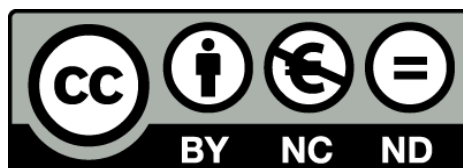


**Diversidad intraespecífica y factores de virulencia en el “complejo de especies de *Aeromonas hydrophila*” (*A. hydrophila*, *A. salmonicida*, *A. bestiarum*).**

Vicenta Albarral Ávila



Aquesta tesi doctoral està subjecta a la llicència Reconeixement- NoComercial – SenseObraDerivada 3.0. Espanya de Creative Commons.

Esta tesis doctoral está sujeta a la licencia Reconocimiento - NoComercial – SinObraDerivada 3.0. España de Creative Commons.

This doctoral thesis is licensed under the Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivs 3.0. Spain License.



**Facultat de Farmàcia  
Departament de Microbiologia i Parasitologia Sanitàries**

**Diversidad intraespecífica y factores de virulencia en el "complejo de especies de *Aeromonas hydrophila*" (*A. hydrophila*, *A. salmonicida*, *A. bestiarum*).**

**Vicenta Albarral Ávila  
2013**



**Facultat de Farmàcia**  
**Departament de Microbiologia i Parasitologia Sanitàries**  
**Programa de Doctorado: Biotecnologia**

**Diversidad intraespecífica y factores de virulencia en el "complejo de especies de *Aeromonas hydrophila*" (*A. hydrophila*, *A. salmonicida*, *A. bestiarum*).**

Memoria presentada por **Vicenta Albarral Ávila** para optar al título de Doctora por la Universitat de Barcelona.

Directores:

Dra. M<sup>a</sup> Carmen Fusté Munné

Dr. David Miñana i Galbis

Doctoranda:

**Vicenta Albarral Ávila**  
**2013**



**Dra. M<sup>a</sup> Carmen Fusté Munné**, Profesora Titular de Microbiología, y el **Dr. David Miñana i Galbis**, Profesor "Agregat" (equivalente a Contratado Doctor) de Microbiología, del Departament de Microbiologia i Parasitologia Sanitàries de la Universitat de Barcelona,

INFORMA:

Que la memoria titulada "Diversidad intraespecífica y factores de virulencia en el "complejo de especies de *Aeromonas hydrophila*" (*A. hydrophila*, *A. salmonicida*, *A. bestiarum*)", presentada por VICENTA ALBARRAL ÁVILA para optar al título de Doctora por la Universitat de Barcelona, ha sido realizada bajo nuestra dirección en el Departament de Microbiologia i Parasitologia Sanitàries y considerándola finalizada, autorizamos su presentación para ser juzgada por el tribunal correspondiente.

Y, para que así conste, firmamos la presente en Barcelona, el día 26 de julio de 2013,

Dra. M<sup>a</sup> Carmen Fusté Munné

Dr. David Miñana i Galbis



## Agradecimientos

Una vez terminada esta tesis doctoral me siento en la obligación de expresar mis agradecimientos a todas las personas que lo han hecho posible.

En primer lugar a mis directores de tesis, a la Dra. M<sup>a</sup> Carmen Fusté y al Dr. David Miñana i Galbis, gracias por confiar en mí, dándome la oportunidad de realizar esta tesis doctoral bajo vuestra dirección; por toda vuestra dedicación, paciencia y ayuda durante estos años. Gracias por enseñarme todo lo que sé de este apasionante mundo que es la Microbiología.

No me quiero olvidar de aquellos profesores que tuve durante la carrera, y que fueron realmente los responsables de mi pasión por el mundo de los microorganismos, recordar al Dr. Miquel Viñas, a la Dra. Ana M<sup>a</sup> Marqués y especialmente al Dr. Guinea por sus increíbles clases de Microbiología Industrial.

Al resto de personas que integran mi grupo de investigación, el Grupo de Genética de Poblaciones Bacterianas y Filogenia Molecular: Dr. Gaspar Lorén, Dra. Maribel Farfán y cómo no Ariadna Sanglas, "Ari", con la que he pasado infinitas horas en la "poyata" "pecerreando", ¿cuántas puntas de pipeta habremos gastado en nuestras tesis?, empezábamos a contabilizarlas pero nunca acabábamos.

Al resto de personas que forman parte de la Unidad de Microbiología, y que hacen de ella un lugar agradable para trabajar, Dra. Ana M<sup>a</sup> Marqués, Dra. Àngels Manresa, Dra. Josele Espuny, Dr. Francisco Congregado, Dra. Elena Mercadé, Dra. Núria Rius, Sara, Ornela y Montse, porque gracias a ellas me he sentido parte de esta gran familia. A la Dra. María Jesús Montes y a Carmen Guillen, técnicas del Departamento, por facilitar el trabajo diario. A Lucía, secretaria del Departamento, por su ayuda con la burocracia. A Nacho y Guille, que junto con Ari hemos compartido muchas comidas en el aula Ferrán. Y especialmente a la Dra. Merche Berlanga con la que comparto despacho, gracias por su paciencia, por responder siempre a mis dudas y sobretodo por tenderme su mano en los momentos de duda. A Noelia y a Ester por su amistad y por estar ahí siempre que las he



necesitado sobretodo este último año. Y a Albert que me ha tenido que esperar mis particulares 5 minutos para el café de las mañanas.

No quiero olvidar mi agradecimiento a todas las personas que han pasado por el "lab", a mi amigo César Burgos, con quien he compartido charlas científicas, fiestas y vacaciones, agradecerle que pese a la distancia siga ahí, preocupándose por la escritura de esta tesis y escuchando todas mis "neuras". A Jhoanne, que aunque sólo hace unos días que ha vuelto a Brasil, ya la echo de menos. A Jose, con el que compartí poco tiempo pero intenso, por su paciencia, por aguantar mis continuas regañinas de "mami". A Danielle por haberme sacado "del lado oscuro del laboratorio". A mi buena amiga Patri, con la que compartí mis primeros meses en el laboratorio y por ese empujoncito que necesitaba para enrolarme en esta aventura.

Finalmente deseo expresar todo mi agradecimiento a mis padres y a mi hermana, por su apoyo, comprensión y preocupación. Y al resto de la familia por estar siempre ahí.

Cuanto más se aproxima uno al sueño, más se va convirtiendo la leyenda personal en la verdadera razón de vivir.

Paulo Coelho



# Índice

<b>1. Introducción .....</b>	<b>1</b>
1.1 Características generales del género <i>Aeromonas</i> .....	3
1.2 Hábitat y distribución .....	4
1.3 Evolución histórica del género <i>Aeromonas</i> .....	4
1.4 Taxonomía .....	8
1.4.1 El “complejo de <i>Aeromonas hydrophila</i> ” (AHC) .....	10
1.5 Patogenicidad .....	11
1.5.1 Infecciones causadas por <i>Aeromonas</i> en animales .....	11
1.5.2 Infecciones causadas por <i>Aeromonas</i> en humanos .....	11
1.6 Factores de virulencia .....	14
1.6.1 Exotoxinas .....	15
1.6.2 Lipasas .....	16
1.6.3 Proteasas .....	17
1.6.4 Sideróforos .....	17
1.6.5 Lámina S .....	17
1.6.6 Adhesinas .....	18
1.7 Estudios taxonómicos .....	21
1.7.1 Taxonomía bacteriana clásica (taxonomía numérica) .....	21
1.7.2 Taxonomía molecular .....	23
1.7.3 Genes conservados y análisis de secuencias multilocus (MLSA) .....	27
<b>2. Objetivos .....</b>	<b>33</b>

<b>3. Material y métodos .....</b>	<b>37</b>
3.1 Cepas bacterianas.....	39
3.2 Recuperación de las cepas .....	39
3.2.1 Recuperación a partir de cepas congeladas .....	39
3.2.2 Recuperación a partir de cepas liofilizadas.....	40
3.2.3 Recuperación de cepas conservadas en medio semisólido .....	40
3.3 Confirmación de los cultivos bacterianos .....	40
3.3.1 Oxidasa.....	41
3.3.2 Catalasa .....	41
3.3.3 Fermentación de sorbitol .....	41
3.3.4 Asimilación de lactato .....	42
3.4 Conservación de las cepas.....	42
3.4.1 Conservación de las cepas a corto plazo .....	42
3.4.2 Conservación de las cepas a largo plazo.....	43
3.4.2.1 Congelación en medio líquido.....	43
3.4.2.2 Congelación en criobolas .....	43
3.5 Estudio filogenético.....	44
3.5.1 Elección de los genes.....	44
3.5.2 Extracción del DNA genómico .....	44
3.5.3 Valoración de la cantidad y la calidad del DNA.....	46
3.5.4 PCR (reacción en cadena de la polimerasa).....	46
3.5.4.1 Diseño de los cebadores específicos .....	47
3.5.4.2 Condiciones de amplificación del gen <i>cpn60</i> .....	50

3.5.4.3 Condiciones de amplificación del gen <i>dnaJ</i> .....	51
3.5.4.4 Condiciones de amplificación del gen <i>gyrB</i> .....	52
3.5.4.5 Condiciones de amplificación del gen <i>rpoD</i> .....	53
3.5.5 Electroforesis en gel de agarosa .....	54
3.5.6 Purificación del DNA amplificado .....	55
3.5.7 Secuenciación de los fragmentos génicos amplificados .....	55
3.5.7.1 Condiciones de secuenciación del gen <i>cpn60</i> .....	57
3.5.7.2 Condiciones de secuenciación del gen <i>dnaJ</i> .....	57
3.5.7.3 Condiciones de secuenciación del gen <i>gyrB</i> .....	57
3.5.7.4 Condiciones de secuenciación del gen <i>rpoD</i> .....	58
3.5.8 Análisis filogenético .....	59
3.5.8.1 Alineamientos múltiples y elaboración de árboles filogenéticos .....	59
3.5.8.2 Estudio de la estructura poblacional .....	60
3.5.8.3 Detección de eventos de recombinación .....	62
3.6 Detección de genes de virulencia .....	62
3.6.1 Aerolisina ( <i>aer</i> ) .....	64
3.6.2 Gen <i>alt</i> (toxina citotónica termolábil) .....	66
3.6.3 Gen <i>ast</i> (toxina citotónica termoestable) .....	67
3.7 Determinación de actividades enzimáticas .....	68
3.7.1 Hidrólisis de almidón .....	69
3.7.2 Hidrólisis de caseína .....	69
3.7.3 Hidrólisis de gelatina .....	69
3.7.4 Hemólisis .....	70

3.7.5 Hidrólisis de DNA.....	70
3.7.6 Hidrólisis de elastina.....	70
3.7.7 Hidrólisis de lecitina .....	71
3.8 Prueba de sensibilidad “in vitro” a antibióticos.....	71
3.9 Estudio “in vitro” de adherencia y efecto citopático .....	73
3.9.1 Línea celular .....	73
3.9.2 Recuperación y cultivo de la línea celular.....	73
3.9.3 Mantenimiento de la línea celular.....	74
3.9.4 Preparación de las cepas bacterianas.....	74
3.9.5 Infección de la línea celular Caco-2 con las cepas bacterianas .....	75
3.9.5.1 Preparación de la placa de 24 pocillos .....	76
3.9.5.2 Fijación y tinción .....	77
<b>4. Resultados.....</b>	<b>79</b>
4.1 Cepas estudiadas.....	81
4.2 Identificación fenotípica.....	82
4.2.1 Fermentación de sorbitol .....	83
4.2.2 Asimilación de lactato .....	83
4.3 Estudio filogenético.....	84
4.3.1 Análisis de las secuencias del gen <i>cpn60</i> .....	84
4.3.2 Análisis de las secuencias del gen <i>dnaJ</i> .....	87
4.3.3 Análisis de las secuencias del gen <i>gyrB</i> .....	91
4.3.4 Análisis de las secuencias del gen <i>rpoD</i> .....	94
4.3.5 Análisis de los genes concatenados.....	98

4.4	Detección de eventos de recombinación.....	102
4.5	Estudio de la estructura poblacional.....	102
4.6	Factores de virulencia.....	108
4.6.1	Actividades enzimáticas .....	108
4.6.1.1	Hidrólisis de almidón.....	108
4.6.1.2	Hidrólisis de caseína.....	108
4.6.1.3	Hidrólisis de DNA .....	109
4.6.1.4	Hidrólisis de elastina .....	109
4.6.1.5	Hidrólisis de gelatina.....	110
4.6.1.6	Hemólisis.....	110
4.6.1.7	Hidrólisis de lecitina .....	111
4.7	Susceptibilidad a antibióticos.....	111
4.8	Detección de genes de virulencia.....	114
4.8.1	Gen <i>aer</i> (aerolisina).....	114
4.8.2	Gen <i>alt</i> (toxina citotónica termolábil) .....	115
4.8.3	Gen <i>ast</i> (toxina citotónica termoestable).....	115
4.9	Adherencia y efecto citopático en la línea celular Caco-2 .....	116
<b>5.</b>	<b>Discusión .....</b>	<b>123</b>
5.1	Cepas bacterianas.....	125
5.2	Características fenotípicas.....	126
5.2.1	Producción de melanina .....	126
5.2.2	Fermentación de sorbitol y uso de lactato como única fuente de carbono .....	127
5.3	Taxonomía y filogenia molecular .....	128



5.3.1	Análisis individualizado de los genes .....	128
5.3.2	Análisis de secuencias multilocus (MLSA).....	131
5.4	Estructura poblacional.....	132
5.5	Detección de posibles eventos de recombinación en el gen <i>dnaJ</i> .....	134
5.6	Factores de virulencia.....	136
5.6.1	Detección de actividades enzimáticas .....	137
5.6.2	Resistencia a antibióticos .....	140
5.6.3	Genes de virulencia .....	141
5.6.4	Pruebas de adherencia en células Caco-2 .....	142
5.7	Importancia del AHC en salud pública .....	143
<b>6.</b>	<b>Conclusiones .....</b>	<b>145</b>
<b>7.</b>	<b>Bibliografía .....</b>	<b>149</b>
<b>8.</b>	<b>Anexos .....</b>	<b>167</b>
8.1	Cepas utilizadas en el estudio .....	169
8.2	Medios de cultivos y soluciones salinas .....	174
8.3	Reactivos y colorantes.....	180
8.4	Secuencias de los fragmentos amplificados de los genes <i>cpn60</i> , <i>dnaJ</i> , <i>gyrB</i> y <i>rpoD</i> .....	182
8.5	Concentración de los antibióticos y diámetro (mm) de la zona de inhibición.....	187
8.6	Número de acceso al GenBank de las secuencias obtenidas.....	188
8.7	Resultados de las actividades enzimáticas.....	192
8.8	Resultados de los antibiogramas.....	195

8.9 Índice de figuras .....	200
8.10 Índice de tablas.....	203
8.11 Abreviaturas y símbolos .....	206
<b>9. Publicaciones.....</b>	<b>207</b>
9.1 <b>Fusté, M. C., Farfán, M., Miñana-Galbis, D., Albarral, V., Sanglas, A. y Lorén, J. G. (2012).</b> Population Genetics of the “ <i>Aeromonas hydrophila</i> species complex”. In <i>Population Genetics</i> , pp. 39–54. Edited by M.C. Fusté. Croatia: In Tech. ....	209
9.2 <b>Miñana-Galbis, D., Farfán, M., Albarral, V., Sanglas, A., Lorén, J. G. &amp; Fusté, M. C. (2013).</b> Reclassification of <i>Aeromonas hydrophila</i> subspecies <i>anaerogenes</i> . <i>Syst Appl Microbiol</i> <b>36</b> , 306–308. ....	225
9.3 <b>Farfán, M., Albarral, V., Sanglas, A. y Lorén, J. G. y Fusté, M. C. (2013).</b> The effect of recombination in <i>Aeromonas</i> . In <i>Recent Advances in Pharmaceutical Sciences III</i> , Ch. 11, pp. 179–193. Edited by D. Muñoz-Torrero, A. Cortés y E. Mariño. Kerala: Transworld Research Network .....	229



# Capítulo 1

---

## Introducción



## 1.1 Características generales del género *Aeromonas*

El género *Aeromonas* está formado por bacterias Gram negativas, con forma de bacilos o cocobacilos con extremos redondeados, y un tamaño de entre 1 y 3,5  $\mu\text{m}$  de longitud y 0,3 y 1  $\mu\text{m}$  de diámetro. Estas células bacterianas no forman endosporas y cuando se visualizan en el microscopio óptico, en ocasiones, se observan aisladas, en parejas o formando pequeñas cadenas. Normalmente son móviles por flagelación polar aunque hay algunas cepas que son inmóviles, especialmente las cepas psicrófilas de *A. salmonicida*. Pueden presentar estructuras externas a la pared como capa S, cápsula y algunas presentan pili.

Metabólicamente son quimioorganotrofos y anaerobios facultativos. Son oxidasa y catalasa positivos y reductores de nitratos a nitritos pero no desnitrificantes. Las bacterias integrantes de este género son capaces de metabolizar tanto la D-glucosa como otros carbohidratos (maltosa, D-galactosa...) produciendo ácidos y frecuentemente gas. Utilizan sales amónicas como fuente de nitrógeno, y azúcares y ácidos orgánicos como fuente de carbono. Las cepas del género *Aeromonas* son resistentes al agente vibriostático O/129 (2,4-diisopropilpteridina).

En base a la temperatura de crecimiento, este género se divide en *Aeromonas* mesófilas, cepas que pueden crecer hasta una temperatura de 44°C, y psicrófilas, que no crecen a partir de 30°C. En general se puede decir que las cepas del género *Aeromonas* tienen una temperatura óptima de crecimiento que oscila entre 22°C y 37°C. No requieren NaCl para su crecimiento, aunque se observa un crecimiento óptimo en medios con una concentración entre 1-3%, y concentraciones superiores al 6% pueden inhibir el crecimiento. Estos microorganismos crecen a pH alcalino, pero no a pH ácido.

Las bacterias integrantes de este grupo producen diferentes exoenzimas como proteasas, DNasas, elastasas, lecitinasas, amilasas, gelatinasas, etc. (Martin-Carnahan y Joseph, 2005).

## 1.2 Hábitat y distribución

*Aeromonas* tiene una distribución muy amplia y se ha podido aislar de numerosos ecosistemas, aunque mayoritariamente del medio acuático tanto de aguas dulces, saladas y estancadas, como de aguas potables sean cloradas o no (Altwegg y Geiss, 1989).

Aunque normalmente *Aeromonas* se ha asociado a peces, también se han podido aislar del tracto gastrointestinal de animales sanos como ovejas, caballos, anfibios y reptiles (Janda y Abbott, 2010). Así mismo también se ha podido aislar *Aeromonas* de distintos alimentos, independientemente de su origen geográfico. Palumbo y col. (1985) aislaron *Aeromonas* en pescados, mariscos, leche cruda, pollo, carne de cordero y ternera, y carne picada. En otros estudios se han aislado *Aeromonas* en el 41% de verduras analizadas (McMahon y Wilson, 2001). Recientemente en un estudio realizado con comida preparada, Nyere y col. (2012) aislaron *A. hydrophila* de verduras, arroz, patatas y carnes.

## 1.3 Evolución histórica del género *Aeromonas*

La primera descripción válida de una especie, que posteriormente haya sido reconocida como *Aeromonas*, fue en 1891, cuando Sanarelli publicó el aislamiento de una nueva bacteria aislada de sangre y tejido ganglionar de una rana con septicemia y que fue denominada *Bacillus hydrophilus fuscus*. Este nombre no fue aceptado y, posteriormente, la descripción de Sanarelli fue corregida por Russel en 1898, aunque finalmente fue Chester en 1901, quien definió este microorganismo como *Bacterium hydrophilum*. En 1923 se publicó la primera edición del Bergey's Manual, donde aparece con la denominación de *Proteus hydrophilus*, junto con una amplia descripción morfológica y bioquímica. Posteriormente, Stanier en 1943 la reclasificó como *Aeromonas hydrophila*

Zimmermann, en 1890, aisló de muestras de agua de la ciudad de Chemnitz (Alemania) una nueva especie bacteriana que denominó *Bacillus punctatus*, esta

descripción fue ampliada posteriormente por Lehmann y Neumann en 1896. Actualmente, este aislado corresponde a la especie *Aeromonas caviae*.

En 1894, Emmerich y Weiber describieron un bacilo causante de forunculosis en truchas y lo denominaron “*Bacillus der Forellenseuche*”. Trabajos posteriores de Lehman y Neuman en 1896 y Chester en 1901, sobre bacterias causantes de forunculosis en peces, introducen un cambio de nombre, pasando a denominarse *Bacterium salmonicida*. Actualmente corresponde a *Aeromonas salmonicida*.

A lo largo de estos años se utilizaron técnicas fenotípicas para estudiar y comparar las diferentes especies, que permitían calcular la similitud entre diferentes microorganismos, pero no permitían el cálculo de distancias evolutivas a partir de las cuales poder establecer las relaciones filogenéticas.

Durante esta época ya era posible diferenciar dos grupos en *Aeromonas*: *Aeromonas* móviles y *Aeromonas* inmóviles. Se había observado que las cepas móviles no producían pigmento marrón y que tenían una temperatura óptima de crecimiento de 37°C. Mientras que las cepas inmóviles eran productoras de pigmento marrón y su temperatura óptima de crecimiento estaba entre 10-15°C, y no crecían a 37°C. La descripción de este último grupo coincide con las características de las cepas psicrófilas de *A. salmonicida*.

A partir de 1920, muchos microorganismos que posteriormente se confirmaría que pertenecen a *Aeromonas*, fueron clasificados en diversos géneros como: *Proteus*, *Pseudomonas*, *Escherichia*, *Achromobacter*, *Flavobacterium*, *Necromonas* y *Vibrio* (Farmer y col., 2006).

En 1936, Kluver y Van Niel propusieron la creación de un nuevo género bacteriano basándose en las características morfológicas y fisiológicas, al que denominaron *Aeromonas*. Este nombre deriva de las palabras griegas:

*aero* → que significa aire o gas.

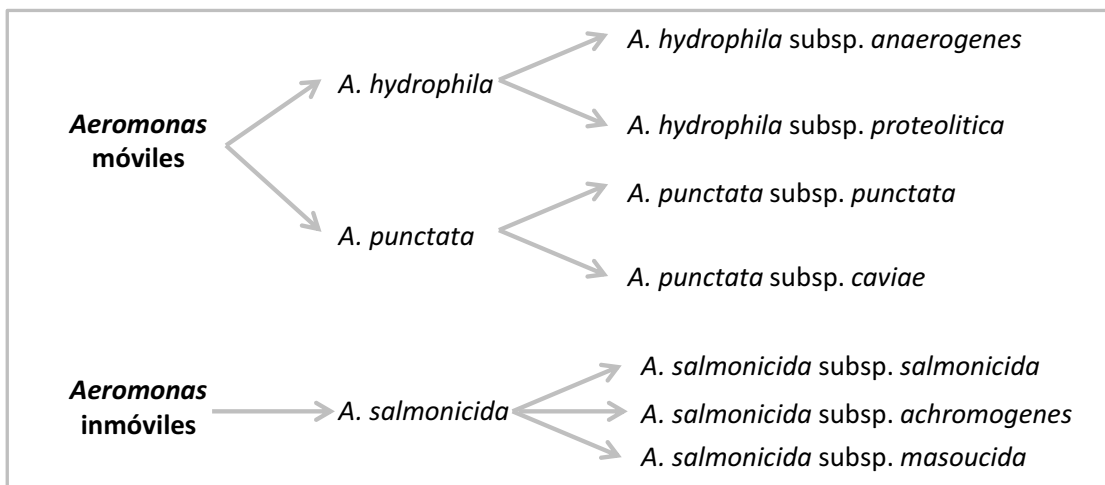
*monas* → que significa unidad.



Por tanto, se definió *Aeromonas* como una unidad productora de gas, aún y así el género *Aeromonas* todavía no fue aceptado como nuevo género bacteriano (Martin-Carnahan y Joseph, 2005)

Stanier en 1943, valida el nombre del género *Aeromonas*, pero este, no aparece publicado hasta 1957 en la séptima edición del “Bergey’s Manual of Determinative Bacteriology” (Breed y col., 1966), pero incluido dentro de la familia *Pseudomonadaceae*. En esta publicación aparecen cuatro especies descritas dentro del género *Aeromonas*: *A. hydrophila*, *A. punctata*, *A. liquefaciens* y *A. salmonicida*.

Entre los años 1960 y 1970, se realizaron numerosos estudios sobre nomenclatura y taxonomía numérica del género *Aeromonas*. En la octava edición del “Bergey’s Manual of Determinative Bacteriology” (Schubert, 1974) se reubicó el género *Aeromonas* desde la familia *Pseudomonadaceae* a la familia *Vibrionaceae*. En esta publicación, el género *Aeromonas* se encontraba dividido en tres especies y cada una de ellas en distintas subespecies (Figura 1).

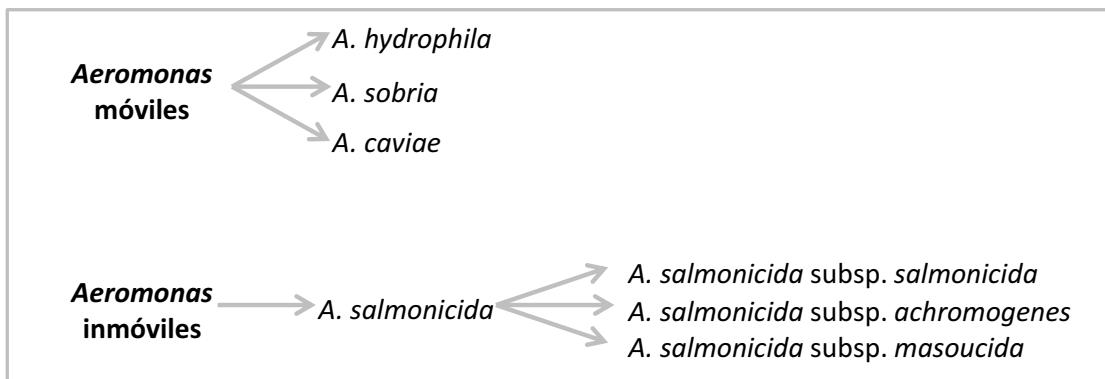


**Figura 1.** Clasificación del género *Aeromonas* según el “Bergey’s Manual of Determinative Bacteriology” en 1974.

A partir del 1979, con la aplicación de técnicas moleculares que permiten estudiar relaciones entre microorganismos basadas en las diferencias en las secuencias de sus ácidos nucleicos, se inicia un nuevo tipo de análisis que permitirá estudiar las relaciones filogenéticas de las poblaciones analizadas. En este mismo año, Maccines realizó las primeras hibridaciones DNA-DNA entre especies del género *Aeromonas*, llegando a la conclusión que en este género hay dos líneas

evolutivas, una formada por *Aeromonas* móviles y la otra por un grupo genéticamente muy uniforme, formado por las cepas no móviles de las subespecies de *A. salmonicida* (Farmer y col., 2006).

En 1981, Popoff y col. utilizan la hibridación DNA-DNA junto con estudios de taxonomía numérica, para estudiar el grupo de *Aeromonas* móviles aisladas de peces, humanos, ranas y muestras de agua, poniendo de manifiesto que las cepas móviles de *Aeromonas* se dividen en diez grupos de hibridación diferentes. Estas modificaciones en la clasificación de las especies que constituyen el género *Aeromonas* se publicaron en la primera edición del “Bergey’s Manual of Systematic Bacteriology” (Popoff, 1984), quedando la clasificación del género como se muestra en la Figura 2.



**Figura 2.** Clasificación del género *Aeromonas* publicada en la primera edición del “Bergey’s Manual of Systematic Bacteriology” en 1984.

El género *Aeromonas* se mantiene dentro de la familia *Vibrionaceae* junto con los géneros *Vibrio*, *Photobacterium* y *Plesiomonas* hasta que Colwell y col. (1986) demuestran, a partir del análisis de secuencias de los genes 16S rRNA y 5S rRNA y de estudios de hibridación DNA-DNA, que el género *Aeromonas* constituye una rama filogenética diferente a la de las familias *Vibrionaceae* y *Enterobacteriaceae* y proponen elevar el estatus de género a familia, creando la familia *Aeromonadaceae*.

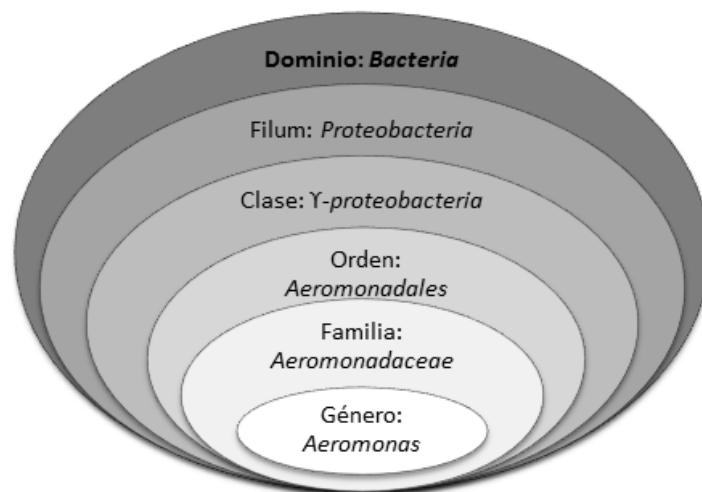
En la última edición del “Bergey’s Manual of Systematic Bacteriology” (Martin-Carnahan y Joseph, 2005) se incluye el género *Aeromonas* dentro de la familia *Aeromonadaceae* y de un nuevo orden denominado *Aeromonadales*, este

nuevo orden incluye las familias *Succinivibrionaceae* y *Aeromonadaceae*, esta última con los géneros *Aeromonas*, *Oceanimonas* y *Tolomonas*, aunque posteriormente se han descrito dos nuevos géneros, *Oceanisphaera* y *Zobellella*. Dentro del género *Aeromonas* se incluyeron las siguientes especies: *A. hydrophila*, *A. bestiarum*, *A. salmonicida*, *A. caviae*, *A. media*, *A. eucrenophila*, *A. sobria*, *A. veronii* (biovar *Sobria* y *Veronii*), *A. jandaei*, *A. schubertii*, *A. trota*, *A. allosaccharophila*, *A. encheleia*, *A. popoffii* y dos grupos de hibridación (HG), *Aeromonas* sp. HG11 y *Aeromonas* sp. HG13.

Sin embargo, en los últimos años se han descrito numerosas especies del género *Aeromonas*, llegando actualmente a 26 especies descritas

## 1.4 Taxonomía

La clasificación actual es:



**Figura 3.** Clasificación actual del género *Aeromonas*.

La clasificación del género *Aeromonas* es muy compleja, ya que desde hace más de 15 años numerosos grupos de investigación han descrito nuevas especies y reclasificado otras. Actualmente, como se ha citado anteriormente, hay descritas 26 especies: *A. allosaccharophila*, *A. aquariorum*, *A. australiensis*, *A. bestiarum*, *A. bivalvium*, *A. caviae*, *A. diversa*, *A. encheleia*, *A. eucrenophila*, *A. fluvialis*, *A. hydrophila*, *A. jandaei*, *A. media*, *A. molluscorum*, *A. piscicola*, *A. popoffii*, *A. rivuli*, *A.*

*salmonicida*, *A. sanarelli*, *A. schubertii*, *A. simiae*, *A. sobria*, *A. taiwanensis*, *A. tecta*, *A. trota* y *A. veronii*. En la Tabla 1 se muestran todas las especies descritas actualmente, así como la cepa tipo de cada una de ellas.

La situación taxonómica de *A. aquariorum* es controvertida ya que se considera que es un sinónimo posterior de *A. hydrophila* subsp. *dhakensis*, y se ha propuesto que esta subespecie se eleve a especie, denominándose *A. dhakensis* (Martínez-Murcia y col., 2009; Beaz-Hidalgo y col., 2013).

Otra de las especies incluida en el género, *A. sharmana*, fue descrita por (Saha y Chakrabarti, 2006) en base a una única cepa aislada de un manantial de agua caliente, realizando análisis filogenéticos, análisis de ácidos grasos y secuenciación del gen 16S rRNA, pero no de hibridación DNA-DNA. Martínez-Murcia y col. (2007) proponen que no se debe incluir a *A. sharmana* dentro del género *Aeromonas* debido al porcentaje de similitud que se obtiene del estudio del gen 16S rRNA. Posteriormente, un estudio filogenético basado en el gen *cpn60* confirma que *A. sharmana* no pertenece al género *Aeromonas* (Miñana-Galbis y col., 2009).

