reus, Spain.

^cLaboratorio de Bacteriología Médica, Escuela Nacional de Ciencias Biológicas (ENCB), Instituto Politécnico Nacional (IPN), México.

* Corresponding authors.

Tel.: + 52 55 57296300 ext. 62374; fax: + 52 55 57296207. E-mail address: chelacastro@hotmail.com (Graciela Castro-Escarpullí).

Tel: +34 977759321; fax: +34 977759322. E-mail address: mariajose.figueras@urv.cat (María José Figueras)

21 Abstract

22

23 Forty eight *Aeromonas* isolates from rainbow trout previously identified by the 16S rDNA–
24 RFLP technique were re-identified using 2 housekeeping genes (*gyrB* and *rpoD*). After
25 sequencing the prevalences of the species were *A. veronii* (29.2%), *A. bestiarum* (20.8%),
26 *A. hydrophila* (16.7%), *A. sobria* (10.4%), *A. media* (8.3%), *A. popoffii* (6.2%), *A.*
27 *allosaccharophila* (2.1%), *A. caviae* (2.1%), *A. salmonicida* (2.1%) and one isolate (2.1%)
28 belongs to a candidate new species “**Aeromonas lusitana**”. **Coincident identification results**
29 to the 16S rDNA–RFLP technique were only obtained for 68.8% of the isolates. PCR
30 amplification of the enterobacterial repetitive intergenic consensus (ERIC–PCR) indicated
31 that the 48 isolates belonged to 33 different ERIC genotypes. Several genotypes were
32 isolated from different farms and organs in the same fish, indicating a systemic
33 dissemination of the bacteria. The presence of genes (*bla*_{IMP}, *bla*_{CphA/IMIS}, *bla*_{TEM}, *bla*_{SHV}
34 and *int11*) that encode extended–spectrum beta–lactamases (ESBLs), metallo–beta–
35 lactamases (MBLs) and class 1 integrons were studied by PCR. Only 39.6% (19/48) of the
36 strains showed the presence of one or more resistance genes. The gene *bla*_{CphA/IMIS} was
37 detected in 29.2% of the isolates, followed by the *int11* (6.2%) and *bla*_{SHV} (4.2%) genes.
38 The variable region of class 1 integrons of the 3 positive isolates was sequenced revealing
39 the presence of the gene cassette *aadA1* (aminoglycoside transferase) that plays a role in
40 streptomycin/spectinomycin resistance.

41

42 Keywords: *Aeromonas*, *gyrB*, *rpoD*, ESBLs, MBLs, integrons, rainbow trout.

43

44 Introduction

45 The genus *Aeromonas* belongs to the class *Gammaproteobacteria*, order
46 *Aeromonadales*, family *Aeromonadaceae* and includes species implicated in human and
47 animal infections being contaminated water and food the major sources of infection (Janda
48 and Abbott, 2010; Figueras and Beaz-Hidalgo, 2014). In aquaculture the species
49 *Aeromonas salmonicida* is regarded as one of the main pathogenic fish species and is the
50 causal agent of furunculosis, a haemorrhagic and ulcerative disease that affects trout,
51 salmonids and other fish species (Beaz-Hidalgo and Figueras, 2013; Dallaire-Dufresne et
52 al., 2014). However, studies using housekeeping genes have demonstrated that up to 10
53 *Aeromonas* species (*A. bestiarum*, *A. caviae*, *A. encheleia*, *A. eucrenophila*, *A. hydrophila*,
54 *A. media*, *A. piscicola*, *A. salmonicida*, *A. sobria* and *A. tecta*) are isolated from healthy or
55 diseased fish (Beaz-Hidalgo et al., 2010). Nowadays the use of housekeeping genes is the
56 gold standard technique for the correct identification of *Aeromonas* species (Figueras et al.,
57 2011).

58 An increased **resistance to β -lactam** antibiotics in the genus *Aeromonas* has been
59 **detected due to the presence of β -lactamases** genes (Ndi and Barton 2011; Carvalho et al.,
60 2012; Chen et al., 2012). Extended-spectrum beta-lactamases (ESBLs), metallo-beta-
61 lactamases (MBLs) and class 1 integrons include genes that encode antimicrobial resistance
62 in the genus *Aeromonas* and have been identified in isolates recovered from aquaculture
63 systems (Jacobs and Chenia, 2007). Integrons are able to capture several resistance gene
64 cassettes from the environment and to incorporate them by using site-specific
65 recombination and play a major role in the dissemination of antibiotic resistance genes
66 (Fluit and Schmitz, 2004). The classes 1 integrons are the most commonly found in the
67 genus *Aeromonas* (Perez-Valdespino et al., 2009; Ndi and Barton, 2011).

68 The aim of the current study was to re-identify 48 isolates recovered from rainbow
69 trout using the *rpoD* and *gyrB* **genes and to analyze their genotypes and the presence of β -**
70 lactamases genes and the class 1 integrons.

71

72 2. Materials and Methods

73 2.1. Bacterial strains

74 A total of 48 isolates from rainbow trout previously identified (Vega-Sánchez et al.,
75 2014) using the 16S rDNA-RFLP technique (Borrell et al., 1997; Figueras et al., 2000)
76 were included in the study. The sources and origins of isolates are shown in Table 1.

77 2.2. *Aeromonas* re-identification and typing

78 The DNA of the strains was extracted with the InstaGene™ Matrix (Bio-Rad
79 Laboratories, Ltd., Mississauga, Ontario, Canada) according to the manufacturer's
80 protocols. Re-identification of all isolates was performed by sequencing the *gyrB* and *rpoD*
81 genes determining their similarity with the type strains and on the basis of their position in
82 the phylogenetic tree constructed with the concatenated sequences of both genes as in
83 previous studies (Soler et al., 2004; Martínez-Murcia et al., 2011). The nucleotide
84 sequences were aligned by Clustal W software with the published reference sequences of
85 all type strains described by Martínez-Murcia et al. (2011) including the recently described
86 species *A. australiensis* and *A. dhakensis* (GenBank accession numbers for *gyrB*:
87 FN691773; HQ442711 and *rpoD*: FN773335; HQ442800, respectively). Genetic distances
88 were obtained by Kimura's two parameter model and phylogenetic trees were constructed
89 using the Neighbor-Joining method implemented in MEGA 5.2 software (Tamura et al.,
90 2011) as in previous studies (Martínez-Murcia et al., 2011). The enterobacterial repetitive
91 intergenic consensus polymerase chain reaction (ERIC-PCR) technique was used to

92 genotype the isolates as described by Soler et al. (2003). Fingerprints with identical patterns
93 were considered to be the same genotype or strain.

94 2.3. Detection of β -Lactamase and class 1 integron genes

95 The β -lactamase genes *bla*_{TEM}, *bla*_{SHV}, *bla*_{IMP}, *bla*_{CphA/IMIS} and class 1 integron gene
96 (*int1*) were amplified using primers and PCR conditions described elsewhere (Nüesch-
97 Inderbine et al., 1996; Navarro et al., 2001; Migliavacca et al., 2002; Henriques et al.,
98 2006). Positive isolates for the *int1* gene were tested for the presence of inserted gene
99 cassettes into the variable region of this integron as described earlier (Henriques et al.,
100 2006). Briefly, the band obtained was extracted from the agarose gel and purified using
101 Wizard® SV gel and PCR clean-up system (Promega, USA), according to the
102 manufacturer's protocols and was submitted for sequencing.

103 2.4 Statistical analysis

104 To determine if there was any significant difference in the number of isolates
105 recovered from different organs and in the number of isolates obtained of the different
106 *Aeromonas* species, data were analyzed with ANOVA and Tukey's test using the software
107 MegaStat version 10.1 of Excel 2007.

108

109 3. Results and discussion

110 3.1. Molecular Identification

111 A total of 68.8% (33/48) of the strains showed coincident identification with those
112 obtained in the previous study using the 16S rDNA-RFLP (Vega et al., 2014) and belonged
113 to the species *A. bestiarum*, *A. hydrophila*, *A. media*, *A. popoffii*, *A. sobria* and *A. veronii*
114 (Table 2). The 16S rDNA-RFLP identification method described by Borrel et al. (1997) and
115 Figueras et al. (2000) generated species-specific profiles that enabled the identification of
116 the 14 species that composed the genus in the year 2000. The addition of new species in the

117 genus since 2000 limits the usefulness of this method, because the same RFLP pattern is
118 obtained for the species *A. salmonicida*, *A. bestiarum* and *A. piscicola* as described by
119 Beaz-Hidalgo et al. (2010). In the current study this occurred for 12.5% (6/48) of the strains
120 that showed with the 16S rDNA-RFLP the common pattern for the species *A. salmonicida*,
121 *A. bestiarum* and *A. piscicola*, and also 4.2% (2/48) of the isolates that showed the typical
122 16 rDNA-RFLP pattern described for the species *A. salmonicida*, although after sequencing
123 they were identified as *A. bestiarum* (n=7) and *A. salmonicida* (n=1) (Table 2). Furthermore
124 8.3% (4/48) of the isolates showed atypical RFLP patterns and after sequencing they were
125 shown to correspond to *A. allosaccharophila* (n=1), *A. caviae* (n=1) and *A. media* (n=2)
126 (Table 2 and Fig. 1) and 2.1% (1/48) showed the typical RFLP pattern described for the
127 species *A. encheleia*, nevertheless after sequencing this isolate was identified as
128 **“Aeromonas lusitana”** (Table 2 and Fig 2). The remaining isolates 4.2 % (2/48) showed the
129 typical RFLP pattern described for the species *A. sobria* (Table 2) but were wrongly
130 interpreted in the previous study (Vega et al., 2014). Atypical 16S rDNA RFLP patterns are
131 due to the presence of microheterogeneities (i.e. sequence variation in the operon copies of
132 the 16S rRNA gene) and have previously been detected for the species *A. caviae*, *A. media*
133 and *A. veronii* and reported in 8.1% of the strains analyzed by Alperi et al. (2008).
134 However, this is the first time that they are described for *A. allosaccharophila* (Fig 1).

135 The phylogenetic tree constructed with concatenated sequences of the *gyrB* and
136 *rpoD* genes of the 48 isolates and representative strains of all *Aeromonas* species showed
137 that the rainbow trout sequences clustered with 9 known species (Fig. 2): *A. veronii* 14
138 (29.2%), *A. bestiarum* 10 (20.8%), *A. hydrophila* 8 (16.7%), *A. sobria* 5 (10.4%), *A. media*
139 4 (8.3%), *A. popoffii* 3 (6.2%), *A. allosaccharophila* 1 (2.1%), *A. caviae* 1 (2.1%), *A.*
140 *salmonicida* 1 (2.1%) and **“Aeromonas lusitana”** 1 (2.1%). The latter has been recognized
141 as a new species by Martínez-Murcia et al. (2011) but its formal description has not yet

142 been published. The partial *gyrB* and *rpoD* gene sequences obtained from the rainbow trout
143 isolates have been deposited in the GenBank under the accession numbers (*gyrB*;
144 KJ743507–KJ743554 and *rpoD*; KJ743555–KJ743602)

145 In a previous study performed in Spain by Beaz–Hidalgo et al. (2010) the prevalent
146 species isolated from diseased rainbow trout (identified by *rpoD* sequencing) were *A.*
147 *sobria* 45.7% (16/35), *A. hydrophila* 22.9% (8/35), *A. media* 11.4% (4/35), *A. piscicola*
148 8.6% (3/35), *A. bestiarum* 5.7% (2/35) and *A. salmonicida* 5.7% (2/35). All these species
149 with the exception of *A. piscicola* were found in the present study. However, in addition we
150 found *A. veronii* as the most prevalent species. Interestingly, this species has been found to
151 be responsible of important catfish outbreaks in the USA (Nawaz et al., 2010). Other
152 species found like *A. allosaccharophila* and *A. caviae* have so far been recognized after
153 sequencing, for instance the species *A. caviae* was identified in diseased fish by Beaz–
154 Hidalgo et al. (2010). To our knowledge, this is the first time that the species *A. popoffii* is
155 recovered from rainbow trout, as so far it has only been recognized once from eels and
156 most reports are from water and occasionally from human disease (Soler et al., 2002; Hua
157 et al., 2004; Alcaide et al., 2010). **Interestingly, the potential new species “*A. lusitana*”** has
158 been only described from a drinking water–fountain, thermal water and vegetables
159 (Martínez–Murcia et al., 2011). The present results confirms once more that sequencing the
160 *rpoD* and *gyrB* genes is a straight forward identification approach for the precise
161 identification of *Aeromonas* spp. (Soler et al., 2004).

162 3.2. ERIC–PCR genotyping.

163 Several isolates showed identical *gyrB* and *rpoD* sequences and therefore all isolates
164 were genotyped with the ERIC–PCR to confirm if they were epidemiologically related. The
165 48 fish isolates showed to belong to 33 (68.8%) different ERIC patterns indicating a high
166 genetic diversity that depended upon the species (Table 1). The ERIC patterns E1, E11,

167 E25 and E28 (Table 1) which belong to the species *A. veronii*, *A. bestiarum*, *A. media* and
168 *A. popoffii* respectively were isolated from different organs in the same fish, indicating a
169 systemic dissemination of the bacteria. Other studies using experimental infection assays
170 have confirmed the ability of *A. salmonicida* to produce a systemic dissemination and this
171 has been attributed to the presence of the type III secretion system (Burr et al., 2005).
172 Sreedharan et al. (2013) isolated the species *A. veronii* from ornamental fish and showed a
173 clonal relationship among isolates obtained from different internal organs (kidney, liver and
174 spleen) within the same batch of fish. However, other authors indicate that the presence of
175 *Aeromonas* in different organs is not necessarily related with a disease (Koziońska and
176 Pękała, 2012). Four ERIC genotypes (E1, E7, E8 and E9) were found simultaneously in
177 fish farms located in two states (México and Hidalgo, México and Veracruz, México and
178 Michoacán, México and Hidalgo) but the epidemiological connection is unknown. Ndi and
179 Barton (2011) showed that the same clonal strain, recognized by pulsed-field gel
180 electrophoresis, was present in various rainbow trout farms in Victoria (Australia) as found
181 in our study. Furthermore, it has recently been demonstrated a highly clonal relationship
182 between *A. hydrophila* epidemic channel catfish isolates from the USA (Hossain et al.,
183 2013).

184 Results also showed (Table 1) the presence of two or three different *Aeromonas*
185 species in the same fish (fishes F5, F6, F8, F10, F12 and F25). This indicated the presence
186 of mixed infections, further analysis on the virulence factors and activity of these isolates
187 would provide more insight on their pathological mechanisms.

188 Significant differences ($P < 0.05$) were observed on the number of isolates recovered from
189 different organs and species, according to Tukey's test, showing the gills as the most
190 colonized organ and *A. veronii* as the most prevalent species ($P < 0.05$).

191 **3.3. β -Lactamase genes and class 1 integron**

192 Only 39.6% (19/48) of the strains showed the presence of one or more resistance
193 genes. The concurrent presence of *bla*_{C_{pha}/IMIS} and *bla*_{SHV} genes that encode for a
194 carbapenem-hydrolyzing MBLs and ESBLs was observed in only 1 *A. hydrophila* isolate
195 while *bla*_{C_{pha}/IMIS} gene and class 1 integrons were present in 3 isolates belonging to the
196 species *A. allosaccharophila*, *A. hydrophila* and *A. sobria* (Table 1). However, the *bla*_{IMP}
197 and *bla*_{TEM} genes that encode for a MBLs and ESBLs were not detected in any of the
198 isolates as has previously occurred in other studies that report a low prevalence or not
199 detection (Ndi and Barton, 2011; Carvalho et al., 2012). The *bla*_{C_{pha}/IMIS} gene that encode
200 for a carbapenem-hydrolyzing MBLs was the most prevalent one being found in 14 isolates
201 (29.2%) of the species *A. hydrophila* (7/48), *A. bestiarum* (2/48), *A. veronii* (2/48), *A.*
202 *allosaccharophila* (1/48), *A. salmonicida* (1/48) and *A. sobria* (1/48). These results are
203 similar to those previously reported by Carvalho et al. (2012) that detected a high presence
204 of this gene in *A. hydrophila* (15/20) but lower in other species including *A.*
205 *allosaccharophila* (1/20), *A. bestiarum* (1/20), *A. eucrenophila* (2/20) and *A. salmonicida*
206 (1/20). Also Chen et al. (2012) reported that the *bla*_{C_{pha}/IMIS} resistance gene was the most
207 prevalent in the genus *Aeromonas*. Nevertheless the fact that the primers were designed for
208 *A. hydrophila* together with the high molecular diversity observed in sequences of this gene
209 by Carvalho et al. (2012) may justify the low detection of this gene in other species. The
210 gene *bla*_{SHV} that encode for ESBLs was found in 2 isolates (4.2%) which belong to the
211 species *A. hydrophila* and *A. sobria* (Table 1). There are few reports of the presence of this
212 gene and so far it has been described in strains of *A. allosaccharophila* 10.5% (2/19), *A.*
213 *media* 5.3% (1/19) and *A. veronii* 5.3% (1/19) isolated from river water in Paris and these
214 species were genetically identified on the basis of sequencing of 16S rRNA and *rpoB* genes
215 (Girlich et al., 2011). Maravic et al. (2013) reported *bla*_{SHV} in 45.5% (10/22) of *A. caviae*

216 isolates and in 4.5% (1/22) of *A. hydrophila* isolates recovered from the Mediterranean
217 mussel (*Mytilus galloprovincialis*) and from Adriatic Sea.