**Tabla 1.** Especies del género *Aeromonas* descritas actualmente.

Taxón	Cepa tipo	Referencias
<i>A. allosaccharophila</i> (HG15)	CECT 4199 = ATCC 51208	(Martínez-Murcia y col., 1992b)
<i>A. aquariorum</i>	MDC47 = CECT 7289	(Martínez-Murcia y col., 2008)
<i>A. australianensis</i>	266 = CECT 8023	(Aravena-Román y col., 2012)
<i>A. bestiarum</i> (HG2)	ATCC 51108 = CECT 4227	(Ali y col., 1996)
<i>A. bivalvium</i>	868E = CECT 7113	(Miñana-Galbis y col., 2007)
<i>A. caviae</i> (HG4)	ATCC 15468 = CECT838	(Martin-Carnahan y Joseph,
<i>A. diversa</i> (HG13)	CDC 2478-85 = CECT 4254	(Miñana-Galbis y col., 2010a)
<i>A. encheleia</i> (HG16)	S181 = CECT 4342	(Esteve y col., 1995)
<i>Aeromonas</i> sp. ODC+(HG11)	CDC 1306-83 = CECT 4253	(Martin-Carnahan y Joseph,
<i>A. eucrenophila</i> (HG6)	ATCC 23309 = CECT 4224	(Schubert y Hegazi, 1988)
<i>A. fluvialis</i>	717 = CECT 7401	(Alperi y col., 2010a)
<i>A. hydrophila</i> (HG1)		
subsp. <i>hydrophila</i>	ATCC 7966 = CECT 839	(Martin-Carnahan y Joseph,
subsp. <i>dhakensis</i>	LMG 19562 = CECT 5744	(Huys y col., 2002)
subsp. <i>ranae</i>	CIP 107985 = LMG 19707	(Huys y col., 2003)
<i>A. jandaei</i> (HG9)	CDC 0787-80 = CECT 4228	(Carnahan y col., 1991a)
<i>A. media</i> (HG5)	R <sub>M</sub> = CECT 4232	(Allen y col., 1983)
<i>A. molluscorum</i>	848T= CECT 5864	(Miñana-Galbis y col., 2004a)
<i>A. piscicola</i>	S1.2=CECT 7443	(Beaz-Hidalgo y col., 2009)

Taxón	Cepa tipo	Referencias
<i>A. popoffii</i> (HG17)	IK-O-a-10-3 = LMG 17541	(Huys y col., 1997b)
<i>A. rivuli</i>	WB4.1-19 = CECT 7518	(Figueras y col., 2011)
<i>A. salmonicida</i> (HG3)		
subsp. <i>achromogenes</i>	NCMB 1110 = LMG 14900	(Schubert, 1969)
subsp. <i>masoucida</i>	ATCC 27013 = CECT 896	(Martin-Carnahan y Joseph,
subsp. <i>pectinolytica</i>	34mel = CECT 5752	(Pavan y col., 2000)
subsp. <i>salmonicida</i>	NCMB 1102 = CECT 894	(Martin-Carnahan y Joseph,
subsp. <i>smithia</i>	138 = CIP 104757	(Austin y col., 1989)
<i>A. sanarellii</i>	A2-67 = CECT 7402	(Alperi y col., 2010b)
<i>A. schubertii</i> (HG12)	CDC 2446-81 = CIP 103437	(Hickman-Brenner y col., 1988)
<i>A. simiae</i>	BS S6874 = CIP 107798	(Harf-Monteil y col., 2004)
<i>A. sobria</i> (HG7)	CIP 7433 = CECT 4245	(Popoff y Veron, 1976)
<i>A. taiwanensis</i>	A2-50 = CECT 7403	(Alperi y col., 2010b)
<i>A. tecta</i>	F518 = CECT 7082	(Demarta y col., 2008)
<i>A. trota</i> (HG14)	AH2 = CECT 4255	(Carnahan y col., 1991b)
<i>A. veronii</i> (HG8/10)	ATCC 35624 = CCUG 27821	(Hickman-Brenner y col., 1987)
bv. <i>Sobria</i> (HG8)		(Martin-Carnahan y Joseph,
bv. <i>Veronii</i> (HG10)		(Martin-Carnahan y Joseph,

#### 1.4.1 El "complejo de *Aeromonas hydrophila*" (AHC)

Un ejemplo de la complejidad taxonómica dentro del género *Aeromonas* es la dificultad para discriminar, fenotípicamente y genéticamente, especies estrechamente relacionados como las pertenecientes al denominado "*Aeromonas hydrophila* complex" (AHC), que incluye: *A. hydrophila*, a su vez compuesta por tres subespecies (*A. hydrophila* subsp. *hydrophila*, subsp. *ranae* y subsp. *dhakensis*), *A. bestiarum*, *A. popoffii* y *A. salmonicida*, formada por cinco subespecies (*A. salmonicida* subsp. *salmonicida*, subsp. *masoucida*, subsp. *achromogenes*, subsp. *pectinolytica* y subsp. *smithia*) (Martin-Carnahan y Joseph, 2005). Recientemente, se han descrito dos nuevas especies en este grupo, *A. aquariorum* y *A. piscicola* (Martínez-Murcia y col., 2008; Beaz-Hidalgo y col., 2009). Los miembros del AHC originalmente fueron descritos como cepas productoras de enzimas como elastasa o lecitinasa (Abbott y col., 2003). Las especies integrantes de este complejo están muy relacionadas genéticamente y comparten múltiples características fenotípicas, siendo extremadamente difícil la diferenciación de las especies incluidas en el complejo de *Aeromonas hydrophila* (Miñana-Galbis, 2002).

## 1.5 Patogenicidad

Algunas especies de *Aeromonas* son de interés sanitario ya que causan diferentes infecciones, tanto en animales como en personas. Las especies causantes de patologías en humanos están consideradas como patógenos oportunistas emergentes. En los últimos años *Aeromonas* está adquiriendo importancia como patógeno entérico, causante de diarreas. Además de diarreas también pueden producir septicemia en inmunodeprimidos, infecciones en heridas, peritonitis, meningitis, infecciones oculares, de articulaciones y huesos (Janda y Abbott, 2010).

### 1.5.1 Infecciones causadas por *Aeromonas* en animales

El género *Aeromonas* ha estado relacionado con infecciones en animales desde sus primeros aislamientos en ranas con septicemia y peces enfermos (Schubert, 1967a; 1967b). *A. salmonicida*, *A. hydrophila* y *A. veronii* son causantes de forunculosis en peces, principalmente en salmónidos. La enfermedad se puede presentar en forma aguda caracterizada por septicemia con hemorragias en la base de las aletas, inapetencia, y melanosis; o en forma subaguda o crónica que consta de letargo, ligera exoftalmia, y hemorragia en músculos y órganos internos (Janda y Abbott, 2010; Beaz-Hidalgo y Figueras, 2013).

*Aeromonas* también se ha descrito como el agente responsable de enfermedades graves en animales de sangre fría como estomatitis ulcerativa en serpientes, lagartos y ranas, septicemia en perros, artritis séptica en terneros, etc. (Pierce y col., 1973; Lallier y Higgins, 1988; Orozova y col., 2012).

### 1.5.2 Infecciones causadas por *Aeromonas* en humanos

Las cepas del género *Aeromonas* son causantes de numerosas infecciones tanto intestinales como extraintestinales, que van desde enfermedades leves, como gastroenteritis aguda, a otras que pueden llegar a comprometer la vida del enfermo,

como septicemia, fascitis necrotizante y mionecrosis (Janda y Abbott, 2010). También se han descrito infecciones intra-abdominales, oculares y osteomielitis.

Las infecciones causadas por *Aeromonas* se dividen en tres grupos: infecciones gastrointestinales, en la piel y en tejidos blandos.

- **Infecciones gastrointestinales**

El primer aislamiento de *Aeromonas* en heces tuvo lugar en 1961, aunque en 1954 *Aeromonas* ya se había aislado como agente causal de miositis en una mujer jamaicana (von Graevenitz, 2007).

Si bien *Aeromonas* está claramente relacionado como agente causal de diarreas, su papel como enteropatógeno no está claro, debido a la presencia de portadores asintomáticos, a los escasos brotes epidémicos documentados (Altwegg y Geiss, 1989; von Graevenitz, 2007) y a que no cumple los postulados de Koch, debido a que no existe un modelo que pueda reproducir fielmente la diarrea asociada a *Aeromonas* (Janda y Abbott, 2010).

En los brotes epidémicos causados por *Aeromonas* es muy difícil localizar el foco de la infección, ya que se encuentran en aguas, alimentos y suelos. Las infecciones por *Aeromonas* se adquieren principalmente por consumo de agua o alimentos contaminados. Son pocos los brotes epidémicos documentados ya que las gastroenteritis causadas por *Aeromonas* suelen ser autolimitadas y no son de declaración obligatoria, aunque en ocasiones pueden prolongarse durante más de dos semanas pudiendo llegar a ser crónica. Una pequeña parte de los enfermos sufren náuseas, vómitos, fiebre y calambres abdominales, en cambio un tercio de los enfermos sufren colitis (von Graevenitz, 2007).

- **Bacteriemias**

La principal infección invasiva producida por *Aeromonas* es la septicemia y tiene lugar en pacientes con cáncer o cirrosis (Conn, 1964; Wu y col., 2007). Más del 80% de los casos descritos de septicemia causada por *Aeromonas* se producen en enfermos inmunodeprimidos principalmente con trastornos

mieloproliferativos o enfermedad hepática crónica. Los síntomas más comunes asociados con bacteriemia causada por *Aeromonas* incluyen fiebre, ictericia, dolor abdominal, shock séptico y disnea. Antes o durante la bacteriemia pueden aparecer cuadros diarreicos en un porcentaje muy pequeño de casos. La mayoría de estas infecciones son monomicrobianas (Janda y Abbott, 2010).

- **Infecciones del tracto biliar**

Las infecciones del tracto biliar causadas por *Aeromonas* son poco frecuentes y se diagnostican en pacientes con inflamación del tracto hepatobiliar. En el estudio realizado por Chao y col. (2012), un 50% de los enfermos diagnosticados presentaron piedras en la vesícula biliar, un 38% sufrían un cáncer y un 29% eran pacientes con diabetes mellitus. *A. hydrophila* fue la especie que se aisló con más frecuencia, aunque también se aisló *A. caviae* y *A. veronii* biovar Sobria.

- **Infecciones de piel y tejidos blandos**

Las heridas infectadas son la manifestación más común de las infecciones de tejidos blandos causadas por *Aeromonas* y a menudo están asociadas con infecciones polimicrobianas junto con *Enterococcus*, *Clostridium* y enterobacterias (Chao y col., 2012). Las heridas infectadas por *Aeromonas* pueden ser superficiales, generar celulitis, forunculosis o afectar a músculos, tendones, articulaciones y huesos. En personas sanas la infección se produce por contacto con aguas, suelos u objetos contaminados (Chao y col., 2012).

- **Síndrome urémico hemolítico**

El síndrome urémico hemolítico se caracteriza por la presencia de anemia hemolítica, trombocitopenia y daño renal agudo. Este síndrome producido por la toxina Shiga, típica de *Shigella dysenteriae* y de *E. coli* O157:H7, también se ha descrito en *Aeromonas*, en cepas que han adquirido la capacidad de producir la toxina Shiga (Figueras y col., 2007; Alperi y Figueras, 2010).



## 1.6 Factores de virulencia

La presencia de factores de virulencia en *Aeromonas* es ampliamente conocido, sin embargo el mecanismo por el que se produce la patogénesis de las infecciones causadas por estos microorganismos es desconocido. La variedad de manifestaciones clínicas observadas en las infecciones causadas por *Aeromonas* concuerda con la idea de que la patogenicidad de estos microorganismos es multifactorial (Yu y col., 2004). Los factores de virulencia descritos para este género incluyen tanto componentes estructurales como productos extracelulares (Pemberton y col., 1997; Janda y Abbott, 2010). En la Figura 4 se muestra el mecanismo de patogénesis que realizan los microorganismos para poder causar enfermedad.

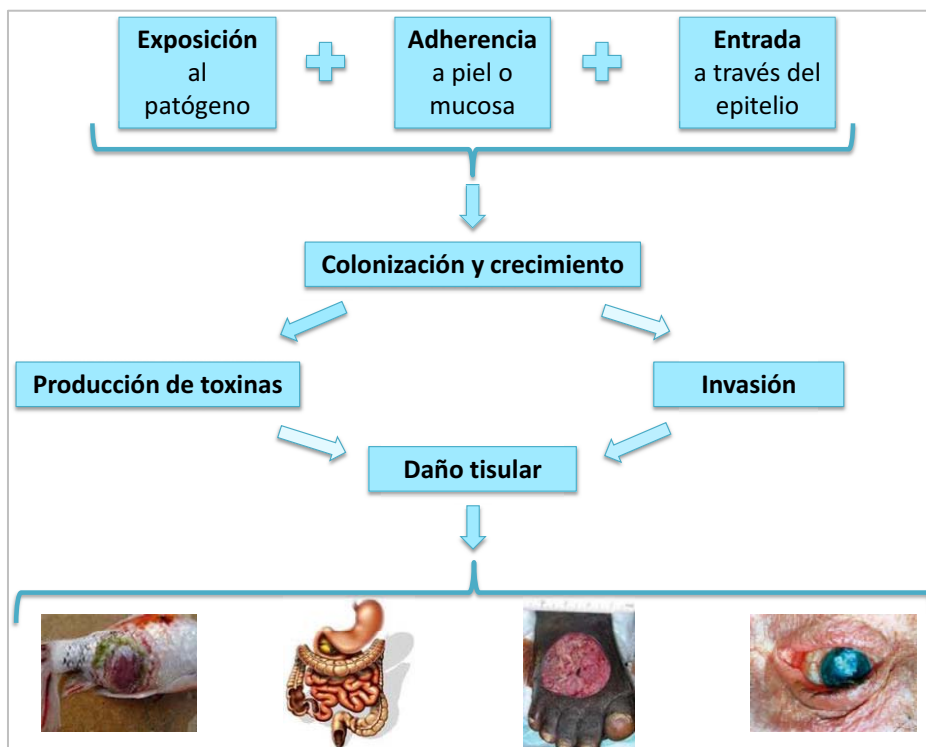


Figura 4. Mecanismos de patogénesis.

### 1.6.1 Exotoxinas

Muchas cepas de *Aeromonas* secretan enzimas extracelulares, que actúan en el proceso de patogenicidad. La mayoría de las proteínas secretadas al periplasma, membrana externa o extracelularmente poseen un péptido señal N-terminal necesario para el sistema general de secreción (Pemberton y col., 1997). Las cepas del género *Aeromonas* pueden producir dos tipos de enterotoxinas:

- **Enterotoxinas citotóxicas**

Las enterotoxinas citotóxicas producen un importante daño en el epitelio. En *Aeromonas* se han descrito dos enterotoxinas de este tipo, una aerolisina y la toxina Act.

La aerolisina es una enterotoxina citotóxica, también denominada hemolisina. Se han descrito dos clases de hemolisinas,  $\alpha$  y  $\beta$ , las cuales presentan diferencias a nivel funcional, ambas son capaces de formar poros en la membrana de la célula diana provocando así su lisis (Singh y Sanyal, 1992). La aerolisina es una  $\beta$ -hemolisina termolábil, con actividad hemolítica, citotóxica y enterotóxica (Chopra y col., 1991; Kirov y col., 1993). Es secretada por el sistema de secreción tipo 2 y es sintetizada en la célula como preproaerolisina con una secuencia señal de 23 aminoácidos que se separa al atravesar la membrana citoplasmática. El producto es la proaerolisina que será inactiva hasta que pierda una secuencia de 25 aminoácidos del extremo c-terminal, en este momento la proteína activa se unirá al receptor de membrana de los eritrocitos. La aerolisina tiene la capacidad de oligomerizar para formar canales de aproximadamente 1,5 nm en la membrana celular (Van der Goot y col., 1994).

La toxina Act, es termolábil (56°C durante 20 min), inhibe la capacidad fagocitaria de los fagocitos de ratón y aumenta los niveles del factor de necrosis tumoral TNF- $\alpha$  y la interleucina IL-1 $\beta$  en macrófagos (Galindo y col., 2004; von Graevenitz, 2007). Act es activada por unión a la membrana plasmática de la célula diana dando lugar a una oligomerización que provoca la formación de un poro en la membrana celular (Chopra y Houston, 1999).

- **Enterotoxinas citotónicas**

Las toxinas citotónicas no producen degeneración del epitelio, sino que aumentan los niveles de AMPc y prostaglandinas en las células del epitelio intestinal provocando una secreción fluida por activación de la enzima adenilato ciclasa (Chopra y col., 1992).

Las enterotoxinas citotónicas se dividen en dos tipos: Alt es termolábil (56°C, 10 min) y no presenta reactividad cruzada con la antitoxina colérica, y Ast es termoestable (100°C, 30 min). El mecanismo de acción de estas toxinas es parecido al de la toxina colérica, ya que aumentan los niveles de AMPc y prostaglandinas en las células eucariotas. Este efecto podría deberse a que las toxinas actuaran como adenosín difosfato activando la adenilato ciclasa. Tanto el aumento de AMPc como el de prostaglandinas pueden estimular la adenilato ciclasa causando una secreción fluida (Chopra y col., 1992)

### 1.6.2 Lipasas

*Aeromonas* secreta al medio distintas enzimas con actividad lipasa, que actúan como hidrolasas sobre los lípidos de membrana, jugando un papel importante en la patogénesis de estas cepas. Además, algunas lipasas presentan actividad hemolítica, citotóxica y pueden afectar a distintas funciones del sistema inmunitario (Ingham y Pemberton, 1995).

Las fosfolipasas, principalmente la fosfolipasa C, son un factor de virulencia que juega un papel importante en procesos patogénicos intestinales (Pemberton y col., 1997), especialmente la de *A. hydrophila* ya que tienen actividad lecitinasa y presenta homología con una hemolisina de *A. salmonicida* (Merino y col., 1999).

*Aeromonas* también produce una lipasa, la colesterol aciltransferasa (GCAT), que produce ésteres de colesterol y puede actuar como una fosfolipasa, provocando la destrucción de membranas (Darveau y col., 1983).

### 1.6.3 Proteasas

Las proteasas contribuyen a la patogenicidad provocando daño tisular mediante la activación proteolítica de toxinas, ayudando así a la invasión. También contribuyen a la infección proporcionando nutrientes para la proliferación celular. Actualmente se han descrito tres tipos de proteasas: una serin proteasa termolábil y dos metaloproteasas termoestables (Pemberton y col., 1997; Seshadri y col., 2006).

La caseinasa es una proteasa de 70 kDa que en *A. salmonicida* es letal para los peces, ya que provoca la licuefacción del tejido y activa el sistema de coagulación de la sangre (Ellis, 1991; Cascón y col., 2000) pudieron demostrar mediante mutantes, que una serín proteasa termolábil de 68 kDa era la responsable de la actividad elastasa y caseinasa en *Aeromonas*.

### 1.6.4 Sideróforos

El hierro es un nutriente esencial para la mayoría de bacterias, y la supervivencia de muchas bacterias patógenas en el huésped depende de su capacidad para adquirir hierro. Se conocen dos mecanismos de captación de hierro en *Aeromonas*, uno dependiente y otro no dependiente de sideróforos (Janda, 2001). Los sideróforos son moléculas de bajo peso molecular que presentan grupos funcionales con elevada afinidad y especificidad por los iones ferrosos y necesitan de receptores en la membrana celular de las bacterias para poder llevar a cabo su función. Algunas *Aeromonas* también pueden adquirir hierro “in vivo” por contacto directo entre proteínas secuestradoras de hierro del huésped y alguna proteína de membrana de la bacteria (Najimi y col., 2008).

### 1.6.5 Lámina S

La lámina S de *Aeromonas* es una estructura de naturaleza proteica. Las proteínas que la conforman se ensamblan de forma tetragonal para formar una envoltura externa a la pared celular que se une al lipopolisacárido bacteriano (Thomas y col., 1992). Aunque la función se desconoce, se piensa que actúan como barrera de permeabilidad, protegiendo a la célula de agentes externos, como las

proteasas. Además, la presencia de capa S aumenta la capacidad de adherencia a las células del organismo hospedador (Turska-Szewczuk y col., 2013), la colonización de la mucosa intestinal y disminuye la susceptibilidad de la bacteria a la opsonización y, por lo tanto, a la fagocitosis (Merino y col., 1995).

La capa S en *A. salmonicida*, denominada también capa A, se considera un importante factor de virulencia (Ishiguro y col., 1981). En esta especie la capa S está formada por una única proteína de 50 kDa que es codificada por el gen *vapA* (Chu y col., 1991). Mutantes en este gen aumentan 10,000 veces su LD<sub>50</sub> en peces, demostrando que la capa S es un factor de virulencia importante en las cepas que generan patología en peces (Ishiguro y col., 1981). Las cepas virulentas de *A. salmonicida* que presentan la capa S fueron capaces de adherirse, invadir y sobrevivir dentro de los macrófagos de peces con una eficacia de 10 a 20 veces superior que las cepas de *A. salmonicida* sin capa S (Garduño y col., 2000). En cepas de *A. hydrophila* y *A. veronii* bv. Sobria pertenecientes al serogrupo O:11, y que frecuentemente se asocian a infecciones extraintestinales en humanos, se detectó también la presencia de la capa S (Kokka y col., 1991). En estas especies, la capa S está formada por una proteína con un peso molecular de 52-53 kDa y está codificada por el gen *ahsA* (Janda, 2001).

### 1.6.6 Adhesinas

Las adhesinas son las proteínas responsables de establecer el primer contacto entre la célula huésped y el microorganismo patógeno. En *Aeromonas* existen dos tipos de adhesinas, filamentosas (flagelo y fimbrias o pili) y no filamentosas (lipopolisacárido, cápsula y proteínas de membrana externa) (Beaz-Hidalgo y Figueras, 2013).

- **Fimbrias o pili**

Los pili, orgánulos extracelulares filamentosos de 2 µm de longitud, están implicados en la adherencia de las bacterias a los tejidos del huésped o a superficies sólidas (Sauer y col., 2000; Boyd y col., 2008). Pueden estar presentes individualmente o en agrupaciones. Actualmente se han descrito

cuatro tipos de pili (I-IV). Los pili de tipo IV han sido implicados en la adhesión a células epiteliales, la colonización, la invasión celular, la formación de biopelículas y a la virulencia (Masada y col., 2002; Boyd y col., 2008; Chopra y col., 2009; Hadi y col., 2012). Se han descrito tres tipos diferentes de pili IV que se denominan: Tap, Flp y Msh o Bfp. Los pili Tap están codificados por el operón *tapABCD* (Janda, 2001; Boyd y col., 2008). Masada y col. (2002) fueron los primeros en demostrar que el gen *tapD* es indispensable para la viabilidad de *A. salmonicida* cuando infecta la célula huésped y que la presencia de TapA estimula la respuesta del sistema inmune en peces. Los genes que codifican para los pili de tipo IV se han encontrado en los genomas de *A. hydrophila* ATCC 7966<sup>T</sup>, *A. salmonicida* A449 y *A. aquariorum* AAK1 (Beaz-Hidalgo y Figueras, 2013). En un estudio reciente se han caracterizado genéticamente los pili Bfp en *A. veronii* biovar Sobria (que se asocia comúnmente a infecciones en humanos), en este estudio se observó que las mutaciones en la pilina reducen la capacidad de la bacteria para adherirse a una línea celular humana y formar biopelículas (Hadi y col., 2012). Kirov y col. (2000) determinaron que los pili de la familia Bfp son más importantes para la colonización intestinal que los de la familia Tap.

- **Flagelos**

Los flagelos son las principales estructuras responsables del movimiento de las bacterias. En *Aeromonas* se han descrito dos sistemas flagelares, el flagelo polar y el flagelo lateral. Todas las especies de *Aeromonas* móviles producen un flagelo polar que permite el movimiento en entornos líquidos (Joseph y Carnahan, 1994; Canals y col., 2007; Wilhelms y col., 2009), además es un factor de patogenicidad ya que interviene en la adherencia a células eucariotas y en la formación de biopelículas (Merino y col., 2003). Cuando las bacterias crecen en ambientes viscosos o en superficies sólidas, desarrollan múltiples flagelos laterales que mejoran la adherencia y la formación de biopelículas (Canals y col., 2007; Noonin y col., 2010). Estos dos sistemas flagelares se han estudiado en cepas de *A. caviae* (Sch3N), *A. salmonicida* (A450) y *A. hydrophila* (AH-3), caracterizando los genes implicados en su biosíntesis y el

papel de estos sistemas flagelares en la virulencia (Merino y col., 2003; Canals y col., 2007).

En el genoma de *A. salmonicida* A449 se han observado deleciones en los genes implicados en la formación del flagelo tanto polar como lateral (Reith y col., 2008), por lo tanto no puede sintetizar ningún sistema flagelar, lo que explicaría que algunas de las cepas de *A. salmonicida* no sean móviles (Reith y col., 2008; Beaz-Hidalgo y Figueras, 2013).

- **Proteínas de membrana externa (OMPs)**

Las OMPs juegan un papel importante en la virulencia, ya que actúan como moléculas de adhesión a células epiteliales del organismo huésped (Janda, 2001; Khushiramani y col., 2012; Beaz-Hidalgo y Figueras, 2013). Estas proteínas son responsables de estimular el sistema inmunológico del huésped y también participan en numerosos mecanismos asociados a la membrana plasmática, como osmorregulación, modulación de la señal, transporte de proteínas, adquisición de nutrientes, etc. (Ebanks y col., 2005; Beaz-Hidalgo y Figueras, 2013).

- **Lipopolisacárido (LPS)**

El LPS es indispensable para la unión inicial de las bacterias al tejido del huésped y necesario para el proceso de infección (Turska-Szewczuk y col., 2013). Además, el LPS es la principal estructura inmunomoduladora presente en el exterior de la membrana de las bacterias Gram negativas y es responsable de la actividad inflamatoria (Janda, 2001; Jiménez y col., 2009; Beaz-Hidalgo y Figueras, 2013). En el año 2001, en base a los determinantes antigénicos presentes en los LPS (antígeno O), se determinó que en el género *Aeromonas* se podían establecer 97 serogrupos distintos (Thomas y col., 1990; Janda, 2001). Se ha descrito la agrupación génica implicada en la biosíntesis del antígeno O.

## 1.7 Estudios taxonómicos

Las técnicas que se utilizan actualmente para realizar estudios taxonómicos, se pueden dividir en dos grupos:

### 1.7.1 Taxonomía bacteriana clásica (taxonomía numérica).

La taxonomía clásica se basa en el estudio de las propiedades morfológicas, nutricionales, fisiológicas y ecológicas de los microorganismos, también se tiene en cuenta la determinación del contenido G+C del DNA genómico (Brock y col., 2009).

- **Identificación fenotípica**

En el género *Aeromonas* se han realizado numerosos estudios con la finalidad de identificar cepas a nivel de especie. Un ejemplo representativo es el de Abbott y col; que en 1992 proponían un protocolo para identificar cepas del género *Aeromonas* basado en las siguientes 18 pruebas bioquímicas: oxidasa, indol, producción de gas a partir de glucosa, ornitina y lisina descarboxilasas, arginina dihidrolasa, hidrólisis de esculina, Vogues-Proskauer, hemólisis en agar sangre, producción de elastasa, oxidación de gluconato de potasio, producción de ácido sulfhídrico en medio gelatina-cisteína-tiosulfato y la fermentación de L-arabinosa, D-manitol, salicina, manosa, celobiosa y sacarosa. Abbott y col. (1992). También determinaron que, para algunas cepas, es necesario la realización de pruebas adicionales, de manera que son necesarias entre 25 y 40 pruebas bioquímicas para llegar a clasificar un 87% de las cepas estudiadas. En la Tabla 2 se muestran 16 pruebas fenotípicas útiles para la diferenciación de las especies del género *Aeromonas* (Miñana-Galbis y col., 2010a; Alperi y col., 2010b; Figueras y col., 2011; Aravena-Román y col., 2012), y en la Tabla 3 se muestran las diferencias fenotípicas de las cepas psicrófilas de *A. salmonicida*.



**Tabla 2.** Pruebas fenotípicas utilizadas para la diferenciación de las especies del género *Aeromonas*.

Prueba fenotípica	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28
<b>Producción de:</b>																												
Pigmento	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Gas de glucosa	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
H <sub>2</sub> S	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Indol	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
LDC	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
ODC	-	V	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Voges-Proskauer	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<b>Formación de ácido:</b>																												
L-Arabinosa	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-Manitol	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Sorbitol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Sacarosa	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<b>Hidrólisis de:</b>																												
Esculina	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Arbutina	ND	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Elastina	-	-	ND	V	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Almidón	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<b>Utilización de L-lactato</b>	+	V	-	-	+	V	-	-	-	ND	+	-	+	V	-	+	-	-	-	-	+	ND	-	ND	-	+	-	-

**Taxones:** 1, *A. australiensis*; 2, *A. allosaccharophila*; 3, *A. aquariorum*; 4, *A. bestiarum*; 5, *A. bivalvium*; 6, *A. caviae*; 7, *A. diversa*; 8, *A. encheleia*; 9, *A. eucrenophila*; 10, *A. fluvialis*; 11, *A. hydrophila*; 12, *A. jandaei*; 13, *A. media*; 14, *A. molluscorum*, 15, *A. piscicola*; 16, *A. popoffii*; 17, *A. rivuli*; 18, *A. salmonicida*; 19, *A. sanarellii*; 20, *A. schubertii*; 21, *A. simiae*; 22, *A. sobria*; 23, *A. taiwanensis*; 24, *A. tecta*; 25, *A. trota*; 26, *A. veronii* bv. *Sobria*; 27, *A. veronii* bv. *Veronii*.

**Tabla 3.** Diferencias fenotípicas de las cepas psicrófilas de *A. salmonicida* (Martin-Carnahan y Joseph, 2005).

**TABLE BXII.γ.183.** Differential characteristics for psychrophilic nonmotile *Aeromonas* species and subspecies (HG 3)

Characteristic	<i>A. salmonicida</i> subsp. <i>salmonicida</i>	<i>A. salmonicida</i> subsp. <i>salmonicida</i>	<i>A. salmonicida</i> subsp. <i>achromogenes</i>	<i>A. salmonicida</i> subsp. <i>masoucida</i>	<i>A. salmonicida</i> subsp. <i>smithia</i>	Atypical <i>A. salmonicida</i>
Strain	ATCC 33658 <sup>T</sup>	47 strains <sup>a</sup>	ATCC 33659 <sup>T</sup>	ATCC 27013 <sup>T</sup>	ATCC 49393 <sup>T</sup>	34 strains <sup>a</sup>
Motility	–	– (100%)	–	–	–	– (100%)
β-Hemolysis <sup>b</sup>	+	+	–	+	–	– (100%)
Oxidase	+	+	+	+	+	+
Brown diffusible pigment <sup>d</sup>	+	+	+	–	–	+
Esculin hydrolysis	+	+	–	+	–	–
Indole	–	–	+	+	–	+
Arginine dihydrolase	–	–	+	+	–	nd
Voges-Proskauer	–	nd	–	+	–	nd
Fermentation of D-glucose	+	+	+	+	+	+
Gas from D-glucose	+	+	–	+	–	–
<i>Fermentation of:</i>						
Sucrose	–	–	+	+	+	+
Maltose	+	+	+	+	+	+
Salicin	+	+	–	–	–	–
Arbutin <sup>e</sup>	+	+	–	–	–	–
D-Galactose <sup>c</sup>	+	+	+	+	–	+
D-Mannitol	+	+	–	+	–	+
L-Arabinose <sup>e</sup>	+	+	–	+	–	–
ε-Inositol <sup>c</sup>	–	–	–	–	–	–
N-Acetyl glucosamine assimilation <sup>e</sup>	+	+	–	–	+	+

<sup>a</sup>Data from Hirvelä-Koski et al. (1994) (deals with both typical *A. salmonicida* subsp. *salmonicida* strains (n = 47), as well as atypical strains (n = 34), Hänninen and Hirvelä-Koski (1997) (atypical strains).

<sup>b</sup>β-Hemolysis detected on ox blood agar.

<sup>c</sup>Oxidase-negative strains have been isolated from turbot.

<sup>d</sup>Pigment production for all strains in this table were evaluated using the medium containing tyrosine (Bernoth and Artzt, 1989) (see text for medium formulation).

<sup>e</sup>Tested with API 50 CH.

- **Determinación del contenido G+C del DNA genómico**

Históricamente se ha utilizado esta técnica para comparar la semejanza genética de diferentes microorganismos. El contenido en G+C se expresa en moles% y es especialmente útil en la comparación de géneros o niveles taxonómicos superiores. Actualmente se requiere la determinación del G+C de la cepa tipo en la descripción de nuevas especies (Stackebrandt y col., 2002), el valor determinado tendrá que estar dentro del rango de valores descritos para el género al que pertenece la nueva especie y esta variación será inferior al 10%.

### 1.7.2 Taxonomía molecular.

- **Hibridación DNA-DNA (DDH)**

La hibridación DNA-DNA es el método de referencia utilizado para determinar si dos microorganismos pertenecen a una misma especie bacteriana. Existen diferentes métodos de hibridación y el resultado obtenido puede variar según la técnica utilizada y el laboratorio que la haya realizado (Martínez-Murcia, 1999), por tanto es importante llevarla a cabo en un laboratorio de referencia. Se considera que dos cepas bacterianas pertenecen a la misma

especie si el valor DDH es superior o igual al 70% con una  $\Delta T_m$  (intervalo de temperatura de fusión) inferior o igual a 5°C. Si el resultado de la DDH es inferior al 50%, las cepas estudiadas pertenecen a especies diferentes. En el caso que el valor de hibridación esté entre el 50% y el 70%, los resultados no son concluyentes si no van acompañados de evidencias fenotípicas y filogenéticas (Kaznowski, 1998; Gevers y col., 2005; Coenye y col., 2005).