218 The occurrence of class 1 integrons have previously been reported in *Aeromonas*
219 isolated from clinical, environmental and fish culture samples (Jacobs and Chenia, 2007;
220 Pérez-Valdespino et al., 2009; Carvalho et al., 2012). In the present study, the gene *int11*
221 associated with class 1 integrons was found in 3 isolates (6.2%) that belonged to species *A.*
222 *allosaccharophila*, *A. hydrophila* and *A. sobria* (Table 1). These positive strains bared only
223 the gene cassette of the aminoglycoside transferase (*aadA1*) that confers resistance to
224 streptomycin/spectinomycin. Different prevalences for the presence of the class 1 integrons
225 have previously been reported. Carvalho et al. (2012) found a prevalence of 8.8% (7/80) in
226 strains obtained from untreated water samples; although, Jacobs and Chenia (2007) found
227 that 51.4% (19/37) of the *Aeromonas* isolates from common carp, koi, rainbow trout and
228 tilapia harbored this gene. Other studies have found different resistance gene cassettes
229 within the class 1 integrons in *Aeromonas* isolates associated to aquaculture (Jacobs and
230 Chenia, 2007) but the gene cassette *aadA1* is commonly reported in environmental, clinical
231 and fish strains (Jacobs and Chenia, 2007; Pérez-Valdespino et al., 2009; Carvalho et al.,
232 2012).

233 In conclusion, considering the importance and the high prevalence of the genus
234 *Aeromonas* in fish ichthyopathology, the use of molecular methods (sequencing
235 housekeeping genes) for a reliable identification to species level and the identification of
236 strains carrying antibiotic resistance genes as performed in the present study, are highly
237 recommended for a constant monitoring in aquaculture. Furthermore, the application of
238 molecular typing methods would enable the observation of possible routes of transmission
239 among different aquaculture farms allowing the development of prevention strategies.

240

241 Conflict of interest

242 The author(s) declare that they have no competing interests.

243

244 Acknowledgements

245 This study was financially supported by Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología

246 (CONACYT), project CB-2008-01-103142 (UAEM1900/2010C) and grants 20120652,

247 20130601 and 20140854 from SIP-IPN, México City. Ma. Guadalupe Aguilera-Arreola and

248 Graciela Castro-Escarpulli received COFAA, EDI and SNI support, Vicente Vega-Sánchez

249 held a scholarship from CONACYT. This work was also supported in part by the project

250 with reference AGL2011-30461-C02-02 by the Ministerio de Ciencia e Innovación (Spain).

251

252 References

253

254 Alcaide, E., Blasco, M. D., Esteve, C. 2010. Mechanisms of quinolone resistance in
255 *Aeromonas* species isolated from humans, water and eels. Res. Microbiol. 161, 40-45.

256 Alperi, A., Figueras, M. J., Inza, I., Martínez-Murcia, A. J. 2008. Analysis of 16S rRNA
257 gene mutations in a subset of *Aeromonas* strains and their impact in species delineation. Int.
258 Microbiol. 11, 185-194.

259 Beaz-Hidalgo, R., Alperi, A., Buján, N., Romalde, J. L., Figueras, M. J. 2010. Comparison
260 of phenotypical and genetic identification of *Aeromonas* strains isolated from diseased fish.
261 Syst. Appl. Microbiol. 33, 149-153.

262 Beaz-Hidalgo, R., Figueras, M. J. 2013. *Aeromonas* spp. whole genomes and virulence
263 factors implicated in fish disease. J. Fish Dis. 36, 371-388.

264 Borrell, N., Acinas, S. G., Figueras, M. J., Maertínez-Murcia, A. J. 1997. Identification of
265 *Aeromonas* clinical isolates by restriction fragment polymorphism of PCR-amplified 16S
266 rRNA genes. J. Clin. Microbiol. 35, 1671-1674.

267 Burr, S. E., Puqovkin, D., Wahli, T., Seqner, H., Frey, J. 2005. Attenuated virulence of
268 *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida* type III secretion mutant in a rainbow trout
269 model. Microbiology. 151, 2111-2118.

270 Carvalho, M. J., Martínez-Murcia, A., Esteves, A. C., Correia, A., Saavedra, M. J. 2012.
271 Phylogenetic diversity, antibiotic resistance and virulence traits of *Aeromonas* spp. from
272 untreated waters for human consumption. Int. J. Food. Microbiol. 159, 230-239.

273 **Chen, P. L., Ko, W. C., Wu, C. J. 2012. Complexity of β -lactamases among clinical**
274 *Aeromonas* isolates and its clinical implications. J. Microbiol. Immunol. Infect. 45, 398-
275 403.

276 Dallaire-Dufresne, S., Tanaka, K. H., Trudel, M. V., Lafaille, A., Charette, S. J. 2014.
277 Virulence, genomic features, and plasticity of *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida*,
278 the causative agent of fish furunculosis. *Vet. Microbiol.* 169, 1–7.

279 Figueras, M. J., Beaz-Hidalgo, R., 2014. *Aeromonas*: Introduction. In: Batt, C. A.,
280 Tortorello, M. L. (Eds.), *Encyclopedia of Food Microbiology*, vol 1. Elsevier Ltd,
281 Academic Press, pp. 24–30.

282 Figueras, M. J., Beaz-Hidalgo, R., Collado, L., Martínez-Murcia, A. J. 2011. Point of view
283 on the recommendations for new bacterial species description and their impact on the genus
284 *Aeromonas* and *Arcobacter*. *The Bulletin of BISMIS.* 2(Pt 1), 1–16.

285 Figueras, M. J., Soler, L., Chacón, M. R., Guarro, J., Martínez-Murcia, A. J. 2000.
286 Extended method for discrimination of *Aeromonas* spp. by 16S rDNA RFLP analysis. *Int.*
287 *J. Syst. Evol. Microbiol.* 50, 2069–2073.

288 Fluit, A. C., Schmitz, F. J. 2004. Resistance integrons and super-integrons. *Clin. Microbiol.*
289 *Infect.* 10: 272–88.

290 Girlich, D., Poirel, L., Nordmann, P. 2011. Diversity of clavulanic acid-inhibited extended-
291 spectrum β -lactamases in *Aeromonas* spp. from the Seine River, Paris, France. *Antimicrob.*
292 *Agents Chemother.* 55, 1256–1261.

293 Henriques, I. S., Fonseca, F., Alves, A., Saavedra, M. J., Correia, A. 2006. Occurrence and
294 diversity of integrons and beta-lactamase genes among ampicillin-resistant isolates from
295 estuarine waters. *Res. Microbiol.* 157, 938–947.

296 Hossain, M. J., Waldbieser, G. C., Sun, D., Capps, N. K., Hemstreet, W. B., Carlisle, K.,
297 Griffin, M. J., Khoo, L., Goodwin, A. E., Sonstegard, T. S., Schroeder, S., Hayden, K.,
298 Newton, J. C., Terhune, J. S., Liles, M. R. 2013. Implication of lateral genetic transfer in
299 the emergence of *Aeromonas hydrophila* isolates of epidemic outbreaks in channel catfish.
300 *PloS One.* 8, e80943.

301 Hua, H. T., Bollet, C., Tercian, S., Drancourt, M., Raoult, D. 2004. *Aeromonas popoffii*
302 urinary tract infection. J. Clin. Microbiol. 42, 5427–5428.

303 Jacobs, L., Chenia, H. Y. 2007. Characterization of integrons and tetracycline resistance
304 determinants in *Aeromonas* spp. isolated from South African aquaculture systems. Int. J.
305 Food. Microbiol. 114, 295–306.

306 Janda, J. M., Abbott, S. L. 2010. The Genus *Aeromonas*: Taxonomy, Pathogenicity, and
307 Infection. Clin. Microbiol. Rev. 23, 35–73.

308 **Kozińska, A., Pękala, A., 2012. Characteristics of disease spectrum in relation to species,**
309 serogroups, and adhesion ability of motile aeromonads in fish. Scientific World Journal.
310 2012:949358.

311 **Maravić, A., Skočibušić, M., Samanić, I., Fredotović, Z., Cvjetan, S., Jutronić, M., Puizina,**
312 J. 2013. *Aeromonas* spp. simultaneously harbouring bla(CTX-M-15), bla(SHV-12),
313 bla(PER-1) and bla(FOX-2), in wild-growing Mediterranean mussel (*Mytilus*
314 galloprovincialis) from Adriatic Sea, Croatia. Int. J. Food Microbiol. 166, 301–308.

315 Martínez-Murcia, A. J., Monera, A., Saavedra, M. J., Oncina, R., Lopez-Alvarez, M., Lara,
316 E., Figueras, M. J. 2011. Multilocus phylogenetic analysis of the genus *Aeromonas*. Syst.
317 Appl. Microbiol. 34, 189–199.

318 Migliavacca, R., Docquier, J. D., Mugnaioli, C., Amicosante, G., Daturi, R., Lee, K.,
319 Rossolini, G.M., Pagani, L. 2002. Simple microdilution test for detection of metallo- β -
320 lactamase production in *Pseudomonas aeruginosa*. J. Clin. Microbiol. 40, 4388–4390.

321 Navarro, F., Perez-Trallero, E., Marimon, J. M., Aliaga, R., Gomariz, M., Mirelis, B. 2001.
322 CMY-2-producing *Salmonella enterica*, *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella oxytoca*,
323 *Proteus mirabilis* and *Escherichia coli* strains isolated in Spain (October 1999–December
324 2000). J. Antimicrob. Chemother. 48, 383–389.

325 Nawaz, M., Khan, S. A., Khan, A. A., Sung, K., Tran, Q., Kerdahi, K., Steele, R. 2010.
326 Detection and characterization of virulence genes and integrons in *Aeromonas veronii*
327 isolated from catfish. Food Microbiol. 27, 327–331.

328 Ndi, O. L., Barton, M. D. 2011. Incidence of class 1 integron and other antibiotic resistance
329 determinants in *Aeromonas* spp. from rainbow trout farms in Australia. J. Fish. Dis. 34,
330 589–599.

331 Nüesch–Inderbinnen, M. T., Hächler, H., Kayser, F. H. 1996. Detection of genes coding for
332 extended–spectrum SHV beta–lactamases in clinical isolates by a molecular genetic method,
333 and comparison with the E test. Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. 15, 398–402.

334 Pérez–Valdespino, A., Fernández–Redón, E., Curiel–Quesada, E. 2009. Detection and
335 characterization of class 1 integrons in *Aeromonas* spp. isolated from human diarrheic stool
336 in México. J. Basic. Microbiol. 49, 572–578.

337 Soler, L., Figueras, M. J., Chacón, M. R., Guarro, J., Martínez–Murcia, A. J. 2003.
338 Comparison of three molecular methods for typing *Aeromonas popoffii* isolates. Antonie
339 van Leeuwenhoek 83, 341–349.

340 Soler, L., Figueras, M. J., Chacón, M. R., Vila, J., Marco, F., Martínez–Murcia, A. J.,
341 Guarro, J. 2002. Potential virulence and antimicrobial susceptibility of *Aeromonas popoffii*
342 recovered from freshwater and seawater. FEMS Immunol. Med. Microbiol. 32, 243–247.

343 Soler, L., Yáñez, M. A., Chacon, M. R., Aguilera–Arreola, M. G., Catalán, V., Figueras, M.
344 J., Martínez–Murcia, A. J. 2004. Phylogenetic analysis of the genus *Aeromonas* based on
345 two housekeeping genes. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 54, 1511–1519.

346 Sreedharan, K., Philip, R., Singh, I. 2013. Characterization and virulence potential of
347 phenotypically diverse *Aeromonas veronii* isolates recovered from moribund freshwater
348 ornamental fishes of Kerala, India. Antonie van Leeuwenhoek. 103, 53–67.

349 Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M., Kumar, S., 2011. MEGA5:
350 molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance,
351 and maximum parsimony methods. *Mol. Biol. Evol.* 28, 2731–2739.

352 Vega-Sánchez, V., Acosta-Dibarrat, J., Vega-Castillo, F., Castro-Escarpulli, G., Aguilera-
353 Arreola, M. G., Soriano-Vargas, E. 2014. Phenotypical characteristics, genetic
354 identification, and antimicrobial sensitivity of *Aeromonas* species isolated from farmed
355 rainbow trout (*Onchorynchus mykiss*) in México. *Acta. Trop.* 130, 76–79.

Table 1 *Aeromonas* spp. and ERIC genotypes encountered among the 48 isolates recovered from different organs and lesions from rainbow trout.

Species n° isolates (%)	n° genotypes /n° isolates (%)	Genetic diversity among the different species and distribution of the genotypes by origin										
		Genotype	n° isolates	Fish	Gills	Intestine	Spleen	Liver	Kidney	Lesion	State	
<i>A. veronii</i> 14 (29.2)	6/14 (42.8)	E1	4	F24					1	1	2 ^{a,b}	Hidalgo
		E1	2	F1	1						1 ^c	México
		E1	2	F25	1	1						Hidalgo
		E1	1	F23			1					Hidalgo
		E2	1	F5			1					Hidalgo
		E3	1	F12			1 ^g					Veracruz
		E4	1	F15	1							Veracruz
		E5	1	F16	1							Veracruz
<i>A. bestiarum</i> 10 (20.8)	6/10 (60)	E6	1	F16			1 ^g					Veracruz
		E7	1	F11	1							México
		E7	1	F13	1							Veracruz
		E8	1	F2				1 ^g				Michoacán
		E8	1	F10							1 ^d	México
		E9	1	F3					1 ^g			México
		E9	1	F5				1				Hidalgo
		E10	1	F5						1		Hidalgo
<i>A. hydrophila</i> 8 (16.7)	7/8 (87.5)	E11	2	F6	1			1				Hidalgo
		E12	1	F19	1							Hidalgo
		E13	1	F12	1 ^{g,i}							Veracruz
		E13	1	F1			1 ^g					Veracruz
		E14	1	F5	1 ^g							Hidalgo
		E15	1	F8				1 ^{g,h}				Hidalgo
		E16	1	F20			1 ^g					Hidalgo
		E17	1	F20	1							Hidalgo
<i>A. sobria</i> 5 (10.4)	5/5 (100)	E18	1	F27							1 ^{e,g}	Michoacán
		E19	1	F28	1 ^g							Michoacán
		E20	1	F6						1 ^{g,i}		Hidalgo
		E21	1	F8			1					Hidalgo
<i>A. media</i> 4 (8.3)	3/4 (75)	E22	1	F10	1							México
		E23	1	F12				1 ^h				Veracruz
		E24	1	F26	1							Michoacán
		E25	2	F18	1	1						Veracruz
<i>A. popoffii</i> 3 (6.3)	2/3 (66.6)	E26	1	F25			1					Hidalgo
		E27	1	F8 [†]						1		Hidalgo
		E28	2	F7	1	1						Hidalgo
<i>A. allosaccharophila</i> 1 (2.1)	1/1 (100)	E29	1	F4						1		Hidalgo
		E30	1	F21	1 ^{g,i}							Hidalgo
<i>A. caviae</i> 1 (2.1)	1/1 (100)	E31	1	F17	1						Veracruz	
<i>A. salmonicida</i> 1 (2.1)	1/1 (100)	E32	1	F22						1 ^{f,g}	Hidalgo	
"<i>Aeromonas lusitana</i>" 1 (2.1)	1/1 (100)	E33	1	F29	1						Hidalgo	

^aErosion in the dorsal fin, ^bPetechiae haemorrhages in the pectoral fins, ^cErosion of the mouth, ^dPetechiae haemorrhages in the ventral fin, ^eEpidermal ulceration, ^fUlceration in the base of the pectoral fin. ^gPCR positive for the *bla*_{CpH4/IMIS} gen; ^hPCR positive for the *bla*_{S_{HV}} gen; ⁱPCR positive for the *int1*gen

361 Table 2 Identification of 48 *Aeromonas* isolates from rainbow trout on the basis of *gyrB*-
 362 *rpoD* sequencing and comparison with identification results obtained by the 16S rDNA-
 363 RFLP.