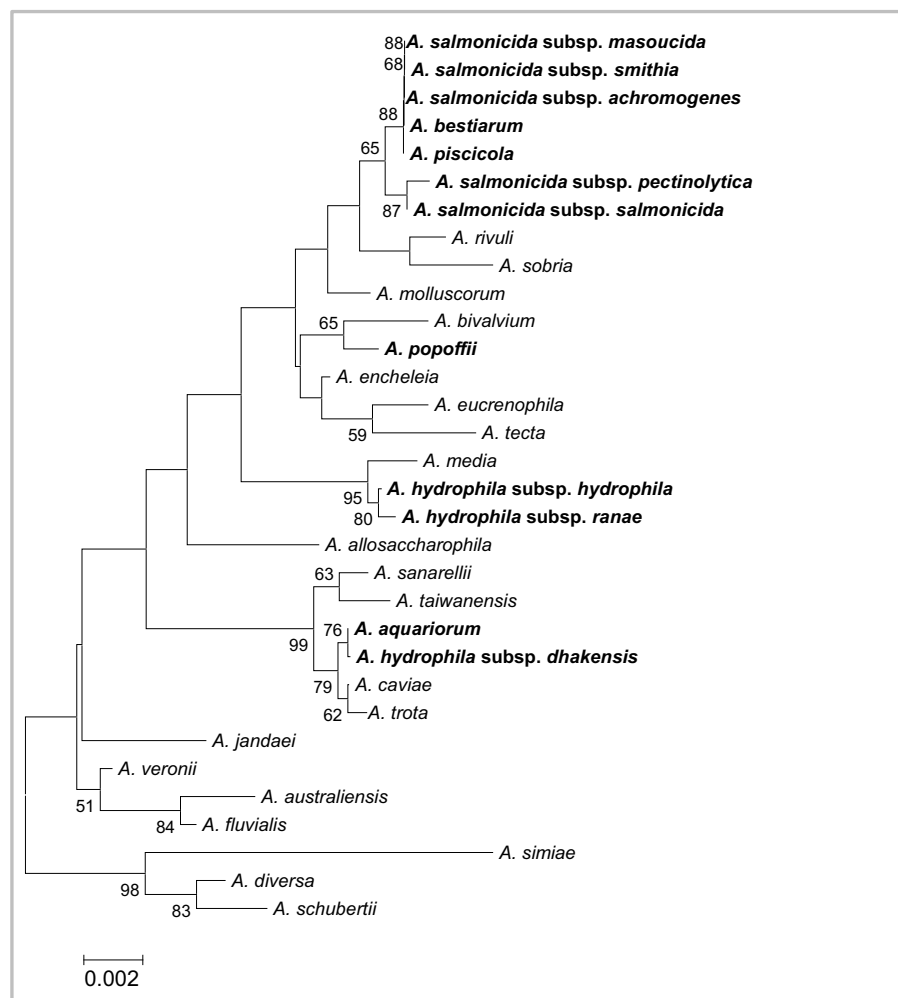
En base a los resultados obtenidos en la DDH, las especies móviles de *Aeromonas* se dividieron en ocho grupos de hibridación (Popoff y col., 1981). Investigaciones posteriores los ampliaron hasta 17 (Martin-Carnahan y Joseph, 2005) (Tabla 1), desde entonces y debido a la continua reclasificación y descripción de especies, y a las nuevas metodologías introducidas, esta numeración está en desuso.

- **Secuenciación del gen 16S rRNA**

El estudio de las secuencias del gen 16S rRNA es el método universalmente aceptado para determinar el nivel de relación filogenética entre bacterias, especialmente en los taxones superiores (género, familia). Se podría decir que este gen mantiene una función de cronómetro evolutivo (Woese, 1987), en este sentido se ha determinado que dos cepas pertenecen a especies diferentes cuando se obtienen valores de similitud <97%-98% entre las respectivas secuencias del gen 16S rRNA (Gillis y col., 2001). Para valores superiores se debe utilizar la hibridación DNA-DNA. En la descripción de nuevas especies es requisito indispensable la publicación de las secuencias de este gen (Stackebrandt y col., 2002).

Martínez-Murcia y col. (1992a) secuenciaron el gen 16S rRNA de todas las especies de *Aeromonas* que estaban descritas hasta el momento, y basaron la filogenia del género en los resultados obtenidos de la secuenciación de este gen. Las relaciones filogenéticas obtenidas con este gen concordaban con las obtenidas con la técnica de hibridación DNA-DNA, aunque en *Aeromonas*, este gen no siempre permitía la diferenciación a nivel de especie ya que se encontraron secuencias iguales para diferentes grupos de hibridación, como por

ejemplo: las secuencias de *A. bestiarum* sólo se diferencian de las de *A. salmonicida* subsp. *salmonicida* en dos pares de bases, y son idénticas a las de *A. salmonicida* subsp. *achromogenes* y *A. salmonicida* subsp. *mausocida*. Además las secuencias de *A. caviae* son iguales a las de *A. trota*. En el género *Aeromonas*, el poder de discriminación entre especies, obtenido a partir del análisis de las secuencias del gen 16S rRNA es bajo (Figura 5), tal como se ha comentado anteriormente. Es por ello que actualmente se recomienda la secuenciación de genes conservados como un método alternativo no sólo al de la secuenciación del gen 16S rRNA sino también al de la hibridación DNA-DNA (Stackebrandt y col., 2002; Miñana-Galbis y col., 2009).



**Figura 5.** Árbol filogenético *neighbour-joining* elaborado con las secuencias del gen 16S rRNA de las cepas tipo de las especies y subespecies de *Aeromonas*. En negrita se muestran las especies y subespecies pertenecientes al AHC.

- **RFLP (polimorfismos en la longitud de los fragmentos de restricción)**

Esta técnica consiste en amplificar el gen de 16S rRNA con cebadores específicos y posteriormente se hace una digestión con endonucleasas de restricción (*AluI* y *Hbol*). Los fragmentos obtenidos se separan por electroforesis, obteniendo un patrón de bandas característico.

Borrell y col. (1997) identificaron con esta técnica 10 de las 13 especies descritas hasta ese momento. Posteriormente utilizando endonucleasas complementarias como *NarI* y *HaeIII*, consiguieron identificar 12 de las 13 especies. Esta técnica tiene diferentes inconvenientes, uno de ellos es que, al aumentar el número de especies descritas, se tienen que utilizar más endonucleasas adicionales (Figueras y col., 2000), lo que hace que sea una técnica muy compleja.

- **Ribotipado**

Esta técnica consisten en fraccionar el DNA genómico mediante enzimas de restricción, posteriormente, estos fragmentos se hibridan con una sonda universal para el gen 16S rRNA.

El ribotipado se ha utilizado en estudios epidemiológicos y de identificación en el género *Aeromonas* (Pedersen y col., 1996; Huys y col., 1997a; Demarta y col., 1999), aunque actualmente está en desuso.

- **AFLP (polimorfismo en la longitud de fragmentos amplificados)**

Esta técnica es una combinación de la técnica de ribotipado y la de la PCR. Con esta técnica, Huys y col. (1996) discriminaron las 14 especies de *Aeromonas* que se conocían hasta el momento y ha sido útil en la descripción de algunas especies, como *A. molluscorum* y *A. bivalvium* (Miñana-Galbis y col., 2004a; Miñana-Galbis y col., 2007). Sin embargo, esta técnica presenta problemas a la hora de diferenciar algunas especies como es el caso de *A. allosaccharophila* y *A. veronii*.

- **FAME (perfil de ésteres metilados de ácidos grasos)**

Este método utilizado en la identificación bacteriana, consiste en la caracterización de los tipos y proporciones de los ácidos grasos presentes en los lípidos de la membrana citoplasmática y de la membrana externa de la pared celular mediante cromatografía de gases (Brock y col., 2009)

### **1.7.3 Genes conservados y análisis de secuencias multilocus (MLSA)**

En 2002, se propone que el análisis de las secuencias de cinco genes de copia única que codifiquen para funciones esenciales de la bacteria, sea utilizado como método complementario o alternativo a la hibridación DNA-DNA para la descripción de especies bacterianas (Stackebrandt y col., 2002). Las secuencias de estos genes conservados deben contener una región variable que sea suficientemente corta y permita la determinación de suficientes alelos polimórficos para poder diferenciar las cepas, pero que a su vez estén flanqueadas por regiones altamente conservadas.

Se han utilizado diversos genes para el estudio filogenético del género *Aeromonas*, como ejemplo se exponen a continuación seis de ellos:

- **Gen *cpn60***

Gen de 1635 pb que codifica una chaperona tipo I también denominada Hsp60 o GroEL. Este gen aumenta su expresión en situaciones de estrés, principalmente por choque térmico, estrés oxidativo, radiación ultravioleta, deficiencias nutritivas e infecciones víricas. Este gen se encuentra en todas las bacterias, arqueas, mitocondrias y cloroplastos. El gen de *cpn60* es muy conservado, su variación es uniforme en todo el gen y sólo se encuentra una copia en el genoma.

En estudios filogenéticos bacterianos se secuencia un fragmento de 555 pb de este gen, que corresponde a una región que es representativa de la variabilidad del gen entero y se denomina "Universal Target" (UT) (Hill y col., 2004). El rango de divergencia observado con este gen en el género *Aeromonas* es de 0 a 23,3%, con una media de  $11,2 \pm 0,9\%$ , mostrando un poder

discriminatorio similar o superior al de los genes *gyrB* y *rpoD*. Por lo tanto, es útil para establecer relaciones tanto interespecíficas como intraespecíficas, con la ventaja de que metodológicamente es más rápido y sencillo (Miñana-Galbis y col., 2009).

- **Gen *dnaJ***

Gen de 1143 pb que codifica una chaperona de 40 kDa, también denominada Cpn40 o Hsp40. Este gen se había utilizado anteriormente para identificar especies de *Mycobacterium* (Takewaki y col., 1993), *Legionella* (Liu y col., 2003) y *Streptococcus* (Itoh y col., 2006). Del gen *dnaJ* se secuencian generalmente un fragmento de 934 pb. La divergencia de las secuencias para este gen es mucho mayor que la del gen 16S rRNA, pero similar a las obtenidas con los genes *gyrB* y *rpoD* (Nhung y col., 2007).

El gen *dnaJ* ha demostrado ser útil en la diferenciación de *A. salmonicida* y *A. bestiarum*, con un valor de divergencia de 5,2–6,2% entre las cepas de estas especies.

- **Gen *gyrB***

Gen que codifica para la subunidad  $\beta$  de la DNA girasa. Es una proteína que desarrolla un papel crucial en la replicación del DNA. Este gen es de distribución universal y ha demostrado ser un excelente cronómetro molecular en estudios filogenéticos en otros géneros bacterianos. El gen *gyrB* tiene una tasa de sustitución media cuatro veces superior a la del gen 16S rRNA (Yamamoto y Harayama, 1996). Este gen tiene una longitud de 2.415 pb, aunque en *Aeromonas* se ha secuenciado un fragmento de aproximadamente 960 pb.

El gen *gyrB*, a diferencia del 16S rRNA, ha demostrado su utilidad tanto en la diferenciación a nivel de especie como a nivel intraespecífico (Yáñez y col., 2003).

- **Gen *mdh***

Gen que codifica para la enzima malato deshidrogenasa (MDH) que cataliza la conversión de malato a oxalacetato. Este gen se encuentra en bacterias, arqueas, hongos, plantas y mamíferos, así como en mitocondrias y cloroplastos. Farfán y col. (2010) proponen que este gen es un buen marcador filogenético y que debería incluirse en los estudios filogenéticos de *Aeromonas* a partir de un estudio realizado con las secuencias completas del gen (936 pb) de todas las cepas tipo y cepas de referencia de las especies y subespecies de *Aeromonas* descritas hasta el momento.

- **Gen *recA***

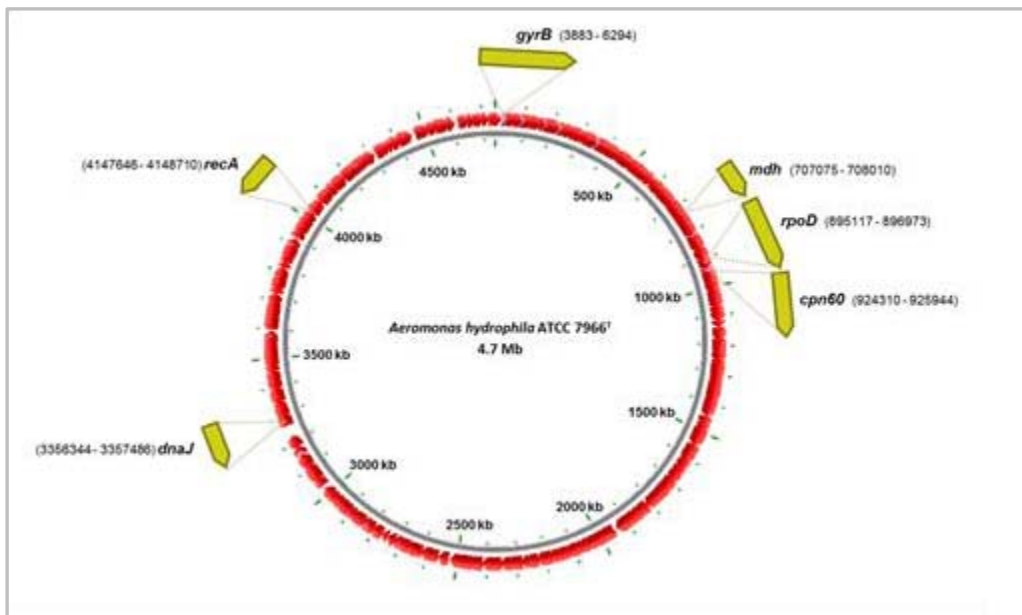
Gen que forma parte del sistema SOS. El gen *recA* se encuentra en todos los microorganismos, es altamente conservado y tiene muy poca variabilidad a excepción de una región variable que se encuentra en los últimos 30 pb del extremo carboxi terminal. Para el estudio de este gen como posible marcador filogenético se secuencia un fragmento de 272 pb (Sepe y col., 2008). Según este autor el resultado obtenido en *Aeromonas* no pone de manifiesto ninguna ventaja respecto a *gyrB* y *rpoD*. Posteriormente, Fusté y col. (2012) realizan un estudio multilocus donde secuencian el gen completo que tiene una longitud entre 1062 y 1065 pb.

- **Gen *rpoD***

Gen de 1839 pb que codifica para el factor sigma 70 de la RNA polimerasa. Este gen ya había demostrado ser apropiado como marcador filogenético en otras familias bacterianas (Yamamoto y col., 2000). Para el estudio de las relaciones filogenéticas en *Aeromonas* se secuencia una fracción de 957 pb (Saavedra y col., 2006). Las secuencias tienen un 34% de posiciones variables, valor similar al de las secuencias de *gyrB* (32%), siendo la tasa de sustitución igual a la del *gyrB* (<2%). Pero en estudios interespecíficos, se observa que como marcador filogenético, se comporta diferente según cual sea la especie. Por ejemplo, es un excelente marcador filogenético y con gran resolución para la diferenciación de *A. salmonicida* y *A. bestiarum*.



En la Figura 6, se puede observar la posición que ocupan estos genes en el genoma de la cepa tipo de *A. hydrophila* (CP000462).



**Figura 6.** Situación de los genes conservados en el genoma de *A. hydrophila* (Farfán y col., 2013).

- **Análisis de secuencias multilocus (MLSA)**

El MLSA fue propuesto por Maiden y col. (1998) como un método universal y reproducible para la caracterización de bacterias. Este método está basado en el estudio de secuencias nucleotídicas (400–600pb) de diferentes loci que codifiquen proteínas. Este es un método derivado de la electroforesis de enzimas multilocus (MLEE), pero en el MLSA los alelos se identifican directamente a partir de las secuencias de nucleótidos obtenidas de los fragmentos de los genes, en lugar de la comparación de las movilidads electroforéticas de las enzimas (Maiden y col., 1998). Esta técnica se ha utilizado principalmente en epidemiología, pero actualmente se utiliza tanto para clasificación bacteriana, como para realizar estudios de genética de poblaciones o estudios filogenéticos (Stackebrandt y col., 2002; Maiden, 2006; Martens y col., 2008).

El comité *ad hoc* para la reevaluación de la definición de especie bacteriana considera la secuenciación de un mínimo de cinco genes conservados de distribución universal, presentes como copias individuales y situados en loci

cromosómicos distintos, como un método de gran utilidad para el estudio taxonómico de procariotas (Stackebrandt y col., 2002). Debido a que las secuencias de los genes conservados presentan mayor divergencia que las del gen 16S rRNA, éstos nos permiten mayor discriminación a nivel de especie. Zeigler (2003) propuso que el análisis de un pequeño número de secuencias de genes conservados bien seleccionados podría igualar, o incluso superar, la precisión de la hibridación DNA-DNA.

Actualmente existen cinco trabajos publicados donde se ha utilizado MLSA en distintas poblaciones de *Aeromonas* (Martínez-Murcia y col., 2011; Silver y col., 2011; Martino y col., 2011; Fusté y col., 2012; Roger y col., 2012).



## **Capítulo 2**

---

### **Objetivos**



1. Obtención de una colección representativa de cepas de las especies del “complejo *Aeromonas hydrophila*” y su caracterización a nivel de especie.
2. Realizar un análisis de secuencias multilocus para estudiar la variabilidad inter- e intraespecífica de la colección de cepas del “complejo *Aeromonas hydrophila*” mediante el análisis de las secuencias parciales de los genes *cpn60*, *dnaJ*, *gyrB* y *rpoD*.
3. Estudio de la estructura poblacional de las cepas del “complejo *Aeromonas hydrophila*” en base a las frecuencias alélicas de los cuatro genes estudiados.
4. Estudio de la prevalencia y distribución de diversos factores de virulencia en la población estudiada para poder establecer su potencial patogénico. Para ello se estudiarán actividades enzimáticas, el perfil de sensibilidad a antibióticos, la detección por PCR de los genes *act* (aerolisina/hemolisina), *alt* (toxina citotónica) y *ast* (toxina citotónica), y la capacidad de adherencia y efecto citopático de las cepas en la línea celular Caco-2.



## **Capítulo 3**

---

### **Material y métodos**





### 3.1 Cepas bacterianas

En este estudio se han utilizado 128 cepas pertenecientes al complejo de especies de *Aeromonas hydrophila*: 4 cepas de *A. aquariorum*, 38 de *A. bestiarum*, 30 de *A. hydrophila*, de las cuales 20 pertenecen a *A. hydrophila* subsp. *hydrophila*, una a la subespecie *A. hydrophila* subsp. *ranae* y 9 a la subespecie *A. hydrophila* subsp. *dhakensis*, junto con 4 cepas de *A. piscicola*, 7 de *A. popoffii* y 36 de *A. salmonicida* incluyendo a sus 5 subespecies.

Una parte de estas cepas proceden de distintas colecciones de cepas tipo como: CECT (Colección Española de Cultivos Tipo), CIP (“Collection de l'Institut Pasteur”), JCM (“Japan Collection of Microorganisms”) y LMG (“Belgian Co-ordinated Collection of Micro-organisms”). Mientras que otras han sido cedidas por distintos grupos de investigación: Dra. Mònica Bassas; Dra. Katri Berg de la “University of Helsinki” (Finlandia); Dra. Margarita Gomila de la Universitat de les Illes Balears (Mallorca); Dra. M.J. Figueras de la Universitat Rovira i Virgili (Tarragona) y al Dr. A.J. Martínez-Murcia de la Universidad Miguel Hernández (Alicante). El resto de las cepas que se han utilizado pertenecen a una colección de nuestro grupo de investigación y han sido aisladas y estudiadas en trabajos anteriores. Los detalles sobre su origen y características se muestran en el Anexo 8.1.

### 3.2 Recuperación de las cepas

#### 3.2.1 Recuperación a partir de cepas congeladas

Las cepas bacterianas se han conservado a  $-40^{\circ}\text{C}$  y  $-80^{\circ}\text{C}$  en TSB con 20% de glicerol o en criobolas, para su recuperación se inoculó 50  $\mu\text{l}$  del vial que contiene la cepa bacteriana o una criobola en 5 ml de Caldo Triptona de Soja (TSB) con un 1% de NaCl (ver Anexo 8.2) y se incubó a  $30^{\circ}\text{C}$  durante 24–48 h. En los casos donde el crecimiento no fue óptimo en este medio, se utilizó el Caldo de Tolerancia Salina

(STB) con un 1% de NaCl (ver Anexo 8.2). Transcurrido el periodo de incubación se realizó una siembra por estría en TSA al 1% de NaCl (ver Anexo 8.2), con el objetivo de obtener un buen aislamiento de la cepa.

### **3.2.2 Recuperación a partir de cepas liofilizadas**

Las cepas liofilizadas que se han utilizado en este trabajo son procedentes de las colecciones CECT y LMG. Una vez abierto el liofilizado se añadió caldo de cultivo, en este caso TSB al 1% de NaCl, y se resuspendió el liofilizado. La suspensión obtenida se traspasó a un tubo con 5ml de TSB al 1% de NaCl. Dentro del vial se encuentra una tira de celulosa que, con ayuda de unas pinzas previamente esterilizadas, se sembró en una placa de TSA al 1% de NaCl.

### **3.2.3 Recuperación de cepas conservadas en medio semisólido**

Con ayuda de un asa de Kolle se transfirió una pequeña muestra del medio semisólido, de la zona donde se observó crecimiento, a un tubo con 5ml de TSB con 1% de NaCl.

En todos los casos, las cepas se incubaron durante 24–48 h a 25 ó 30°C.

## **3.3 Confirmación de los cultivos bacterianos**

Con la finalidad de confirmar que las cepas recuperadas eran cultivos puros, a partir de los cultivos líquidos, se realizó una siembra por estría en una placa de TSA 1% de NaCl, con el objetivo de obtener colonias aisladas. Las placas se incubaron 24h a 25-30°C. Para confirmar que los cultivos eran puros, se observó que todas las colonias fuesen iguales, en tamaño, forma y color, también se realizó una tinción Gram. Para confirmar que podría tratarse de *Aeromonas* se hicieron las pruebas de la oxidasa, catalasa, aunque estas no son suficientes para identificar el género.

Además se realizó la fermentación de sorbitol y asimilación de lactato que son pruebas específicas del AHC.

### 3.3.1 Oxidasa

Con esta prueba se determinó la presencia de la enzima citocromo c oxidasa. Esta prueba se realizó a partir de una colonia aislada de un cultivo puro en placa de TSA, según el siguiente protocolo:

- Tomar una muestra de una colonia aislada con un mondadientes estéril y depositarla en papel de filtro.
- Añadir unas gotas de reactivo de oxidasa.

El resultado positivo se observa mediante un cambio de color a azul oscuro. La lectura debe ser inmediata para evitar falsos negativos, ya que el reactivo se oxida en presencia de oxígeno produciendo una coloración azulada (Reddy y col., 2007).

Como control (-) se utilizó *Escherichia coli* CECT 405 y como control (+) *Aeromonas hydrophila* CECT 839<sup>T</sup>.

### 3.3.2 Catalasa

Para ensayar la actividad catalasa se partió de un cultivo puro en TSA, al que se añadió unas gotas de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 10 vol. El resultado se considera positivo cuando se observa la formación de burbujas de O<sub>2</sub> (Reddy y col., 2007).

Como control (-) se utilizó *Enterococcus hirae* CECT 4081 y como control (+) *Aeromonas hydrophila* CECT 839<sup>T</sup>.

### 3.3.3 Fermentación de sorbitol

Medio: caldo base de fermentación (ver Anexo 8.2) con un 1 % de sorbitol.

Siembra: Este medio se sembró añadiendo 50  $\mu$ l del inóculo ( $10^8$ - $10^9$ -UFC/ml) a 4 ml del caldo de fermentación.

Tiempo de incubación: 24 h - 7 días.

Lectura e interpretación: la fermentación del sorbitol provoca una acidificación del medio, lo que produce un viraje a color amarillo del indicador de pH por la presencia de púrpura de bromocresol (Twedt, 1984; Miñana-Galbis, 2002).

### 3.3.4 Asimilación de lactato

Medio: solución M-70 (ver Anexo 8.2) con un 0,1 % de L-lactato sódico.

Tiempo de incubación: 14 días.

Siembra: Este medio se sembró añadiendo 10  $\mu$ l del inóculo ( $10^8$ - $10^9$  UFC/ml) a 5 ml de la solución M-70 + 0,1 % de L-lactato sódico.

Lectura e interpretación: la turbidez indicará crecimiento y, por tanto, la utilización del lactato (Véron, 1975; Popoff y Lallier, 1984; Miñana-Galbis, 2002).

## 3.4 Conservación de las cepas

### 3.4.1 Conservación de las cepas a corto plazo

Con el objetivo de mantener viables las cepas con las que se trabajaba frecuentemente, estas se resembraron en TSA al 1% NaCl, tanto en placa como en tubos con medio inclinado. Los cultivos se conservaron a 4°C ó 25°C por un tiempo máximo de tres semanas.

### 3.4.2 Conservación de las cepas a largo plazo

Los sistemas de conservación a largo plazo, paralizan el crecimiento de las células, manteniéndolas viables. Estos métodos garantizan la estabilidad genética de las cepas. En este trabajo se han utilizado los siguientes métodos:

#### 3.4.2.1 Congelación en medio líquido

El glicerol actúa como crioprotector, impidiendo que el agua cristalice en el interior de las células, conservando así su viabilidad. El procedimiento utilizado fue el siguiente:

- Preparar el medio crioprotector con 80 ml de TSB al 1% NaCl y 20 ml de glicerol. Una vez preparado esterilizar en autoclave 20 min a 121°C.
- A partir de un cultivo puro, sembrar un cultivo confluyente en una placa de TSA al 1% NaCl e incubar a la temperatura adecuada, dependiendo de la cepa 25°C ó 30°C, durante 24 horas.
- Con una asa de Kolle, previamente esterilizada, transferir el crecimiento bacteriano, a un tubo con 5 ml de medio con crioprotector.
- Resuspender con ayuda de un vórtex y distribuir en tres tubos eppendorf.
- Conservar a -40°C y -80°C.

#### 3.4.2.2 Congelación en criobolas

El sistema de congelación en criobolas (Ferrer Farma S. A., ref. 3029) consiste en un vial que contiene abalorios, inmersos en una solución crioprotectora, a los que los microorganismos pueden adherirse. La metodología que se utilizó fue la siguiente:

- Resuspender parte del crecimiento bacteriano, procedente de un cultivo confluyente en TSA, en la solución crioprotectora del vial con ayuda de un vórtex.

- Eliminar todo el líquido crioprotector del vial con ayuda de una micropipeta. Los viales se conservaron a  $-40^{\circ}\text{C}$  y  $-80^{\circ}\text{C}$ .

### 3.5 Estudio filogenético

#### 3.5.1 Elección de los genes

Para realizar el estudio de la variabilidad intraespecífica de las cepas pertenecientes al complejo *A. hydrophila*, se utilizaron cuatro genes conservados ("housekeeping genes"):

**Tabla 4.** Genes seleccionados para realizar el estudio.

Gen	Producto génico	Longitud del gen
<i>cpn60</i>	Chaperona 60 kDa (Cpn60)	1635 pb
<i>dnaJ</i>	Co-chaperona 40 kDa (Cpn40)	1143 pb
<i>gyrB</i>	Subunidad beta de la DNA girasa	2412 pb
<i>rpoD</i>	Factor sigma 70 de la RNA polimerasa	1857 pb

#### 3.5.2 Extracción del DNA genómico

La extracción de DNA genómico se realizó utilizando el kit comercial REALPURE® (Durviz, ref. RBMEG01), siguiendo el siguiente protocolo:

- **Preparación:**

Para la extracción de DNA genómico se partió de las cepas cultivadas en TSB 1% de NaCl. Para ello, se inocula un tubo con 5 ml de TSB al 1% de NaCl a partir de una colonia aislada, procedente de un cultivo en placa de TSA al 1% de NaCl, y se incuba a  $25-30^{\circ}\text{C}$  durante 24 h.

- **Lisis celular:**

- Se trasfiere 1 ml del cultivo líquido en un tubo Eppendorf estéril, de 1,5 ml.

- Centrifugar durante 30 seg y eliminar el sobrenadante.
- Añadir 600 µl de la suspensión de lisis y resuspender mediante pipeteo.
- Incubar a 80°C durante 5 min, en un bloque térmico. (Multiblock® Heater barnstead lab-line) y enfriar a temperatura ambiente.
- **Tratamiento con RNasa:**
  - Añadir 3 µl de RNasa a una concentración de 10 mg/ml y mezclar por inversión del tubo.
  - Incubar a 37°C durante 40 min, en un baño de agua y enfriar a temperatura ambiente.
- **Precipitación de proteínas:**
  - Añadir 300 µl de la solución de precipitación de proteínas y homogeneizar mediante sucesivos pipeteos.
  - Centrifugar 7 min a 13.500 rpm. El precipitado de proteínas forma un sedimento en el fondo del tubo.
- **Precipitación de DNA:**
  - Pasar el sobrenadante a un tubo Eppendorf que contenga 600 µl de isopropanol.
  - Centrifugar durante 3 min.
  - Eliminar el sobrenadante.
  - Añadir 600 µl de etanol al 70% e invertir el tubo varias veces para lavar el sedimento que contiene el DNA genómico.
  - Centrifugar durante 2 min y eliminar el etanol.
  - Secar el sedimento que contiene el DNA genómico, invirtiendo el tubo sobre un papel de filtro al lado de la llama del Bunsen.
- **Hidratación**
  - Añadir 200 µl de solución de hidratación o agua Milli-Q® estéril e incubar “overnight” a temperatura ambiente o a 65°C durante 1 h.



### 3.5.3 Valoración de la cantidad y la calidad del DNA

Para la valoración del DNA se utilizó un espectrofotómetro Nanodrop® 1000 Thermo Scientific, para ello se realizaron lecturas de la absorbancia a 260, 280 y 230 nm. La cantidad de DNA se determina mediante la absorbancia a 260 nm, debido a que los ácidos nucleicos presentan una absorción máxima a esta longitud de onda por la presencia de bases nitrogenadas. La relación A260/A280 se utiliza como indicador de pureza de la muestra. Se considera que la muestra tiene una pureza correcta si el valor A260/A280 es próximo a 1,80, si esta relación es menor puede indicar la presencia de proteínas, fenol u otros contaminantes ya que presentan una absorción máxima a 280 nm. La absorbancia a 230 nm depende de la cantidad de sales presentes en la muestra, por lo tanto la relación A260/A230 se utiliza como indicador secundario de pureza, indicando si en la muestra se encuentran solventes orgánicos procedentes del proceso de extracción. Se consideran valores aceptables los que se encuentran entre 1,8-2 (<http://www.nanodrop.com>).

### 3.5.4 PCR (reacción en cadena de la polimerasa)

Esta técnica tiene como objetivo la amplificación de un gen o de un fragmento de DNA, es un método idóneo para obtener ácidos nucleicos en una cantidad muy superior a la presente en la muestra original

Para la realización de la PCR es necesario realizar una mezcla de los siguientes reactivos:

- **dNTPs** en exceso, como sustrato para la síntesis de las copias de DNA, para que sean reconocidos por la polimerasa esta requiere de  $Mg^{2+}$  ya que actúa como coenzima para la polimerasa.
- **Dos cebadores** que son dos oligonucleótidos monocatenarios sintéticos de entre 18 y 30 nucleótidos. Sus secuencias tienen que ser complementarias a los dos extremos 5' del DNA molde, uno en cada hebra.

- **DNA polimerasa termoestable**, la Taq polimerasa procede de la bacteria *Thermus aquaticus*. Esta enzima es activa a 75°C. La replicación a temperaturas altas impide la formación de híbridos parcialmente desapareados y contribuye a la especificidad y rendimiento del proceso.

La PCR se divide en tres etapas:

- **Desnaturalización** del DNA para obtener moléculas monocatenarias mediante incubación a temperaturas de entre 68°C y 97°C durante 30-120 seg.
- **Hibridación** específica de la molécula monocatenaria con un oligonucleótido, para ello se disminuye la temperatura de manera rápida para permitir el apareamiento del DNA monocatenario de interés con los cebadores. Se usan temperaturas entre 37°C y 65°C que se mantienen entre 10 y 120 seg.
- **Replicación**, es la etapa donde se realiza la amplificación, la Taq polimerasa elonga los cebadores, utilizando como molde las dos hebras moldes de DNA. La replicación se realiza en dirección 5'→3' a partir del extremo 3'-OH de cada cebador, utilizando como sustrato los cuatro dNTPs.

Este proceso se repite entre 20 y 40 ciclos de 1,5 a 5 min cada uno. Además de estas tres etapas, se añade una etapa previa, a elevada temperatura, que sirve para inactivar las proteasas y nucleasas de la muestra, asegurando la desnaturalización completa del DNA molde. También se añade una etapa final que permite a la DNA polimerasa alargar la copia de la hebra de DNA.