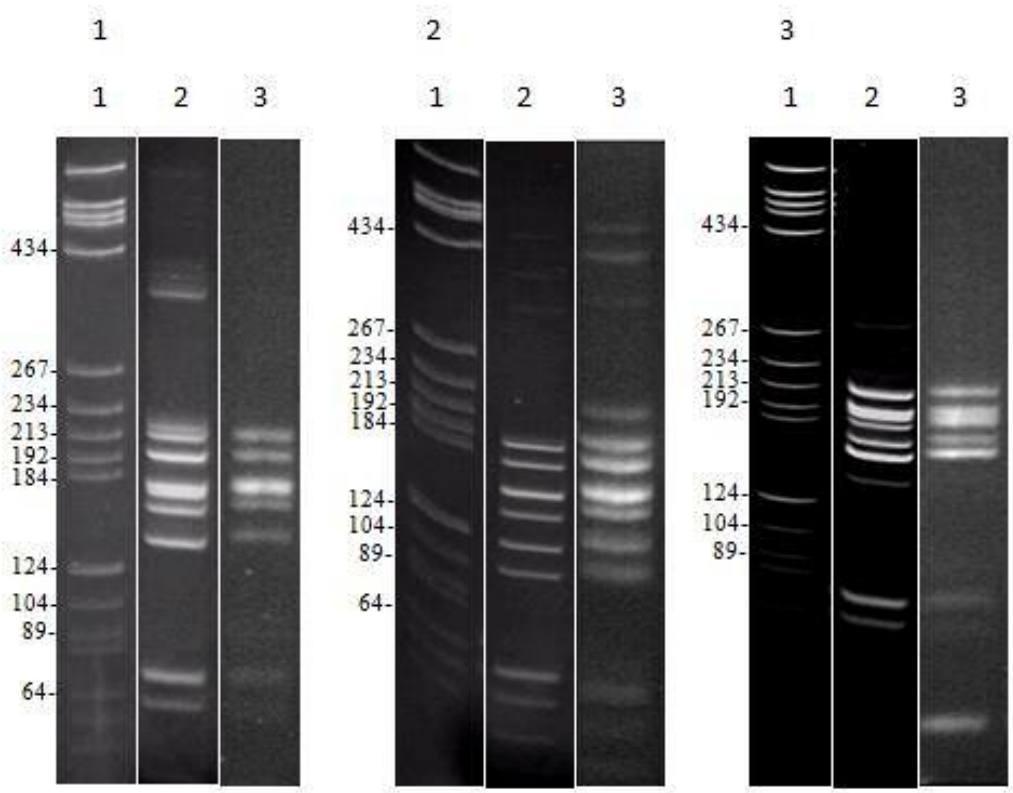
<i>gyrB-rpoD</i>	16S rDNA-RFLP ^a	% Coincident results
14 <i>A. veronii</i>	14 <i>A. veronii</i>	100
10 <i>A. bestiarum</i>	5 <i>A. bestiarum</i> / <i>A. salmonicida</i> / <i>A. piscicola</i> 3 <i>A. bestiarum</i> 2 <i>A. salmonicida</i>	30
8 <i>A. hydrophila</i>	8 <i>A. hydrophila</i>	100
5 <i>A. sobria</i>	3 <i>A. sobria</i> 1 <i>A. allosaccharophila</i> ^b 1 <i>A. eucrenophila</i> ^b	60
4 <i>A. media</i>	2 <i>A. media</i> 2 <i>A. hydrophila</i> ^c	50
3 <i>A. popoffii</i>	3 <i>A. popoffii</i>	100
1 <i>A. allosaccharophila</i>	1 <i>A. sobria</i> ^c	0
1 <i>A. caviae</i>	1 <i>A. encheleia</i> ^c	0
1 <i>A. salmonicida</i>	1 <i>A. bestiarum</i> / <i>A. salmonicida</i> / <i>A. piscicola</i>	0
1 “ <i>Aeromonas lusitana</i> ”	1 <i>A. encheleia</i>	0

364 ^a Identification by comparison with the described 16S rDNA-RFLP patterns for the
 365 different *Aeromonas* spp, (Borrell et al., 1998; Figueras et al., 2000)

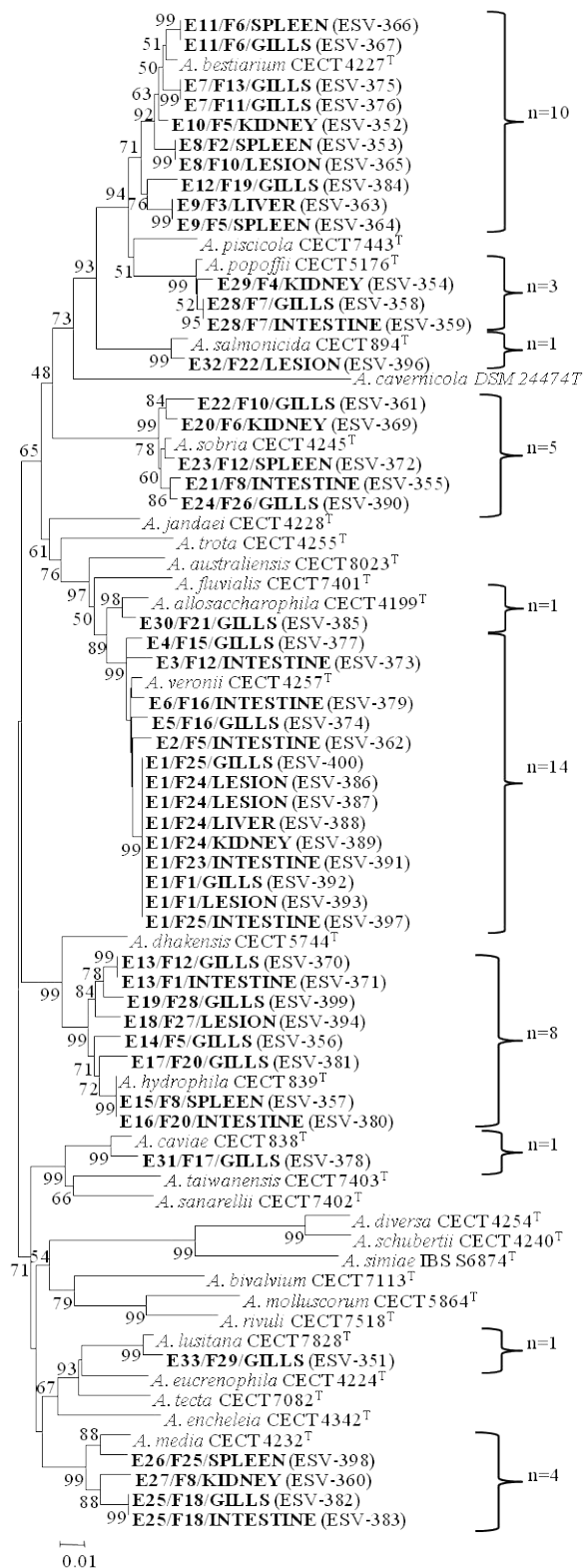
366 ^b The isolates showed the 16S rDNA-RFLP pattern of *A. sobria* but were wrongly
 367 interpreted in the previous study (Vega et al., 2014).

368 ^c Isolates showed atypical 16S rDNA-RFLP patterns

369 Fig. 1 Polyacrylamide (17%) gels showing atypical 16S rDNA-RFLP patterns observed for
 370 rainbow trout strains and comparison with typical patterns of *A. media*, *A.*
 371 *allosaccharophila* and *A. caviae*. (1) *A. media*: Line 1, DNA molecular size marker (marker
 372 V Roche Applied Science); lane 2, strain E25/F18 showing an atypical restriction pattern;
 373 lane 3, strain CECT 4232^T showing the typical restriction pattern. (2) *A. allosaccharophila*:
 374 Lane 1, DNA molecular size marker (marker V Boehringer); lane 2, strain E30/F21 showing
 375 an atypical restriction pattern; lane 3, strain CECT 4199^T showing the typical restriction
 376 pattern. (3) *A. caviae*: Lane 1, DNA molecular size marker (marker V Boehringer); lane 2,
 377 strain E31/F17 showing an atypical restriction pattern; lane 3, strain CECT 838^T showing
 378 the typical restriction pattern.



379 Fig. 2 Unrooted neighbour-joining phylogenetic tree derived from the concatenated
 380 sequences of the *gyrB-rpoD* genes (1004bp) showing the relationship between rainbow
 381 isolates and other known *Aeromonas* species. Number shown next to each node indicates
 382 bootstrap values (percentage of 1000 replicates)



c. Artículo en preparación

Current Microbiology



Explorar todos los aspectos de las células microbianas, incluyendo procariotas y eucariotas y virus. La cobertura se extiende por la microbiología general, médica, y aplicada en microbiología y virología. Se basa en la fisiología, la bioquímica, la genética, morfología, taxonomía, la inmunología y más.

Factor de impacto 1.520

Factor de impacto en 5 años 1.648

1 Short communication

2

3 Biochemical characterization, identification of putative virulence genes and antibiotic
4 susceptibility of *Aeromonas lusitana* isolates.

5

6 Vicente Vega-Sánchez,^a Fadia Latif-Eugenín,^b Roxana Beaz-Hidalgo,^b Antonio J.

7 Martínez-Murcia,^c María José Figueras,^{b,*} Graciela Castro-Escarpulli,^c Edgardo Soriano-

8 Vargas^d

9

10 ^a Centro de Investigación y Estudios Avanzados en Salud Animal, Facultad de Medicina
11 Veterinaria y Zootecnia, Universidad Autónoma del Estado de México, Toluca, México.

12 ^b Unitat de Microbiologia, Departament de Ciències Mèdiques Bàsiques, Facultat de
13 Medicina i Ciències de la Salut, IISPV, Universitat Rovira i Virgili, Reus, Spain.

14 ^c Area de Microbiología, EPSO, Universidad Miguel Hernández, Orihuela E-03300,
15 Alicante, Spain.

16 ^d Laboratorio de Bacteriología Médica, Escuela Nacional de Ciencias Biológicas (ENCB),
17 Instituto Politécnico Nacional (IPN), México.

18

19 * Corresponding author.

20 Tel: +34 977759321; fax: +34 977759322. E-mail address: mariajose.figueras@urv.ca

21 (María José Figueras).

22 Abstract

23

24 In the present study, the comparative result using the key biochemical scheme,
25 antimicrobial resistance with a new isolate of the species *Aeromonas lusitana* obtained
26 from gills in rainbow trout and the putative virulence genes present in the 6 isolates of *A.*
27 *lusitana* are described. The key biochemical scheme showed difference with indole
28 production in the new isolate and could be change this test to variable. The new *A. lusitana*
29 isolate showed only intermediate resistance to ampicillin, amoxicillin–clavulanic acid and
30 cephalothin using minimal inhibitory concentrations (MICs). The identification of putative
31 virulence genes showed five different profiles, but six different fingerprints with the
32 enterobacterial repetitive intergenic consensus polymerase chain reaction (ERIC-PCR), the
33 type strain CECT7828^T showed to contain the higher number of virulence factors
34 (*laf*⁺/*lipase*⁺/*serine*⁺/*ascF*-*G*⁺/*ascV*⁺/*aexT*⁺) followed by MDC 2467
35 (*laf*⁺/*lipase*⁺/*serine*⁺/*ascF*-*G*⁺/*ascV*⁺). Virulence genes also detected were *aerA* (100%),
36 lipase genes (100%), serine protease genes (83%), *laf* (67%), *act* (50%), type III secretion
37 system (T3SS) (50%), effector protein of T3SS *aexT* (17%), the genes *alt*, *ast*, *apoP*, *stx1*
38 and *stx2* were negative in all strains included in the present study.

39 Introduction

40 The genus *Aeromonas* resides within the family *Aeromonadaceae* that belongs to
41 the class *Gamma-proteobacterias* (Martin-Carnahan and Joseph, 2005), the genus are found
42 in water and soil environments and are many times associated with fish and human disease
43 (Janda and Abbott, 2010; Beaz-hidalgo and Figueras, 2013). The study of the genome of
44 the genus *Aeromonas* showed evidence of adaptation and evolution (Beaz-Hidalgo and
45 Figueras, 2013); the virulence genes in pathogenic *Aeromonas* strains that acquired these
46 from their common ancestor or more recently by lateral gene transfer (Hossain et al., 2013).
47 These virulence genes are implicated in adhesion structural components (flagella, fimbria,
48 outer membrane proteins (OMPs), and capsule responsible for the first contact between
49 host and pathogen and evasion of the immune response (Beaz-Hidalgo and Figueras, 2013).
50 Different extracellular proteins secreted by *Aeromonas* were described including cytotoxic
51 and cytotoxic enterotoxin, haemolysin, proteases, lipases that play a role in invasiveness
52 and in the establishment of the infection (Galindo et al., 2006,). Four of the six secretion
53 systems (TSS) have been detected in the genus *Aeromonas* (type II, III, IV and VI),
54 however the type III (T3SS) play an important role in the pathogenesis and virulence of the
55 *Aeromonas* in fish and human disease (Dallaire-Dufresne et al., 2014; Janda and Abbott,
56 2010).

57 The taxonomy of the genus *Aeromonas* is complex and continually changes due the
58 addition of newly description species and today the genus includes 28 species with the
59 recent incorporation of the species *Aeromonas lusitana* (Martínez-Murcia et al., 2014). *A.*
60 *lusitana* was described on the basis of 5 isolates in Spain “136/15” isolated from drinking
61 water-fountain (MDC 2467), “L8-3” and “L10-4” isolated from vegetable (MDC 2468,
62 MDC 2469), 28/6 and 11/6 (CECT 7828^T) isolated from thermal water. The research aims

63 of the present study were the characterization of biochemical and antimicrobial activity of
64 the new isolate of *A. lusitana* from gills in rainbow trout and the virulence potential of the
65 recently new species.

66

67 Materials and Methods

68 Isolation and molecular identification

69 Cultured juvenile rainbow trout sourced from a pond located in Huasca de Ocampo
70 in the state of Hidalgo in Mexico, were submitted for routine diagnosis at the CIESA, one
71 fish were examined for bacteriology analysis and samples from gills, intestine, spleen, liver,
72 and kidney were plated out on Tryptic Soy Agar (TSA) incubated at 30 °C for 24 h.
73 Colonies suspected of *Aeromonas* were confirmed by Vega-Sánchez et al. (2014) to
74 *Aeromonas lusitana* using the genes *gyrB* and *rpoD* (GeneBank accession number *gyrB*:
75 KJ743554; *rpoD*: KJ743565).

76

77 Phenotypic characteristic and susceptibility to antimicrobial agents

78 Phenotypic tests of the recovered strain were evaluated using conventional
79 biochemical test as elsewhere reported (Abbott et al., 2003; Beaz-Hidalgo et al., 2010) and
80 using MicroScan WalkAway-40 system and the specific test are listed in Table 1 and Table
81 S1. The antimicrobial susceptibility test was performed by agar disk diffusion method as
82 recommended by the Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI, 2012) and also the
83 MicroScan WalkAway-40 system and the MIC breakpoints used as described (CLSI, 2005;
84 Aravena-Román et al., 2012). The antimicrobial agents tested are listed in Table 2 and
85 Table S1). The phenotypic test and antimicrobial susceptibility were performed in
86 triplicates.

87

88 Detection of putative virulence genes

89 The recovered new strain and the five strains described by Martínez-Murcia et al.
90 (2014) of the specie *A. lusitana*, were evaluated the presences of several putative virulence
91 genes by PCR with three replicates. The specific gene studied were lateral flagellum *lafA*
92 (Merino et al., 2003), for aerolysin/haemolysin *aerA* (Soler et al., 2002) for cytotoxic
93 enterotoxin *act* (Kimgombe et al., 1999), for heat stable enterotoxin *ast* (Aguilera-Arreola
94 et al., 2005), heat-labile cytotoxic enterotoxin *alt* (Chopra et al., 1996), for lipase genes *lip*,
95 *lipH3*, *pla*, *plc* (Chacón et al., 2003), for aerolysin/haemolysin *aerA*, for serine protease
96 *aspA*, *ahe2* (Chacón et al., 2003), for T3SS *ascF-G* and *ascV* (Chacón et al., 2004), the
97 effectors protein *aexT* (Braun et al., 2002) and *aopP* (Fehr et al., 2006) and shiga toxins
98 *stx1* (Wang et al., 2002) and *stx2* (Muniesa et al., 2003).

99

100 Results and Discussion

101 Isolation and molecular identification

102 No growth was observed in samples from intestine, spleen, liver, and kidney but
103 predominant colonies were isolated from gills and confirmed belong to the genus
104 *Aeromonas* and identified on the basis of the 16S rDNA RFLP with *A. encheleia* and using
105 the genes *gyrB* and *rpoD* was identified with *A. lusitana* (Vega-Sánchez et al., 2014), This
106 was corroborated using NEB cutter V 2.0 software (Vincze et al., 2002), which is available
107 online (<http://tools.neb.com/NEBcutter2/index.php>). Both strains *A. lusitana* CECT 7828^T
108 and *A. encheleia* CECT 4342^T showed the same patten with the 16S rRNA gene (1503 bp)
109 digestions with enzymes AluI and MboI, NarI, HaeIII and AlwNI in the computer
110 simulation (Table S2). The 5 strains described by Mattinez-Murcia et al. (2014) were

111 isolated from vegetables and water in Spain, this is the first report of *A. lusitana* out Spain.
112 The genus *Aeromonas* was the most prevalent on gills from farmed of rainbow trout
113 (58.2%) (Salgado-Miranda et al., 2010). The isolates from gills are a reflection of their
114 environment (Nieto et al., 1984; Cahill, 1990).

115

116 Phenotypic characteristic and susceptibility to antimicrobial agents

117 All phenotypic characteristics obtained by conventional biochemical and MicroScan
118 WalkAway-40 are showed in table S1. The phenotypic characteristic of the isolate
119 described in the present study showed discordant results with the indole production (Table
120 1). The four isolates and the reference strain (CECT 7828^T) described by Martínez-Murcia
121 et al. (2014) were negatives for indole production. However the indole production should
122 be considered a variable test in the specie *A. lusitana* 16.6% (1/6) according to the criteria
123 described by Abbott et al. (2003). The key tests for the phenotypic differentiation described
124 by Martínez-Murcia et al. (2014) is able to distinguish the specie *A. lusitana* (variable to
125 indole production) from to species reported today. Discordant results was observed between
126 conventional biochemical and MicroScan WalkAway-40 sowed in Table S1, with the test
127 ADH, LDC, indole production, ONPG and utilization of citrate. The MicroScan WalkAway
128 is unable to correctly identify *Aeromonas* spp. from the genera *Pasteurella*, *Pseudomonas*
129 and *Vibrio* (Soler et al., 2003). The mistakes may be associated to different result in the
130 biochemical test, similar to other commercial system used in the identification of
131 *Aeromonas* spp. (Toranzo et al., 1986).

132 The susceptibility to 23 antimicrobial agents were evaluated (Table 2), of which
133 intermediate resistance were observed to ampicillin, amoxicillin-clavulanic acid and
134 cephalothin. Higher levels of resistance were observed in isolates with ampicillin from

135 clinical and environmental samples (Abbott et al., 2003; Beaz-Hidalgo et al., 2012; Dias et
136 al., 2012). A comparative studied described by Aravena-Román et al. (2012) with isolates
137 of *Aeromonas* spp. obtained from environmental and clinical samples showed 83%
138 (161/193) of resistance with amoxicillin-clavulanate of which 94% (135/144) from clinical
139 samples and 53% (26/49) from environmental samples and 73% (140/ 193) of the isolates
140 showed resistance to cephalothin of which 79% (114/144) from clinical samples and 53%
141 (26/49) from environmental samples.

142

143 Detection of putative virulence genes

144 The six strains of the recent new species *A. lusitana* showed five different virulence
145 genes profiles (Table 3), however all isolates showed different fingerprints with the
146 enterobacterial repetitive intergenic consensus polymerase chain reaction (ERIC-PCR); the
147 strain CECT7828^T showed the higher number of virulence factors
148 (*laf*⁺/*aerA*⁺/*lipase*⁺/*serine*⁺/*ascF-G*⁺/*ascV*⁺/*aexT*⁺) (Table 3). Lye et al. (2011) demonstrated
149 that strains of *Aeromonas* isolated from environmental samples were pathogenic and
150 contained virulence abilities similar to those seen in clinical isolates in a mouse model.

151 The lipase genes (*pla/lip/lipH3/apl-1/lip*) was detected in all strains included (100%
152 6/6) (Table 3) these genes has a hydrolytic effect on the lipids of the membrane of the host
153 cells, the lipase genes has been detected in higher prevalence in clinical (93%) and
154 environmental isolates (96%) (Chacon et al., 2003). However, Merino et al. (1999) reported
155 that *A. hydrophila* with insertion mutants for the lipase gene reduced the lethal dose in mice
156 and fish models. The *aerA* gene was present in all strains (100% 6/6) (Table 3), this gen has
157 been reported in 96% (74/77) in *Aeromonas* spp. isolates from fish, rang to 76 – 81% in
158 clinical isolates and 68 – 78% in environmental samples (Chacon et al., 2003; Aravena-

159 Román et al., 2014). The serine protease genes were detected in 83% (5/6) (Table 3), these
160 genes play an important role in the pathogenic of *Aeromonas* because causes tissue damage
161 and facilitating bacterial invasion into the host cell (Beaz-Hidalgo et al., 2013). Higher
162 prevalence of serine protease in clinical and environmental isolates (72% and 77%) as
163 reported by Chacon et al. (2003). However Araven-Román et al. (2014) reported low
164 prevalence 19% (19/98) in clinical isolates. The species *A. taiwanensis* and *A. sanrelii*
165 isolates from chironomid egg masses showed low or absences of this gene (25% and 0%)
166 (Beaz-Hidalgo et al., 2012). The prevalence of lateral flagellum (*laf*) in this study was of
167 67% (Table 3), an important structure involved in adherence and biofilm formation,
168 expressed during bacterial grown on viscous surfaces (Beaz-Hidalgo et al., 2013). The *fla*
169 gen has been detected in 100% of isolates of *Aeromonas* spp. from drinking water in Spain
170 (Pablos et al., 2009). Recently Aravena-Román et al. (2014) observed the presence of *laf*
171 gene was more often in clinical than environmental isolates. The cytotoxic enterotoxin gene
172 (*act*) was detected in 50% of the strains; different prevalence has been reported 43% to
173 62% (Figueras et al., 2009; Puthuchearry et al., 2012; Wu et al 2007). However, the species
174 *A. taiwanensis* and *A. sanarelii* isolates from chironomid egg the gene *act* was not detected
175 (Beaz-Hidalgo et al 2012). The T3SS (*ascF-G* and *ascV*) was detected in 3 strains (CECT
176 7828^T, MDC 2467, MDC 2468) however only the type strain expressed the effector protein
177 *axeT* (Table 3), the T3SS is regarded an important virulence factor involved in the injection
178 of effector toxins directly into the cytoplasm of the host cells (Beaz-Hidalgo et al., 2013).
179 Different studies that used mutant strains showed the structural genes of the T3SS are
180 essential for the toxicity and virulence (Burr et al., 2005; Dacanay et al., 2006). However
181 mutant whit effector proteins showed less virulence but not abolished (Dacanay et al.,
182 2006). None of the strains of either species were heat stable enterotoxin (*ast*), heat-labile

183 cytotoxic enterotoxin (*alt*), Shiga toxins (stx1 and stx2) and the gene of the *Aop-P* toxin
184 secreted by the TTSS (Table 3).

185 In conclusion, this study corroborate that the biochemical characteristic in the genus
186 *Aeromonas* is complex and changed quickly and demonstrate the diversity profiles of
187 virulence genes in the recent new specie *A. lusitana* and the relative potential to cause
188 disease by virulence factors that contributed to pathogenicity in *Aeromonas*.

189

190 Acknowledgments

191 This work was funded by Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT),
192 project CB-2008-01-103142 (UAEM1900/2010C). Vicente Vega-Sánchez held a
193 scholarship from CONACYT and BECA MIXTA – CONACYT for a research visit to Dra.
194 Figueras laboratory, Spain.

195

196 References

- 197 1. Abbott SL, Cheung WK, Janda JM (2003) The genus *Aeromonas*: biochemical
198 characteristics, atypical reactions, and phenotypic identification schemes. J Clin Microbiol
199 41:2348–2357 doi: 10.1128/JCM.41.6.2348–2357.2003
- 200 2. Aguilera-Arreola MG, Hernández-Rodríguez C, Zúñiga G, Figueras MJ, Castro-
201 Escarpulli G (2005) *Aeromonas hydrophila* clinical and environmental ecotypes as revealed
202 by genetic diversity and virulence genes. FEMS Microbiol Lett 242:231–240.
203 doi: 10.1016/j.femsle.2004.11.011
- 204 3. Aravena-Román M, Inglis TJJ, Henderson B, Riley TV, Chang BJ (2012) Antimicrobial
205 susceptibilities of *Aeromonas* strains isolated from clinical and environmental sources to 26

206 antimicrobial agents. *Antimicrob Agents Chemother* 56:1110–1112. doi:
207 10.1128/AAC.05387-11

208 4. Aravena-Román M, Inglis TJJ, Riley TV, Chang BJ (2014) Distribution of 13 virulence
209 genes among clinical and environmental *Aeromonas* spp. in Western Australia. *Eur J Clin*
210 *Microbiol Infect Dis*. doi: 10.1007/s10096-014-2157-0

211 5. Beaz-Hidalgo R, Figueras MJ (2013) *Aeromonas* spp. whole genomes and virulence
212 factors implicated in fish disease. *J Fish Dis* 36:371–388. doi: 10.1111/jfd.12025.

213 6. Beaz-Hidalgo R, Alperi A, Buján N, Romalde JL, Figueras MJ (2010) Comparison of
214 phenotypical and genetic identification of *Aeromonas* strains isolated from diseased fish.
215 *Syst Appl Microbiol* 33:149–153. doi: 10.1016/j.syapm.2010.02.002.

216 7. Beaz-Hidalgo R, Shakèd T, Laviad S, Halpern M, Figueras MJ (2012) Chironomid egg
217 masses harbour the clinical species *Aeromonas taiwanensis* and *Aeromonas sanarellii*.
218 *FEMS Microbiol Lett* 337:48–54. doi: 10.1111/1574-6968.12003.

219 8. Braun M, Stuber K, Schlatter Y, Wahli T, Kuhnert P, Frey J (2002) Characterization of
220 an ADP-ribosyltransferase toxin (Aext) from *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida*.
221 *J Bacteriol* 184:1851–1858. doi: 10.1128/JB.184.7.1851–1858.2002

222 9. Burr SE, Pugovkin D, Wahli T, Segner H, Frey J (2005) Attenuated virulence of an
223 *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida* type III secretion mutant in a rainbow trout
224 model. *Microbiology* 151:2111–2128. doi: 10.1099/mic.0.27926-0

225 10. Cahill MM (1990) Bacterial flora of fishes: A review. *Microb Ecol* 19:21–41. doi:
226 10.1007/BF02015051.

227 11. Chacón MR, Figueras MJ, Castro-Escarpulli G, Soler L, Guarro J (2003) Distribution
228 of virulence genes in clinical and environmental isolates of *Aeromonas* spp. *Antonie van*
229 *Leeuwenhoek* 84:269–278. doi: 10.1023/A:1026042125243.

- 230 12. Chacón MR, Soler L, Groisman EA, Guarro J, Figueras MJ (2004) Type III secretion
231 system genes in clinical *Aeromonas* isolates. J Clin Microbiol 42:1285–1287. doi:
232 10.1128/JCM.42.3.1285–1287.2004.
- 233 13. Chopra AK, Peterson JW, Xu XJ, Copenhaver DH, Houston CW (1996) Molecular
234 and biochemical characterization of a heat-labile cytotoxic enterotoxin from *Aeromonas*
235 *hydrophila*. Microb Pathog 21:357–377. doi: 10.1006/mpat.1996.0068.
- 236 14. Clinical and Laboratory Standards Institute (2005). Methods for Antimicrobial Dilution
237 and Disk Susceptibility Testing of Infrequently Isolated or Fastidious Bacteria; Proposed
238 Guideline, M45–P. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne.
- 239 15. Clinical and Laboratory Standards Institute (2012). Performance Standards for
240 Antimicrobial Disk Susceptibility Tests; Approved Standard–Eleventh Edition, M02–A11.
241 Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne.
- 242 16. Dacanay A, Knickle L, Solanky KS, Boyd JM, Walter JA, Brown LL, Johnson SC,
243 Reith M (2006) Contribution of the type III secretion system (TTSS) to virulence of
244 *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida*. Microbiology 152:1847–1856. doi:
245 10.1099/mic.0.28768-0.
- 246 17. Dallaire-Dufresne S, Tanaka KH, Trudel MV, Lafaille A, Charette SJ (2014) Virulence,
247 genomic features, and plasticity of *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida*, the
248 causative agent of fish furunculosis. Vet Microbiol 169:1–7. doi:
249 10.1016/j.vetmic.2013.06.025.
- 250 18. Dias C, Mota V, Martínez-Murcia A, Saavedra MJ (2012) Antimicrobial resistance
251 patterns of *Aeromonas* spp. isolated from ornamental fish. J Aquacult Res Dev 3:131.
252 doi:10.4172/2155–9546.1000131.

253 19. Fehr D, Casanova C, Liverman A, Blazkova H, Orth K, Dobbelaere D, Frey J, Burr SE
254 (2006) AopP, a type III effector protein of *Aeromonas salmonicida*, inhibits the NF- κ B
255 signalling pathway. *Microbiology* 152:2809–2818. doi: 10.1099/mic.0.28889-0.

256 20. Figueras MJ, Alperi A, Saavedra MJ, Ko WC, Gonzalo N, Navarro M, Martínez–
257 Murcia AJ (2009) Clinical relevance of the recently described species *Aeromonas*
258 *aquariorum*. *J Clin Microbiol* 47:3742–3746. doi: 10.1128/JCM.02216-08.

259 21. Galindo CL, Sha J, Fadhil AA, Pillai LL, Chopra AK, 2006. Host immune responses to
260 *Aeromonas* virulence factors. *Curr Immunol Rev* 2:13–26. doi:
261 10.2174/157339506775471910.

262 22. Hossain MJ, Waldbieser GC, Sun D, Capps NK, Hemstreet WB, Carlisle K, Griffin MJ,
263 Khoo L, Goodwin AE, Sonstegard TS, Schroeder S, Hayden K, Newton JC, Terhune JS,
264 Liles MR (2013) Implication of lateral genetic transfer in the emergence of *Aeromonas*
265 *hydrophila* isolates of epidemic outbreaks in channel catfish. *PloS One* 8:e80943. doi:
266 10.1371/journal.pone.0080943.

267 23. Janda JM, Abbott SL (2010). The genus *Aeromonas*: taxonomy, pathogenicity, and
268 infection. *Clin Microbiol Rev* 23:35–73. doi: 10.1128/CMR.00039-09.

269 24. Kingombe CI, Huys G, Tonolla M, Albert MJ, Swings J, Peduzzi R, Jemmi T (1999)
270 PCR detection, characterization, and distribution of virulence genes in *Aeromonas* spp.
271 *Appl Environ Microbiol* 65:5293–5302.

272 25. Martin–Carnahan A, Joseph SW (2005) *Aeromonadaceae*, In: Garrity GM (Ed.), 2nd ed.
273 *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, vol. 2. Springer–Verlag, New York, NY, pp.
274 556–580.

275 26. Martínez-Murcia AJ, Beaz-Hidalgo R, Carvalho MJ, Aravena-Román M, Correia A,
276 Figueras MJ, Saavedra MJ (2014). *Aeromonas lusitana* sp. nov., isolated from untreated
277 water and vegetables. (in preparation).

278 27. Merino S, Aguilar A, Nogueras MM, Regue M, Swift S, Tomás JM (1999) Cloning,
279 sequencing, and role in virulence of two phospholipases (A1 and C) from mesophilic
280 *Aeromonas* sp. serogroup O:34. *Infect Immun* 67:4008–4013.

281 28. Merino S, Gavín R, Vilches S, Shaw JG, Tomás JM. (2003). A colonization factor
282 (production of lateral flagella) of mesophilic *Aeromonas* spp. is inactive in *Aeromonas*
283 *salmonicida* strains. *Appl Environ Microbiol.* 69:663–667. doi: 10.1128/AEM.69.1.663–
284 667.2003.

285 29. Muniesa M, de Simon M, Prats G, Ferrer D, Pañella H, Jofre J (2003) Shiga toxin 2–
286 converting bacteriophages associated with clonal variability in *Escherichia coli* O157:H7
287 strains of human origin isolated from a single outbreak. *Infect Immun.* 71:4554–4562. doi:
288 10.1128/IAI.71.8.4554–4562.2003.

289 30. Nieto TP, Toranzo AE, Barja JL (1984). Comparison between the bacterial flora
290 associated with fingerling rainbow trout cultured in two different hatcheries in the north–
291 west of Spain. *Aquaculture* 42:193–206. doi: 10.1016/0044-8486(84)90100-5.

292 31. Pablos M, Rodríguez-Calleja JM, Santos JA, Otero A, García-López ML (2009)
293 Occurrence of motile *Aeromonas* in municipal drinking water and distribution of genes
294 encoding virulence factors. *Int J Food Microbiol* 135:158–164. doi:
295 10.1016/j.ijfoodmicro.2009.08.020.

296 32. Puthucheary SD, Puah SM, Chua KH (2012) Molecular characterization of clinical
297 isolates of *Aeromonas* species from Malaysia. *PloS One* 7:e30205. doi:
298 10.1371/journal.pone.0030205.

299 33. Soler L, Figueras MJ, Chacón MR, Vila J, Marco F, Martínez-Murcia AJ, Guarro J
300 (2002) Potential virulence and antimicrobial susceptibility of *Aeromonas popoffii* recovered
301 from freshwater and seawater. FEMS Immunol Med Microbiol 32:243–247. doi:
302 10.1111/j.1574-695X.2002.tb00560.x

303 34. Soler L, Marco F, Vila J, Chacón MR, Guarro J, Figueras MJ (2003) Evaluation of two
304 miniaturized systems, MicroScan W/A and BBL Crystal E/NF, for identification of clinical
305 isolates of *Aeromonas* spp. J Clin Microbiol 41:5732–5734. doi: 10.1128/JCM.41.12.5732–
306 5734.2003.

307 35. Tena D, Aspiroz C, Figueras MJ, Gonzalez-Prætorius A, Aldea MJ, Alperi A, Bisquert
308 J (2009) Surgical site infection due to *Aeromonas* species: report of nine cases and
309 literature review. Scand J Infect Dis 41:164–170. doi: 10.1080/00365540802660492.

310 36. Toranzo AE, Santos Y, Nieto TP, Barja JL (1986) Evaluation of different assay systems
311 for identification of environmental *Aeromonas* strains. Appl Environ Microbiol 51:652–
312 656.

313 37. Vega-Sánchez V, Latif-Eugenín F, Soriano-Vargas E, Beaz-Hidalgo R, Figueras MJ,
314 Aguilera-Arreola MG, Castro-Escarpulli G (2014) Re-identification of *Aeromonas* isolates
315 **from rainbow trout and incidence of class 1 integron and β -lactamase genes.** Vet Microbiol
316 (in press).

317 38. Vincze T, Posfai J, Roberts RJ (2003) NEBcutter: a program to cleave DNA with
318 restriction enzymes. Nucleic Acids Res 31:3688–3691. doi: 10.1093/nar/gkg526.

319 39. Wang G, Clark CG, Rodgers FG (2002) Detection in *Escherichia coli* of the genes
320 encoding the major virulence factors, the genes defining the O157:H7 serotype, and
321 components of the type 2 Shiga toxin family by multiplex PCR. J Clin Microbiol 40:3613–
322 3619. doi: 10.1128/JCM.40.10.3613–3619.2002.