#### 3.5.4.1 Diseño de los cebadores específicos

Los cebadores se diseñaron a partir de un alineamiento múltiple realizado con secuencias disponibles en la base de datos Genbank del NCBI (National Center for Biotechnology Information) (Tabla 5). A partir del alineamiento múltiple se seleccionaron regiones conservadas con longitud de entre 20 y 25 nt, para ello se

utilizó el programa MEGA 5 (Tamura y col., 2011). Las propiedades termodinámicas de los oligonucleótidos se calcularon con el programa Primer3 (v. 0.4.0) (Rozen y Skaletsky, 2000), seleccionándose aquellos oligonucleótidos que cumplieran las siguientes características:

- Los cebadores deben tener una longitud entre 20 y 25 nt.
- Temperatura de fusión ( $T_m$ ) de 50-60°C, esta temperatura es importante para el cálculo de la temperatura de hibridación de los cebadores con el DNA molde.
- El contenido de G+C (Guanina + Citosina) debe estar entre 40 y 60 %.
- La secuencia de los cebadores debe iniciarse y terminarse con 1 o 2 bases púricas.
- Evitar regiones con potencialidad para formar estructuras secundarias internas.
- Se pueden agregar degeneraciones en algunas posiciones del cebador:

A	adenina	W	A o T
C	citosina	S	C o G
G	guanina	Y	C o T
T	timina	K	G o T
N	A o C o G o T	H	A o C o T; no G
M	A o C	B	C o G o T; no A
V	A o C o G; no T	D	A o G o T; no C
R	A o G		

Se tiene que evitar nucleótidos degenerados en el extremo 3' (Green y Sambrook, 2012)

**Tabla 5.** Secuencias a partir de las cuales se han diseñado los cebadores específicos.

Gen	Nº acceso Genbank	Organismo
<b><i>dnaJ</i></b>	CP000462	<i>A. hydrophila</i> subsp. <i>hydrophila</i> ATCC 7966, complete genome
	CP000644	<i>A. salmonicida</i> subsp. <i>salmonicida</i> A449, complete genome
	CP000948	<i>E. coli</i> strain K12 substrain DH10B, complete genome
<b><i>gyrB</i></b>	CP000462	<i>A. hydrophila</i> subsp. <i>hydrophila</i> ATCC 7966, complete genome
	CP000644	<i>A. salmonicida</i> subsp. <i>salmonicida</i> A449, complete genome
	X04341	<i>E. coli</i> genes <i>dnaN</i> (3' region), <i>recF</i> and <i>gyrB</i>
<b><i>rpoD</i></b>	CP000462	<i>A. hydrophila</i> subsp. <i>hydrophila</i> ATCC 7966, complete genome
	CP000644	<i>A. salmonicida</i> subsp. <i>salmonicida</i> A449, complete genome
	U00096	<i>E. coli</i> strain K-12 substrain MG1655, complete genome
	AE003852	<i>V. cholerae</i> O1 bv. Eltor strain N16961 chromosome I, complete sequence

Los cebadores utilizados en este estudio se muestran a continuación:

**Tabla 6.** Cebadores utilizados en la PCR.

<b><i>cpn60</i></b>	
C175: GAAATYGAAGTGAAGACAA (Miñana-Galbis y col., 2009)	T <sub>m</sub> 52,2°C
C938: GTYGCTTTTCCAGCTCCA (Miñana-Galbis y col., 2009)	T <sub>m</sub> 55,6°C
<b><i>dnaJ</i></b>	
F: CGAGATCAAGAAGGCGTACAAG (Nhung y col., 2007)	T <sub>m</sub> 60,3°C
F1: TCTAYGAAGTGCTCGGGTAT (Diseñado para este estudio)	T <sub>m</sub> 58,8°C
R3: CACCACCTTGCACATCAGATC (Nhung y col., 2007)	T <sub>m</sub> 58,9°C
<b><i>gyrB</i></b>	
3F: TCCGGCGGTCTGCACGGCGT (Yáñez y col., 2003)	T <sub>m</sub> 67,6°C
UP-1S: GAAGTCATCATGACCGTTCTGCA (Yamamoto y Harayama, 1995)	T <sub>m</sub> 60,6°C
14R: TTGTCCGGTTGTACTIONGTC (Yáñez y col., 2003)	T <sub>m</sub> 59,4°C
<b><i>rpoD</i></b>	
Fa: CCAGATGATCAACGACATGG (Diseñado para este estudio)	T <sub>m</sub> 57,3°C
70Fs: ACGACTGACCCGGTACGCATGTA (Yamamoto y col., 2000)	T <sub>m</sub> 64,2°C
70Rs: ATAGAAATAACCAGACGTAAGTT (Yamamoto y col., 2000)	T <sub>m</sub> 53,5°C
Ra: ACTTGTAGCCRCGACGGTAT (Diseñado para este estudio)	T <sub>m</sub> 58,3°C

En el Anexo 8.4 se muestra las secuencias de los fragmentos amplificados de los genes *cpn60*, *dnaJ*, *gyrB* y *rpoD*, así como la de los cebadores utilizados y su posición.

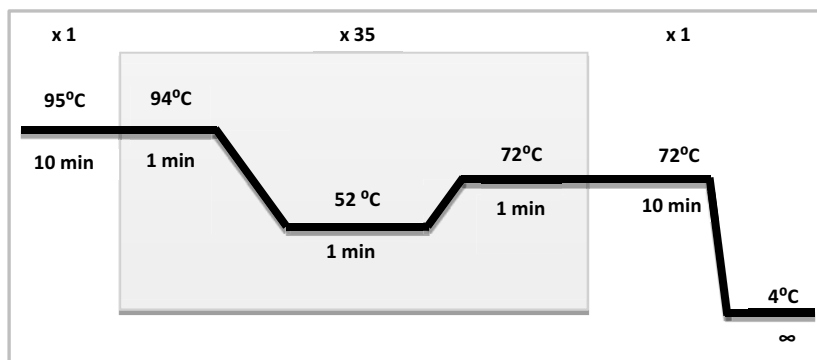
La amplificación se realizó utilizando un termociclador 2720 Thermal cycler de Applied Biosystem™. Las reacciones de amplificación por PCR se llevaron a cabo en un volumen final de 50 µl por muestra, que incluía además del DNA, los cebadores (Isogen Life Science), Taq polimerasa (Applied Biosystems™), dNTPs mix (dATP, dCTP, dGTP y dTTP) (Applied Biosystems™) a una concentración equimolar, 25 mM, cada uno y tampón de PCR (Applied Biosystems™), que es una solución que contiene las sales necesarias para el buen funcionamiento de la Taq polimerasa.

### 3.5.4.2 Condiciones de amplificación del gen *cpn60*

Se amplificó un fragmento de 764 pb de un total de 1635 pb que corresponde a la longitud total del gen (Ver Tabla 7 y Figura 7).

**Tabla 7.** Mezcla de PCR para la amplificación del gen *cpn60*.

<b>MEZCLA <i>cpn60</i></b>	
DNA genómico	1 µg
Cebador C175 10 µM	5µl
Cebador C938 10 µM	5µl
dNTPs mix 1,25 mM	10µl
Tampón de PCR (500 mM KCl, 150 mM Tris/HCl, 15 mM MgCl <sub>2</sub> , pH 8	5µl
Ampli Taq Gold® 5U/ µl	0,5µl
Agua MILLI-Q® qsp	50 µl



**Figura 7.** Condiciones de PCR para el gen *cpn60*.

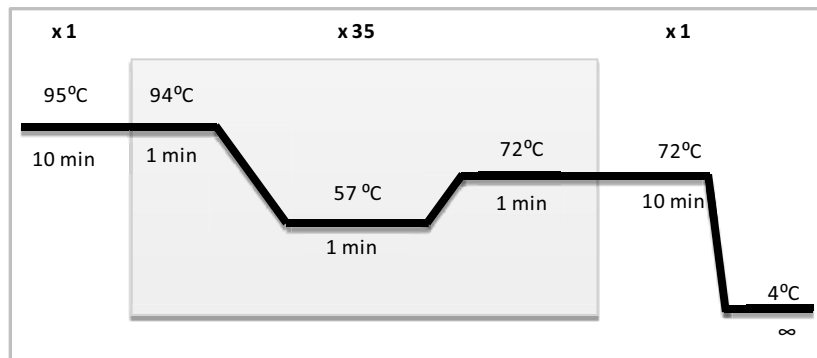
### 3.5.4.3 Condiciones de amplificación del gen *dnaJ*

El gen *dnaJ* tiene una longitud de 1143 pb de los cuales se han amplificados fragmentos de entre 934 pb y 974 pb, dependiendo de los cebadores utilizados (Ver Tabla 8 y Figura 8).

**Tabla 8.** Mezcla de PCR para la amplificación del gen *dnaJ*.

<b>MEZCLA <i>dnaJ</i></b>	
DNA genómico	400-500 ng
Cebador F o F1 10 $\mu$ M	5 $\mu$ l
Cebador R3 10 $\mu$ M	5 $\mu$ l
dNTPs mix 1,25 mM	12 $\mu$ l
Tampón de PCR (500 mM KCl, 150 mM Tris/HCl, 15 mM MgCl <sub>2</sub> , pH 8)	5 $\mu$ l
Ampli Taq Gold® 5U/ $\mu$ l	0,5 $\mu$ l
Agua MILLI-Q® qsp	50 $\mu$ l

En algunas de las muestras se añadió 5  $\mu$ l de DMSO (dimetilsulfóxido) (Sigma 41639)



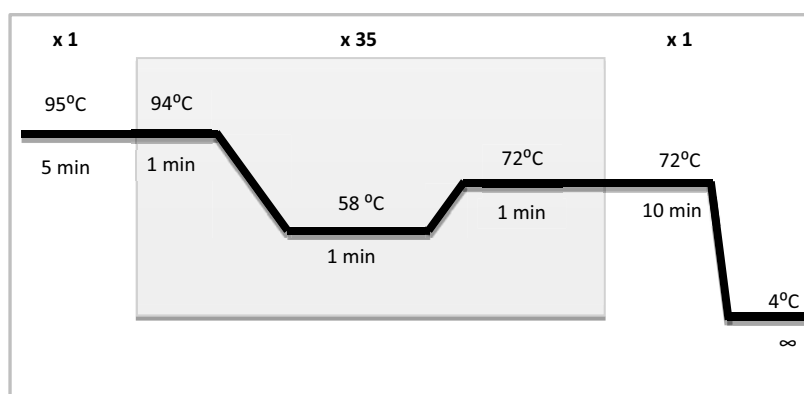
**Figura 8.** Condiciones de PCR para el gen *dnaJ* utilizando los cebadores F o F1 y R3.

### 3.5.4.4 Condiciones de amplificación del gen *gyrB*

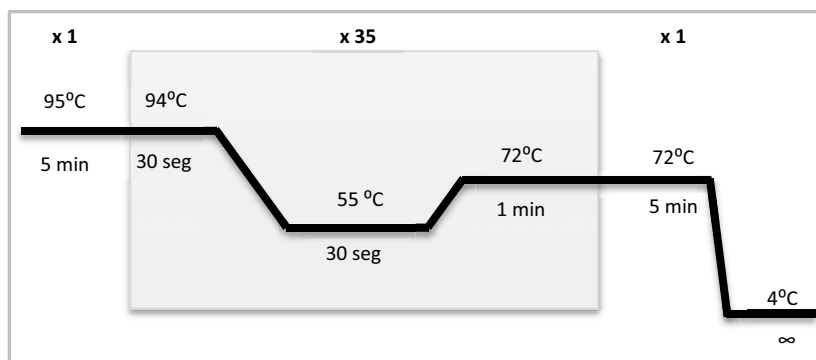
Este gen tiene una longitud de 2412 pb. En la PCR, dependiendo de la combinación de cebadores utilizados, se obtuvieron amplicones de entre 1124 y 1184 (Ver Tabla 9 y Figura 9).

**Tabla 9.** Mezcla de PCR para la amplificación del gen *gyrB*.

<b>MEZCLA <i>gyrB</i></b>	
DNA genómico	400 ng
Cebador UP-1S o 3F 10 $\mu$ M	5 $\mu$ l
Cebador 14R 10 $\mu$ M	5 $\mu$ l
dNTPs mix 1,25 mM	12 $\mu$ l
Tampón de PCR (500 mM KCl, 150 mM Tris/HCl, 15 mM MgCl <sub>2</sub> , pH 8	5 $\mu$ l
Ampli Taq Gold® 5U/ $\mu$ l	0,5 $\mu$ l
Agua MILLI-Q® qsp	50 $\mu$ l



**Figura 9.** Condiciones de PCR para el gen *gyrB* utilizando los cebadores 3F y 14R.



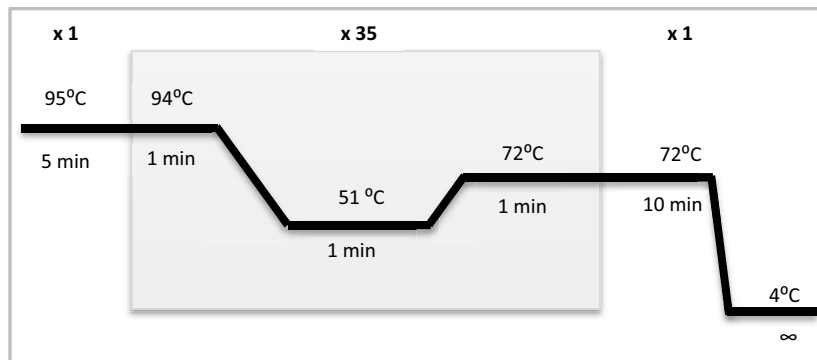
**Figura 10.** Condiciones de PCR para el gen *gyrB* utilizando los cebadores UP-1S y 14R.

### 3.5.4.5 Condiciones de amplificación del gen *rpoD*

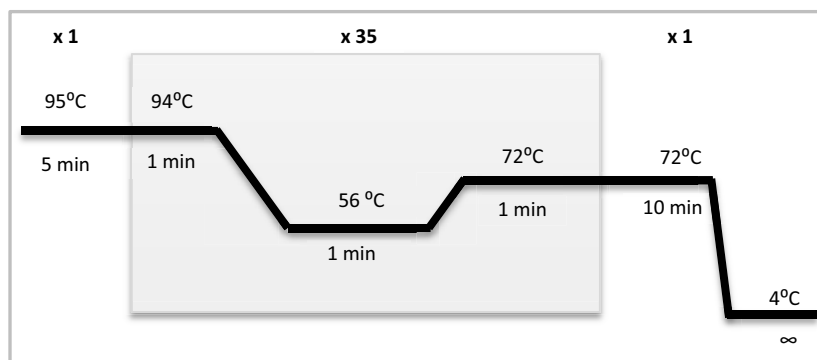
El gen que codifica para el factor sigma 70 de la RNA polimerasa tiene una longitud de 1857 pb, de los cuales se han amplificado fragmentos de entre 902 y 1160 pb (Ver Tabla 10 y Figura 10).

**Tabla 10.** Mezcla de PCR para la amplificación del gen *rpoD*.

<b>MEZCLA <i>rpoD</i></b>	
DNA genómico	400 ng
Cebador 70Fs o Fa 10 $\mu$ M	5 $\mu$ l
Cebador 70Rs o Ra 10 $\mu$ M	5 $\mu$ l
dNTPs mix 1,25 mM	12 $\mu$ l
Tampón de PCR (500 mM KCl, 150 mM Tris/HCl, 15 mM MgCl <sub>2</sub> , pH 8)	5 $\mu$ l
Ampli Taq Gold® 5U/ $\mu$ l	0,5 $\mu$ l
Agua MILLI-Q® qsp	50 $\mu$ l



**Figura 11.** Condiciones de PCR para el gen *rpoD* utilizando los cebadores 70Fs y 70Rs.



**Figura 12.** Condiciones de PCR para el gen *rpoD* utilizando los cebadores Fa y Ra.



### 3.5.5 Electroforesis en gel de agarosa

Se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 1% en TBE x 1 (100 mM Tris, 100 mM ácido bórico y 0,4 mM EDTA pH 8) para determinar si la amplificación había sido correcta, utilizando la siguiente metodología:

- Añadir 50 ml de tampón TBE x1 a 0,5 g de agarosa, type I (Sigma-Aldrich) en una botella de Pyrex de 100 ml.
- Fundir la mezcla en microondas durante aproximadamente 2 minutos, hasta que se observó que la mezcla era completamente homogénea y transparente.
- Dejar enfriar la mezcla hasta alcanzar aproximadamente 50 °C y añadir 4 µl de Gel Red™.
- Verter la mezcla en el molde que contiene los peines que formarán los pocillos una vez solidificado el gel.
- Dejar solidificar el gel durante 45 minutos.
- Retirar los peines y colocar el gel en la cubeta de electroforesis, asegurándose de que todo el gel queda cubierto con la solución tampón TBE.
- Preparación de las muestras:
  - Mezclar en un tubo eppendorf, 5µl del amplificado de PCR, 2µl de tampón de carga y 3µl de agua Milli-Q®.
- Proceso electroforético:
  - Cargar las muestras en pocillos independientes del gel de agarosa, así como 5µl de un patrón de pesos moleculares (Real Escala N°1 RBMM1, Durviz®).
  - Conectar la cubeta de electroforesis a la fuente de alimentación a 90V durante 45 min.
  - Visualizar las bandas de DNA, colocando el gel de agarosa en un transiluminador con luz ultravioleta a 312 nm de longitud de onda (Fisher Scientific, Pittsburg, PA, USA).

### 3.5.6 Purificación del DNA amplificado

Para eliminar los restos de reactivos de la PCR que pueden provocar interferencias durante el proceso de secuenciación, se procedió a purificar el DNA amplificado mediante el kit comercial MSB®Spin PCRapace, este kit permite purificar fragmentos de DNA, de entre 80 bp y 30 kb. Se siguió el protocolo propuesto por el fabricante:

- Añadir en un eppendorf el contenido del DNA amplificado por PCR con 250 µl de la solución de “Binding Buffer”.
- Transferir esta mezcla a un eppendorf de 2 ml que contiene una columna con una membrana de sílice.
- Se centrifuga durante 3 min a 12.000 rpm.
- Traspasar la columna al eppendorf receptor proporcionado por el “kit”.
- Añadir entre 10 y 30 µl de “Buffer Elution”.
- Incubar a temperatura ambiente durante un minuto y centrifugar durante un min a 10.000 rpm.

### 3.5.7 Secuenciación de los fragmentos génicos amplificados

Para la secuenciación de los fragmentos génicos, amplificados previamente por PCR, se ha utilizado la secuenciación automática de DNA desarrollada por Applied Biosystems™ que utiliza la metodología de Sanger. Esta metodología utiliza una polimerasa termoestable que permite una reacción de secuenciación cíclica. El producto de la reacción se separa mediante electroforesis capilar y detección de fluorescencia inducida por láser. La secuenciación del fragmento amplificado nos permite conocer la secuencia nucleotídica de este fragmento.

La detección de cada una de las bases se realiza por el método de terminación de cadena en el que los ddNTPs se encuentran marcados con 4 fluorocromos distintos, de tal forma que a medida que se incorporan y detienen la

elongación, marcan la base que han incorporado. Estos fluorocromos están incorporados en el kit Big Dye que se utiliza y que incluye la polimerasa, el MgCl<sub>2</sub>, los dNTPs, dNTPs marcados y tampón. La reacción de marcaje de secuenciación se realiza mediante la PCR (Trun y Trempy, 2004).

La secuenciación se realizó utilizando los mismos cebadores que en la amplificación (Tabla 6). Además, para secuenciar los fragmentos de *dnaJ*, *gyrB* y *rpoD* debido a que eran fragmentos muy largos, se diseñaron cebadores internos (Tabla 11) obteniendo la secuencia en varias partes que posteriormente se ensamblaron.

**Tabla 11.** Cebadores internos utilizados en la secuenciación.

<b><i>dnaJ</i></b>	
F5: CAGATGCGYCAGGGCTTCTT (Diseñado para este estudio)	T <sub>m</sub> 60,4°C
R5: AAGAAGCCCTGRCGCATCTG (Diseñado para este estudio)	T <sub>m</sub> 60,4°C
<b><i>gyrB</i></b>	
7F: GGGGTCTACTGCTTCACCAA (Yáñez y col., 2003)	T <sub>m</sub> 59,4°C
7Fa: TATCAGGAAGGGGYTACTGC (Diseñado para este estudio)	T <sub>m</sub> 58,8°C
10R: AAGTTCTCCTCCCAGACCAA (Diseñado para este estudio)	T <sub>m</sub> 57,3°C
9R: GCCGTTATCTCCGTCAAGGT (Yáñez y col., 2003)	T <sub>m</sub> 59,4°C
9Ra: GACTTGGCCTTCTTGCTGTA (Diseñado para este estudio)	T <sub>m</sub> 57,3°C
<b><i>rpoD</i></b>	
Fs1: GTCAATTCCGCTGATGC (Soler y col., 2004)	T <sub>m</sub> 56,0°C
Fs2: CTGGTCAACAACATGCGCGA (Diseñado para este estudio)	T <sub>m</sub> 59,4°C
Rs1: ATCATCTCGCGCATGTTGT (Soler y col., 2004)	T <sub>m</sub> 56,0°C

La reacción de secuenciación tuvo lugar para todos los genes en un volumen final de 20 µl. Se realizó una reacción de secuenciación para cada uno de los cebadores utilizados. Cada mezcla de secuenciación estuvo formada por DNA amplificado por PCR, cebador 5 ó 10 µM (Isogen Life Science), tampón de secuenciación (Applied Biosystems™), BigDye® Terminator v3.1 (Applied Biosystems™) y agua MILLI-Q®.

### 3.5.7.1 Condiciones de secuenciación del gen *cpn60*

Se secuenció un fragmento de 555 pb que corresponde a la región UT (“universal target”), a partir del amplicón de 764 pb (Tabla 12).

**Tabla 12.** Mezcla y condiciones de secuenciación para el gen *cpn60*.

<b>MEZCLA de secuenciación <i>cpn60</i></b>		<b>Condiciones de secuenciación</b>
DNA	110 µg	96°C durante 1min
Cebador 5 µM	1 µl	96°C durante 10 seg
Buffer, de secuenciación	3 µl	52°C durante 5seg } 25 ciclos
BigDye® Terminator v3.1	1µl	60°C durante 1min }
Agua MILLI-Q® qsp	20 µl	∞ a 4°C

### 3.5.7.2 Condiciones de secuenciación del gen *dnaJ*

A partir de los fragmentos amplificados de entre 934 y 974 pb, se secuenció un fragmento de 891 pb (Tabla 13)

**Tabla 13.** Mezcla y condiciones de secuenciación para el gen *dnaJ*.

<b>MEZCLA de secuenciación <i>dnaJ</i></b>		<b>Condiciones de secuenciación</b>
DNA	85 µg	96°C durante 1min
Cebador 5 µM	1 µl	96°C durante 10 seg
Buffer, de secuenciación	3 µl	57°C durante 5seg } 25 ciclos
BigDye® Terminator v3.1	1µl	60°C durante 1min }
Agua MILLI-Q® qsp	20 µl	∞ a 4°C

### 3.5.7.3 Condiciones de secuenciación del gen *gyrB*

Del gen *gyrB*, se secuenció un fragmento de 1089 pb en todas las especies de *Aeromonas* incluidas en este estudio, a excepción de *A. hydrophila* en que se secuenció 1086 pb, debido a una deleción en este gen (Tabla 14).

**Tabla 14.** Mezcla y condiciones de secuenciación para el gen *gyrB*.

<b>MEZCLA de secuenciación <i>gyrB</i></b>		<b>Condiciones de secuenciación</b>
DNA	110 µg	96°C durante 1min
Cebador 5 µM	1 µl	96°C durante 10 seg
Buffer, de secuenciación	3 µl	57°C durante 5seg
BigDye® Terminator v3.1	2µl	60°C durante 1min
Agua MILLI-Q® qsp	20 µl	∞ a 4°C

} 25 ciclos

### 3.5.7.4 Condiciones de secuenciación del gen *rpoD*

Se secuenciaron fragmentos de 837 pb de este gen, a partir de los fragmentos amplificados por PCR (Tablas 15 y 16).

**Tabla 15.** Mezcla de secuenciación para el gen *rpoD*.

<b>MEZCLA de secuenciación <i>rpoD</i></b>	
DNA	110 µg
Cebador 5 µM	1 µl
Buffer, de secuenciación	3 µl
BigDye® Terminator v3.1	2µl
Agua MILLI-Q® qsp	20 µl

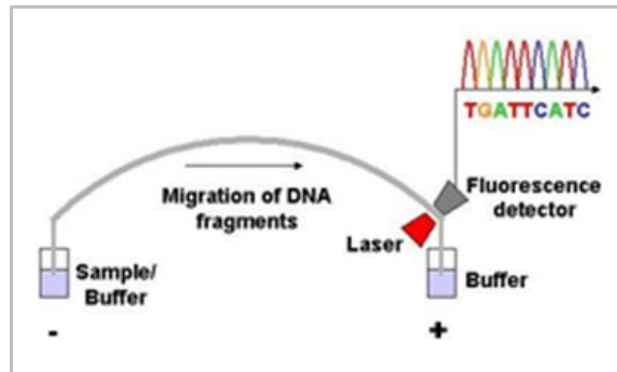
**Tabla 16.** Condiciones de secuenciación para el gen *rpoD*.

<b>Condiciones de secuenciación con los cebadores Fs y Rs</b>	<b>Condiciones de secuenciación con los cebadores Fa y Ra</b>
96°C durante 1min	96°C durante 1min
96°C durante 10 seg	96°C durante 10 seg
50°C durante 5seg	54°C durante 5seg
60°C durante 1min	60°C durante 1min
∞ a 4°C	∞ a 4°C

} 25 ciclos

El resto del proceso se llevó a cabo en la Unidad de Genómica de los Centros Científicos y Tecnológicos de la UB (CCITUB). Donde las muestras fueron filtradas por un sistema de filtración de membrana para eliminar los ddNTP's fluorescentes y procesadas por un secuenciador capilar ABI PRISM 3700 DNA (Applied-Biosystems), que por electroforesis separa los fragmentos de DNA secuenciados para que un

lector láser capte la fluorescencia emitida por cada base, esta información es interpretada por un sistema informático para transformarla en un electroferograma (Figura 13).



**Figura 13.** Fragmentos de DNA pasan a través de un haz láser y son captados por el detector óptico.

Una vez recibidos los electroferogramas se ensamblaron los distintos fragmentos de cada gen, para cada una de las cepas del estudio, de esta forma se obtuvieron las cadenas “forward” y “revers” completas, que se compararon entre sí para tener la secuencia consenso.

### 3.5.8 Análisis filogenético

#### 3.5.8.1 Alineamientos múltiples y elaboración de árboles filogenéticos

Para realizar el análisis filogenético de las cepas incluidas en este estudio, se realizaron alineamientos múltiples con las secuencias parciales de cada uno de los genes utilizando el programa Clustal W, incluido en el paquete informático MEGA 5 (“Molecular Evolutionary Genetics Analysis”) (Tamura y col., 2011).

Se elaboró un concatenado con las secuencias de los cuatro genes, para ello se utilizó el programa informático DAMBE (“Data Analysis in Molecular Biology and Evolution”) (Xia & Xie., 2001). Se elaboraron árboles filogenéticos para cada uno de los genes y para el concatenado utilizando los métodos ML (“Maximum Likelihood”) y NJ (“Neighbor Joining”). El modelo evolutivo, que se aplicó en cada caso, fue

determinado con MEGA 5. En los árboles en que se utilizó el método NJ se utilizó el modelo JC (“Jukes Cantor”). En todos los árboles se utilizó un “bootstrap” de 500 réplicas a excepción de los que se elaboraron con el método JC en que se realizaron 1000 réplicas. A partir de los alineamientos múltiples de cada uno de los genes y del concatenado, se calculó la distancia evolutiva entre las 128 secuencias, así como la distancia media para cada especie del complejo de *Aeromonas hydrophila* (AHC), en ambos casos se realizaron 500 réplicas con con el programa MEGA 5. Se utilizó el programa DnaSP (Librado y Rozas, 2009) para calcular el porcentaje guanina más citosina (% G+C) para cada uno de los genes estudiados y para el concatenado. Este programa también nos permitió determinar el número de sitios polimórficos así como los “parsimony informative sites” (sitios que tienen un mínimo de dos nucleótidos que están presentes al menos dos veces).

### 3.5.8.2 Estudio de la estructura poblacional

Primeramente se definieron los tipos alélicos (AT) asignando un alelo distinto a cada secuencia diferente, aunque únicamente difiriera en un nucleótido, utilizando el programa DnaSP (Librado y Rozas, 2009). Para cada cepa se definió un perfil alélico compuesto por todos los ATs de los loci estudiados. Los distintos perfiles alélicos determinados en la población estudiada se denominan secuencias tipo (ST). A partir de los perfiles alélicos se determinaron los siguientes parámetros:

- **Diversidad genética  $H$ :**

Es la probabilidad de que aleatoriamente dos secuencias sean diferentes y se define como:

$$H = \frac{n}{n-1} \left( 1 - \sum_{i=1}^h p_i^2 \right)$$

Donde  $n$  es el número de secuencias,  $h$  el número de haplotipos (número de secuencias diferentes) y  $P_i$  es la frecuencia relativa del haplotipo  $i$ . La diversidad genética se calculó utilizando el programa DnaSP.

- **Diversidad nucleotídica  $P_i$  (Jukes Cantor):**

Es el número medio de sustituciones de nucleótidos por sitio, entre dos secuencias, obtenido mediante la corrección Jukes Cantor. La diversidad nucleotídica se calculó utilizando el programa DnaSP.

- **Sustituciones sinónimas y no sinónimas:**

Con estos parámetros se estudia el tipo de selección a la que ha estado sometida la población estudiada en base a las sustituciones sinónimas ( $d_S$ ) y las sustituciones no sinónimas ( $d_N$ ). Si  $d_N = d_S$ , se cumplirá la hipótesis de neutralidad. Si  $d_N / d_S > 1$  indica selección positiva y si  $d_N / d_S < 1$  la población se encuentra bajo selección purificadora.  $d_N$  y  $d_S$  se calcularon con el programa MEGA 5 (Tamura y col., 2011).

- **Índice de asociación  $I_A$ :**

Este índice estadístico cuantifica el desequilibrio de ligamiento presente en una población a partir del perfil alélico de cada una de las cepas. Este índice compara la varianza observada ( $V_O$ ) y la varianza esperada ( $V_E$ ) en equilibrio de ligamiento, el valor de  $I_A$  depende del número de loci analizados. El  $I_A$  se calculó con el programa informático START2 (Jolley y col., 2001) con 1000 repeticiones.

$$I_A = (V_O / V_E) - 1$$

- **Índice de asociación  $I_A^S$  estandarizado:**

Este índice estadístico es una variación de  $I_A$  cuyo valor no depende del número de loci analizado.  $I_A^S$  se calculó con el programa informático START2 con 1000 repeticiones.



$$I_A^S = (1/l-1) I_A$$

### 3.5.8.3 Detección de eventos de recombinación

Los posibles eventos de recombinación se detectaron mediante el paquete informático RDP4 (Martin y col., 2010), este paquete informático está compuesto de distintos programas basados en diferentes metodologías:

- Métodos filogenéticos: Bootscanning, RDP.
- Métodos de sustitución nucleotídica: Geneconv, Maxchi, Chimaera, Sis-Scan.

Para la detección de los posibles eventos de recombinación se han utilizado las secuencias concatenadas con la finalidad de aumentar el grado de divergencia entre las secuencias y así facilitar la detección de recombinación.

## 3.6 Detección de genes de virulencia

En este trabajo se ha realizado la detección de tres genes de virulencia, los genes *aer*, *alt*, y *ast*, en el total de 128 cepas estudiadas. La detección de estos tres genes se realizó mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Primeramente se realizó la extracción de DNA genómico (ver 3.5.2) de las 128 cepas bacterianas incluidas en el estudio.

A continuación se describen los cebadores utilizados para la detección de los genes aerolisina (*aer*), toxina citotónica termolábil (*alt*) y toxina citotónica termoestable (*ast*).

Los cebadores *aer-f-d* y *aer-r-d* han sido diseñados a partir de los cebadores *aer-f* y *aer-r* publicados por Soler y col. (2002), en *aer-f-d* y *aer-r-d* se han agregado degeneraciones en algunas posiciones. En cambio, *F-Ah-a* y *R-Ah-9* se diseñaron a partir de las secuencias del gen que codifica para la aerolisina de *A. hydrophila* ATTC

7966<sup>T</sup>, *A. salmonicida* A449 y *A. veronii* B565, como se explica en el (Apartado 3.5.4.1) (Tabla 17).

**Tabla 17.** Cebadores utilizados para la detección del gen *aer*.

<b>aer-f-d:</b> CCTAYRGCCTGAGCGAGAAG	$T_m$ 61,4°C
<b>F-Ah-a:</b> ATCATATCCGGCCTGCTGA	$T_m$ 56,7°C
<b>aer-r-d:</b> CCAGTTCCARTCCSACCACT	$T_m$ 61,4°C
<b>R-Ah-9:</b> ATCTTCACCGGGATCTTGGA	$T_m$ 57,3°C

**Tabla 18.** Cebadores utilizados para la detección del gen *alt*.

<b>F2:</b> AGCGCATAGGCGTTCTCT T	$T_m$ 57,3°C
<b>R2:</b> AAAGCGTCTGACAGCGAAGT	$T_m$ 56,7°C

Los cebadores utilizados para la amplificación de los genes *alt* y *ast*, proceden de otros trabajos publicados por Sen y Rodgers (2004) y Aguilera-Arreola y col. 2005)(Tablas 19 y 20).

**Tabla 19.** Cebadores utilizados para la detección del gen *ast*.

<b>F1:</b> TCTCCATGCTTCCCT TCCA	$T_m$ 49°C
<b>F2:</b> ATCGTCAGCGACAGCTTC TT	$T_m$ 49°C
<b>R1:</b> GTGTAGGGATTGAAGAAGCCG	$T_m$ 49°C
<b>R2:</b> CTCATCCCTTGGCTTGTTGT	$T_m$ 49°C

La reacción de PCR se llevó a cabo en un volumen de 50 µl, que contenía el DNA genómico, los cebadores (Isogen Life Science), Taq polimerasa (Applied Biosystems™), dNTPs mix (dATP,dCTP, dGTP y dTTP) (Applied Biosystems™) a una concentración equimolar de 25 mM, y tampón de PCR (Applied Biosystems™). Las amplificaciones se realizaron en un termociclador Applied Biosystems 2720.

A continuación se muestra cuáles fueron las composiciones de cada una de las mezclas de PCR y las condiciones de amplificación:

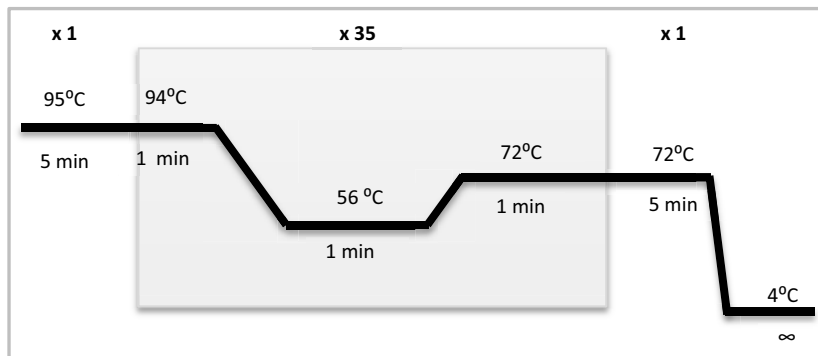
### 3.6.1 Aerolisina (*aer*)

La detección el gen de la aerolisina se realizó mediante la amplificación de un fragmento de 402 pb de un total de 2528 pb, que corresponde a la longitud total de este gen (Tabla 20 y Figura 14).

**Tabla 20.** Mezcla de PCR para la detección del gen *aer*.

**MEZCLA PCR 1**

DNA genómico	400 ng
Cebador aer-f-d 10 µM	5 µl
Cebador aer-r-d 10 µM	5 µl
dNTPs mix 1,25 mM	12 µl
Tampón de PCR (500 mM KCl, 150 mM Tris/HCl, 15 mM MgCl <sub>2</sub> , pH 8	5µl
Ampli Taq Gold® 5U/µl	0,5µl
Agua MILLI-Q® qsp	50 µl



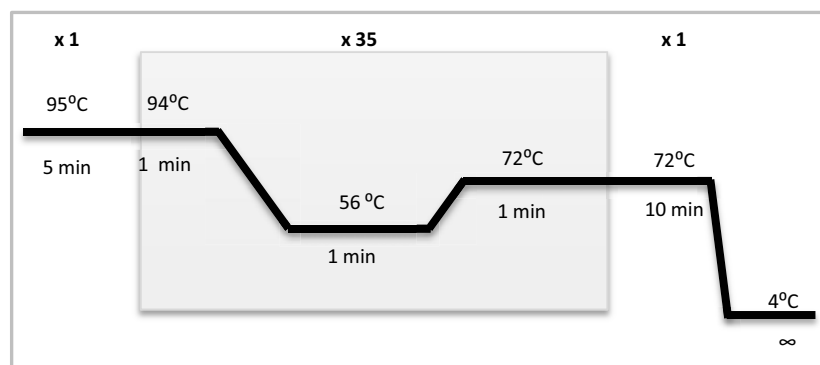
**Figura 14.** Condiciones de PCR para la amplificación del gen *aer*.

Las muestras que fueron negativas con estas condiciones de PCR, se ensayaron con una pareja de cebadores distinta, en este segundo caso las condiciones de PCR utilizadas fueron las siguientes (Tabla 21 y Figura15).

**Tabla 21.** Mezcla de PCR utilizada para la detección del gen *aer*.

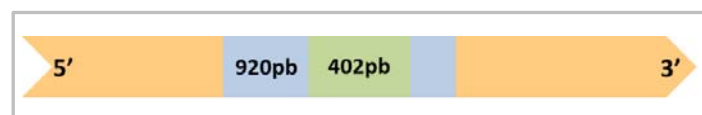
**MEZCLA PCR 2**

DNA genómico	400 ng
Cebador F-Ah-a 10 µM	5 µl
Cebador R-Ah-9 10 µM	5 µl
dNTPs mix 1,25 mM	12 µl
Tampón de PCR (500 mM KCl, 150 mM Tris/HCl, 15 mM MgCl <sub>2</sub> , pH 8	5 µl
Ampli Taq Gold® 5U/µl	0,5µl
Agua MILLI-Q® qsp	50 µl



**Figura 15.** Condiciones de PCR utilizadas en la primera amplificación de la PCR anidada.

En algunas de las muestras, al comprobar mediante electroforesis en gel de agarosa el resultado de la amplificación, se obtuvieron bandas muy tenues, por lo que el resultado de la PCR no era concluyente, para verificar que el resultado era positivo, se realizó una PCR anidada, aprovechando que los cebadores *aer-f-d* y *aer-f-r* amplifican una región interna de la región amplificada por *F-Ah-a* y *R-Ah-9*. Para ello se realizó la PCR utilizando el producto de PCR de la primera amplificación en sustitución de DNA (Figura 16).

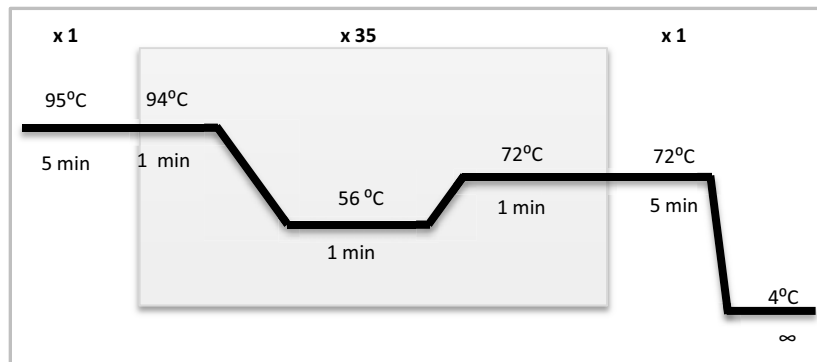


**Figura 16.** Gen *aer* donde en azul se muestra la región amplificada en la primera amplificación de la PCR anidada y en verde el segundo fragmento amplificado.

Para la PCR anidada se utilizaron las siguientes condiciones de amplificación (Tabla 22 y Figura 17).

**Tabla 22.** Mezcla de PCR utilizada en la segunda amplificación de la PCR anidada.

<b>MEZCLA PCR anidada</b>	
Purificado PCR 2	50 ng
Cebador aer-f-d 10 µM	5 µl
Cebador aer-r-d 10 µM	5 µl
dNTPs mix 1,25 mM	12 µl
Tampón de PCR (500 mM KCl, 150 mM Tris/HCl, 15 mM MgCl <sub>2</sub> , ph 8	5µl
Ampli Taq Gold® 5U/µl	0,5µl
Agua MILLI-Q® qsp	50 µl



**Figura 17.** Condiciones de PCR de la segunda amplificación de la PCR anidada.

### 3.6.2 Gen *alt* (toxina citotónica termolábil)

El gen *alt* tiene una longitud de 1371 pb, para su detección se amplificaron fragmentos de 320 pb (Tabla 23 y Figura 18).

**Tabla 23.** Mezcla de PCR para la detección del gen *alt*.

<b>MEZCLA PCR <i>alt</i></b>	
DNA genómico	200 ng
Cebador <i>alt</i> -F2 10 µM	1 µl
Cebador <i>alt</i> -R2 10 µM	1 µl
dNTPs mix 10 mM	4 µl
Tampón de PCR (500 mM KCl, 150 mM Tris/HCl, 15 mM MgCl <sub>2</sub> , pH 8	5µl
Ampli Taq Gold® 5U/µl	0,25µl
Agua MILLI-Q® qsp	50 µl

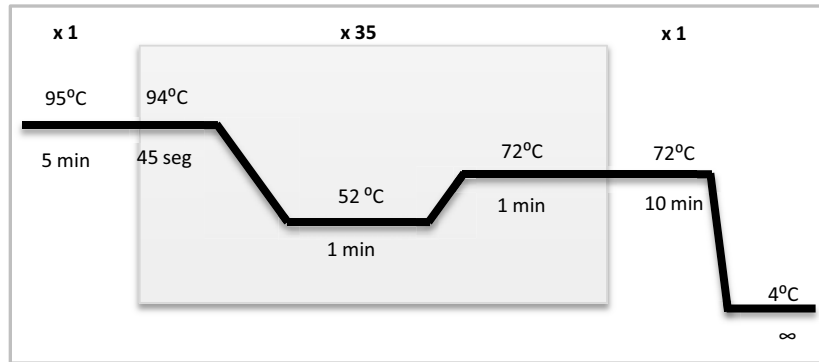


Figura 18. Condiciones de PCR para la amplificación del gen *alt*.

### 3.6.3 Gen *ast* (toxina citotónica termoestable)

El gen *ast* tiene una longitud total de 4623 pb, su detección se ha realizado mediante la amplificación de fragmentos de 331 pb (tabla 24 y Figura 19) y 504 pb (tabla 25 y Figura 20).

Tabla 24. Mezcla de PCR para la detección del gen *ast* mediante la amplificación de un fragmento de 331 pb.

**MEZCLA PCR 1 *ast***

DNA genómico	450 ng
Cebador <i>ast</i> -F2 10 μM	4 μl
Cebador <i>ast</i> -R2 10 μM	4 μl
dNTPs mix 10 mM	2 μl
Tampón de PCR (500 mM KCl, 150 mM Tris/HCl, 15 mM MgCl <sub>2</sub> , pH 8)	5 μl
Ampli Taq Gold® 5U/μl	0,25 μl
Agua MILLI-Q® qsp	50 μl

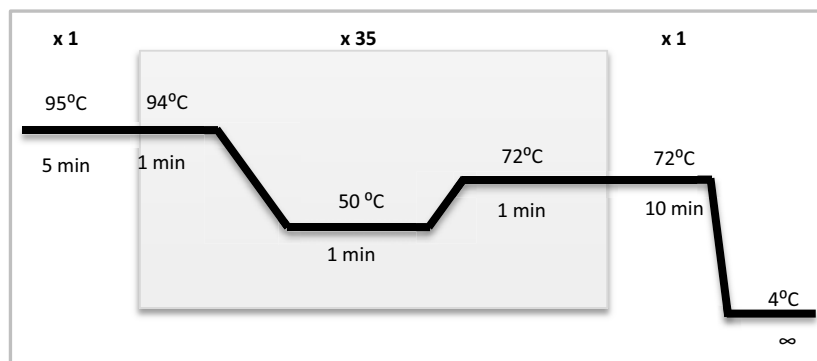


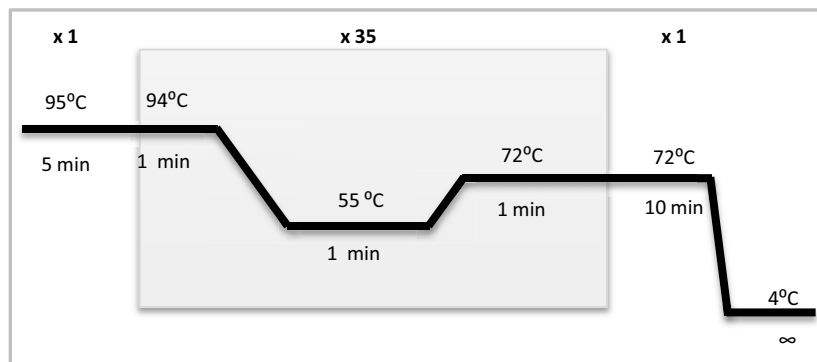
Figura 19. Condiciones de PCR para el fragmento de 331 pb.

Las cepas en las que el resultado fue negativo con esta pareja de cebadores se ensayaron con otro par, el *ast*-F1 y *ast*-R1, utilizando las siguientes condiciones:

**Tabla 25.** Mezcla de PCR para la detección del gen *ast* mediante la amplificación de un fragmento de 504 pb.

**MEZCLA PCR 2 *ast***

DNA genómico	450 ng
Cebador <i>ast</i> -F1 10 µM	4 µl
Cebador <i>ast</i> -R1 10 µM	4 µl
dNTPs mix 10 mM	2 µl
Tampón de PCR (500 mM KCl, 150 mM Tris/HCl, 15 mM MgCl <sub>2</sub> , pH 8	5µl
Ampli Taq Gold® 5U/µl	0,25µl
Agua MILLI-Q® qsp	50 µl



**Figura 20.** Condiciones de PCR para el fragmento de 504 pb

### 3.7 Determinación de actividades enzimáticas

Todos los medios de cultivo se sembraron a partir de un crecimiento de las distintas cepas en placas de TSA, la siembra se realizó haciendo una estría con un mondadientes estéril.

Como medida de control de los resultados de las pruebas enzimáticas se repitió un 10% de las pruebas.

La composición de todos los medios de cultivo, soluciones salinas, reactivos y colorantes, se detallan en los Anexos 8.2 y 8.3.

### 3.7.1 Hidrólisis de almidón

Medio: agar almidón (Adsa 1-283).

Incubación: 24-48 horas.

Lectura: se inundan las placas con lugol, la presencia de un halo transparente alrededor del crecimiento bacteriano indica que la prueba es positiva (Reddy y col., 2007).

Controles: *Bacillus subtilis* ATTC 6633 como control (+), *Escherichia coli* CECT 405 como control (-).

### 3.7.2 Hidrólisis de caseína

Medio: TSA (Conda 1068.05) + 2% de “skim milk” (Difco 0032-17/232100).

Incubación: 24-48h.

Lectura: la presencia de zonas claras alrededor del crecimiento indica la proteólisis de la caseína (Reddy y col., 2007).

Controles: *Bacillus subtilis* ATTC 6633 como control (+), *Escherichia coli* CECT 405 como control (-).

### 3.7.3 Hidrólisis de gelatina

Medio: TSA + 0,4% gelatina (Cultimed 403902).

Incubación: 24-48 h.

Lectura: se inunda la placa con ácido tánico al 1%, en las cepas positivas se observa un halo transparente alrededor del crecimiento bacteriano (Pickett y col., 1991; Miñana i Galbis, 2002).



Controles: *Aeromonas bivalvium* 868E<sup>T</sup> como control (+), *Escherichia coli* CECT 405 como control (-).

#### **3.7.4 Hemólisis**

Medio: agar Columbia con sangre de oveja (Oxoid PB5039A).

Incubación: 48h-4 días.

Lectura: la  $\beta$ -hemólisis produce una lisis completa de los hematíes, observándose un halo trasparente alrededor del crecimiento bacteriano, si se produce  $\alpha$ -hemólisis se observa coloración verdosa alrededor del crecimiento bacteriano debido a la hemólisis parcial de los hematíes (Reddy y col., 2007).

#### **3.7.5 Hidrólisis DNA**

Medio: agar DNA (Difco 0632-17-7) + 1% de azul de toluidina.

Incubación: 4 días.

Lectura: Las cepas positivas crean un halo rosado alrededor del crecimiento bacteriano (Reddy y col., 2007).

Controles: *Aeromonas molluscorum* 848T<sup>T</sup> como control (+), *Escherichia coli* CECT 405 como control (-).

#### **3.7.6 Hidrólisis de elastina**

Medio: agar elastina

Incubación: 15 días.

Lectura: en las cepas positivas se observa un halo transparente alrededor del crecimiento bacteriano (Popoff and Lallier, 1984).

Controles: *Aeromonas bestiarum* CECT 4227<sup>T</sup> como control (+), *Aeromonas bivalvium* 868E<sup>T</sup> como control (-).

### 3.7.7 Hidrólisis de lecitina

Medio: agar yema de huevo.

Incubación: 15 días.

Lectura: las cepas productoras de lecitinasa forman una zona opaca a su alrededor (Esselmann y Liu, 1961).

Controles: *Bacillus cereus* ATTC 10876 como control (+), *Bacillus subtilis* ATTC 6633 como control (-).

## 3.8 Prueba de sensibilidad “in vitro” a antibióticos

Se determinó la sensibilidad a 21 antibióticos mediante el método de difusión en placa para ello se utilizaron placas de Mueller-Hinton y discos de antibiograma (Biomérieux)

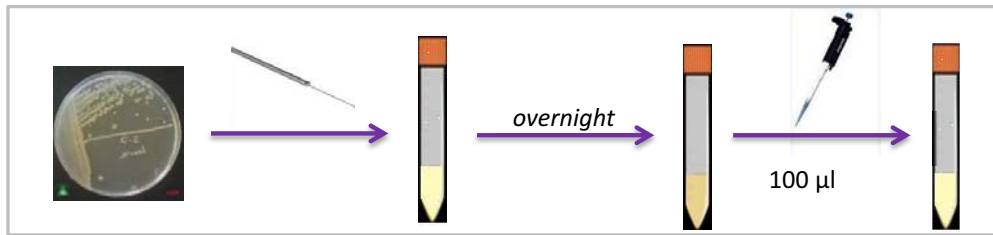
Los antibióticos ensayados se muestran en el Anexo 8.7.

Medio: agar Mueller-Hinton (Oxoid CM337).

Incubación: 24h.

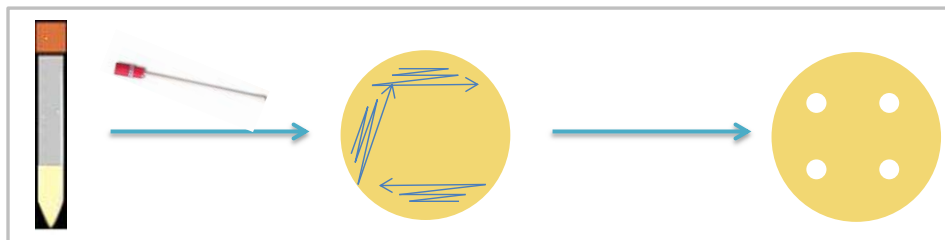
El protocolo utilizado fue el siguiente (Figura 21 y 22).

- Inocular una colonia de la cepa a ensayar en un tubo con 5 ml de caldo Mueller-Hinton
- Incubar “overnight” a 30°C.



**Figura 21.** Preparación del inóculo para el antibiograma.

- Inocular 100 µl del cultivo “overnight” en 5 ml de caldo Mueller-Hinton fresco.
- Incubar a 30°C hasta obtener una turbidez equivalente a 0,5 en la escala de McFarland ( $10^8$  ufc/ml).
- Sembrar las placas, deslizando un escobillón estéril, en 3 direcciones, por toda la superficie de la placa.
- Depositar 4 discos de antibióticos distintos en la superficie del agar con unas pinzas metálicas desinfectadas con etanol.



**Figura 22.** Antibiograma.

Lectura: se midieron los diámetros de los halos de inhibición, en mm. Los diámetros medidos para cada disco fueron interpretados según de pautas publicadas por el NCCLS, según éstas los microorganismos son clasificados como sensibles, intermedios o resistentes al agente antimicrobiano (Murray y Baron, 2003).

### 3.9 Estudio “in vitro” de adherencia y efecto citopático

#### 3.9.1 Línea celular

Para los estudios de determinación de la adherencia y efecto citopático, la línea celular utilizada fue la Caco-2, ATCC® HTB-37™, esta línea celular está formada por células epiteliales provenientes de adenocarcinoma de colon humano. La línea celular se cultivó en medio completo que está compuesto por DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium high glucose, glutaMAX) (Invitrogen 31966-021) suplementado con 10% de FBS (“foetal bovine serum heat inactivated”)( Invitrogen 10500-064) y 1% de penicilina-estreptomicina (Invitrogen 15140-122). El cultivo se realizó en frascos de 75 cm<sup>2</sup> (Cultek 430641) y se incubó a 37°C y un 5% de CO<sub>2</sub> en un incubador Nuair (UN-4850). La manipulación del cultivo celular se realizó siempre en una cabina de seguridad biológica clase II (Nuair).

#### 3.9.2 Recuperación y cultivo de la línea celular

- Descongelar, a temperatura ambiente, un vial que contiene  $1-7 \times 10^6$  células/ml., en un volumen de 1,5 ml de medio completo con un 10% de DMSO (Sigma 41639).
- Traspasar el contenido a un tubo de centrifuga.
- Centrifugar a 3000 rpm durante 5 min.
- Eliminar el sobrenadante y resuspender el sedimento obtenido en 1 ml de medio completo.
- Transferir la suspensión celular a un frasco de cultivo con 11 ml de medio completo.
- Incubar la línea celular a 37°C y un 5% de CO<sub>2</sub>.
- Transcurridas 48 horas de incubación, comprobar el crecimiento de la línea celular, observando en microscopio invertido (Leica) un crecimiento semiconfluente en la base del frasco (Freshney, 2005).

### 3.9.3 Mantenimiento de la línea celular

Para el mantenimiento de la línea celular, se renovó el medio a las 48 horas de su recuperación según la siguiente metodología:

- Aspirar todo el medio de cultivo con ayuda de una pipeta pasteur conectada a una bomba de vacío.
- Realizar dos lavados con 5 ml de D-PBS (Dulbecco's Phosphate Buffered Saline x1) (Invitrogen 14190-094).
- Añadir 12 ml de medio completo al frasco de cultivo FBS (Freshney, 2005).
- Transcurridos 4 días desde la descongelación de las células se procedió a la tripsinización, con el objetivo de separar las células entre si y de la superficie del frasco de cultivo, para ello se siguió el siguiente protocolo:
  - Aspirar el medio de cultivo.
  - Realizar dos lavados con 5 ml de D-PBS.
  - Añadir 1,4 ml de tripsina-EDTA (Invitrogen 25200-056).
  - Incubar a 37°C y 5% CO<sub>2</sub>, durante 5 minutos.
  - Resuspender con 5 ml de medio completo.

La suspensión celular obtenida como resultado de la tripsinización se dividió en tres alícuotas, con cada una de ellas se inoculó un frasco de cultivo y se añadió medio completo hasta un volumen final de 12 ml (Freshney, 2005).

### 3.9.4 Preparación de las cepas bacterianas

La recuperación de las cepas bacterianas conservadas a -40°C en TSB con un 20% de glicerol o en criobolas, se llevó a cabo de la siguiente forma:

- Inocular 50 µl de un vial de TSB-glicerol, que contenía la cepa bacteriana o una criobola en 5 ml de TSB suplementado con 1% de NaCl.
- Incubar a 30°C durante 24 horas.
- Sembrar por estría de agotamiento en TSA suplementado con 1% de NaCl.

- Comprobar que se ha obtenido un cultivo puro.

Para realizar la infección “in vitro” de las células Caco-2 con las cepas bacterianas, es necesario tener una concentración bacteriana de  $1 \times 10^8$  cél/ml, para tener una relación 1:10, entre las células Caco-2 y las células bacterianas, para ello se realizó un cultivo “overnight” en TSB doble concentrado sin dextrosa (Scharlau 02-227), una vez incubadas las cepas bacterianas se realizaron 2 lavados con D-PBS. La densidad del cultivo se calculó tanto por el cálculo de células viables como por medición de la densidad óptica, de esta forma se determinó que una absorbancia de 0.35 nm determinada a una  $\lambda$  de 580 nm, corresponde a una concentración bacteriana de  $1 \times 10^8$  cél/ml) (Couto y col., 2007).

### **3.9.5 Infección de la línea celular Caco-2 con las cepas bacterianas**

Para realizar el ensayo “in vitro”, con la finalidad de determinar la adherencia de las cepas bacterianas y el posible efecto citopático que causan sobre células Caco-2, se puso en contacto las distintas cepas bacterianas con un cultivo semiconfluyente al 80% de la línea celular Caco-2.

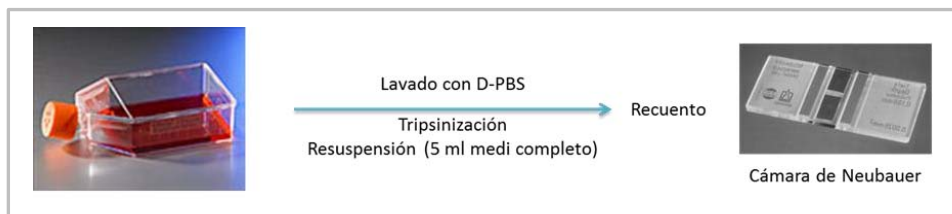
El ensayo “in vitro” de adherencia se realizó en placas de 24 pocillos, donde cada uno de los pocillos tiene una superficie de  $1,9 \text{ cm}^2$ . Antes de sembrar cada uno de los pocillos se depositó un portaobjetos circular, estéril, de 13 mm de diámetro en el fondo de cada uno de los pocillos.

Para ajustar la concentración bacterias/células Caco-2 a una proporción 1:10 se realizó una dilución 1:10 de la suspensión bacteriana con D-MEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) + 5% de FBS (Suero Bovino Fetal) para que la concentración final de células bacterianas fuese de  $1 \times 10^7$  cél/ml.

### 3.9.5.1 Preparación de la placa de 24 pocillos

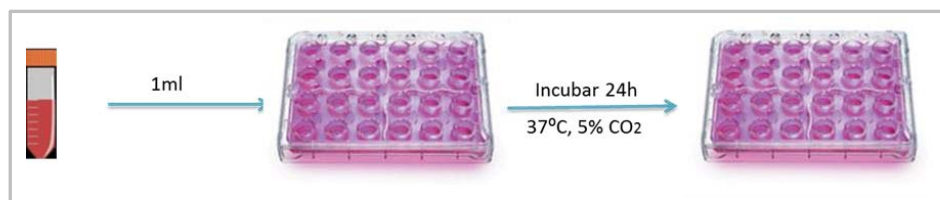
La infección “in vitro” se realizó en placas de 24 pocillos (Cultek 3524). Con el objetivo de realizar la infección a un cultivo semiconfluyente al 80% de células Caco-2, 24 h antes del proceso de infección se inoculó 1 ml de una suspensión de células Caco-2 a una concentración  $3 \times 10^5$  cél/ml en medio completo, para ello se actuó de la siguiente forma (Figuras 23-26).

- Tripsinización de un frasco de cultivo.
- Recuento en cámara de Neubauer (Scharlab 022-717805).



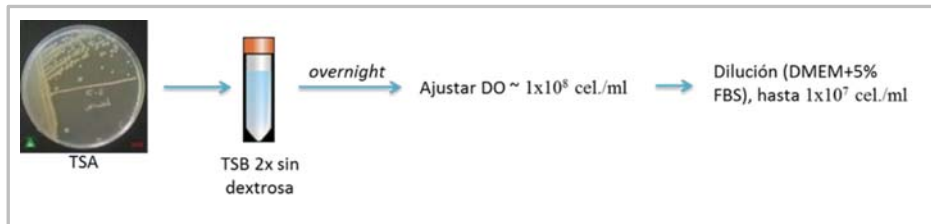
**Figura 23.** Preparación del cultivo celular para realizar un recuento en cámara de Neubauer.

- Resuspensión en medio completo hasta obtener una concentración  $3 \times 10^5$  cél/ml.
- Incubar la placa durante 24 h. a  $37^{\circ}\text{C}$  y 5%  $\text{CO}_2$ .
- Siembra de cada uno de los pocillos con 1 ml de la suspensión.
- Incubar la placa durante 24 h para obtener un cultivo semiconfluyente al 80%.



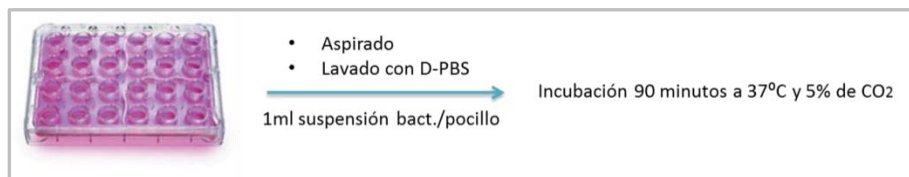
**Figura 24.** Preparación de la placa para realizar el ensayo.

- Aspirar el medio de cada uno de los pocillos y realizar un doble lavado con D-PBS.



**Figura 25.** Preparación de las cepas bacterianas para realizar la infección

- Inoculación de cada uno de los pocillos con 1 ml de la suspensión bacteriana
- Incubación de la placa durante 90 minutos.



**Figura 26.** Inoculación de la placa de 24 pocillos.

- Aspiración del medio de cultivo.
- Doble lavado con D-PBS, para eliminar las células bacterianas no adheridas.

El ensayo de adherencia se realizó por triplicado y se utilizó como control negativo un pocillo inoculado con D-MEM + 5% de FBS (Guimarães y col., 2002; Couto y col., 2007).

### 3.9.5.2 Fijación y tinción

Finalizado el tiempo de exposición de las cepas bacterianas con la línea celular y los posteriores lavados, se procedió a realizar una tinción de Giemsa, siguiendo el siguiente protocolo:

- Fijación de la muestra con metanol durante 2 min.
- Aspiración del metanol.
- Se cubrió la muestra con 1ml de colorante de Giemsa (azur-eosina-azul de metileno) (Merck 109204) , diluido 1:10 con agua del grifo, durante 20 min.
- Aspiración del colorante Giemsa.
- Doble lavado con agua del grifo.



- Se extrae el cubreobjetos y se coloca en un portaobjetos.
- Una vez finalizada la tinción se visualizaron las muestras a microscopio óptico a 10, 40 y 100 aumentos.

## **Capítulo 4**

---

## **Resultados**



## 4.1 Cepas estudiadas

De las 128 cepas estudiadas, 28 fueron reclasificadas en base a las distancias genéticas obtenidas con el gen *cpn60* (Miñana-Galbis y col., 2009), este estudio fue previo al análisis filogenético y se realizó con el objetivo de confirmar la clasificación taxonómica de todas las cepas. A continuación se muestran las cepas que fueron reclasificadas (Tabla 26).

**Tabla 26.** Cepas reclasificadas en base al gen *cpn60*

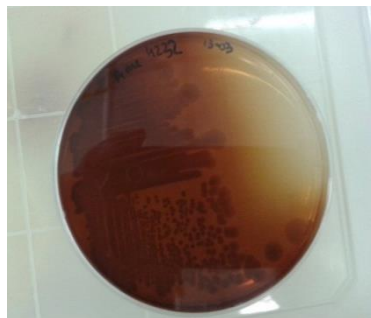
<b>Cepa</b>	<b>Clasificación original</b>	<b>Reclasificación</b>
AE092	<i>A. salmonicida</i>	<i>A. piscicola</i>
AE145	<i>A. salmonicida</i>	<i>A. bestiarum</i>
AE147	<i>A. salmonicida</i>	<i>A. bestiarum</i>
AE163	<i>A. salmonicida</i>	<i>A. piscicola</i>
AE203	<i>A. salmonicida</i>	<i>A. piscicola</i>
AE238	<i>A. salmonicida</i>	<i>A. bestiarum</i>
AE258	<i>A. salmonicida</i>	<i>A. piscicola</i>
HE22	<i>A. salmonicida</i>	<i>A. piscicola</i>
HE73	<i>A. salmonicida</i>	<i>A. bestiarum</i>
CECT 5173	<i>A. hydrophila</i>	<i>A. salmonicida</i>
CECT 5205	<i>A. bestiarum</i>	<i>A. salmonicida</i>
CECT 5206	<i>A. bestiarum</i>	<i>A. salmonicida</i>
CECT 5211	<i>A. bestiarum</i>	<i>A. salmonicida</i>
CECT 5214	<i>A. bestiarum</i>	<i>A. salmonicida</i>
CECT 5215	<i>A. bestiarum</i>	<i>A. salmonicida</i>
CECT 5219	<i>A. bestiarum</i>	<i>A. salmonicida</i>
CECT 5222	<i>A. bestiarum</i>	<i>A. salmonicida</i>
CECT 5223	<i>A. bestiarum</i>	<i>A. salmonicida</i>
CECT 5233	<i>A. bestiarum</i>	<i>A. hydrophila</i>
CECT 5236	<i>A. bestiarum</i>	<i>A. hydrophila</i>
CECT 5239	<i>A. bestiarum</i>	<i>A. salmonicida</i>
CECT 5242	<i>A. bestiarum</i>	<i>A. salmonicida</i>
CECT 5247	<i>A. bestiarum</i>	<i>A. salmonicida</i>
CECT 7453	<i>A. bestiarum</i>	<i>A. salmonicida</i>
LMG 13445	<i>A. bestiarum</i>	<i>A. piscicola</i>
LMG 14043	<i>A. bestiarum</i>	<i>A. piscicola</i>
LMG 3756	<i>A. hydrophila</i>	<i>A. salmonicida</i>
LMG 3769	<i>A. hydrophila</i>	<i>A. hydrophila</i> subsp. <i>dhakensis</i>
LMG 3770	<i>A. hydrophila</i>	<i>A. hydrophila</i> subsp. <i>dhakensis</i>

## 4.2 Identificación fenotípica

En todas las cepas incluidas en este estudio se observaron, mediante la tinción de Gram, bacilos o cocobacilos Gram negativos que en algunos casos formaban filamentos.