323 40. Wu CJ, Wu JJ, Yan JJ, Lee HC, Lee NY, Chang CM, Shih HI, Wu HM, Wang LR, Ko
324 WC (2007) Clinical significance and distribution of putative virulence markers of 116
325 consecutive clinical *Aeromonas* isolates in southern Taiwan. J Infect 54:151–158. doi:
326 10.1016/j.jinf.2006.04.002.
327

328 Table 1. Comparative phenotypic characteristic between strain ESV-351 and the five
 329 strains reported by Martínez-Murcia *et al.*, 2014

	ESV-351	CECT 7828 ^T	Isolates (4)
B -haemolysis	+	+	+
Indole	+	-	-
RM	+	+	+
LDC	+	+	+
Glucose (gas)	+	+	+
Citrate	+	+	+
<u>Hydrolysis of</u>			
SDS	-	-	V
Aesculin	+	+	+
Starch	+	+	+
Elastase	ND	+	+
<u>Acid from</u>			
Glycerol	+	+	+
L-arabinose	-	-	-
Salicine	+	+	+
<u>Utilization of</u>			
DL-lactate	-	-	-
L-arabinose	-	-	-
Growth at 4.5% NaCl	+*	+	+

330 ND: no detected; *Two of three repetition were positive.
 331

332 Table 2. Susceptibility profile of strain ESV-351 to 23 antimicrobial agents.

Antimicrobial agents	Result (MIC)	Breakpoints		
		Sensitive	Intermediate	Resistance
Amikacin	S (≤8)	≤16	32	≥64
Ampicillin	I (>16)	≤8	16	≥32
Amoxicillin-clavulanic acid	I (>16/8)	≤8/4	16/8	≥32/16
Aztreonam	S (≤1)*	≤8	16	≥32
Ceftazidime	S (≤1)*	≤8	16	≥32
Ceftriaxone (30 µg)	S (33) [□]	≥21	14-20	≤13
Cephalothin	I (>16)	≤8	16	≥32
Ciprofloxacin (5µg)	S (42) [□]	≥21	16-20	≤15
Cefotaxime	S (≤1)	≤8	16-32	≥64
Cefoxitin	S (≤8)	≤8	16	≥32
Ciprofloxacin	S (≤0.5)*	≤1	2	≥4
Cefepime	S (≤1)	≤8	16	≥32
Cefuroxime	S (8)*	≤8	16	≥32
Ertapenem	S (≤0.5)	≤2	4	≥8
Gentamicin	S (≤2)	≤4	8	≥16
Imipenem	S (≤1)	≤4	8	≥16
Nalidixic acid	S (≤16)	≤8	16	≥16
Piperacillin (100µg)	S (29) [□]	≥21	18-20	≤17
Piperacillin-tazobactam	S (≤8)	≤16/4	32/4-64/4	≥128/4
Tetracycline (30µg)	S (27) [□]	≥19	15-18	≤14
Trimetoprim-sulfamethoxazole	S (≤2/38)	≤2/38	-	≥4/76
Tigecycline	S (≤1)	≤1	2	≥2
Tobramycin	S (≤2)	≤2	4	≥4

333

334 [□] Antimicrobial susceptibility test was performed by agar disk diffusion (results expressed
 335 in mm).

336 * Two of three replicates were the same result.

337 Table 3. Virulence genes in six strains of *Aeromonas lusitana* included in the study
 338

Strain	Origen	<i>laf</i>	<i>act</i>	<i>ast</i>	<i>alt</i>	<i>aerA</i>	Lipase genes	Serine protease genes	<i>ascF-G</i>	<i>ascV</i>	<i>aexT</i>
ESV-351	Rainbow trout	-	+	-	-	+	+	+	-	-	-
CECT 7828 ^T	Thermal water	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+
MDC 2467	Drinking water	+	-	-	-	+	+	+	+	+	-
MDC 2468	Vegetable	+	-	-	-	+	+	-	+	+	-
MDC 2469	Vegetable	+	+	-	-	+	+	+	-	-	-
MDC 2472	Thermal water	-	+	-	-	+	+	+	-	-	-

339 All strains were negative for the genes *stx1*, *stx2* and *aopP*
 340

341 Table S1. Biochemical characteristic using conventional biochemical test and MicroScan
 342 (W/A) of ESV-351 isolate from rainbow trout.

Test	Biochemical results		Test	Biochemical results	
	Conventional	MicroScan		Conventional	MicroScan
Motility	+	ND	<u>Acid from:</u>		
Oxidase	+	ND	D-adonitol	ND	-
Catalase	+	ND	D-cellobiose	-	ND
ADH	+	-	D-mannitol	+	ND
LDC	+	-	D-sorbitol	-	-
ODC	-	-	Glucose	ND	+
Tryptophan deaminase	ND	-	Glycerol	+	ND
Indole	+	-*	L-Arabinose	-	ND
ONPG	+	-	L-Rhamnose	-	ND
Urea	-	-	D-lactose	-	ND
H ₂ S	-	-	D-mellobiose	ND	-
VP	-	-	<i>m</i> -Inositol	-	-
MR	+	ND	D-raffinose	ND	ND
Gelatin	+	ND	D-sacarose	+	ND
DNase	+	ND	Salicin	+	ND
Glucose (gas)	+	ND	Sucrose	-	-
Nitrate reduction	+	+	<u>Hydrolysis of:</u>		
β -Hemolysis	+		Aesculina	+	-
<u>Utilization of:</u>			SDS	-	ND
Citrate	+	-	Starch	+	ND
DL-Lactate	-	ND	<u>Resistance to :</u>		
Malonate	ND	-	Chepalothin	ND	+
Acetamide	ND	-	Colistin	ND	-
Tartrate	ND	-	Kanamycin	ND	+
<u>Growth in:</u>			Nitrofurantoin	ND	-
0% NaCl	+	ND	O /129 ^a (150 μ g)	+	ND
4.5% NaCl	+	ND	Penicillin	ND	+
6% NaCl	-	ND	Tobramycin	ND	-
Cetridime	ND	-			
Growth at 42°C	-	ND			

343

344 ADH: Arginine dihydrolase; LDC: Lysine decarboxylase; ODC: Ornithine decarboxylase; ONPG: *o*-

345 nitrophenyl- β -D-galactopyranoside; VP: Voges-Proskauer, MR: Methyl Red

346 ^a Vibriostatic agent (2,4-diamino-6,7diisopropylpteridine) (150 μ g / disk).

347 * Negative in two of three repetitions

348 Table S2. Computer simulated profiles of the digestion of the 16S rRNA gene (1505 bp) sequence of *A. lusitana* CECT 7828^T (GeneBank # HQ436039.2) and *A.*
 349 *encheleia* CECT 4342^T (GeneBank # HQ832414.1) with the method described by Figueras *et al.*, 2000
 350

		RFLP fragments with enzymes AluI and MboI of the following size (bp):																										
		1503	1044	459	346	317	220	207	204	195	171	169	161	157	138	121	119	69	66	59	54	47	42	38	34	33		
<i>A. lusitana</i>					X			X		X				X	X		X	X	X		X	X	X			X		
<i>A. encheleia</i>					X			X		X				X	X		X	X	X		X	X	X			X		
		RFLP fragments with enzyme NarI of the following size (bp):																										
<i>A. lusitana</i>		X																										
<i>A. encheleia</i>		X																										
		RFLP fragments with enzyme HaeIII of the following size (bp):																										
<i>A. lusitana</i>						X	X		X		X	X	X		X					X				X	X			
<i>A. encheleia</i>						X	X		X		X	X	X		X					X				X	X			
		RFLP fragments with enzyme AlwNI of the following size (bp):																										
<i>A. lusitana</i>			X	X																								
<i>A. encheleia</i>			X	X																								

VIII. DISCUSIÓN GENERAL

En la acuicultura, la producción intensiva de organismos acuáticos enfrenta el riesgo de aparición de enfermedades infecciosas, las cuales pueden ocasionar pérdidas económicas significativas por mortalidad. Las infecciones bacterianas son, en la mayoría de los casos, especies de los géneros *Aeromonas*, *Edwardsiella*, *Lactococcus*, *Photobacterium*, *Pseudomonas*, *Renibacterium*, *Streptococcus*, *Vibrio* y *Yersinia*, principalmente (Austin y Austin, 2007; Noga, 2010). En un estudio realizado en granjas de trucha arcoíris de México, se identificaron los géneros *Aeromonas* (48.7%), *Edwardsiella* (1.8%), *Enterobacter* (6.4%), *Escherichia* (15%), *Klebsiella* (6.1%), *Plesiomonas* (16.1%) y *Yersinia* (1.8%) (Salgado-Miranda *et al.*, 2010). En el presente estudio, se confirmaron que todos los aislamientos pertenecen al género *Aeromonas* utilizando el PCR específico de género (Chacon *et al.*, 2002), de los cuales se identificaron 10 especies en 50 aislamientos estudiados mediante los genes concatenados *gyrB-rpoD* (Vega-Sánchez *et al.*, 2014b), de las cuales solo el 16% (8/50) concordó con la identificación de especie descrita utilizando 32 pruebas fenotípicas (Vega-Sánchez *et al.*, 2014a). Beaz-Hidalgo *et al.* (2010) observaron una correlación del 35.5% entre la correlación fenotípica y genotípica. Contrariamente, Nagar *et al.* (2013) observaron una correlación en la identificación del 100% (n=22) utilizando las pruebas bioquímicas descritas por Abbott *et al.* (2003) y Beaz-Hidalgo *et al.* (2010) y la identificación genética utilizando el gen *rpoD*.

Abbott *et al.* (2003) describieron reacciones atípicas en especies del género *Aeromonas*. En el presente estudio se observaron estas reacciones en el 8% (4/50) de los aislamientos, con la producción de ácido a partir de m-inositol en las especies identificadas por los genes *gyrB-rpoD* como *A. bestiarum*, *A. hydrophila*, *A. popoffii* y *A. veronii*; esta prueba logra diferenciar los géneros *Aeromonas* y *Plesiomonas* (Martin-Cargnham y Joseph, 2005). En este estudio el 12% (6/50) de los aislamientos fueron sensibles al agente vibriostático e identificados como *A. bestiarum*, *A. media*, *A. popoffii* y *A. sobria*. Sin embargo, estas reacciones atípicas se observan en las especies *A. eucrenophila*, *A. veronii* (Abbott *et al.*, 2003), *A. sobria* (Martin-Cargnham y Joseph, 2005), *A. australiensis* (Aravena-Román *et al.*, 2013) y *A. cavernicola* (Martínez-Murcia *et al.*, 2013). La

implementación del PCR específico de género descrito por Chacón *et al.* (2002) es indispensable para la correcta identificación del género, ya que las reacciones fenotípicas pueden presentar reacciones atípicas y excluir aislamientos o confundirlos con otros géneros (Puthucheary *et al.*, 2012; Beaz-Hidalgo *et al.*, 2010; Vega-Sánchez *et al.*, 2014a).

En el presente trabajo la identificación genética mediante el análisis de los genes *gyrB-rpoD* mostró una correlación del 70% (35/50) con la identificación obtenida por RFLP del gen 16S DNAr (Vega-Sánchez *et al.*, 2014a), donde 12% (6/50) mostraron el patrón común de *A. salmonicida*, *A. bestiarum* y *A. piscicola*, siendo imposible de diferenciar utilizando RFLP del gen 16S DNAr (Beaz-Hidalgo *et al.*, 2009, 2010) y 4% (2/50) mostraron el patrón descrito para la especie *A. salmonicida*, pero el 2% (1/50) fue reidentificada como *A. bestiarum*; esto es debido a la alta identidad en el gen 16S RNAr (99.6–100%) entre las especies de *A. salmonicida*, *A. bestiarum* y *A. piscicola* por lo cual solo pueden ser identificadas correctamente con la utilización de los genes *housekeeping* (Beaz-Hidalgo *et al.*, 2009, 2010).

En el presente estudio se identificó en el 8% (4/50) de los aislamientos la presencia de patrones atípicos utilizando los RFLP del gen 16S DNAr, los cuales fueron reidentificados utilizando los genes *housekeeping* (*gyrB-rpoD*) como *A. allosaccharophila* 2% (1/50), *A. caviae* 2% (1/50) y *A. media* 4% (2/50), esto es debido a la presencia de polimorfismos o microheterogeneidad en la secuencia del gen 16S RNAr asociado principalmente a aislamientos obtenidos de casos clínicos (Alperi *et al.*, 2008).

Se identificó correctamente el 2% (1/50) de *A. encheleia* utilizando RFLP del gen 16S DNAr; sin embargo, la secuenciación de los genes *gyrB-rpoD* permitió la reidentificación como “*A. lusitana*”. Por lo que con la técnica de RFLP del gen 16S DNAr es imposible diferenciar ambas especies, aún cuando presentan porcentajes de similitud del 98.9% del gen 16S RNAr (Vega-Sánchez *et al.*, 2014c).

La genotipificación de los aislamientos utilizando la técnica de ERIC-PCR determinó una diversidad genética del 70% (35/50), de forma similar a lo descrito por otros

autores (Aguilera-Arreola *et al.*, 2005, 2007; Fontes *et al.*, 2011). Las especies *A. veronii*, *A. bestiarum*, *A. media* y *A. popoffii* fueron obtenidas de diferentes órganos, mostraron el mismo patrón ERIC, lo cual indica una septicemia en los peces y su potencial invasivo. Burr *et al.* (2005) asociaron este potencial con la presencia del sistema de secreción tipo III de la especie *A. salmonicida*. Otros autores han asociado este potencial con diferentes factores de virulencia, tales como: la cápsula, flagelo, fimbrias tipo IV, capa A, LPS y proteasas (Masada *et al.*, 2002; Boyd *et al.*, 2008; Jutfelt *et al.*, 2008; Beaz-Hidalgo *et al.*, 2013a; Quin *et al.*, 2014; Dallaire-Dufresne *et al.*, 2014). Por lo cual es necesario identificar los factores de virulencia implicados en estos aislamientos.

Se identificaron cuatro genotipos idénticos (E1, E7, E8 y E9) en aislamientos de diferentes localidades: México-Hidalgo, México-Veracruz, México-Michoacán y México-Hidalgo. Sin embargo, no se encontró alguna relación epidemiológica aparente entre estos aislamientos. Otros autores han descrito la asociación de genotipos idénticos con infecciones en granjas diferentes (Ndi y Barton, 2011; Sreedharan *et al.*, 2013; Godoy *et al.*, 2010). Por lo cual es necesario realizar estudios de epidemiología molecular para conocer las rutas de distribución o permanencia de este género en granjas de acuícolas.

En el presente estudio, la identificación de 2 y 3 genotipos asociados a diferentes especies de *Aeromonas* en un mismo organismo, indica la presencia de una co-infección o infección mixta. Este es el primer reporte de co-infección de especies diferentes de *Aeromonas* en el mismo organismo. Sin embargo, es necesario identificar los genes de virulencia de estos aislamientos para determinar su potencial patogénico y de virulencia (Vega-Sánchez *et al.*, 2014a).

Los miembros del género *Aeromonas* son generalmente resistentes a las penicilinas, ampicilina, carbencilina pero sensibles a cefalosporinas (2ª y 3ª generación), aminoglucósido, carbapenemas, cloranfenicol, tetraciclinas, trimetoprim-sulfametoxazol y quinolonas (Martin-Cargnham y Joseph, 2005). Sin embargo algunas especies del género son sensibles a la ampicilina, tales como: *A. bestiarum*, *A. jandaei*, *A. media*, *A. salmonicida*, *A. schubertii*, *A. sobria* y *A. trotra* (Abbott *et al.*, 2003). En el presente

estudio se identificó únicamente un aislamiento sensible a la ampicilina, identificado como *A. popoffii* 2% (1/50).

En el presente trabajo se detectaron niveles altos de resistencia a la ampicilina (98%) y cefalotina (100%), lo cual es común en el género (Castro-Escarpulli *et al.*, 2003; Martin-Cargnham y Joseph, 2005; Janda y Aboott, 2010). Se detectaron bajos niveles de resistencia a cefotaxima con las especies *A. sobria* (4%), *A. bestiarum* (4%), cloranfenicol con la especie *A. bestiarum* (4%), nitrofurantoina con la especie *A. bestiarum* (4%) y trimetoprim-sulfametoxazol con la especie *A. bestiarum* (2%), de las cuales un aislamiento identificado como *A. bestiarum*, fue resistente al cloranfenicol, nitrofurantoina y trimetoprim-sulfametoxazol. Otros estudios con aislamientos de México, no detectaron la resistencia a nitrofurantoina y cefotaxima (Castro-Escarpulli *et al.*, 2003). Estudios recientes detectaron una resistencia del 38.2% (18/46) al trimetoprim-sulfametoxazol, 25.5% (12/46) a nitrofurantoina, 25.5% (12/46) a cloranfenicol y 2.1% (1/46) cefotaxima (Sarria-Guzmán *et al.*, 2014) y de forma particular la resistencia a la nitrofurantoina y trimetoprim-sulfametoxazol se ha reportado con mayor frecuencia en aislamiento de origen clínico (Aravena-Román *et al.*, 2012).

La mayoría de las especies de *Aeromonas* producen beta-lactamasas cromosómicas y se han detectado principalmente la cefalosporinasas de la clase C, penicilinasas de la clase D, y metalo-beta-lactamasas (MLBs) de la clase B carbapenemasas (Janda y Abbott, 2010). En el presente estudio se detectaron los genes *bla*_{Cpha/IMIS} (28% 14/50) y *bla*_{SHV} (4% 2/50). El gen *bla*_{Cpha/IMIS} es el más frecuente en el género *Aeromonas* (Chen *et al.*, 2012). Carvalho *et al.* (2012) reportaron frecuencias elevadas del gen *bla*_{Cpha/IMIS} en aislamientos de *Aeromonas* y principalmente en la especie *A. hydrophila*; de forma similar, en el presente estudio se detectó la presencia del gen en el 50% de los aislamientos identificados como *A. hydrophila* (7/14). Lo anterior puede explicarse porque los iniciadores fueron diseñados principalmente con las secuencias descritas para *A. hydrophila* (Henriques *et al.*, 2006). Sin embargo, se reporta una alta diversidad en este gen, lo cual explica la baja detección en otras especies (Carvalho *et al.*, 2012). En el presente estudio el gen *bla*_{SHV} fue detectado en las especies *A. hydrophila* y *A. sobria*. Este gen se ha detectado en *A. caviae*

(10/22), *A. hydrophila* (1/22) (Maverić *et al.*, 2013) *A. allosaccharophila* (2/19), *A. media* (1/19) y *A. hydrophila* (1/19) (Girlich *et al.*, 2011).