En todas las cepas cultivadas en TSA 1% NaCl se observaron colonias translúcidas, convexas y con bordes lisos, pero muy variables en tamaño. Todas las cepas fueron positivas para las pruebas de la oxidasa y la catalasa. En el siguiente grupo de cepas se observó la producción de pigmento marrón (Figura 27) cuando fueron cultivadas en TSA.

- *A. salmonicida* subsp. *achromogenes* LMG 14900<sup>T</sup>
- *A. salmonicida* subsp. *salmonicida* CECT 894<sup>T</sup>
- *A. salmonicida* CECT 5201
- *A. salmonicida* CECT 7453
- *A. salmonicida* subsp. *pectinolytica* CECT 5752<sup>T</sup>
- *A. bestiarum* LMG 13663
- *A. bestiarum* LMG 13664



**Figura 27.** Cultivo en TSA de una cepa productora de pigmento marrón

#### 4.2.1 Fermentación de sorbitol

La mayoría de las cepas que fermentaron el sorbitol presentaron un resultado positivo entre las 24 y 48 h, observándose un cambio de color de púrpura a amarillo.

**Tabla 27.** Resultados en % de cepas que fermentaron sorbitol

<b>Cepas fermentadoras de sorbitol</b>	
<i>A. hydrophila</i> subsp. <i>dhakensis</i> / <i>A. aquariorum</i>	0%
<i>A. bestiarum</i>	4%
<i>A. hydrophila</i> subsp. <i>hydrophila/ranae</i>	0%
<i>A. piscicola</i>	50%
<i>A. popoffii</i>	0%
<i>A. salmonicida</i>	81%

Ninguna cepa de *A. bestiarum* fermentó sorbitol excepto la cepa 624A, por lo contrario, todas las cepas de *A. salmonicida* lo fermentaron a excepción de las siguientes: CECT 5201, CECT 5239, CIP 104757<sup>T</sup>, LMG 14900<sup>T</sup>, S09-32.

#### 4.2.2 Asimilación de lactato

Las cepas que utilizan lactato como única fuente de carbono, tras el periodo de incubación, mostraron turbidez en el medio.

**Tabla 28.** Resultados en % de las cepas asimiladoras de lactato

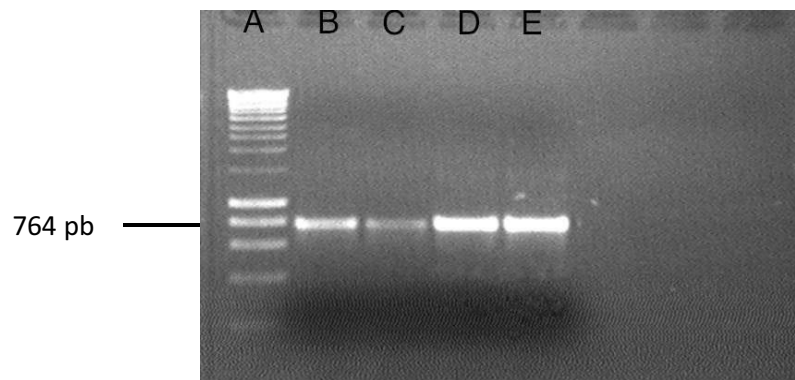
<b>Cepas que utilizan lactato como fuente de carbono</b>	
<i>A. hydrophila</i> subsp. <i>dhakensis</i> / <i>A. aquariorum</i>	100%
<i>A. bestiarum</i>	4%
<i>A. hydrophila</i> subsp. <i>hydrophila/ranae</i>	93%
<i>A. piscicola</i>	0%
<i>A. popoffii</i>	100%
<i>A. salmonicida</i>	0%

Solamente la cepa AE147 de *A. bestiarum* utilizó sorbitol como única fuente de carbono, en cambio sí lo utilizaron todas las cepas de *A. hydrophila* excepto las cepas AE180 y JCM 3995.

### 4.3 Estudio filogenético

#### 4.3.1 Análisis de las secuencias del gen *cpn60*

Las secuencias del gen *cpn60*, se obtuvieron a partir de la amplificación y posterior secuenciación de un fragmento de 555 pb, correspondiente a la región UT del gen *cpn60*. La región amplificada corresponde a las posiciones 274-828 del gen completo de *A. hydrophila* (CP000462) (Figura28).



**Figura 28.** Electroforesis en gel de agarosa del fragmento amplificado de 764 pb del gen *cpn60*, en el pocillo A se observa el marcador de pesos moleculares

Para cada una de las 128 cepas estudiadas, se obtuvo una secuencia nucleotídica de 555 pb. En el análisis de estas secuencias se detectaron 144 sitios polimórficos, de los cuales 124 fueron “parsimony informative sites”. El contenido en G+C osciló entre 56,9% y 61,1%.

Para estudiar las relaciones filogenéticas basadas en el gen *cpn60*, se elaboraron árboles filogenéticos utilizando los métodos Neighbor Joining (NJ) con el modelo evolutivo de Jukes Cantor (JC) y Maximum Likelihood (ML) con el de Tamura 3 con una distribución gamma y considerando los sitios invariantes (T92+G+I). En

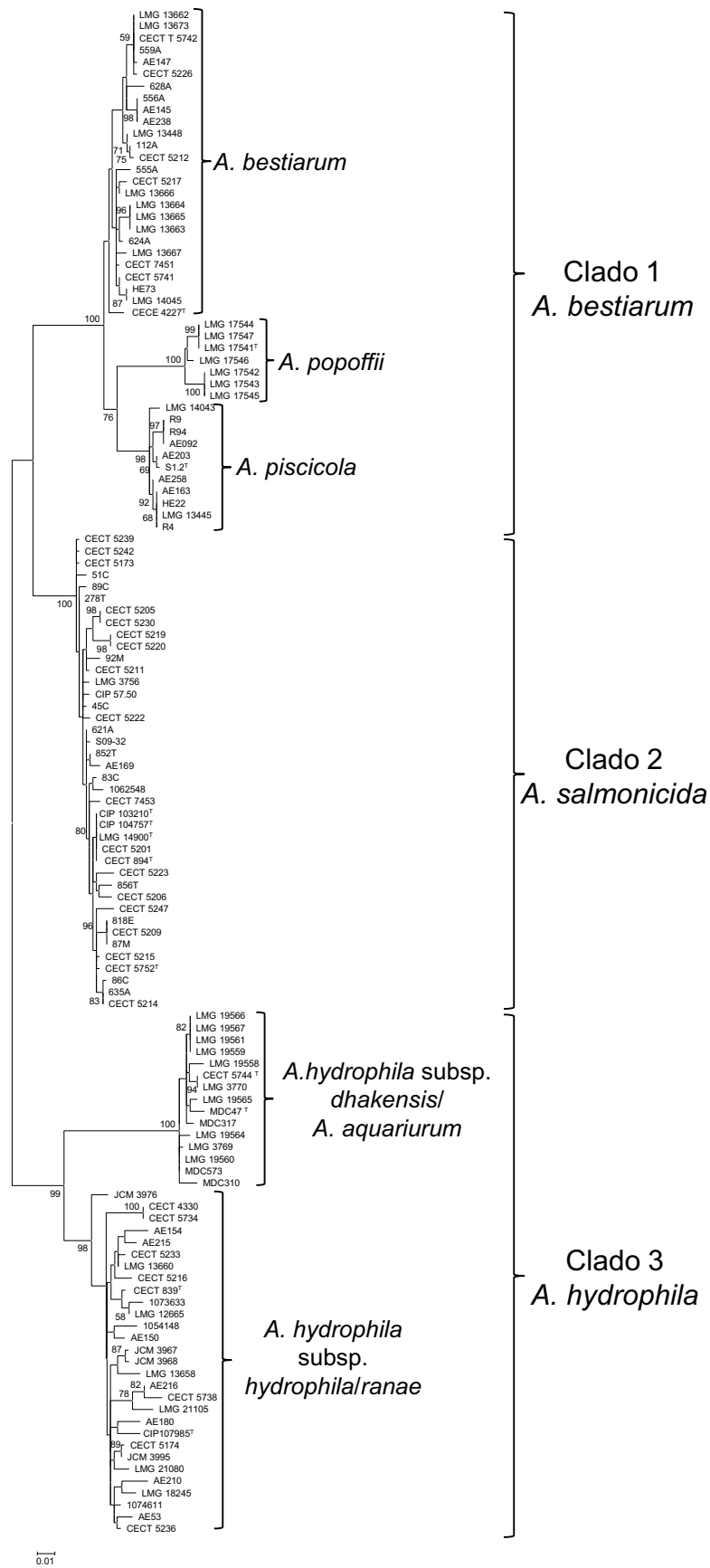
ambos casos las topologías de los árboles obtenidos fueron similares. El árbol obtenido con el método ML es el que se muestra en la Figura 29.

En el árbol, se observan 3 clados claramente diferenciados, el clado *A. bestiarum*, *A. salmonicida* y *hydrophila*, los tres grupos presentando valores de “bootstrap” superiores al 98%.

En el primer clado se diferencian 2 grupos, el primero de ellos está formado por cepas de *A. bestiarum* y un segundo grupo que a su vez se divide en dos subgrupos, el primero incluye las cepas de *A. popoffii* y el segundo las de *A. piscicola*. El segundo clado es el más homogéneo y agrupa las cepas de *A. salmonicida* incluyendo a sus cinco subespecies. El último clado se divide formando 2 grupos, el primero agrupa todas las cepas de *A. hydrophila* subsp. *hydrophila* y *A. hydrophila* subsp. *ranae*, y el segundo grupo las cepas de *A. hydrophila* subsp. *dhakensis* y *A. aquariorum*.

A partir del alineamiento múltiple también se elaboró una matriz de distancias con el modelo T92. La distancia evolutiva media para cada uno de los 6 grupos que se observan en el árbol filogenético y la divergencia entre las diferentes especies del complejo *Aeromonas hydrophila* (AHC) se muestran en las Tablas 29 y 30 respectivamente. Con estos datos se ha determinado que el gen *cpn60* presenta una distancia intraespecífica de 0–4,1% e interespecífica entre 3,5 y 12,7%.





**Figura 29.** Árbol obtenido mediante el método ML basado en las secuencias parciales del gen *cpn60*. La barra indica el número de sustituciones nucleotídicas por sitio. En los nodos se muestran los valores de “bootstrap” iguales o mayores al 50%.

**Tabla 29.** Distancia evolutiva media para cada uno de los 6 grupos obtenida a partir de las secuencias del gen *cpn60*

<i>A. bestiarum</i>	0,011 ± 0,003
<i>A. piscicola</i>	0,007 ± 0,002
<i>A. popoffii</i>	0,010 ± 0,003
<i>A. hydrophila</i> subsp. <i>hydrophila/ranae</i>	0,022 ± 0,003
<i>A. hydrophila</i> subsp. <i>dhakensis/A. aquariorum</i>	0,009 ± 0,002
<i>A. salmonicida</i>	0,012 ± 0,002

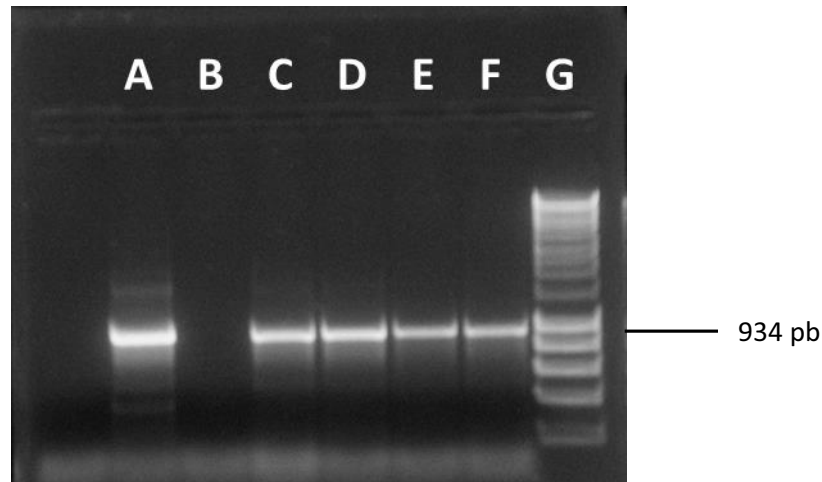
**Tabla 30.** Divergencia entre las especies del AHC obtenida a partir de las secuencias del gen *cpn60*

	<i>A. bestiarum</i>	<i>A. hydrophila</i>	<i>A. h.dhakensis*</i>	<i>A. piscicola</i>	<i>A. popoffii</i>	<i>A. salmonicida</i>
<i>A. bestiarum</i>	0,0-2,5%					
<i>A. hydrophila</i>	6,4-9,4%	0,0-4,1%				
<i>A. h.dhakensis*</i>	8,4-10,6%	5,6-8,2%	0,0-1,2%			
<i>A. piscicola</i>	3,5-3,9%	7,4-10,0%	10,0-11,5%	0,0-1,1%		
<i>A. popoffii</i>	4,1-6,0%	9,0-11,5%	10,8-12,7%	4,5-6,2%	0,0-1,6%	
<i>A. salmonicida</i>	5,0-7,6%	6,0-9,4%	7,4-10,0%	6,8-8,6%	8,2-10,4%	0,0-2,6%

\* *A. hydrophila* subsp. *dhakensis*

#### 4.3.2 Análisis de las secuencias del gen *dnaJ*

El análisis filogenético realizado con las secuencias parciales de gen *dnaJ* se elaboró a partir de la amplificación y posterior secuenciación de un fragmento de 891 pb, correspondiente a las posiciones 78-969 del gen completo de *A. hydrophila* (CP000462) (Figura 30).

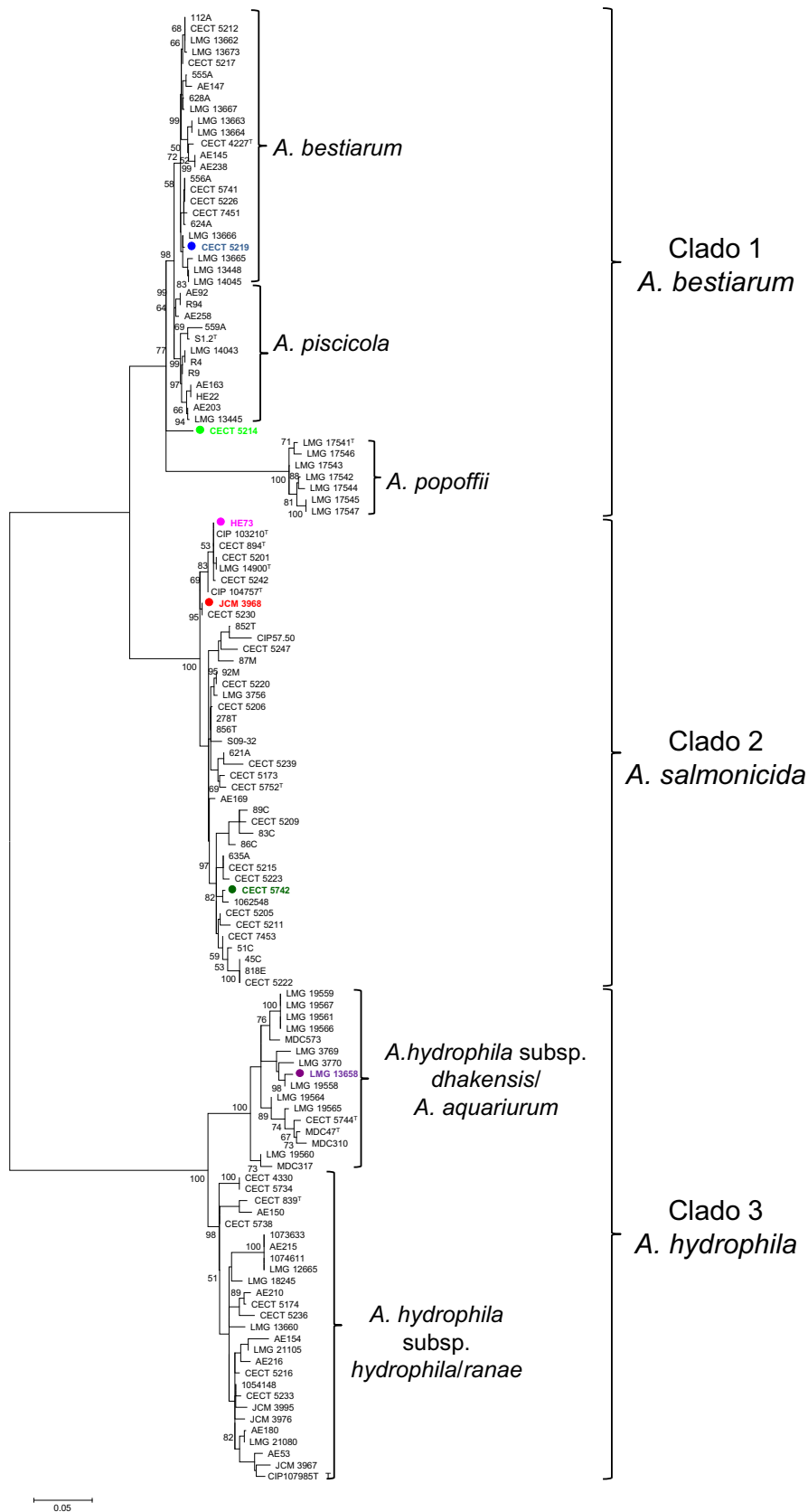


**Figura 30.** Electroforesis en gel de agarosa del fragmento amplificado correspondiente al gen *dnaJ*, en el pocillo A se observa el control (+), B control (-) y en el pocillo G se observa el marcador de pesos moleculares.

A partir del análisis realizado, se determinó que para este conjunto de 128 secuencias hay 236 sitios polimórficos de los cuales 201 son “parsimony informative sites”. El contenido en G+C calculado oscila entre el 62,1 y el 65,5%.

Las relaciones filogenéticas basadas en el gen *dnaJ* se representaron mediante árboles filogenéticos que se elaboraron utilizando los métodos NJ y ML usando como modelo evolutivo JC y T92+G+I respectivamente, observándose topologías muy similares entre los árboles obtenidos. En la Figura 31 se muestra el árbol obtenido mediante el método ML.

En el árbol se diferencian 3 clados, el clado 1 *A. bestiarum*, el clado 2 *A. salmonicida* y el clado 3 *A. hydrophila*. El clado 1 esta formado por 2 agrupaciones, una correspondiente a las cepas de *A. popoffii* y otra que se divide en dos subgrupos, uno corresponde a *A. bestiarum* y el otro a *A. piscicola*. El segundo clado lo forman todas las cepas de *A. salmonicida* incluidas sus cinco subespecies. El clado 3 esta dividido en dos agrupaciones, la primera de ellas formada por las cepas de *A. hydrophila* subsp. *hydrophila* y *A. hydrophila* subsp. *ranae*, y la segunda por las cepas de *A. hydrophila* subsp. *dhakensis* y *A. aquariorum*.



**Figura 31.** Árbol obtenido mediante el método ML basado en las secuencias parciales del gen *dnaJ*. La barra indica el número de sustituciones nucleotídicas por sitio. En los nodos se muestran los valores de “bootstrap” iguales o mayores al 50%. ● *A. salmonicida* CECT 5219, ● *A. salmonicida* CECT 5214, ● *A. bestiarum* HE73, ● *A. hydrophila* subsp. *hydrophila* JCM 3968, ● *A. bestiarum* CECT 5742, ● *A. hydrophila* subsp. *hydrophila* LMG 13658.

Todas las ramas que corresponden a los 6 grupos que se observan en el árbol filogenético tienen valores de bootstrap de 100% excepto las que agrupan a *A. bestiarum* y *A. piscicola* en que el valor es inferior.

Por otra parte, a diferencia del árbol filogenético del gen *cpn60*, en el árbol del gen *dnaJ* cabe destacar la existencia de 6 cepas que se agrupan en clados diferentes al resto de cepas de su especie. Así, la cepa *A. salmonicida* CECT 5219 se agrupó con la especie *A. bestiarum*, la cepa de *A. bestiarum* 559A se agrupó con la especie *A. piscicola* y la cepa *A. salmonicida* CECT 5214 se agrupa en el clado 1 entre los subgrupos *A. bestiarum*, *A. piscicola* y *A. popoffii*. Las cepas *A. bestiarum* CECT 5742 y HE73 y *A. hydrophila* JCM 3968 se agruparon en el clado de *A. salmonicida*. Por último, la cepa *A. hydrophila* subsp. *hydrophila* LMG 13658 se agrupó con *A. hydrophila* subsp. *dhakensis*/*A. aquariorum*.

A partir del alineamiento múltiple también se elaboró un matiz de distancias con el modelo T92 del cual se ha calculado la distancia evolutiva media de cada uno de los grupos que se observan en el árbol (Tabla 31).

**Tabla 31.** Distancia evolutiva media para cada uno de los 6 grupos obtenida a partir de las secuencias del gen *dnaJ*

<i>A. bestiarum</i>	0,008 ± 0,002
<i>A. piscicola</i>	0.010 ± 0.002
<i>A. popoffii</i>	0,012 ± 0,002
<i>A. hydrophila</i> subsp. <i>dhakensis</i> / <i>A. aquariorum</i>	0,021 ± 0,003
<i>A. hydrophila</i> subsp. <i>hydrophila</i>	0,021 ± 0,002
<i>A. salmonicida</i>	0,015 ± 0,002

El alineamiento múltiple también ha permitido determinar las distancias intraespecífica e interespecífica. Los resultados se muestran en la Tabla 32, donde se observan valores de entre 0-3,5% para relaciones intraespecíficas y de 3,6 a 13,4% para las relaciones interespecíficas, excepto en el caso *A. bestiarum* y *A. piscicola* que es de 0,7–2,1%.

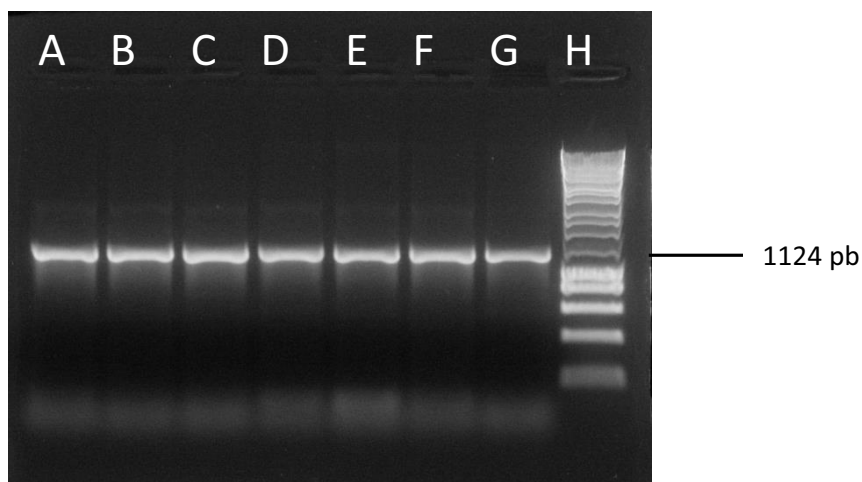
**Tabla 32.** Divergencia entre las especies del AHC obtenida a partir de las secuencias del el gen *dnaj*.

	<i>A. bestiarum</i>	<i>A. hydrophila</i>	<i>A.h.dhakensis*</i>	<i>A. piscicola</i>	<i>A. popoffii</i>	<i>A. salmonicida</i>
<i>A. bestiarum</i>	0-2,2%					
<i>A. hydrophila</i>	9-11,2%	0-3,5%				
<i>A.h.dhakensis*</i>	9,6-11,8%	3,6-6,2%	0-3,3%			
<i>A. piscicola</i>	0,7-2,1%	8,7-11,2%	9,4-11,6%	0-1,3%		
<i>A. popoffii</i>	5,3-6,9%	7-13,4%	11,1-13%	4,9-6,5%	0-2%	
<i>A. salmonicida</i>	4,8-7,2%	9,2-12,4%	10,1-13,3%	4,6-6,7%	6,9-8,4%	0-3%

\* *A. hydrophila* subsp. *dhakensis*

### 4.3.3 Análisis de las secuencias del gen *gyrB*

Este análisis se ha realizado a partir del alineamiento múltiple de las 128 secuencias nucleotídicas obtenidas de la secuenciación parcial del gen *gyrB* de cada una de las cepas incluidas en este estudio, el fragmento secuenciado corresponde a las posiciones 355-1444 respecto al gen completo de *A. hydrophila* (CP000462) (Figura 32). En las secuencias correspondientes a las cepas de *A. hydrophila* y *A. aquariorum* se ha observado una delección de tres pares de bases entre las posiciones 487 y 489 del fragmento amplificado.



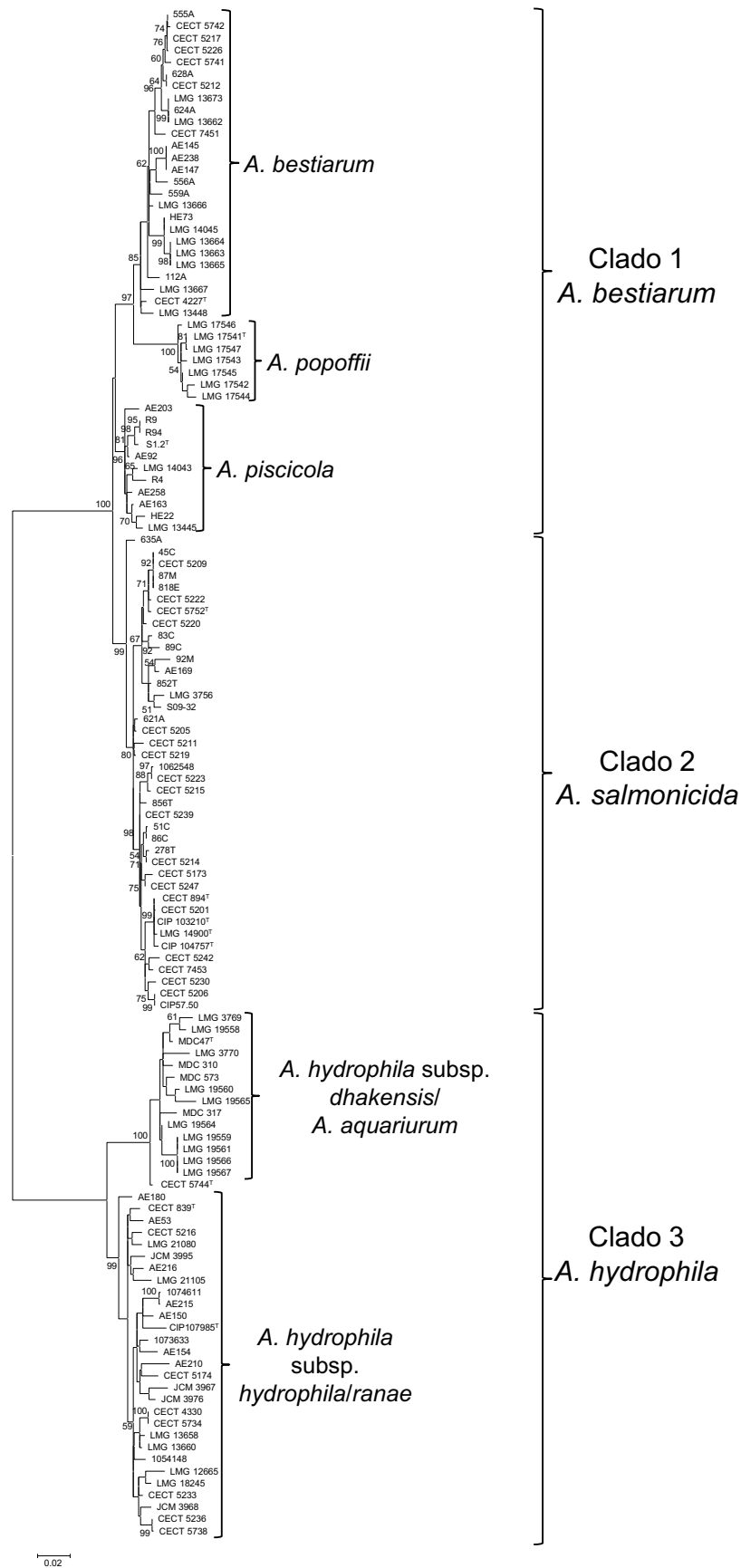
**Figura 32.** Electroforesis en gel de agarosa del fragmento amplificado de 1124 pb del gen *gyrB*, en el pocillo H se observa el marcador de pesos moleculares

Se analizaron todas las secuencias y se determinó la existencia de 268 sitios polimórficos de los cuales 217 son “parsimony informative sites”. También se determinó el contenido G+C, que osciló entre 58,5 y 62%.

Se construyó la filogenia de las 128 cepas analizadas a partir del alineamiento múltiple de todas las secuencias. Se elaboraron dos árboles, utilizando los métodos NJ y ML con los modelos evolutivos JC y T93+G+I, respectivamente. En ambos casos la topología de los árboles obtenidos fue muy similar. En la Figura 33 se muestra el que se obtuvo por el método ML, donde se observan tres clados, el primero de ellos (*A. bestiarum*) se subdivide en tres agrupaciones correspondientes a las especies *A. bestiarum*, *A. popoffii*, *A. piscicola*. El segundo clado agrupa las cepas de *A. salmonicida*, incluyendo sus 5 subespecies. El tercer clado (*A. hydrophila*) se divide en dos grupos, el primero de ellos incluye las cepas de *A. hydrophila* subsp. *hydrophila* y *A. hydrophila* subsp. *ranae* y el segundo grupo a las cepas de *A. hydrophila* subsp. *dhakensis*/*A. aquariorum*.

Todas las ramas que forman los 6 grupos que se observan en el árbol filogenético tienen valores de “bootstrap” superior al 85%.

A partir del alineamiento múltiple también se elaboró una matriz de distancias con el modelo TN93, a partir del cual se ha calculado la distancia evolutiva media de cada uno de los grupos que se observan en el árbol (Tabla 33), y la distancia entre las diferentes especies del AHC (Tabla 34). Con estos datos se ha determinado que el gen *gyrB* tiene una distancia intraespecífica de 0–3,4% e interespecífica entre 2,3 y 11%.



**Figura 33.** Árbol obtenido mediante el método ML basado en las secuencias parciales del gen *gyrB*. La barra indica el número de sustituciones nucleotídicas por sitio. En los nodos se muestran los valores de “bootstrap” iguales o mayores al 50%.



**Tabla 33.** Distancia evolutiva media para cada uno de los 6 grupos obtenida a partir de las secuencias del gen *gyrB*

<i>A. bestiarum</i>	0,014 ± 0,002
<i>A. piscicola</i>	0,012 ± 0,002
<i>A. popoffii</i>	0,008 ± 0,002
<i>A. hydrophila</i> subsp. <i>hydrophila</i>	0,019 ± 0,002
<i>A. hydrophila</i> subsp. <i>dhakensis</i> / <i>A. aquariorum</i>	0,015 ± 0,002
<i>A. salmonicida</i>	0,013 ± 0,002

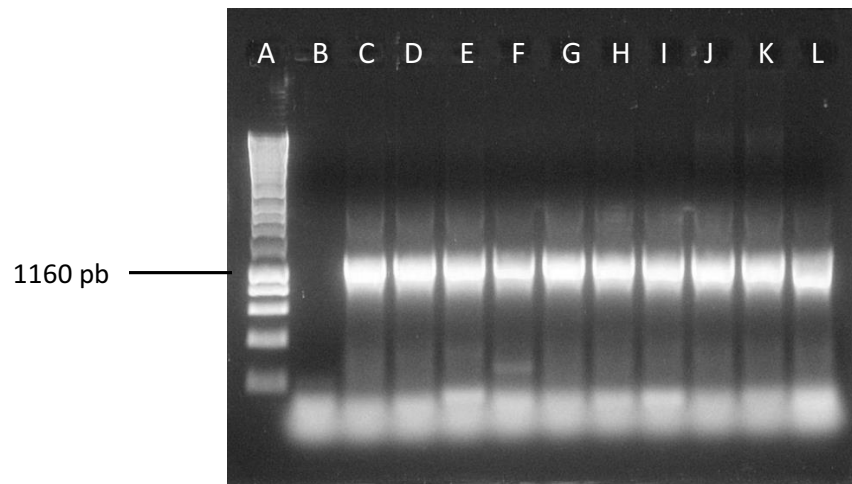
**Tabla 34.** Divergencia entre las especies del AHC obtenida a partir de las secuencias del gen *gyrB*

	<i>A. bestiarum</i>	<i>A. hydrophila</i>	<i>A.h.dhakensis</i> *	<i>A. piscicola</i>	<i>A. popoffii</i>	<i>A. salmonicida</i>
<i>A. bestiarum</i>	0-2,3%					
<i>A. hydrophila</i>	7,5-9,8%	0-3,4%				
<i>A.h.dhakensis</i> *	8-10,3%	3,8-5,9%	0-2,6%			
<i>A. piscicola</i>	2,5-3,9%	7,2-9,3%	7,5-9,6%	0-1,8%		
<i>A. popoffii</i>	3-4,4%	8,9-10,8%	9,4-11%	3,8-4,8%	0,1-1,2%	
<i>A. salmonicida</i>	2,3-4,9%	7,4-9,5%	7,9-10,2%	1,7-4%	3,8-5,6%	0-2,5%

\* *A. hydrophila* subsp. *dhakensis*

#### 4.3.4 Análisis de las secuencias del gen *rpoD*

Se realizó un análisis filogenético del gen *rpoD* a partir de la secuenciación de un fragmento de 837 pb que corresponde a las posiciones 324-1168 del gen completo de *A. hydrophila* (CP000462) (Figura 34).