El integron de clase 1 se ha identificado en aislamientos obtenidos de muestras clínicas (Pérez-Valdespino *et al.*, 2009), ambientales (Carvalho *et al.*, 2012) y de granjas acuícolas (Jacobs y Chenia, 2007; Lukkana *et al.*, 2012; Sarria-Guzmán *et al.*, 2014). En granjas acuícolas se han reportado prevalencias elevadas de este integron en 51.4% a partir de tilapia, trucha y carpa (Jacobs y Chenia, 2007), 46% en aislamientos obtenidos de tilapia (Lukkana *et al.*, 2012) y 43.4% en aislamientos de carpa (Sarria-Guzmán *et al.*, 2014). En el presente estudio se detectó en 6% (3/50) de los aislamientos, resultados similares son reportados por Carvalho *et al.* (2012). Múltiples genes *cassettes* se han reportado en el género *Aeromonas* (*aadA1*, *aadA2*, *aadA5*, *aphA15*, *catB3*, *cmlA4*, *dfrA1*, *dfrA15*, *dfrA17*, *dfrB4*, *drfA12*, *oxa2*, etc) (Jacobs y Chenia, 2007; Pérez-Valdespino *et al.*, 2009; Lukkana *et al.*, 2012; Sarria-Guzmán *et al.*, 2014). Sin embargo, el de mayor frecuencia en aislamientos obtenidos de peces es el *aadA2* (Jacobs y Chenia, 2007; Sarria-Guzmán *et al.*, 2014) a diferencia de los resultados obtenidos en el presente estudio ya que solo se detectó el gene *cassettes aadA1*, por lo cual es necesario evaluar la diversidad genética de este gen y otros protocolos para su identificación.

La candidata a nueva especie se ha reportado a partir de una muestra de agua: “*A. lusitana*” (Martínez-Murcia *et al.*, 2014). En el presente estudio, el aislamiento de esta especie fue a partir de branquias. Se considera que los aislamientos obtenidos de branquias reflejan las especies presentes en los ambientes acuáticos (Nieto *et al.*, 1984; Cahill, 1990). Este es el segundo reporte a nivel mundial y el primero en el continente Americano específicamente en México en granjas de trucha arcoíris. El primer reporte fue en España (Martínez-Murcia *et al.*, 2011, 2014). La comparación bioquímica de las cepas reportadas por Martínez-Murcia *et al.* (2014), muestran que esta especie es indol negativo. Sin embargo, en este estudio (Vega-Sánchez *et al.*, 2014c), el aislamiento obtenido fue indol positivo, por lo que se sugiere que esta prueba bioquímica se considere como variable con base en los criterios establecidos para otras pruebas bioquímicas en este género (Abbott *et al.*, 2003). La comparación bioquímica utilizando pruebas convencionales y sistemas

automatizados (MicroScan WalkAway-40) muestra discrepancias, por lo que este sistema puede identificar erróneamente el género *Aeromonas* con otros géneros (Soler *et al.*, 2003) y muy posiblemente sea debido a la diferencia de resultados en el uso de bioquímicas convencionales y otros sistemas comerciales (Toranzo *et al.*, 1986).

La detección de los genes de virulencia presentes en las cepas pertenecientes a la especie “*A. lusitana*” hasta el momento reportadas, mostró que la cepa de referencia (CECT 7828^T) portaba el mayor número de genes de virulencia (*laf*⁺/*aerA*⁺/*lipasas*⁺/*proteasas*⁺/*ascF-G*⁺/*ascV*⁺/*aexT*⁺), a diferencia del aislamiento Mexicano (*act*⁺/*aerA*⁺/*lipasas*⁺/*proteasas*⁺). El gen *laf* fue detectado en el 67% de los aislamientos el cual es una estructura involucrada en la adherencia y la formación de biofilm (Beaz-Hidalgo *et al.*, 2013a). El gen *laf* es más frecuentemente detectado en aislamientos clínicos que aislamientos medioambientales (Aravena-Román *et al.*, 2014). Las enterotoxinas citotónicas (*ast* y *alt*) no fueron detectadas, sin embargo, la enterotoxina citotóxica se identifica en el 50% de los aislamientos. Se han reportado diferentes prevalencias de este gen 43% –62% (Figueras *et al.*, 2009; Puthucherry *et al.*, 2012; Wu *et al.*, 2007). El gen *aerA* fue detectado en el 100% de los aislamientos, Castro-Escarpulli *et al.* (2003) reporta el 96% en aislamientos obtenidos de tilapia, en aislamientos de origen clínico del 76 al 81% y en aislamientos ambientales del 68 al 78% (Chacon *et al.*, 2003; Aravena-Román *et al.*, 2014). Los genes que codifican para lipasas y proteasas fueron detectados en el 100% y 83% respectivamente de los aislamientos, considerando que las lipasas tienen un efecto hidrolítico sobre los lípidos de la membrana de las células hospedero (Beaz-Hidalgo *et al.*, 2013). Merino *et al.* (1999) demostraron la importancia de este gen, ya que observaron una reducción en la mortalidad de ratones y peces infectados experimentalmente con cepas mutantes. Las proteasas están implicadas en la multiplicación y la proliferación de la bacteria y a contribuir al desarrollo de la enfermedad (Janda y Abbott *et al.*, 2010; Beaz-Hidalgo *et al.*, 2013; Dallaire-Dufresne *et al.*, 2014) y se han detectado en aislamientos obtenidos de peces 97% (Castro-Escarpulli *et al.*, 2003) 72% en muestras clínicas y 77% en ambientales (Chacon *et al.*, 2003). Sin embargo estudios recientes por Aravena-Román *et al.* (2014) detectaron el gen *aspA* en el 19% de los aislamientos de origen clínico. El aislamiento Mexicano; el cual carece de T3SS, esta

implicado con la evasión de la respuesta inmune, ya que especies de *Aeromonas* que presentan este sistema son capaces de evadir la fagocitosis (Burr *et al.*, 2005). Lye *et al.* (2011) mostraron que las cepas de *Aeromonas* aisladas a partir de muestras ambientales eran patógenas con virulencia similar a lo observado en los aislados clínicos mediante un modelo en ratón, esto se relaciona con la cepa tipo de *A. lusitana* la cual presentó el mayor número de factores de virulencia por lo que podría ser de importancia en la acuicultura y salud pública.

IX. CONCLUSIONES

Se identificaron 10 especies diferentes utilizando métodos moleculares.

Las especies *A. veronii*, *A. bestiarum* y *A. hydrophila* fueron las especies más prevalentes en la trucha arcoíris.

Se obtuvo una correlación entre la identificación fenotípica y la secuenciación de los genes *housekeeping* del 12% y entre los métodos moleculares del 70% por lo cual se corrobora que la utilización de dos genes *housekeeping* son una herramienta excelente para la identificación genética de las especies de *Aeromonas*.

Es el primer reporte de la presencia de la especie “*A. lusitana*” **fuera de España y en** granjas de trucha arcoíris. El aislamiento “*A. lusitana*” **obtenido en este trabajo fue indol** positivo, lo cual contrasta con lo descrito en la literatura, y puede ser considerado variable esta prueba bioquímica en esta especie.

Las especies *A. veronii*, *A. bestiarum*, *A. hydrophila* y *A. salmonicida* se asociaron con lesiones en la trucha arcoíris, de las cuales *A. veronii* mostró un potencial invasivo debido a la identificación del mismo genotipo a partir de diferentes órganos.

Se mostró la presencia de co-infecciones o infecciones mixtas en un mismo organismo, sin embargo más estudios son necesarios para determinar su potencial patogénico y de virulencia.

Se identificaron especies de *Aeromonas* con idéntico perfil genético (ERIC-PCR) en diferentes entidades federativas: *A. veronii* y *A. bestiarum* en México e Hidalgo, México y Veracruz, México y Michoacán.

Solo dos cepas de *A. bestiarium* mostraron multiresistencia a 5 (Nitrofurantoina, Cloranfenicol, Trimetoprim-sulfametozaxol, cefalotina y ampicilina) y 4 (Nitrofurantoina, Cloranfenicol, Cefalotina, ampicilina) antibioticos el cual es de importancia en la producción acuícola y salud pública.

El gen *bla*_{CphA/IMI5} fue el más prevalente en los aislamientos de trucha arcoíris y la mayor presencia de estos fueron detectados en los aislamientos de la especie *A. hydrophila*.

X. REFERENCIAS

- Abbott SL, Cheung WK, Janda JM. (2003). The genus *Aeromonas*: biochemical characteristics, atypical reactions, and phenotypic identification schemes. *J Clin Microbiol.* 41:2348–2357.
- Abolghait SK, Akeda Y, Kodama T, Cantarelli VV, Iida T, Honda T. (2010). *Aeromonas hydrophila* PepO outer membrane endopeptidase activates human big endothelin-3 in vitro and induces skin ulcer in goldfish (*Carassius auratus*). *Vet Microbiol.* 145:113–121.
- Aguilera-Arreola MG, Hernández-Rodríguez C, Zúñiga G, Figueras MJ, Garduño RA, Castro-Escarpulli G. (2007). Virulence potential and genetic diversity of *Aeromonas caviae*, *Aeromonas veronii*, and *Aeromonas hydrophila* clinical isolates from Mexico and Spain: a comparative study. *Can J Microbiol.* 53:877–887.
- Aguilera-Arreola MG, Hernández-Rodríguez C, Zúñiga G, Figueras MJ, Castro-Escarpulli G. (2005). *Aeromonas hydrophila* clinical and environmental ecotypes as revealed by genetic diversity and virulence genes. *FEMS Microbiol Lett.* 242:231–240.
- Ali A, Carnahan A, Altwegg M, Luthyhottenstein J, Josep SW. (1996). *Aeromonas bestiarum* sp. nov. (formely genomospecies DNA group 2 *Aeromonas hydrophila*), a new species isolated from non human sources. *Med Microbiol Lett.* 5:156–165.
- Alperi A, Figueras MJ, Inza I, Martínez-Murcia AJ. (2008). Analysis of 16S rRNA gene mutations in a subset of *Aeromonas* strains and their impact in species delineation. *Int Microbiol.* 11:185–194.
- Alperi A, Martínez-Murcia AJ, Ko WC, Monera A, Saavedra MJ, Figueras MJ. (2010a) *Aeromonas taiwanensis* sp. nov. and *Aeromonas sanarellii* sp. nov., clinical species from Taiwan. *Int J Syst Evol Microbiol.* 60:2048–2055.

- Alperi A, Martínez-Murcia AJ, Monera A, Saavedra MJ, Figueras MJ. (2010b). *Aeromonas fluvialis* sp. nov., isolated from a Spanish river. *Int J Syst Evol Microbiol.* 60:72–77.
- Aravena-Román M, Beaz-Hidalgo R, Inglis TJ, Riley TV, Martínez-Murcia AJ, Chang BJ, Figueras MJ. (2013). *Aeromonas australiensis* sp. nov., isolated from irrigation water. *Int J Syst Evol Microbiol.* 63:2270–2276.
- Aravena-Román M, Inglis TJ, Riley TV. (2014). Chang BJ. Distribution of 13 virulence genes among clinical and environmental *Aeromonas* spp. in Western Australia. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* DOI:10.1007/s10096-014-2157-0
- Aravena-Román M, Inglis TJJ, Henderson B, Riley TV, Chang BJ. (2012). Antimicrobial susceptibilities of *Aeromonas* strains isolated from clinical and environmental sources to 26 antimicrobial agents. *Antimicrob Agents Chemother.* 56:1110–1112.
- Austin B y Austin DA. (2007). *Bacterial fish pathogens: disease of farmed and wild fish*, 4th Ed, Springer-Praxis.
- Beaz-Hidalgo R y Figueras MJ. (2013a). *Aeromonas* spp. whole genomes and virulence factors implicated in fish disease. *J Fish Dis.* 36:371–388.
- Beaz-Hidalgo R, Alperi A, Buján N, Romalde JL, Figueras MJ. (2010). Comparison of phenotypical and genetic identification of *Aeromonas* strains isolated from diseased fish. *Syst Appl Microbiol.* 33:149–153.
- Beaz-Hidalgo R, Alperi A, Figueras MJ, Romalde JL. (2009). *Aeromonas piscicola* sp. nov., isolated from diseased fish. *Syst Appl Microbiol.* 32:471–479.
- Beaz-Hidalgo R, Martínez-Murcia A, Figueras MJ. (2013b). Reclassification of *Aeromonas hydrophila* subsp. *dhakensis* Huys et al. 2002 and *Aeromonas aquariorum* Martínez-Murcia et al. 2008 as *Aeromonas dhakensis* sp. nov. comb nov. and emendation of the species *Aeromonas hydrophila*. *Syst Appl Microbiol.* 36:171–176.

- Bergh PV y Frey J. (2013). *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida* in the light of its type-three secretion system. *Microb Biotechnol*. DOI: 10.1111/1751-7915.12091
- Bergh PV, Burr SE, Benedicenti O, von Siebenthal B, Frey J, Wahli T. (2013). Antigens of the type-three secretion system of *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida* prevent protective immunity in rainbow trout. *Vaccine* 31:5256-5261.
- Borrell N, Acinas SG, Figueras MJ, Martínez-Murcia AJ. (1997). Identification of *Aeromonas* clinical isolates by restriction fragment length polymorphism of PCR-amplified 16S rRNA genes. *J Clin Microbiol*. 35:1671-1674.
- Borrell N, Figueras MJ, Guarro J. (1988). Phenotypic identification of *Aeromonas* genomospecies from clinical and environmental sources. *Can J Microbiol*. 44:103-108.
- Boyd JM, Dacanay A, Knickle LC, Touhami A, Brown LL, Jericho MH, Johnson SC, Reith M. (2008). Contribution of type IV pili to the virulence of *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida* in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Infect Immun*. 76:1445-1455.
- Braun M, Stuber K, Schlatter Y, Wahli T, Kuhnert P, Frey J. (2002). Characterization of an ADP-ribosyltransferase toxin (Aext) from *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida*. *J Bacteriol*. 184:1851-1858.
- Burr SE, Pugovkin D, Wahli T, Segner H, Frey J. (2005). Attenuated virulence of an *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida* type III secretion mutant in a rainbow trout model. *Microbiology*. 151:2111-2128.
- Cahill MM. (1990). Bacterial flora of fishes: A review. *Microb Ecol* 19:21-41.
- Canals R, Vilches S, Wilhelms M, Shaw JG, Merino S, Tomás JM. (2007). Non-structural flagella genes affecting both polar and lateral flagella-mediated motility in *Aeromonas hydrophila*. *Microbiology*. 153:1165-1175.

- Carnahan A, Fanning GR, Joseph SW. (1991a). *Aeromonas jandaei* (formerly genospecies DNA group 9 *A. sobria*), a new sucrose-negative species isolated from clinical specimens. J Clin Microbiol. 29:560–564.
- Carnahan AM, Chakraborty T, Fanning GR, Verma D, Ali A, Janda JM, Joseph SW. (1991b). *Aeromonas trota* sp. nov., an ampicillin-susceptible species isolated from clinical specimens. J Clin Microbiol. 29:1206–1210.
- Carvalho MJ, Martínez-Murcia A, Esteves AC, Correia A, Saavedra MJ. (2012). Phylogenetic diversity, antibiotic resistance and virulence traits of *Aeromonas* spp. from untreated waters for human consumption. Int J Food Microbiol. 159:230–239.
- Carvalho-Castro GA, Lopes CO, Leal CA, Cardoso PG, Leite RC, Figueiredo HC. (2010). Detection of type III secretion system genes in *Aeromonas hydrophila* and their relationship with virulence in Nile tilapia. Vet Microbiol 144:371–376.
- Castro-Escarpulli G, Figueras MJ, Aguilera-Arreola G, Soler L, Fernández-Rendón E, Aparicio GO, Guarro J, Chacón MR. (2003). Characterisation of *Aeromonas* spp. isolated from frozen fish intended for human consumption in Mexico. Int J Food Microbiol. 84:41–49.
- Chacón MR, Castro-Escarpulli G, Soler L, Guarro J, Figueras MJ. (2002). A DNA probe specific for *Aeromonas* colonies. Diagn Microbiol Infect Dis. 44:221–225.
- Chacón MR, Figueras MJ, Castro-Escarpulli G, Soler L, Guarro J. (2003). Distribution of virulence genes in clinical and environmental isolates of *Aeromonas* spp. Antonie Van Leeuwenhoek. 84:269–278.
- Chacón MR, Soler L, Groisman EA, Guarro J, Figueras MJ. (2004). Type III secretion system genes in clinical *Aeromonas isolates*. J Clin Microbiol 42:1285–1287.
- Charruau P, Pérez-Flores J, Pérez-Juárez JG, Cedeño-Vázquez JR, Rosas-Carmona R. (2012). Oral and cloacal microflora of wild crocodiles *Crocodylus acutus* and *C. moreletii* in the Mexican Caribbean. Dis Aquat Organ. 98:27–39.