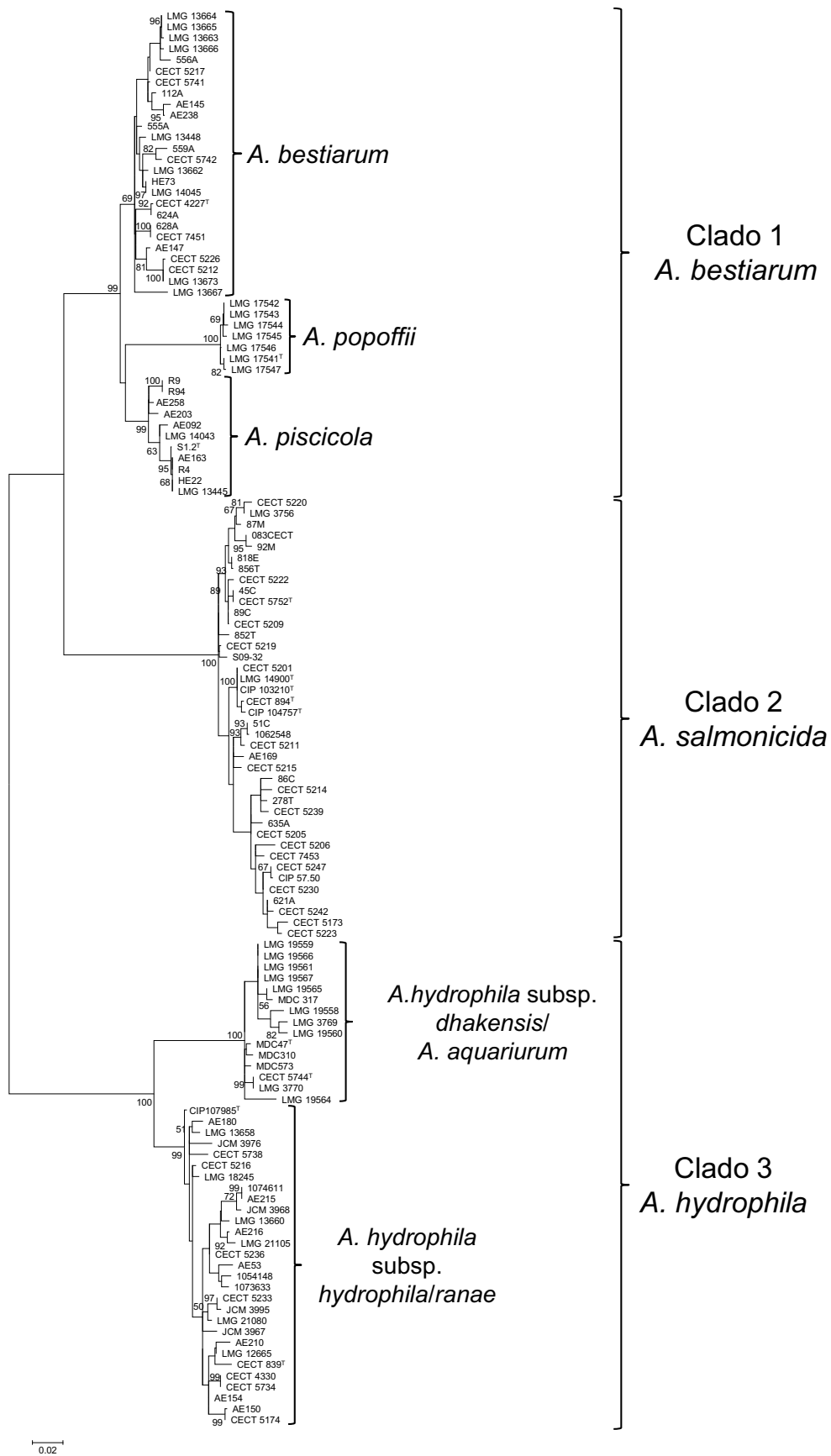
**Figura 34.** Electroforesis en gel de agarosa del fragmento amplificado de 1160 pb del gen *rpoD*, en el pocillo A se observa el marcador de pesos moleculares

En el alineamiento múltiple realizado con las secuencias de las 128 cepas del estudio se detectaron inserciones y deleciones en algunas secuencias. En la secuencia de la cepa *A. salmonicida* CECT 5222 se detectó una inserción de 6 pb en la posición 609 y en la cepa *A. bestiarum* AE145 se observó una deleción de 6 pb entre las posiciones 609 y 615. En las cepas de *A. salmonicida* 86C, CECT 894<sup>T</sup>, CECT 5173, CECT 5201, CECT 5752<sup>T</sup>, CIP 103210<sup>T</sup>, CIP 104757<sup>T</sup> y LMG 14900<sup>T</sup> se observó una deleción de 6 pb entre las posiciones 603 y 609.

Del análisis de todas las secuencias se determinaron 212 sitios polimórficos de los cuales 182 son “parsimony informative sites”. También se determinó el contenido G+C, que osciló entre 53,8 y 58,8%.

Las relaciones filogenéticas basadas en el gen *rpoD* se representaron mediante árboles filogenéticos que se elaboraron utilizando los métodos ML y NJ usando como modelo evolutivo JC y T93+G+I, respectivamente, observándose topologías muy similares entre los árboles obtenidos. En la Figura 35 se muestra el árbol obtenido mediante el método ML.

En el árbol, se observan 3 clados claramente diferenciados, el clado 1 denominado *A. bestiarum*, el clado 2 *A. salmonicida* y el clado 3 *A. hydrophila*. En el primer clado se diferencian 2 grupos, el primero de ellos está formado por cepas de *A. bestiarum* y un segundo grupo que a su vez se divide en dos subgrupos, el primero



**Figura 35.** Árbol obtenido mediante el método ML basado en las secuencias parciales del gen *rpoD*. La barra indica el número de sustituciones nucleotídicas por sitio. En los nodos se muestran los valores de “bootstrap” iguales o mayores al 50%.

incluye las cepas de *A. popoffii* y el segundo las de *A. piscicola*. El segundo clado es el más homogéneo de los tres y agrupa las cepas de *A. salmonicida* incluyendo a sus cinco subespecies. El último clado se divide formando 2 grupos, el primero agrupa las cepas de *A. hydrophila* subsp. *dhakensis* y *A. aquariorum* y el segundo grupo las cepas de *A. hydrophila* subsp. *hydrophila* y *A. hydrophila* subsp. *ranae*. Todas las ramas que forman tanto los 3 cladogramas como los 6 grupos tienen valores de bootstrap superiores al 99% excepto la que agrupa a *A. bestiarum*.

A partir del alineamiento múltiple se elaboró una matriz de distancias con el modelo T93. La distancia media para cada uno de los 6 grupos que se observan en el árbol filogenético y la divergencia entre las diferentes especies del complejo *Aeromonas hydrophila* (AHC) se muestran en las Tablas 35 y 36, respectivamente. Con estos datos se ha determinado que el gen *rpoD* presenta una tasa de divergencia intraespecífica de 0–3,5% e interespecífica entre 2,7 y 13,1%.

**Tabla 35.** Distancia evolutiva media para cada uno de los 6 grupos obtenida a partir de las secuencias del gen *rpoD*.

<i>A. bestiarum</i>	0,018 ± 0,003
<i>A. piscicola</i>	0,011 ± 0,002
<i>A. popoffii</i>	0,004 ± 0,001
<i>A. hydrophila</i> subsp. <i>hydrophila</i>	0,017 ± 0,002
<i>A. hydrophila</i> subsp. <i>dhakensis</i> / <i>A. aquariorum</i>	0,012 ± 0,002
<i>A. salmonicida</i>	0,018 ± 0,002

**Tabla 36.** Divergencia entre las especies del AHC obtenida a partir de las secuencias del gen *rpoD*.

	<i>A. bestiarum</i>	<i>A. hydrophila</i>	<i>A.h.dhakensis</i> *	<i>A. piscicola</i>	<i>A. popoffii</i>	<i>A. salmonicida</i>
<i>A. bestiarum</i>	0-3,5%					
<i>A. hydrophila</i>	8,1-11,2%	0-3,1%				
<i>A.h.dhakensis</i> *	9,1-11,2%	4,4-7,3%	0-2,9%			
<i>A. piscicola</i>	2,7-5%	9,1-11,4%	9,8-11,8%	0-2%		
<i>A. popoffii</i>	3,6-5,5%	10,6-12,3%	9,9-11,6%	4,8-5,8%	0-0,7%	
<i>A. salmonicida</i>	6,5-9,1%	9,4-12,7%	10,2-13,1%	7,4-8,7%	8,6-10,1	0-3,4%

\* *A. hydrophila* subsp. *dhakensis*

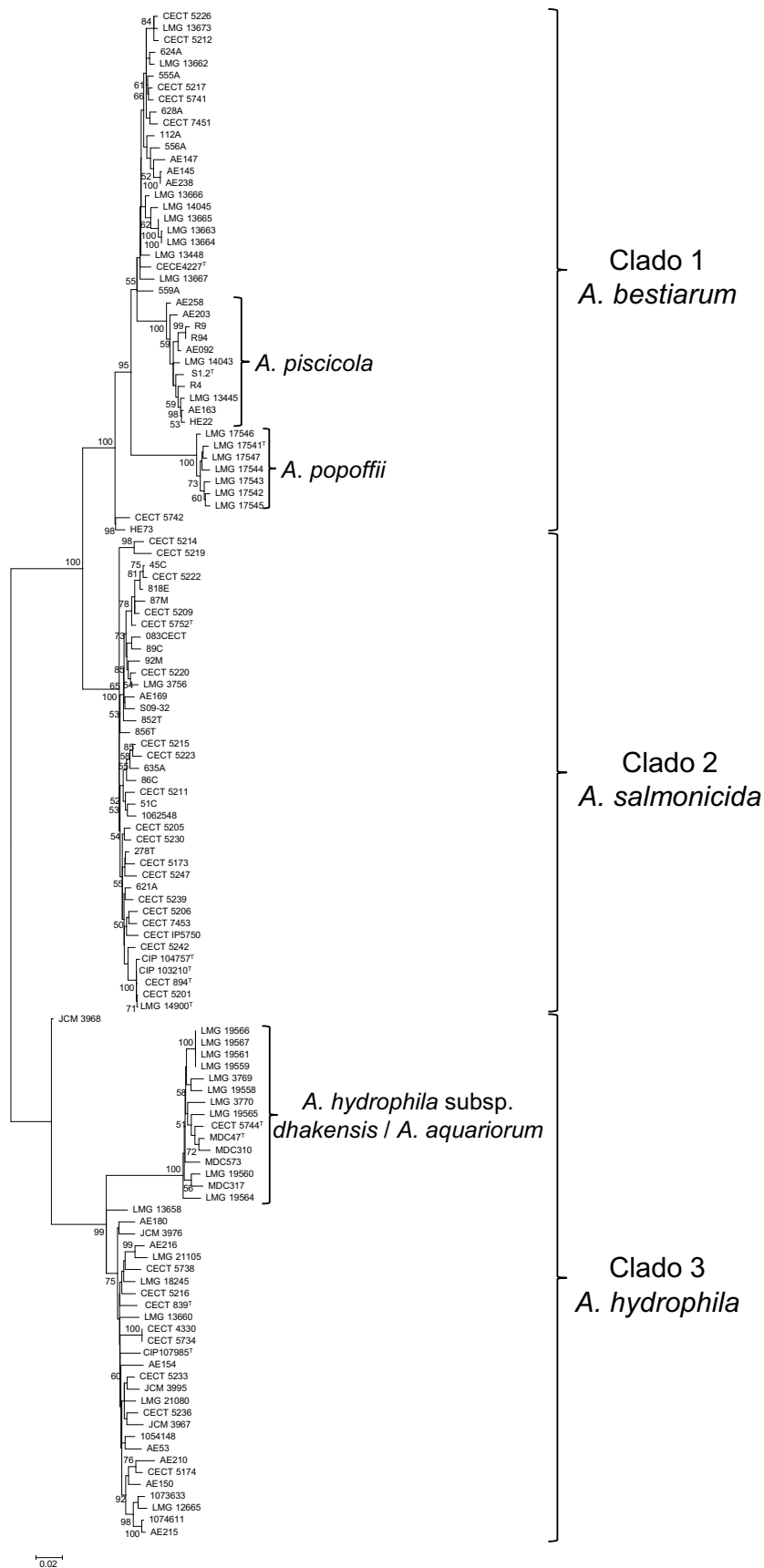
#### 4.3.5 Análisis de los genes concatenados

A partir de las secuencias de los cuatro genes estudiados (*cpn60*, *dnaJ*, *gyrB*, *rpoD*) se obtuvieron secuencias concatenadas con una longitud de 3372 pb utilizando el programa DAMBE (“Data Analysis and Molecular Biology and Evolution”) (Xia & Xie, 2001). Del estudio de estas secuencias se ha determinado que existen 860 sitios polimórficos y 725 “parsimony informative sites”. El contenido G+C oscila entre 58,6 y 61,7%.

Para explicar las relaciones evolutivas entre las especies que forman el AHC se elaboraron árboles filogenéticos con los métodos NJ y ML, obteniéndose filogenias con topologías similares. En la Figura 36 se muestra el árbol ML con el modelo evolutivo “General Time Reversible model” (GTR+G+I).

En el árbol filogenético se diferencian 3 clados. El clado 1 se subdivide en distintos grupos, el primero está formado por todas las cepas de *A. bestiarum* excepto las cepas CECT 5742 y HE73, que se agrupan juntas en una rama independiente. El segundo grupo lo componen las cepas de *A. piscicola* y el último grupo incluye las cepas de *A. popoffii*. El clado 2, con un valor de “bootstrap” de 100, es el más homogéneo de los tres e incluye todas las cepas de *A. salmonicida*, incluidas sus 5 subespecies. El tercer clado está dividido en dos agrupaciones, una de ellas agrupa las cepas de *A. hydrophila* subsp. *dhakensis* y *A. aquariorum*, y la otra las cepas de *A. hydrophila* subsp. *hydrophila* y *A. hydrophila* subsp. *ranae*. En este clado cabe destacar que la cepa *A. hydrophila* JCM 3968 se encuentra en una rama independiente.

A partir de la matriz de distancias, calculadas con el modelo Tamura Nei, se han obtenido las distancias medias para cada uno de los clados (Tabla 37) y las distancias entre las diferentes especies del complejo (Tabla 38). Con estos datos se ha obtenido un rango de distancia intraespecífica de 0 – 3,1% e interespecífica de 4,3 – 11,5%, a excepción de la distancia entre *A. bestiarum* y *A. piscicola* que es de 2,3 – 3,4%.



**Figura 36.** Árbol obtenido mediante el método ML basado en las secuencias concatenadas. La barra indica el número de sustituciones nucleotídicas por sitio. En los nodos se muestran los valores de “bootstrap” iguales o mayores al 50%.

**Tabla 37.** Distancia evolutiva media para cada uno de los 6 grupos obtenida a partir de la secuencia concatenada de los genes

<i>A. bestiarum</i>	0,015 ± 0,001
<i>A. piscicola</i>	0,010 ± 0,001
<i>A. popoffii</i>	0,008 ± 0,001
<i>A. hydrophila</i> subsp. <i>hydrophila</i>	0,021 ± 0,001
<i>A. hydrophila</i> subsp. <i>dhakensis</i> / <i>A. aquariorum</i>	0,015 ± 0,001
<i>A. salmonicida</i>	0,016 ± 0,001

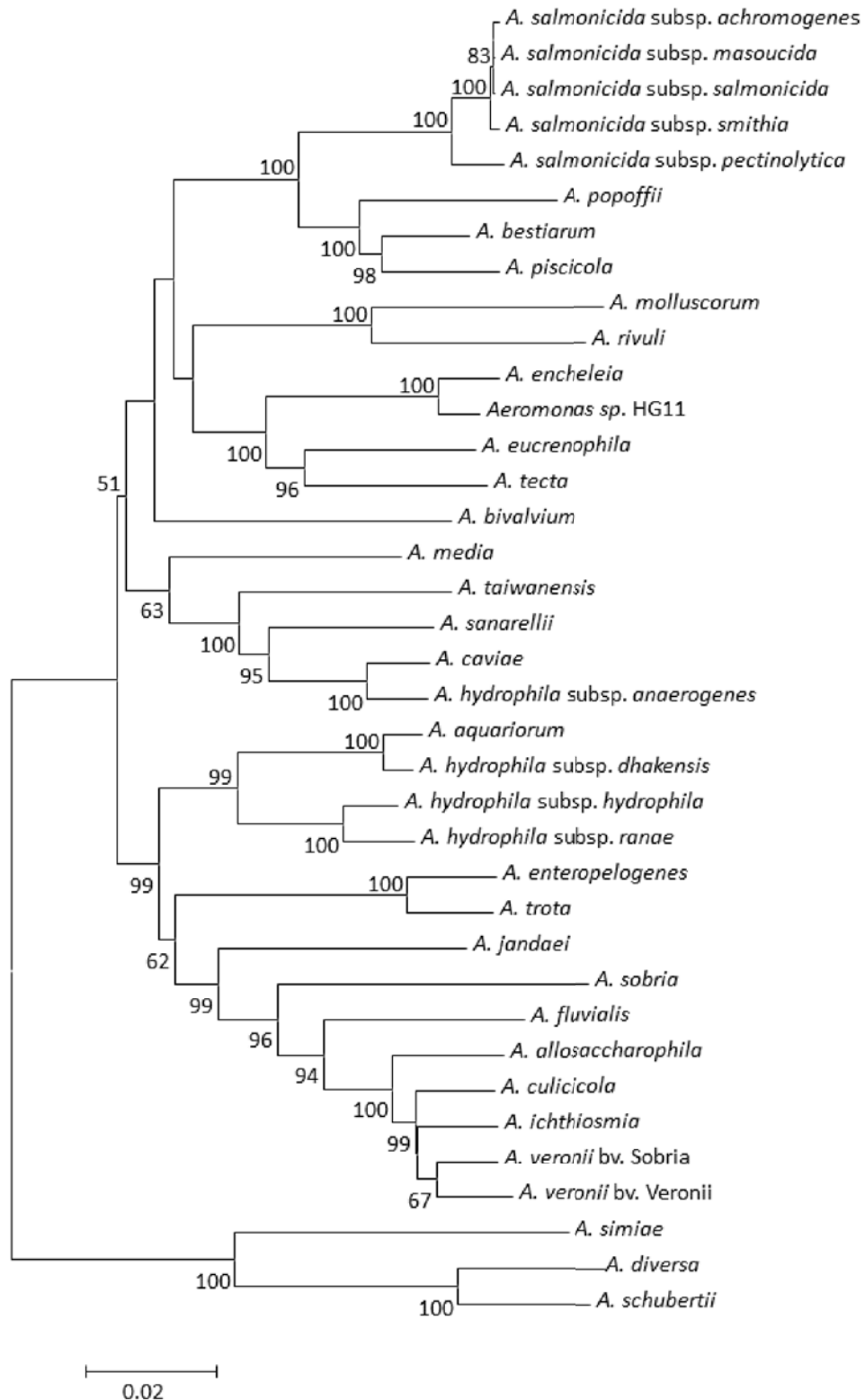
**Tabla 38.** Divergencia entre las especies del AHC obtenida a partir de la secuencia concatenada de los genes

	<i>A. bestiarum</i>	<i>A. hydrophila</i>	<i>A.h.dhakensis</i>	<i>A. piscicola</i>	<i>A. popoffii</i>	<i>A. salmonicida</i>
<b><i>A. bestiarum</i></b>	0-2%					
<b><i>A. hydrophila</i></b>	8,5-9,8%	0-3,1%				
<b><i>A.h.dhakensis</i>*</b>	9,3-10,2%	4,3-5,9%	0-2%			
<b><i>A. piscicola</i></b>	2,3-3,4%	8,6-10%	9,4-10,5%	0,2-1,5%		
<b><i>A. popoffii</i></b>	4,3-5,3%	10,5-11,5	10,6-11,5	4,6-5,5%	0,5-1,1%	
<b><i>A. salmonicida</i></b>	5,2-6,6%	8,8-10,1	9,5-10,9%	5,3-6,3%	6,9-7,8%	0-2,2%

\* *A. hydrophila* subsp. *dhakensis*

También se ha elaborado un árbol filogenético utilizando las secuencias concatenadas de las cepas tipo de todas las especies y subespecies de *Aeromonas*, excepto *A. australialis* que ha sido descrita recientemente cuando esta parte del estudio ya se había realizado (Figura 37).

Los números de acceso al Genbank de todas las secuencias utilizadas en este trabajo se encuentran en el Anexo 8.6.



**Figura 37.** Árbol obtenido mediante el método ML basado en las secuencias concatenadas, de todas las especies y subespecies del género *Aeromonas*. La barra indica el número de sustituciones nucleotídicas por sitio. En los nodos se muestran los valores de “bootstrap” iguales o mayores al 50%.



#### 4.4 Detección de eventos de recombinación.

En el análisis realizado para detectar posibles eventos de recombinación, se obtuvieron distintos resultados según el método de análisis utilizado. Se consideró que existe un posible evento de recombinación, si éste se detecta con al menos dos métodos distintos y con un P-valor <0,05.

**Tabla 39.** Eventos de recombinación detectados con el programa RDP4, en las 128 cepas estudiadas.

Cepa	Métodos de detección de recombinación					
	1	2	3	4	5	6
<i>A. bestiarum</i> CECT 5742						
<i>A. bestiarum</i> HE73						
<i>A. hydrophila</i> JCM 3968						
<i>A. hydrophila</i> subsp. <i>hydrophila</i> LMG 13658						
<i>A. salmonicida</i> CECT 5211						
<i>A. salmonicida</i> CECT 5214						
<i>A. salmonicida</i> CECT 5219						

1 (RDP), 2 (GENECONV), 3 (BootScan), 4 (MaxChi), 5 (Chimaera), 6 (3 Seq).

Como se observa en la Tabla 39, existen seis cepas con posibles eventos de recombinación en el gen *dnaJ*, estas cepas coinciden con las seis que se agruparon en clados diferentes al resto de cepas de su especie en el árbol ML (Figura 31), lo que podría explicar las incongruencias observadas en este árbol respecto al representado a partir de las secuencias concatenadas (Figura 36).

#### 4.5 Estudio de la estructura poblacional

Como se observa en la Tabla 40, alrededor del 25% de las posiciones corresponde a sitios polimórficos en los cuatro genes estudiados. El número de alelos para los cuatro loci difirió entre 96 (*cpn60*) y 110 (*rpoD*). En todos los casos las sustituciones sinónimas superaron a las sustituciones no sinónimas.

**Tabla 40.** Análisis de las 128 secuencias para cada uno de los genes estudiados.

	<i>cpn60</i>	<i>dnaJ</i>	<i>gyrB</i>	<i>rpoD</i>	concatenado
<b>Nº de nucleótidos</b>	555	891	1089	837	3372
<b>Nº de alelos</b>	96	101	109	110	124
<b>Nº sitios polimórficos</b>	144	236	268	212	860
	(25,95%)	(26,49%)	(21,85%)	(25,33%)	(25,50%)
<b>Hd*</b>	0,993	0,995	0,997	0,997	0,999
<b>P<sub>i</sub> (JC)**</b>	0,0635	0,0679	0,0551	0,0736	0,0643
<b>transiciones/transversiones</b>	2,375	1,909	1,931	2,994	3,85
<b>dS</b>	0,260±0,029	0,278±0,024	0,230±0,019	0,362±0,036	0,274±0,013
<b>dN</b>	0,008±0,003	0,013±0,004	0,008±0,002	0,011±0,003	0,010±0,002
<b>dS&gt;dN</b>	P<0,001	P<0,001	P<0,001	P<0,001	P<0,001

\*Hd diversidad genética, \*\* P<sub>i</sub> (JC) Diversidad nucleotídica aplicando la corrección Jukes-Cantor

A partir del alineamiento múltiple de cada uno de los 4 genes estudiados se elaboró el perfil alélico para cada uno de los loci (Tabla 41), para ello se asignó un alelo distinto cuando la secuencia difería en algún nucleótido. A partir de la combinación del número de alelos para cada una de las cepas se definieron 124 secuencias tipo (ST).

**Tabla 41.** Perfiles alélicos y STs.

Cepa	ST	<i>cpn60</i>	<i>dnaJ</i>	<i>gyrB</i>	<i>ropD</i>
<i>A. bestiarum</i> CECT 4227 <sup>T</sup>	1	1	1	1	1
<i>A. bestiarum</i> 112A	2	2	2	2	2
<i>A. bestiarum</i> 555A	3	3	3	3	3
<i>A. bestiarum</i> 556A	4	4	4	4	4
<i>A. bestiarum</i> 559A	5	5	5	5	5
<i>A. bestiarum</i> 624A	6	6	6	6	6
<i>A. bestiarum</i> 628A	7	7	7	7	7
<i>A. bestiarum</i> AE092	8	8	8	8	8
<i>A. bestiarum</i> AE145	9	4	9	9	9
<i>A. bestiarum</i> AE147	10	9	10	9	10
<i>A. bestiarum</i> AE163	11	10	11	10	11
<i>A. bestiarum</i> AE203	12	11	12	11	12
<i>A. bestiarum</i> AE238	13	4	9	9	13
<i>A. bestiarum</i> AE258	14	12	13	12	14
<i>A. bestiarum</i> CECT 5212	15	13	2	7	15
<i>A. bestiarum</i> CECT 5217	16	14	14	3	16
<i>A. bestiarum</i> CECT 5226	17	15	4	13	17
<i>A. bestiarum</i> CECT 5741	18	16	4	14	18
<i>A. bestiarum</i> CECT 5742	19	5	15	15	19
<i>A. bestiarum</i> CECT 7451	20	17	16	16	7
<i>A. bestiarum</i> HE22	21	10	11	17	11
<i>A. bestiarum</i> HE73	22	18	17	18	20

Cepa	ST	<i>cpn60</i>	<i>dnaJ</i>	<i>gyrB</i>	<i>ropD</i>
<i>A. bestiarum</i> LMG 13445	23	10	18	19	11
<i>A. bestiarum</i> LMG 13448	24	19	19	20	21
<i>A. bestiarum</i> LMG 13662	25	5	2	6	22
<i>A. bestiarum</i> LMG 13663	26	20	20	21	23
<i>A. bestiarum</i> LMG 13664	27	20	20	21	24
<i>A. bestiarum</i> LMG 13665	28	20	21	21	24
<i>A. bestiarum</i> LMG 13666	29	21	22	22	25
<i>A. bestiarum</i> LMG 13667	30	22	23	23	26
<i>A. bestiarum</i> LMG 13673	31	5	24	6	15
<i>A. bestiarum</i> LMG 14043	32	23	25	24	27
<i>A. bestiarum</i> LMG 14045	33	18	19	18	20
<i>A. piscicola</i> S1.2 <sup>T</sup>	34	24	26	25	28
<i>A. piscicola</i> R04	35	10	25	26	11
<i>A. piscicola</i> R09	36	8	27	27	29
<i>A. piscicola</i> R94	37	8	8	27	29
<i>A. popoffii</i> LMG 17541 <sup>T</sup>	38	25	28	28	30
<i>A. popoffii</i> LMG 17542	39	26	29	29	31
<i>A. popoffii</i> LMG 17543	40	26	30	30	31
<i>A. popoffii</i> LMG 17544	41	25	31	31	32
<i>A. popoffii</i> LMG 17545	42	26	32	32	33
<i>A. popoffii</i> LMG 17546	43	27	33	33	34
<i>A. popoffii</i> LMG 17547	44	25	32	34	35
<i>A. hydrophila</i> subsp. <i>hydrophila</i> CECT 839 <sup>T</sup>	45	28	34	35	36
<i>A. hydrophila</i> 1054148	46	29	35	36	37
<i>A. hydrophila</i> 1073633	47	30	36	37	38
<i>A. hydrophila</i> 1074611	48	31	36	38	39
<i>A. hydrophila</i> AE053	49	32	37	39	40
<i>A. hydrophila</i> AE150	50	33	38	40	41
<i>A. hydrophila</i> AE154	51	34	39	41	42
<i>A. hydrophila</i> AE180	52	35	40	42	43
<i>A. hydrophila</i> AE210	53	36	41	43	44
<i>A. hydrophila</i> AE215	54	37	36	44	39
<i>A. hydrophila</i> AE216	55	38	42	45	45
<i>A. hydrophila</i> subsp. <i>hydrophila</i> CECT 4330	56	39	43	46	46
<i>A. hydrophila</i> CECT 5174	57	40	44	47	47
<i>A. hydrophila</i> CECT 5216	58	41	45	48	48
<i>A. hydrophila</i> CECT 5233	59	42	46	49	49
<i>A. hydrophila</i> CECT 5236	60	43	47	50	50
<i>A. hydrophila</i> CECT 5734	56	39	43	46	46
<i>A. hydrophila</i> CECT 5738	61	44	48	51	51
<i>A. hydrophila</i> JCM 3967	62	45	49	52	52
<i>A. hydrophila</i> subsp. <i>hydrophila</i> JCM 3968	63	46	50	53	53
<i>A. hydrophila</i> subsp. <i>hydrophila</i> JCM 3976	64	47	51	54	54
<i>A. hydrophila</i> subsp. <i>hydrophila</i> JCM 3995	65	48	52	55	55
<i>A. hydrophila</i> subsp. <i>hydrophila</i> LMG 12665	66	49	36	56	56

Cepa	ST	<i>cpn60</i>	<i>dnaJ</i>	<i>gyrB</i>	<i>ropD</i>
<i>A. hydrophila</i> subsp. <i>hydrophila</i> LMG 13658	67	50	53	57	57
<i>A. hydrophila</i> subsp. <i>hydrophila</i> LMG 13660	68	51	54	58	58
<i>A. hydrophila</i> subsp. <i>hydrophila</i> LMG 18245	69	52	55	59	59
<i>A. hydrophila</i> subsp. <i>hydrophila</i> LMG 21080	70	53	56	60	60
<i>A. hydrophila</i> subsp. <i>hydrophila</i> LMG 21105	71	54	57	61	61
<i>A. hydrophila</i> subsp. <i>ranae</i> CIP 107985 <sup>T</sup>	72	55	58	62	62
<i>A. hydrophila</i> subsp. <i>dhakensis</i> CECT 5744 <sup>T</sup>	73	56	59	63	63
<i>A. hydrophila</i> subsp. <i>dhakensis</i> LMG 3769	74	57	60	64	64
<i>A. hydrophila</i> subsp. <i>dhakensis</i> LMG 3770	75	56	61	65	63
<i>A. hydrophila</i> subsp. <i>dhakensis</i> LMG 19558	76	58	62	66	65
<i>A. hydrophila</i> subsp. <i>dhakensis</i> LMG 19559	77	59	63	67	66
<i>A. hydrophila</i> subsp. <i>dhakensis</i> LMG 19560	78	60	64	68	67
<i>A. hydrophila</i> subsp. <i>dhakensis</i> LMG 19561	77	59	63	67	66
<i>A. hydrophila</i> subsp. <i>dhakensis</i> LMG 19564	79	61	65	69	68
<i>A. hydrophila</i> subsp. <i>dhakensis</i> LMG 19565	80	62	66	70	69
<i>A. hydrophila</i> subsp. <i>dhakensis</i> LMG 19566	77	59	63	67	66
<i>A. hydrophila</i> subsp. <i>dhakensis</i> LMG 19567	77	59	63	67	66
<i>A. aquariorum</i> MDC 47 <sup>T</sup>	81	63	67	71	70
<i>A. aquariorum</i> MDC 310	82	64	68	72	71
<i>A. aquariorum</i> MDC 317	83	65	69	73	72
<i>A. aquariorum</i> MDC 573	84	60	70	74	73
<i>A. salmonicida</i> CECT 894 <sup>T</sup>	85	66	17	75	74
<i>A. salmonicida</i> 45C	86	67	71	76	75
<i>A. salmonicida</i> 51C	87	68	72	77	76
<i>A. salmonicida</i> 83C	88	69	73	78	77
<i>A. salmonicida</i> 86C	89	70	74	79	78
<i>A. salmonicida</i> 87M	90	71	75	76	79
<i>A. salmonicida</i> 89C	91	72	76	80	80
<i>A. salmonicida</i> 92M	92	73	77	81	81
<i>A. salmonicida</i> 278T	93	74	78	82	82
<i>A. salmonicida</i> 621A	94	75	79	83	83
<i>A. salmonicida</i> 635A	95	76	80	84	84
<i>A. salmonicida</i> 818E	96	71	71	76	85
<i>A. salmonicida</i> 852T	97	77	81	85	86
<i>A. salmonicida</i> 856T	98	78	78	86	87
<i>A. salmonicida</i> 1062548	99	79	82	87	88
<i>A. salmonicida</i> AE169	100	80	83	88	89
<i>A. salmonicida</i> CECT 5173	101	81	84	89	90
<i>A. salmonicida</i> CECT 5201	102	66	85	90	91
<i>A. salmonicida</i> CECT 5205	103	82	86	91	92
<i>A. salmonicida</i> CECT 5206	104	83	87	92	93
<i>A. salmonicida</i> CECT 5209	105	71	88	76	94
<i>A. salmonicida</i> CECT 5211	106	84	89	93	95
<i>A. salmonicida</i> CECT 5214	107	76	90	94	96
<i>A. salmonicida</i> CECT 5215	108	85	80	95	97

Cepa	ST	<i>cpn60</i>	<i>dnaJ</i>	<i>gyrB</i>	<i>ropD</i>
<i>A. salmonicida</i> CECT 5219	109	86	91	96	98
<i>A. salmonicida</i> CECT 5220	110	86	77	97	99
<i>A. salmonicida</i> CECT 5222	111	87	71	98	100
<i>A. salmonicida</i> CECT 5223	112	88	92	99	101
<i>A. salmonicida</i> CECT 5230	113	82	50	100	102
<i>A. salmonicida</i> CECT 5239	114	89	93	101	103
<i>A. salmonicida</i> CECT 5242	115	90	94	102	104
<i>A. salmonicida</i> CECT 5247	116	91	95	103	105
<i>A. salmonicida</i> CECT 7453	117	92	96	104	106
<i>A. salmonicida</i> CIP 57.50	118	93	97	92	107
<i>A. salmonicida</i> LMG 3756	119	94	98	105	108
<i>A. salmonicida</i> S09-32	120	95	99	106	109
<i>A. salmonicida</i> subsp. <i>achromogenes</i> LMG 14900 <sup>T</sup>	121	66	85	107	91
<i>A. salmonicida</i> subsp. <i>masoucida</i> CECT 896 <sup>T</sup>	122	66	17	75	91
<i>A. salmonicida</i> subsp. <i>pectinolytica</i> CECT 5752 <sup>T</sup>	123	96	100	108	75
<i>A. salmonicida</i> subsp. <i>smithia</i> CIP 104757 <sup>T</sup>	124	66	101	109	110

Se observan dos conjuntos de cepas que comparten el mismo perfil alélico, el primero lo forman las cepas *A. hydrophila* subsp. *hydrophila* CECT 5734 y CECT 4330 y el segundo *A. hydrophila* subsp. *dhakensis* LMG 19559, LMG 19561 y LMG 19566.