- Chen PL, Ko WC, Wu CJ. (2012). Complexity of β -lactamases among clinical *Aeromonas* isolates and its clinical implications. *J Microbiol Immunol Infect.* 45:398–403.
- Chopra AK, Peterson JW, Xu XJ, Copenhaver DH, Houston CW. (1996). Molecular and biochemical characterization of a heat-labile cytotoxic enterotoxin from *Aeromonas hydrophila*. *Microb Pathog* 21:357–377.
- Clinical and Laboratory Standards Institute. (2005). *Methods for Antimicrobial Dilution and Disk Susceptibility Testing of Infrequently Isolated or Fastidious Bacteria; Proposed Guideline, M45-P*. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne.
- Clinical and Laboratory Standards Institute. (2012). *Performance standards for antimicrobial disk susceptibility test; approved standard, 11th ed.* CLSI Document M02–A11, Wayne, PA.
- Coenye T y Vandamme P. (2003). Intragenomic heterogeneity between multiple 16S ribosomal RNA operons in sequenced bacterial genomes. *FEMS Microbiol Lett.* 228:45–49.
- Colwell RR, Macdonell MR, De Ley J. (1986). Proposal to recognize the family *Aeromonadaceae* fam. nov. *Int J Syst Bacteriol.* 36:473–477.
- Constantino CF, Armijo OA, Osorio SD, Chávez SLA. (1997). Infección por *Aeromonas hydrophila* e *Ichthyophthirius multifiliis* en trucha (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum) y tilapia (*Oreochromis aureus*, L) de un centro de acopio de Morelos, México. Estudio patológico. *Vet Méx.* 28:59–62.
- Dallaire-Dufresne S, Tanaka KH, Trudel MV, Lafaille A, Charette SJ. (2014). Virulence, genomic features, and plasticity of *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida*, the causative agent of fish furunculosis. *Vet Microbiol.* 169:1–7.
- Demarta A, K pfer M, Riegel P, Harf-Monteil C, Tonolla M, Peduzzi R, Monera A, José Saavedra M, Martínez-Murcia A. (2008). *Aeromonas tecta* sp. nov., isolated from clinical and environmental sources. *Syst Appl Microbiol.* 31:278–286.

- Demarta A, Tonolla M, Caminada AP, Ruggeri N, Peduzzi R. (1999). Signature region within the 16S rDNA sequences of *Aeromonas popoffii*. FEMS Microbiol Lett. 172:239–246.
- Dror M, Sinyakov MS, Okun E, Dym M, Sredni B, Avtalion RR. (2006). Experimental handling stress as infection-facilitating factor for the goldfish ulcerative disease. Vet Immunol Immunopathol. 109:279–287.
- Egorov AI, Best JM, Frebis CP, Karapondo MS. (2011). Occurrence of *Aeromonas* spp. in a random sample of drinking water distribution systems in the USA. J Water Health. 9:785–798.
- Esteve C, Gutiérrez MC, Ventosa A. (1995). *Aeromonas encheleia* sp. nov., isolated from European eels. Int J Syst Bacteriol. 45:462–466. Erratum in: Int J Syst Bacteriol 1996; 46:366.
- Farmer JJ, Arduino MJ, Hickman-Brenner FW. (2006). The Genera *Aeromonas* and *Plesiomonas* in The Prokaryotes, a handbook on the biology of Bacteria, Third Edition, Vol 6: Proteobacteria: Gamma Subclass p. 564. Edited by Martin Dworkin. Springer Science+Business Media, LLC.
- Fehr D, Casanova C, Liverman A, Blazkova H, Orth K, Dobbelaere D, Frey J, Burr SE. (2006). AopP, a type III effector protein of *Aeromonas salmonicida*, inhibits the NF- κ B signalling pathway. Microbiology. 152:2809–2818.
- Figueras MJ., Beaz-Hidalgo R. & Paredes K. (2011a). Furunculosis y otras infecciones producidas por *Aeromonas*. In: Enfermedades infecciosas del cultivo de Salmónidos en Chile y el Mundo (ed. by R. Avendaño-Herrera), pp. 285–374. Niva Chile S.A., Puerto Varas, Chile.
- Figueras MJ, Aldea MJ, Fernández N, Aspíroz C, Alperi A, Guarro J. (2007). *Aeromonas* hemolytic uremic syndrome. A case and a review of the literature. Diagn Microbiol Infect Dis. 58:231–234.

Figueras MJ, Alperi A, Beaz-Hidalgo R, Stackebrandt E, Brambilla E, Monera A, Martínez-Murcia AJ. (2011b). *Aeromonas rivuli* sp. nov., isolated from the upstream region of a karst water rivulet. *Int J Syst Evol Microbiol*. 61:242–248.

Figueras MJ, Alperi A, Saavedra MJ, Ko WC, Gonzalo N, Navarro M, Martínez-Murcia AJ. (2009). Clinical relevance of the recently described species *Aeromonas aquariorum*. *J Clin Microbiol*. 47:3742–3746.

Figueras MJ, Beaz-Hidalgo R, Collado L, Martínez-Murcia AJ. (2011c). Point of view on the recommendations for new bacterial species description and their impact on the genus *Aeromonas* and *Arcobacter*. *Bull. BISMIS* 2:1–16.

Figueras MJ, Soler L, Chacón MR, Guarro J, Martínez-Murcia AJ. (2000). Extended method for discrimination of *Aeromonas* spp. by 16S rDNA RFLP analysis. *Int J Syst Evol Microbiol*. 6:2069–2073.

Fluit AC y Schmitz FJ. (2004) Resistance integrons and super-integrons. *Clin Microbiol Infect*. 10:272–288.

Fontes MC, Saavedra MJ, Martins C, Martínez-Murcia AJ. (2011). Phylogenetic identification of *Aeromonas* from pigs slaughtered for consumption in slaughterhouses at the North of Portugal. *Int J Food Microbiol*. 146:118–122.

Fuentes RJM y Pérez HJA. (1998) Aislamiento de *Aeromona hydrophila* en trucha arcoiris (*Oncorhynchus mykiss*). *Vet Méx*. 29:117–119.

Godoy M, Gherardelli V, Heisinger A, Fernández J, Olmos P, Ovalle L, Ilardi P, Avendaño-Herrera R. (2010). First description of atypical furunculosis in freshwater farmed Atlantic salmon, *Salmo salar* L., in Chile. *J Fish Dis*. 33:441–449.

Goldschmidt-Clermont E, Hochwartner O, Demarta A, Caminada AP, Frey J. (2009). Outbreaks of an ulcerative and haemorrhagic disease in Arctic char *Salvelinus alpinus* caused by *Aeromonas salmonicida* subsp. *smithia*. *Dis Aquat Organ*. 86:81–86.

- Harayama S. y Kasai H. (2006). Bacterial phylogeny reconstruction from molecular sequences. In Molecular identification, systematics, and population structure of Prokaryotes. p.105. Edited by E. Stackebrandt. Spriger-Verlag Berlin Heidelberg.
- Harf-Monteil C, Flèche AL, Riegel P, Prévost G, Bermond D, Grimont PA, Monteil H. (2004). *Aeromonas simiae* sp. nov., isolated from monkey faeces. Int J Syst Evol Microbiol. 54:481-485.
- Henriques IS, Fonseca F, Alves A, Saavedra MJ, Correia A. (2006). Occurrence and diversity of integrons and beta-lactamase genes among ampicillin-resistant isolates from estuarine waters. Res Microbiol. 157:938-947.
- Hernández CC, Aguilera-Arreola MG, Castro-Escarpulli G. (2011). Situación de las enfermedades gastrointestinales en México. Enf Inf Microbiol. 31:137-151.
- Hickman-Brenner FW, Fanning GR, Arduino MJ, Brenner DJ, Farmer JJ 3rd. (1998). *Aeromonas schubertii*, a new mannitol-negative species found in human clinical specimens. J Clin Microbiol. 26:1561-1564.
- Hossain MJ, Waldbieser GC, Sun D, Capps NK, Hemstreet WB, Carlisle K, Griffin MJ, Khoo L, Goodwin AE, Sonstegard TS, Schroeder S, Hayden K, Newton JC, Terhune JS, Liles MR. (2013). Implication of lateral genetic transfer in the emergence of *Aeromonas hydrophila* isolates of epidemic outbreaks in channel catfish. PLoS One. 8:e80943.
- Huys G, Cnockaert M, Swings J. (2005). *Aeromonas culicicola* Pidiyar et al. 2002 is a later subjective synonym of *Aeromonas veronii* Hickman-Brenner et al. 1987. Syst Appl Microbiol 28:604-609.
- Huys G, Kämpfer P, Albert MJ, Kühn I, Denys R, Swings J. (2002). *Aeromonas hydrophila* subsp. *dhakensis* subsp. nov., isolated from children with diarrhoea in Bangladesh, and extended description of *Aeromonas hydrophila* subsp. *hydrophila* (Chester 1901) Stanier 1943 (approved lists 1980). Int J Syst Evol Microbiol. 52:705-712.

- Huys G, Kämpfer P, Altwegg M, Kersters I, Lamb A, Coopman R, Lüthy-Hottenstein J, Vancanneyt M, Janssen P, Kersters K. (1997). *Aeromonas popoffii* sp. nov., a mesophilic bacterium isolated from drinking water production plants and reservoirs. *Int J Syst Bacteriol.* 47:1165–1171.
- Jacobs L y Chenia HY. (2007). Characterization of integrons and tetracycline resistance determinants in *Aeromonas* spp. isolated from South African aquaculture systems. *Int J Food Microbiol.* 114:295–306.
- Janda JM y Abbott SL. (2010). The genus *Aeromonas*: taxonomy, pathogenicity, and infection. *Clin Microbiol Rev.* 23:35–73.
- Janda JM y Duffey PS. (1988). Mesophilic aeromonads in human disease: current taxonomy, laboratory identification, and infectious disease spectrum. *Rev Infect Dis.* 10:980–997.
- Jutfelt F, Sundh H, Glette J, Mellander L, Thrandur Björnsson B, Sundell K. (2008). The involvement of *Aeromonas salmonicida* virulence factors in bacterial translocation across the rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), intestine. *J Fish Dis.* 31:141–151.
- Kimura M. (1980). A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *J Mol Evol.* 16:111–120.
- Kingombe CI, Huys G, Tonolla M, Albert MJ, Swings J, Peduzzi R, Jemmi T. (1999). PCR detection, characterization, and distribution of virulence genes in *Aeromonas* spp. *Appl Environ Microbiol.* 65:5293–5302.
- Kirov SM, Castrisios M, Shaw JG. (2004). *Aeromonas* flagella (polar and lateral) are enterocyte adhesins that contribute to biofilm formation on surfaces. *Infect Immun.* 72:1939–1945.

- Lee C, Cho JC, Lee SH, Lee DG, Kim SJ. (2002). Distribution of *Aeromonas* spp. as identified by 16S rDNA restriction fragment length polymorphism analysis in a trout farm. *J Appl Microbiol.* 93:976–985.
- Liu JY y Li AH. (2012). First case of *Aeromonas schubertii* infection in the freshwater cultured snakehead fish, *Ophiocephalus argus* (Cantor), in China. *J Fish Dis.* 35:335–342.
- Lukkana M, Wongtavatchai J, Chuanchuen R. (2012). Class 1 integrons in *Aeromonas hydrophila* isolates from farmed Nile tilapia (*Oreochromis nilotica*). *J Vet Med Sci.* 74:435–440.
- Lye DJ. (2011). Gastrointestinal colonization rates for human clinical isolates of *Aeromonas veronii* using a mouse model. *Curr Microbiol.* 63:332–336.
- Maltz M y Graf J. (2011). The type II secretion system is essential for erythrocyte lysis and gut colonization by the leech digestive tract symbiont *Aeromonas veronii*. *Appl Environ Microbiol.* 77:597–603.
- Martin–Carnahan A y Joseph SW. (2005). Family I. *Aeromonadaceae* Colwell, MacDonell and DeLey 1986. En Brennan DJ, Krieg NR, Staley JT, Garrity GN (Eds.), *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, 2nd Ed., vol. 2. Springer–Verlag, New York, pp.556–578.
- Martínez–Murcia A, Beaz–Hidalgo R, Svec P, Saavedra MJ, Figueras MJ, Sedlacek I. (2013). *Aeromonas cavernicola* sp. nov., isolated from fresh water of a brook in a cavern. *Curr Microbiol.* 66:197–204.
- Martínez–Murcia AJ, Beaz–Hidalgo R, Carvalho MJ, Aravena–Román M, Correia A, Figueras MJ, Saacedra MJ. (2014). *Aeromonas lusitana* sp. Nov., isolated from untrated waters and vegetables. En preparación.

- Martínez-Murcia AJ, Esteve C, Garay E, Collins MD. (1992). *Aeromonas allosaccharophila* sp. nov., a new mesophilic member of the genus *Aeromonas*. FEMS Microbiol Lett. 70:199–205.
- Martínez-Murcia AJ, Figueras MJ, Saavedra MJ, Stackebrandt E. (2007). The recently proposed species *Aeromonas sharmana* sp. nov., isolate GPTSA-6T, is not a member of the genus *Aeromonas*. Int Microbiol. 10:61–64.
- Martínez-Murcia AJ, Monera A, Saavedra MJ, Oncina R, Lopez-Alvarez M, Lara E, Figueras MJ. (2011). Multilocus phylogenetic analysis of the genus *Aeromonas*. Syst Appl Microbiol. 34:189–199.
- Martínez-Murcia AJ, Soler L, Saavedra MJ, Chacón MR, Guarro J, Stackebrandt E, Figueras MJ. (2005). Phenotypic, genotypic, and phylogenetic discrepancies to differentiate *Aeromonas salmonicida* from *Aeromonas bestiarum*. Int Microbiol. 8:259–269.
- Masada CL, LaPatra SE, Morton AW, Strom MS. (2002). An *Aeromonas salmonicida* type IV pilin is required for virulence in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. Dis Aquat Organ. 51:13–25.
- Merino S, Aguilar A, Noguerras MM, Regue M, Swift S, Tomás JM. (1999). Cloning, sequencing, and role in virulence of two phospholipases (A1 and C) from mesophilic *Aeromonas* sp. serogroup O:34. Infect Immun. 67:4008–4013.
- Merino S, Gavín R, Vilches S, Shaw JG, Tomás JM. (2003). A colonization factor (production of lateral flagella) of mesophilic *Aeromonas* spp. is inactive in *Aeromonas salmonicida* strains. Appl Environ Microbiol. 69:663–667.
- Merino S, Rubires X, Aguilar A, Tomás JM. (1997). The role of flagella and motility in the adherence and invasion to fish cell lines by *Aeromonas hydrophila* serogroup O:34 strains. FEMS Microbiol Lett. 151:213–217.

- Merino S, Vilches S, Canals R, Ramirez S, Tomás JM. (2005). A C1q-binding 40 kDa porin from *Aeromonas salmonicida*: cloning, sequencing, role in serum susceptibility and fish immunoprotection. *Microb Pathog.* 38:227–237.
- Migliavacca R, Docquier JD, Mugnaioli C, Amicosante G, Daturi R, Lee K, Rossolini GM, Pagani L. (2002). Simple microdilution test for detection of metallo- β -lactamase production in *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Clin. Microbiol.* 40:4388–4390.
- Miñana-Galbis D, Farfán M, Fusté MC, Lorén JG. (2004). *Aeromonas molluscorum* sp. nov., isolated from bivalve molluscs. *Int J Syst Evol Microbiol.* 54:2073–2078.
- Miñana-Galbis D, Farfán M, Fusté MC, Lorén JG. (2007). *Aeromonas bivalvium* sp. nov., isolated from bivalve molluscs. *Int J Syst Evol Microbiol.* 57:582–587.
- Miñana-Galbis D, Farfán M, Gaspar Lorén J, Carmen Fusté M. (2010). Proposal to assign *Aeromonas diversa* sp. nov. as a novel species designation for *Aeromonas* group 501. *Syst Appl Microbiol.* 33:15–19.
- Miñana-Galbis D, Farfán M, Lorén JG, Fusté MC. (2002). Biochemical identification and numerical taxonomy of *Aeromonas* spp. isolated from environmental and clinical samples in Spain. *J Appl Microbiol.* 93:420–430.
- Muniesa M, de Simon M, Prats G, Ferrer D, Pañella H, Jofre J. (2003). Shiga toxin 2-converting bacteriophages associated with clonal variability in *Escherichia coli* O157:H7 strains of human origin isolated from a single outbreak. *Infect Immun.* 71:4554–4562.
- Nagar V, Shashidhar R, Bandekar JR. (2013). Characterization of *Aeromonas* strains isolated from Indian foods using *rpoD* gene sequencing and whole cell protein analysis. *World J Microbiol Biotechnol.* 29:745–752.
- Navarro F, Perez-Trallero E, Marimon JM, Aliaga R, Gomariz M, Mirelis B. (2001). CMY-2-producing *Salmonella enterica*, *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella oxytoca*,

- Proteus mirabilis* and *Escherichia coli* strains isolated in Spain (October 1999–December 2000). *J Antimicrob Chemother.* 48:383–389.
- Nawaz M, Khan SA, Khan AA, Sung K, Tran Q, Kerdahi K, Steele R. (2010). Detection and characterization of virulence genes and integrons in *Aeromonas veronii* isolated from catfish. *Food Microbiol.* 27:327–331.
- Ndi OL y Barton MD (2011). Incidence of class 1 integron and other antibiotic resistance determinants in *Aeromonas* spp. from rainbow trout farms in Australia. *J Fish Dis.* 34:589–599.
- Negrete RP, Romero JJ, Arrendondo FJL. (2004). Resistencia a antibióticos y presencia de plásmidos en: *Aeromonas hydrophila*, *Vibrio fluvialis* y *Vibrio furnissi*, aislados de *Carassius auratus auratus*. *Vet Méx.* 35:1–10.
- Nieto TP, Toranzo AE, Barja JL. (1984). Comparison between the bacterial flora associated with fingerling rainbow trout cultured in two different hatcheries in the north–west of Spain. *Aquaculture.* 42:193–206.
- Noga E.J. 2010. *Fish Diseases: Diagnosis and Treatment*, 2nd edn. Willey–Blackwell, Singapore.
- Nüesch–Inderbinen MT, Hächler H, Kayser FH. (1996). Detection of genes coding for extended–spectrum SHV beta–lactamases in clinical isolates by a molecular genetic method, and comparison with the E test. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 15:398–402.
- OIE. Organización Mundial de Sanidad Animal. (2013). Aspectos relativos al bienestar en el aturdimiento y la matanza de peces de cultivo para consumo humano. En: Código Sanitario para los Animales Acuáticos. Ed. OIE. Paris.
- Ormen O, Granum PE, Lassen J, Figueras MJ. (2005). Lack of agreement between biochemical and genetic identification of *Aeromonas* spp. *APMIS.* 113:203–207.

- Paniagua GL, Monroy E, Perches M, Negrete E, García O, Vaca S. (2006). Antibiotic and heavy metal resistance of *Aeromonas hydrophila* isolated from charal (*Chirostoma humboldtianum*, Valenciennes, 1835). *Hidrobiológica*. 16:75-80.
- Pérez-Valdespino A, Fernández-Rendón E, Curiel-Quesada E. (2009). Detection and characterization of class 1 integrons in *Aeromonas* spp. isolated from human diarrheic stool in Mexico. *J Basic Microbiol*. 49:572-578.
- Popoff MY, Coynault C, Kriedjan M, Lemelin M. (1981). Polynucleotide sequence relatedness among motile *Aeromonas* species. *Curr Microbiol*. 5:109-114.
- Pridgeon JW y Klesius PH. (2011). Molecular identification and virulence of three *Aeromonas hydrophila* isolates cultured from infected channel catfish during a disease outbreak in west Alabama (USA) in 2009. *Dis Aquat Organ*. 94:249-253.
- Puthucheary SD, Puah SM, Chua KH. (2012). Molecular characterization of clinical isolates of *Aeromonas* species from Malaysia. *PLoS One*. 7:e30205.
- Qin Y, Lin G, Chen W, Huang B, Huang W, Yan Q. (2014). Flagellar motility contributes to the invasion and survival of *Aeromonas hydrophila* in *Anguilla japonica* macrophages. *Fish Shellfish Immunol*. 39:273-279.
- Rangrez AY, Abajy MY, Keller W, Shouche Y, Grohmann E. (2010). Biochemical characterization of three putative ATPases from a new type IV secretion system of *Aeromonas veronii* plasmid pAC3249A. *BMC Biochemistry* 11:10.
- Roger F, Marchandin H, Jumas-Bilak E, Kodjo A; colBVH study group, Lamy B. (2012). Multilocus genetics to reconstruct aeromonad evolution. *BMC Microbiol*. 30:12-62.
- Ruiz-Ruiz J M, Aguilera-Arreola M G, Castro-Escarpulli G. (2012). Markers of pathogenicity islands in strains of *Aeromonas* species of clinical and environmental origin. *Indian Journal of Medical Microbiology*. 30: 467-469.

- Saavedra MJ, Perea V, Fontes MC, Martins C, Martínez-Murcia A. (2007). Phylogenetic identification of *Aeromonas* strains isolated from carcasses of pig as new members of the species *Aeromonas allosaccharophila*. *Antonie Van Leeuwenhoek*. 91:159–167.
- Saitou N y Nei M. (1987). The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol*. 4:406–425.
- Salgado-Miranda C, Palomares E, Jurado M, Marín A, Vega F, Soriano-Vargas E. (2010). Isolation and distribution of bacterial flora in farmed rainbow trout from Mexico. *J Aquat Anim Health*. 22:244–247.
- Sarria-Guzmán Y, López-Ramírez MP, Chávez-Romero Y, Ruiz-Romero E, Dendooven L, Bello-López JM. (2014). Identification of antibiotic resistance cassettes in class 1 integrons in *Aeromonas* spp. strains isolated from fresh fish (*Cyprinus carpio* L.). *Curr Microbiol*. 68:581–586.
- Schubert RH y Hegazi M. (1988). *Aeromonas eucrenophila* species nova *Aeromonas caviae* a later and illegitimate synonym of *Aeromonas punctata*. *Zentralbl Bakteriol Mikrobiol Hyg A*. 268:34–39.
- 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. (2006). Genome sequence of *Aeromonas hydrophila* ATCC 7966T: jack of all trades. *J Bacteriol*. 188:8272–8282.
- Soler L, Figueras MJ, Chacón MR, Guarro J, Martínez-Murcia AJ. (2003). Comparison of three molecular methods for typing *Aeromonas popoffii* isolates. *Antonie Van Leeuwenhoek*. 83:341–349.
- Soler L, Figueras MJ, Chacón MR, Vila J, Marco F, Martínez-Murcia AJ, Guarro J. (2002). Potential virulence and antimicrobial susceptibility of *Aeromonas popoffii* recovered from freshwater and seawater. *FEMS Immunol Med Microbiol*. 32:243–247.

- Soler L, Yáñez MA, Chacon MR, Aguilera-Arreola MG, Catalán V, Figueras MJ, Martínez-Murcia AJ. (2004). Phylogenetic analysis of the genus *Aeromonas* based on two housekeeping genes. *Int J Syst Evol Microbiol*. 54:1511–1519.
- Soriano-Vargas E, Castro-Escarpulli G, Aguilera-Arreola MG, Vega-Castillo F, Salgado-Miranda C. (2010). Aislamiento e identificación de *Aeromonas bestiarum* a partir de carpa común de cultivo (*Cyprinus carpio* L.) procedentes de Santa María Chapa de Mota, Estado de México, México. *Vet Méx*. 41:111–115.
- Soto-Rodríguez SA, Cabanillas-Ramos J, Alcaraz U, Gomez-Gil B, Romalde JL. (2013) Identification and virulence of *Aeromonas dhakensis*, *Pseudomonas mosselii* and *Microbacterium paraoxydans* isolated from Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*, cultivated in Mexico. *J Appl Microbiol*. 115:654–662.
- Sreedharan K, Philip R, Singh I. (2013). Characterization and virulence potential of phenotypically diverse *Aeromonas veronii* isolates recovered from moribund freshwater ornamental fishes of Kerala, India. *Antonie van Leeuwenhoek*. 103:53–67.
- Stainer RY. (1943). A note on the taxonomy of *P. hydrophilus*. *J Bacteriol*. 46:213–214.
- Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S. (2011). MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol Biol Evol*. 28:2731–2739.
- Tena D, Aspiroz C, Figueras MJ, Gonzalez-Praetorius A, Aldea MJ, Alperi A, Bisquert J. (2009). Surgical site infection due to *Aeromonas* species: report of nine cases and literature review. *Scand J Infect Dis*. 41:164–170.
- Toranzo AE, Santos Y, Nieto TP, Barja JL. (1986). Evaluation of different assay systems for identification of environmental *Aeromonas* strains. *Appl Environ Microbiol*. 51:652–656.

- Vanden Bergh P, Frey J. (2013). *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida* in the light of its type-three secretion system. *Microb Biotechnol*. DOI: 10.1111/1751-7915.12091
- Vega-Sánchez V, Acosta-Dibarrat J, Vega-Castillo F, Castro-Escarpulli G, Aguilera-Arreola MG, Soriano-Vargas E. (2014a). Phenotypical characteristics, genetic identification, and antimicrobial sensitivity of *Aeromonas* species isolated from farmed rainbow trout (*Onchorynchus mykiss*) in Mexico. *Acta Trop*. 130:76-79.
- Vega-Sánchez V, Latif-Eugenín F, Beaz-Hidalgo R, Martínez-Murcia AJ, Figueras MJ, Castro-Escarpulli G, Soriano-Vargas E. (2014c). Biochemical characterization, identification of putative virulence genes and susceptibility of *Aeromonas lusinata* isolates. *Curr Microbiol*. En preparación.
- Vega-Sánchez V, Latif-Eugenín F, Soriano-Vargas E, Beaz-Hidalgo R, Figueras MJ, Aguilera-Arreola MG, Castro-Escarpulli G. (2014b). Re-identification of *Aeromonas* isolates from rainbow trout and incidence of class 1 integron and β -lactamase genes. *Vet Microbiol*. 172:528-533.
- Versalovic J, Koeuth T, Lupski JR. (1991). Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes. *Nucleic Acids Res*. 19:6823-6831.
- Wang G, Clark CG, Rodgers FG. (2002). Detection in *Escherichia coli* of the genes encoding the major virulence factors, the genes defining the O157:H7 serotype, and components of the type 2 Shiga toxin family by multiplex PCR. *J Clin Microbiol*. 40:3613-3619.
- Woo PC, Lau SK, Teng JL, Tse H, Yuen KY. (2008). Then and now: use of 16S rDNA gene sequencing for bacterial identification and discovery of novel bacteria in clinical microbiology laboratories. *Clin Microbiol Infect*. 14:908-934.
- Wu CJ, Wu JJ, Yan JJ, Lee HC, Lee NY, Chang CM, Shih HI, Wu HM, Wang LR, Ko WC. (2007). Clinical significance and distribution of putative virulence markers of

116 consecutive clinical *Aeromonas* isolates in southern Taiwan. J Infect. 54:151–158.

Yamamoto S, Kasai H, Arnold DL, Jackson RW, Vivian A, Harayama S. (2000). Phylogeny of the genus *Pseudomonas*: intrageneric structure reconstructed from the nucleotide sequences of *gyrB* and *rpoD* genes. Microbiology. 146:2385–2394.

Yáñez MA, Catalán V, Apráiz D, Figueras MJ, Martínez-Murcia AJ. (2003). Phylogenetic analysis of members of the genus *Aeromonas* based on *gyrB* gene sequences. Int J Syst Evol Microbiol. 53:875–883.

XI. ANEXO

Origen e identificación fenotípica y molecular de 50 aislamientos de *Aeromonas* spp. incluidos en el estudio.

Cepario	Perfil ERIC	Origen	Agua	Órgano	Fenotípica	RFLP del gen 16S DNAr	<i>rpoD-gyrB</i>
351	EAL-1	Hidalgo	Arroyo	Branquias	<i>A. piscicola</i>	<i>A. encheleia</i>	<i>A. lusitana</i>
352	EAB-4	Hidalgo	Arroyo	Riñón	<i>A. eucrenophila</i>	<i>A. bestiarum</i>	<i>A. bestiarum</i>
353	EAB-3	Michoacán	Manantial	Bazo	<i>A. sobria</i>	<i>A. salmonicida</i>	<i>A. bestiarum</i>
354	EAP-1	Hidalgo	Arroyo	Riñón	<i>A. salmonicida</i>	<i>A. popoffii</i>	<i>A. popoffii</i>
355	EAS-2	Hidalgo	Arroyo	Intestino	<i>A. eucrenophila</i>	<i>A. eucrenophila</i>	<i>A. sobria</i>
356	EAH-3	Hidalgo	Arroyo	Branquias	<i>A. hydrophila</i>	<i>A. hydrophila</i>	<i>A. hydrophila</i>
357	EAH-5	Hidalgo	Arroyo	Bazo	<i>A. hydrophila</i>	<i>A. hydrophila</i>	<i>A. hydrophila</i>
358	EAP-2	Hidalgo	Arroyo	Branquias	<i>A. popoffii</i>	<i>A. popoffii</i>	<i>A. popoffii</i>
359	EAP-2	Hidalgo	Arroyo	Intestino	<i>A. salmonicida</i>	<i>A. popoffii</i>	<i>A. popoffii</i>
360	EAM-3	Hidalgo	Arroyo	Riñón	<i>A. hydrophila</i>	<i>A. bestiarum</i>	<i>A. media</i>
361	EAS-5	Edo. Mex	Río	Branquias	<i>A. salmonicida</i>	<i>A. sobria</i>	<i>A. sobria</i>
362	EAV-5	Hidalgo	Arroyo	Intestino	<i>A. sobria</i>	<i>A. veronii</i> bv. <i>sobria</i>	<i>A. veronii</i>
363	EAB-1	Edo. Mex	Río	Hígado	<i>A. hydrophila</i>	<i>A. bestiarum</i>	<i>A. bestiarum</i>
364	EAB-1	Hidalgo	Arroyo	Bazo	<i>A. hydrophila</i>	<i>A. bestiarum</i>	<i>A. bestiarum</i>
365	EAB-3	Edo. Mex	Río	hemorragias petequiales en la aleta ventral	<i>A. salmonicida</i>	<i>A. salmonicida</i>	<i>A. bestiarum</i>
366	EAB-6	Hidalgo	Río	Bazo	<i>A. hydrophila</i>	<i>A. bestiarum</i>	<i>A. bestiarum</i>
367	EAB-6	Hidalgo	Río	Branquias	<i>A. sobria</i>	<i>A. bestiarum</i>	<i>A. bestiarum</i>
368	EAS-NR	Veracruz	Río	Branquias	<i>A. salmonicida</i>	<i>A. sobria</i>	<i>A. sobria</i>
369	EAS-4	Hidalgo	Río	Riñón	<i>A. eucrenophila</i>	<i>A. allosaccharophila</i>	<i>A. sobria</i>
370	EAH-1	Veracruz	Río	Branquias	<i>A. hydrophila</i>	<i>A. hydrophila</i>	<i>A. hydrophila</i>
371	EAH-1	Veracruz	Arroyo	Intestino	<i>A. bestiarum</i>	<i>A. hydrophila</i>	<i>A. hydrophila</i>
372	EAS-1	Veracruz	Río	Bazo	<i>A. hydrophila</i>	<i>A. sobria</i>	<i>A. sobria</i>
373	EAV-6	Veracruz	Río	Intestino	<i>A. sobria</i>	<i>A. veronii</i> bv. <i>sobria</i>	<i>A. veronii</i>
374	EAV-3	Veracruz	Río	Branquias	<i>A. sobria</i>	<i>A. veronii</i> bv. <i>sobria</i>	<i>A. veronii</i>

375	EAB-5	Veracruz	Río	Branquias	<i>A. veronii</i> bv. <i>sobria</i>	<i>A. bestiarum</i>	<i>A. bestiarum</i>
376	EAB-5	Edo. Mex	Manantial	Branquias	<i>A. sobria</i>	<i>A. bestiarum</i>	<i>A. bestiarum</i>
377	EAV-2	Veracruz	Ojo de agua	Branquias	<i>A. sobria</i>	<i>A. veronii</i> bv. <i>veronii</i>	<i>A. veronii</i>
378	EAC-1	Veracruz	Ojo de agua	Branquias	<i>A. salmonicida</i>	<i>A. encheleia</i>	<i>A. caviae</i>
379	EAV-4	Veracruz	Río	Intestino	<i>A. sobria</i>	<i>A. veronii</i> bv. <i>sobria</i>	<i>A. veronii</i>
380	EAH-6	Hidalgo	Manantial	Intestino	<i>A. salmonicida</i>	<i>A. media</i>	<i>A. hydrophila</i>
381	EAH-4	Hidalgo	Manantial	Branquias	<i>A. hydrophila</i>	<i>A. hydrophila</i>	<i>A. hydrophila</i>
382	EAM-1	Veracruz	Manantial	Branquias	<i>A. caviae</i>	<i>A. hydrophila</i>	<i>A. media</i>
383	EAM-1	Veracruz	Ojo de agua	Intestino	<i>A. caviae</i>	<i>A. media</i>	<i>A. media</i>
384	EAB-2	Edo. Mex	Río	Branquias	<i>A. hydrophila</i>	<i>A. bestiarum</i>	<i>A. bestiarum</i>
385	EAALL-1	Hidalgo	Río	Branquias	<i>A. sobria</i>	<i>A. sobria</i>	<i>A. allosaccharophila</i>
386	EAV-1	Hidalgo	Río	Hemorragias petequiales en la aleta pectoral	<i>A. sobria</i>	<i>A. veronii</i> bv. <i>sobria</i>	<i>A. veronii</i>
387	EAV-1	Hidalgo	Río	Erosión de la aleta dorsal	<i>A. sobria</i>	<i>A. veronii</i> bv. <i>sobria</i>	<i>A. veronii</i>
388	EAV-1	Hidalgo	Río	Hígado	<i>A. sobria</i>	<i>A. veronii</i> bv. <i>sobria</i>	<i>A. veronii</i>
389	EAV-1	Hidalgo	Río	Riñón	<i>A. sobria</i>	<i>A. veronii</i> bv. <i>sobria</i>	<i>A. veronii</i>
390	EAS-3	Michoacán	Río	Branquias	<i>A. sobria</i>	<i>A. sobria</i>	<i>A. sobria</i>
391	EAV-1	Hidalgo	Río	Intestino	<i>A. sobria</i>	<i>A. sobria</i>	<i>A. veronii</i>
392	EAV-1	Edo. Mex	Manantial	Branquias	<i>A. sobria</i>	<i>A. hydrophila</i>	<i>A. veronii</i>
393	EAV-1	Edo. Mex	Manantial	Erosión de la boca	<i>A. sobria</i>	<i>A. veronii</i> bv. <i>sobria</i>	<i>A. veronii</i>
394	EAH-2	Michoacán	Manantial	Úlcera profunda de la dermis aleta ventral izquierda	<i>A. hydrophila</i>	<i>A. hydrophila</i>	<i>A. hydrophila</i>
395	EAS-NR1	Michoacán	Arroyo	Intestino	<i>A. salmonicida</i>	<i>A. sobria</i>	<i>A. sobria</i>
396	EAS-1	Hidalgo	Manantial	Úlcera en la base de la aleta pélvica	<i>A. bestiarum</i>	<i>A. bestiarum</i>	<i>A. salmonicida</i>
397	EAV-1	Hidalgo	Río	Intestino	<i>A. sobria</i>	<i>A. veronii</i> bv. <i>sobria</i>	<i>A. veronii</i>
398	EAM-2	Hidalgo	Río	Bazo	<i>A. media</i>	<i>A. hydrophila</i>	<i>A. media</i>
399	EAH-7	Michoacán	Manantial	Branquias	<i>A. hydrophila</i>	<i>A. hydrophila</i>	<i>A. hydrophila</i>
400	EAV-1	Hidalgo	Río	Branquias	<i>A. sobria</i>	<i>A. veronii</i> bv. <i>sobria</i>	<i>A. veronii</i>