A partir del estudio de los alineamientos múltiples de las secuencias y perfiles alélicos de los 4 loci, se determinaron el número de mutaciones y de sitios polimórficos así como los valores de diversidad genética y nucleotídica (Tabla 42).

Tabla 42. Diversidad genética.

Locus	Especie	Nº cepas	Nº Alelos	Nº Sitios Polimórficos		Diversidad Genética	Diversidad Nucleotídica
				(S)	Mutaciones	(Hd)	P <sub>i</sub> (JC)
<b>cpn60</b>	<i>A. bestiarum</i>	44	27	64	69	0,970±0,011	0,029
	<i>A. hydrophila</i>	44	38	88	101	0,990±0,008	0,042
	<i>A. salmonicida</i>	40	31	47	50	0,979±0,013	0,012
<b>dnaJ</b>	<i>A. bestiarum</i>	44	33	119	135	0,986±0,008	0,027
	<i>A. hydrophila</i>	44	37	180	203	0,986±0,010	0,037
	<i>A. salmonicida</i>	40	33	110	122	0,990±0,008	0,018
<b>gyrB</b>	<i>A. bestiarum</i>	44	34	123	141	0,986±0,008	0,026
	<i>A. hydrophila</i>	44	40	166	185	0,993±0,008	0,032
	<i>A. salmonicida</i>	40	35	86	89	0,990±0,010	0,013
<b>rpoD</b>	<i>A. bestiarum</i>	44	35	105	119	0,987±0,008	0,031
	<i>A. hydrophila</i>	44	38	117	126	0,990±0,008	0,034
	<i>A. salmonicida</i>	40	37	76	81	0,995±0,007	0,017

A partir de las secuencias concatenadas de los cuatro loci, se determinó el modelo de estructura poblacional, calculando el índice de asociación ( $I_A$ ) para el conjunto de las 128 cepas estudiadas y para los grupos *A. bestiarum*, *A. hydrophila* y *A. salmonicida*. En todos los casos  $I_A$  fue distinto de 0 (Tabla 43), indicando que la población estudiada presenta desequilibrio de ligamiento y, por lo tanto su estructura es clonal. También se calculó el índice de asociación estandarizado ( $I_A^S$ ) que, a diferencia del  $I_A$ , tiene en cuenta el número de loci analizados. Este valor también fue distinto de 0 en todos los casos, confirmándose así la presencia de desequilibrio de ligamiento y la estructura clonal de la población estudiada. Se observó una elevada diversidad genética que en todos los casos fue próxima a 1. Los valores de varianza observada ( $V_o$ ) en todos los casos superaron a los de la varianza esperada ( $V_e$ ).

Tabla 43. Análisis del desequilibrio de ligamiento.

	(Hd)*	P <sub>i</sub> (JC)**	V <sub>o</sub>	V <sub>e</sub>	I <sub>A</sub>	I <sub>A</sub> <sup>S</sup>	L <sub>MC</sub> ***	P
Todos los STs	0,999 ± 0,005	0,064	0,04	0,02	1,15±0,02	0,38±0,02	0,02	<1 x 10 <sup>-4</sup>
<i>A. bestiarum</i>	1,000 ± 0,005	0,028	0,12	0,07	0,79±0,07	0,26±0,07	0,07	<1 x 10 <sup>-4</sup>
<i>A. hydrophila</i>	0,993 ± 0,008	0,035	0,13	0,04	2,31±0,04	0,77±0,04	0,04	<1 x 10 <sup>-4</sup>
<i>A. salmonicida</i>	1,000 ± 0,006	0,016	0,07	0,05	0,65±0,05	0,22±0,07	0,05	<1 x 10 <sup>-4</sup>

\* Diversidad genética, \*\* Diversidad nucleotídica, \*\*\* Simulación del 5% del valor crítico

## 4.6 Factores de Virulencia

### 4.6.1 Actividades Enzimáticas

#### 4.6.1.1 Hidrólisis de almidón

El 97,66% de las cepas hidrolizaron el almidón (Tabla 44). Solamente las cepas *A. hydrophila* AE215 y AE216 y *A. salmonicida* subsp. *achromogenes* LMG 14900<sup>T</sup> no presentaron esta actividad.

**Tabla 44.** Porcentaje por especies de hidrólisis de almidón

<i>A. bestiarum</i>	100%
<i>A. hydrophila</i> subsp. <i>hydrophila/ranae</i>	93,1%
<i>A. hydrophila</i> subsp. <i>dhakensis/A. aquariorum</i>	100%
<i>A. piscicola</i>	100%
<i>A. popoffii</i>	100%
<i>A. salmonicida</i>	97,5%

#### 4.6.1.2 Hidrólisis de caseína

El 96,1% de las cepas ensayadas hidrolizaron la caseína (Tabla 45). Solamente dos cepas de *A. hydrophila* (AE215, AE216) y tres cepas de *A. salmonicida* (CECT 5219, CECT 896<sup>T</sup>, LMG 14900<sup>T</sup>) no presentaron esta actividad.

**Tabla 45.** Porcentaje por especies de hidrólisis de caseína.

<i>A. bestiarum</i>	100%
<i>A. hydrophila</i> subsp. <i>hydrophila/ranae</i>	93,1%
<i>A. hydrophila</i> subsp. <i>dhakensis/A. aquariorum</i>	100%
<i>A. piscicola</i>	100%
<i>A. popoffii</i>	100%
<i>A. salmonicida</i>	92,5%

#### 4.6.1.3 Hidrólisis de DNA

El 92,97% de las cepas estudiadas hidrolizaron DNA (Tabla 46), únicamente las siguientes cepas no presentaron esta actividad enzimática:

- *A. bestiarum*: CECT 5217, LMG 13665, LMG 13667
- *A. hydrophila*: AE215, AE216
- *A. piscicola*: HE22
- *A. salmonicida*: 818E, CECT 5214, CECT 5247

**Tabla 46.** Porcentaje por especies de hidrólisis de DNA.

<i>A. bestiarum</i>	88,5%
<i>A. hydrophila</i> subsp. <i>hydrophila/ranae</i>	93,1%
<i>A. hydrophila</i> subsp. <i>dhakensis/A. aquariorum</i>	100%
<i>A. piscicola</i>	90,9%
<i>A. popoffii</i>	100%
<i>A. salmonicida</i>	92,5%

#### 4.6.1.4 Hidrólisis de elastina

La mayoría de las cepas ( $\geq 80\%$ ) de *A. hydrophila* subsp. *hydrophila/ranae*, *A. hydrophila* subsp. *dhakensis/A. aquariorum* y *A. salmonicida* hidrolizaron la elastina, un porcentaje menor de las cepas de *A. bestiarum* y *A. piscicola* tuvieron actividad elastasa, y ninguna cepa de *A. popoffii* presentó esta actividad enzimática (Tabla 47)

**Tabla 47.** Porcentaje por especies de hidrólisis de elastina.

<i>A. bestiarum</i>	61,5%
<i>A. hydrophila</i> subsp. <i>hydrophila/ranae</i>	86,2%
<i>A. hydrophila</i> subsp. <i>dhakensis/A. aquariorum</i>	93,3%
<i>A. piscicola</i>	54,5%
<i>A. popoffii</i>	0,0%
<i>A. salmonicida</i>	80,0%



#### 4.6.1.5 Hidrólisis de gelatina

El 96,88% de las cepas ensayadas hidrolizaron la gelatina (Tabla 48), las únicas cepas que no presentaron esta actividad fueron las siguientes:

- *A. bestiarum*: CECT 5217
- *A. hydrophila*: AE215, AE216
- *A. salmonicida*: LMG 14900<sup>T</sup>

**Tabla 48.** Porcentaje por especies de hidrólisis de gelatina.

<i>A. bestiarum</i>	96,2%
<i>A. hydrophila</i> subsp. <i>hydrophila/ranae</i>	93,1%
<i>A. hydrophila</i> subsp. <i>dhakensis/A. aquariorum</i>	100%
<i>A. piscicola</i>	100%
<i>A. popoffii</i>	100%
<i>A. salmonicida</i>	97,5%

#### 4.6.1.6 Hemólisis

El 83,59% de las cepas presentaron una discreta  $\beta$ -hemólisis y un 2,34%  $\alpha$ -hemólisis (*A. hydrophila* AE238 y JCM 3976, y la cepa CECT 5209 de *A. salmonicida*). Las únicas cepas que no presentaron actividad hemolítica fueron las siguientes:

- *A. bestiarum*: 559A, LMG 13665, LMG 14045
- *A. hydrophila*: AE150, AE210, AE215, AE216, LMG 12665, LMG 18245, LMG 21080, LMG 21105
- *A. piscicola*: AE258
- *A. salmonicida*: 1062548, AE169, CECT 5219, CECT 5247, CECT 896<sup>T</sup>, LMG 14900<sup>T</sup>

**Tabla 49.** Porcentaje por especies de  $\beta$ -hemólisis.

<i>A. bestiarum</i>	88,4%
<i>A. hydrophila</i> subsp. <i>hydrophila/ranae</i>	72,4%
<i>A. hydrophila</i> subsp. <i>dhakensis/A. aquariorum</i>	100%
<i>A. piscicola</i>	90,9%
<i>A. popoffii</i>	100%
<i>A. salmonicida</i>	85%

#### 4.6.1.7 Hidrólisis de lecitina

El 89,06% de cepas presentó actividad lecitinasas, a diferencia de las siguientes cepas:

- *A. bestiarum*: 556A, AE145, AE238, CECT5741.
- *A. hydrophila*: AE215, AE216, JCM 3995, LMG 18245
- *A. hydrophila* subsp. *dhakensis*/*A. aquariorum*: LMG3769
- *A. piscicola*: R9
- *A. salmonicida*: CIP 104757<sup>T</sup>, LMG14900<sup>T</sup>

**Tabla 50.** Porcentaje por especies de hidrólisis de lecitina.

<i>A. bestiarum</i>	84,6%
<i>A. hydrophila</i> subsp. <i>hydrophila/ranae</i>	86,2%
<i>A. hydrophila</i> subsp. <i>dhakensis</i> / <i>A. aquariorum</i>	93,3%
<i>A. piscicola</i>	90,9%
<i>A. popoffii</i>	100%
<i>A. salmonicida</i>	95,0%

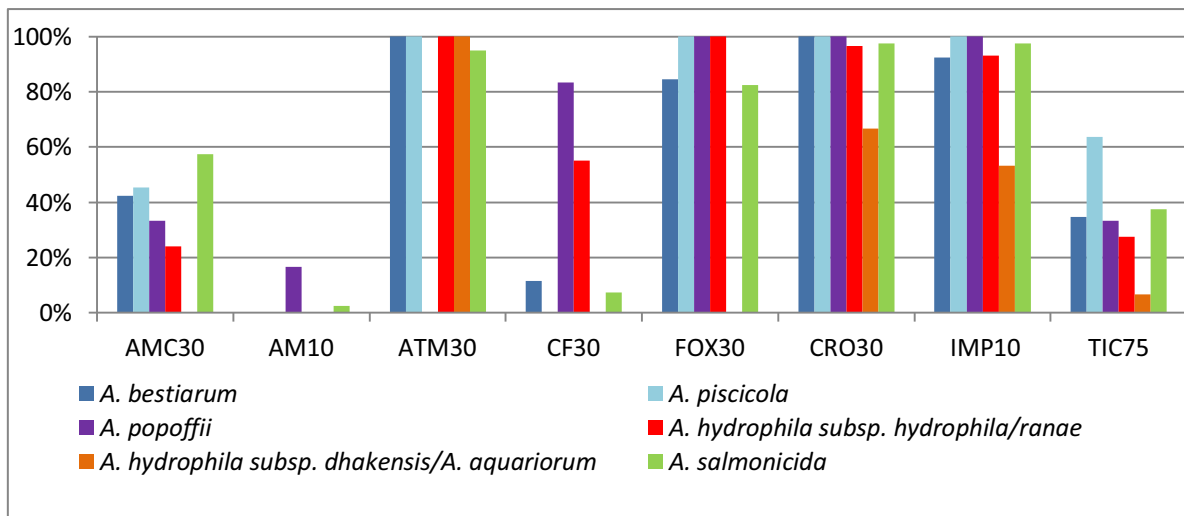
#### 4.7 Susceptibilidad a antibióticos

Se han analizado los resultados de las pruebas de sensibilidad a antibióticos agrupándolos en tres grupos:  $\beta$ -lactámicos, aminoglucósidos y otros.

En la Figura 38, se muestra que la sensibilidad de las cepas del AHC fue muy variable a los antibióticos  $\beta$ -lactámicos, cabe destacar que todas las cepas del complejo fueron resistentes a ampicilina excepto la cepa *A. salmonicida* CECT 894<sup>T</sup> y la cepa de *A. popoffii* LMG 17542.

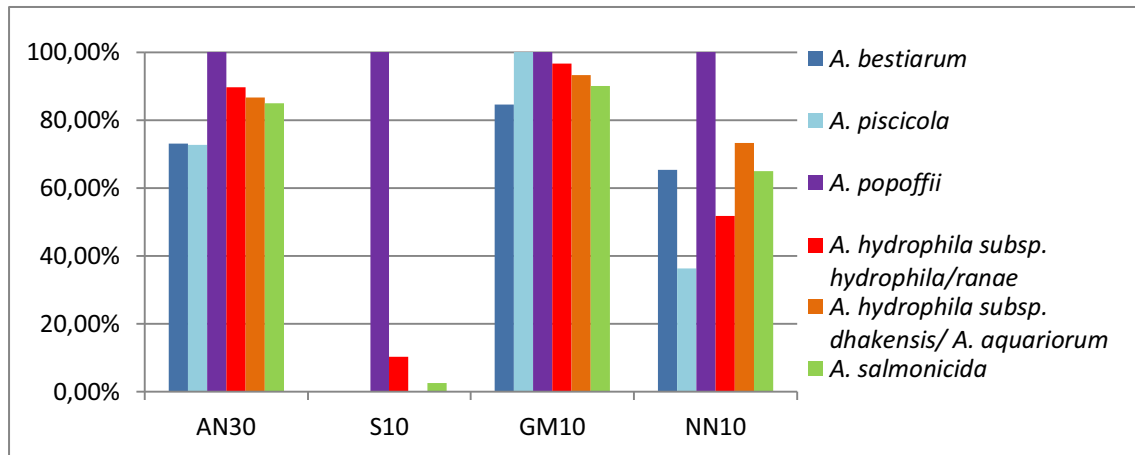
Las cepas de *A. bestiarum*, *A. piscicola*, *A. hydrophila* subsp. *hydrophila* y *A. salmonicida* mostraron sensibilidad a aztreonam, cefoxitina, ceftriaxona y imipenem (83-100%) en cambio, las cepas de *A. hydrophila* subsp. *hydrophila*, fueron resistentes a ampicilina y cefalotina (0-11,5%), para el resto de antibióticos la actividad observada fue variable. Las cepas de *A. popoffii* fueron las únicas

resistentes a aztreonam, pero mostraron sensibilidad a cefalotina, cefoxitina, ceftriaxona y imipenem (83-100%) mientras que la sensibilidad para amoxicilina-clavulánico, ampicilina y ticarcilina fue variable. Las cepas de *A. hydrophila* subsp. *dhakensis*/ *A. aquariorum* fueron las que mostraron mayor resistencia a los  $\beta$ -lactámicos aunque el 100% de ellas fueron sensibles a aztreonam, el 67% a ceftriaxona, el 53% a imipenem y únicamente un 6,7% a ticarcilina.



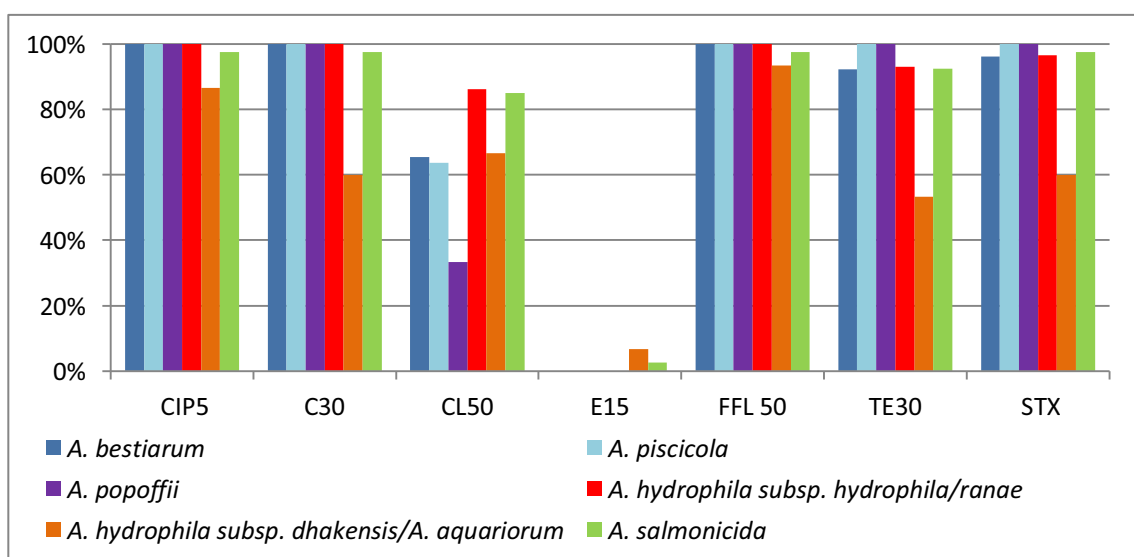
**Figura 38.** Porcentaje de sensibilidad a antibióticos  $\beta$ -lactámicos. AMC30: Amoxicilina-Clavulánico, AM10: Ampicilina, ATM: Aztreonam, CF30: Cefalotina, FOX30: Cefoxitina, CRO30: Ceftriaxona, IMP10: Imipenem, TIC5: Ticarcilina.

En la Figura 39 se muestra la sensibilidad de las cepas del AHC a cuatro antibióticos aminoglucósidos. Todas las cepas de *A. popoffii* fueron sensibles a estos cuatro antibióticos. La mayoría de las cepas de las otras especies fueron sensibles a la amikacina y gentamicina (73-100%) y resistentes a estreptomina (90-100%), mientras que la sensibilidad a tobramicina fue variable.



**Figura 39.** Porcentaje de sensibilidad a antibióticos aminoglucósidos. AN30: Amikacina, S10: Estreptomicina, GM10: Gentamicina, NN10: Tobramicina.

En la Figura 40 se han agrupado los resultados de sensibilidad a antibióticos de familias distintas a los  $\beta$ -lactámicos y aminoglucósidos. Todas las cepas estudiadas mostraron sensibilidad a ciprofloxacino, cloranfenicol, fosfomicina, tetraciclina y trimetoprim-sulfametoxazol excepto las cepas de *A. hydrophila* subsp. *dhakensis/A. aquariorum*, donde se observó una sensibilidad variable para cloranfenicol, tetraciclina y trimetoprim-sulfametoxazol (53-67%). Únicamente las cepas LMG 14900<sup>T</sup> y la LMG 19566 fueron sensibles a eritromicina y en el resto de antibióticos la sensibilidad observada fue variable.

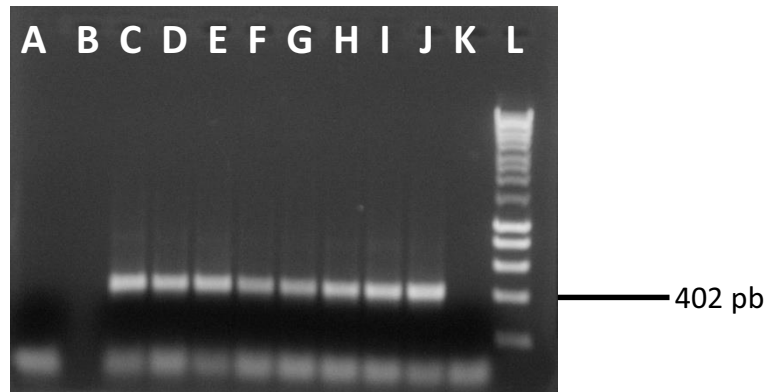


**Figura 40.** Porcentaje de sensibilidad a antibióticos distintos a  $\beta$ -lactámicos y aminoglucósidos. CIP5: Ciprofloxacino, C30: Cloranfenicol, CL50: Colistina, E15: Eritromicina, FFL 50: Fosfomicina, TE30: Tetraciclina, STX: trimetoprim-sulfametoxazol.

## 4.8 Detección de genes de virulencia

### 4.7.1 Gen *aer* (aerolisina)

La detección del gen que codifica para la aerolisina se realizó mediante la amplificación de un fragmento de 402 pb de las 2528 pb del gen completo.



**Figura 41.** Electroforesis en gel de agarosa del fragmento amplificado de 402 pb del gen *aer*, en el pocillo L se observa el marcador de pesos moleculares.

El gen *aer* se detectó en 124 de las 128 cepas ensayadas (96,9%), en 120 de ellas usando los cebadores *aer-f-d* y *aer-r-d* y en las 4 restantes se detectó realizando una PCR aninada amplificando previamente una región mayor con los cebadores *F-Ah-a* y *R-Ah-9*.

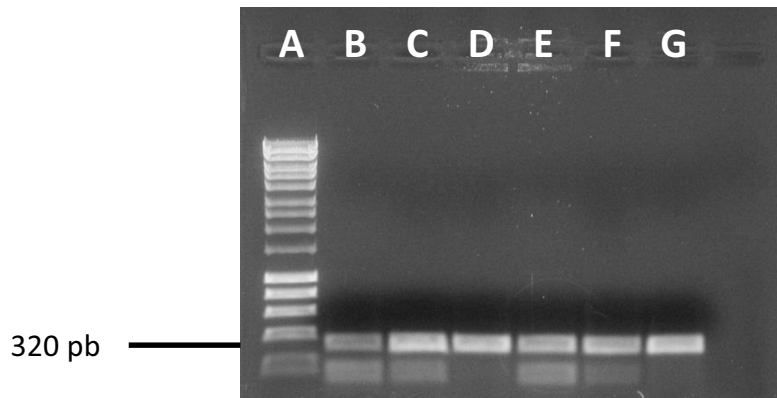
Únicamente en las cepas 1074611, AE150, LMG 21080 de *A. hydrophila* y en la cepa tipo de *A. hydrophila* subsp. *ranae* no se detectó el gen *aer*.

**Tabla 51.** Porcentaje de cepas en que se detectó el gen *aer*.

Especie	<i>aer</i>
<i>A. bestiarum</i>	100%
<i>A. hydrophila</i> subsp. <i>dhakensis</i> / <i>A. aquariorum</i>	100%
<i>A. hydrophila</i> subsp. <i>hydrophila/ranae</i>	86,2%
<i>A. piscicola</i>	100%
<i>A. popoffii</i>	100%
<i>A. salmonicida</i>	100%

#### 4.7.2 Gen *alt* (toxina citotónica termolábil)

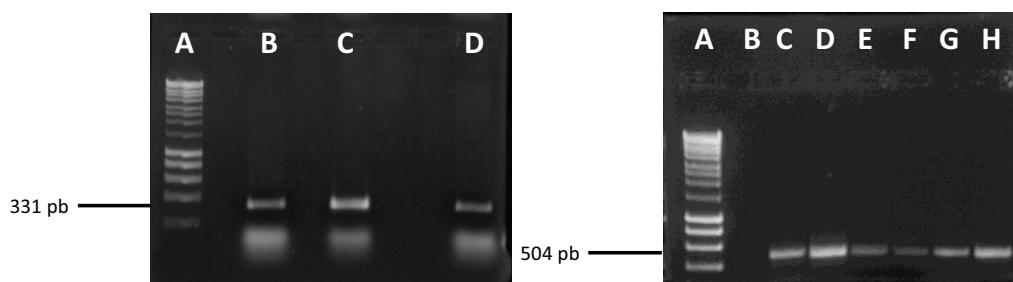
El gen *alt* se detectó en el todas las cepas mediante la amplificación de un fragmento de 320 pb.



**Figura 42.** Electroforesis en gel de agarosa del fragmento amplificado de 320 pb del gen *alt*, en el pocillo A se observa el marcador de pesos moleculares.

#### 4.7.3 Gen *ast* (toxina citotónica termoestable)

En las 128 cepas estudiadas se detectó el gen *ast*, el 75% de las cepas mediante la amplificación de un fragmento de 504 pb usando los cebadores *astF2* y *astR2*, y en el 25% restante mediante la amplificación de un fragmento de 331 pb usando los cebadores *astF1* y *astR1*.



**Figura 43.** Electroforesis en gel de agarosa de los fragmentos amplificados del gen *ast*, en la imagen de la izquierda se muestra los fragmentos amplificados de 331 pb y en la imagen de la derecha el de 504 pb. En ambos casos el pocillo A corresponde al marcador de pesos moleculares.

#### 4.9 Adherencia y efecto citopático en la línea celular Caco-2

Se consideró que las cepas bacterianas presentaban adherencia a las células Caco-2 cuando se observaron más de 10 bacterias adheridas a su superficie. Para valorar el efecto citopático se tuvieron en cuenta los siguientes parámetros:

- Destrucción de la monocapa de la línea celular.
- Picnosis nuclear donde se observa una contracción del núcleo.
- Redondeamiento de las células Caco-2.
- Observación de vacuolas en el citoplasma celular.

La presencia de alguno de los cuatro efectos mencionados anteriormente se consideró efecto citopático. Los resultados obtenidos se muestran en las Tablas 52-57.

**Tabla 52.** Efectos observados en los ensayos de adherencia en *A. bestiarum*.

<i>A. bestiarum</i>	Adherencia	Efecto citopático			
		D	P	R	V
CECT 4227 <sup>T</sup>	>30 bact/cél	+	+	NA	NA
112A	>30 bact/cél	+	+	NA	NA
556A	–	+	+	+	–
559A	>50 bact/cél	+	+	NA	NA
AE145	–	–	–	–	–
CECT 5217	>30 bact/cél	+	+	NA	NA
CECT 5226	>30 bact/cél	+	+	+	–
CECT 5741	10-20 bact/cél	+	+	NA	NA
CECT 5742	–	+	+	+	–
HE73	>30 bact/cél	+	+	NA	NA
LMG 13448	>30 bact/cél	+	+	NA	NA
LMG 13662	>30 bact/cél	+	+	NA	NA
LMG 13663	20-30 bact/cél	+	+	NA	NA
LMG 13665	>30 bact/cél	+	–	+	–
LMG 13667	10-20 bact/cél	+	+	+	–

D: destrucción de la monocapa, P: Picnosis, R: redondeamiento celular, V: vacuolas en el citoplasma, NA: no aplicable.

**Tabla 53.** Efectos observados en los ensayos de adherencia en *A. hydrophila*.

<i>A. hydrophila subsp. hydrophila/</i>	Adherencia	Efecto citopático			
		D	P	R	V
CECT 839 <sup>T</sup>	>30 bact/cél	+	+	NA	NA
1054148	10-20 bact/cél	-	+	+	NA
AE150	10-20 bact/cél	+	+	NA	-
AE180	10-20 bact/cél	+	NA	NA	NA
AE215	>100 bact/cél	+	+	NA	NA
AE216	>100 bact/cél	+	+	NA	NA
CECT 5174	>100 bact/cél	+	+	+	+
CECT 5738	>30 bact/cél	+	+	NA	NA
CIP 107985 <sup>T</sup>	-	-	-	-	-
JCM 3967	-	+	+	NA	NA
LMG 13658	>30 bact/cél	+	+	NA	NA
LMG 18245	>30 bact/cél	+	+	NA	NA
LMG 21080	>30 bact/cél	+	+	NA	NA

D: destrucción de la monocapa, P: Picnosis, R: redondeamiento celular, V: vacuolas en el citoplasma, NA: no aplicable.

**Tabla 54.** Efectos observados los ensayos de adherencia en *A. hydrophila subsp. dhakensis/ A. aquariorum*

<i>A. hydrophila subsp. dhakensis/ A. aquariorum</i>	Adherencia	Efecto citopático			
		D	P	R	V
CECT 5744 <sup>T</sup>	10-20 bact/cél	+	+	NA	NA
LMG 19559	>30 bact/cél	+	-	NA	NA
LMG 19561	+	+	+	NA	NA
LMG 19564	>30 bact/cél	+	+	NA	NA
MDC47 <sup>T</sup>	>100 bact/cél	+	+	+	+
MDC310	>30 bact/cél	+	+	NA	NA

D: destrucción de la monocapa, P: Picnosis, R: redondeamiento celular, V: vacuolas en el citoplasma, NA: no aplicable.

**Tabla 55.** Efectos observados los ensayos de adherencia en *A. piscicola*

<i>A. piscicola</i>	Adherencia	Efecto citopático			
		D	P	R	V
S1.2 <sup>T</sup>	>30 bact/cél	+	+	NA	NA
R 94	>30 bact/cél	+	+	NA	NA

D: destrucción de la monocapa, P: Picnosis, R: redondeamiento celular, V: vacuolas en el citoplasma, NA: no aplicable.



**Tabla 56.** Efectos observados los ensayos de adherencia en *A. popoffii*

<i>A. popoffii</i>	Adherencia	Efecto citopático			
		D	P	R	V
LMG 17541 <sup>T</sup>	-	-	-	-	-
LMG 17542	>30 bact/cél	+	+	NA	NA
LMG 17546	-	-	-	-	-

D: destrucción de la monocapa, P: Picnosis, R: redondeamiento celular, V: vacuolas en el citoplasma, NA: no aplicable.

**Tabla 57.** Efectos observados en los ensayos de adherencia en *A. salmonicida*

<i>A. salmonicida</i>	Adherencia	Efecto citopático			
		D	P	R	V
CECT 894 <sup>T</sup>	-	-	-	+	+
045C	>30 bact/cél	+	+	NA	NA
089C	>30 bact/cél	+	+	NA	NA
092M	-	-	+	+	+
278A	>30 bact/cél	+	+	NA	NA
852T	>30 bact/cél	+	+	NA	NA
1062548	>30 bact/cél	+	+	NA	NA
CECT 5206	10-20 bact/cél	+	+	NA	NA
CECT 5209	10-20 bact/cél	+	+	NA	NA
CECT 5211	10-20 bact/cél	+	+	NA	NA
CECT 5219	>30 bact/cél	+	+	NA	NA
CECT 5222	>30 bact/cél	+	+	NA	NA
CECT 5247	-	-	-	-	-
CECT 5752 <sup>T</sup>	-	-	-	+	-
CECT 7453	-	+	-	+	+
CIP 57.50	10-20 bact/cél	-	-	+	-
CECT 896 <sup>T</sup>	-	-	-	+	+
LMG 3756	10-20 bact/cél	-	-	+	+
LMG 14900 <sup>T</sup>	-	-	-	+	+
S09-32	>30 bact/cél	+	-	NA	NA

D: destrucción de la monocapa, P: Picnosis, R: redondeamiento celular, V: vacuolas en el citoplasma, NA: no aplicable.

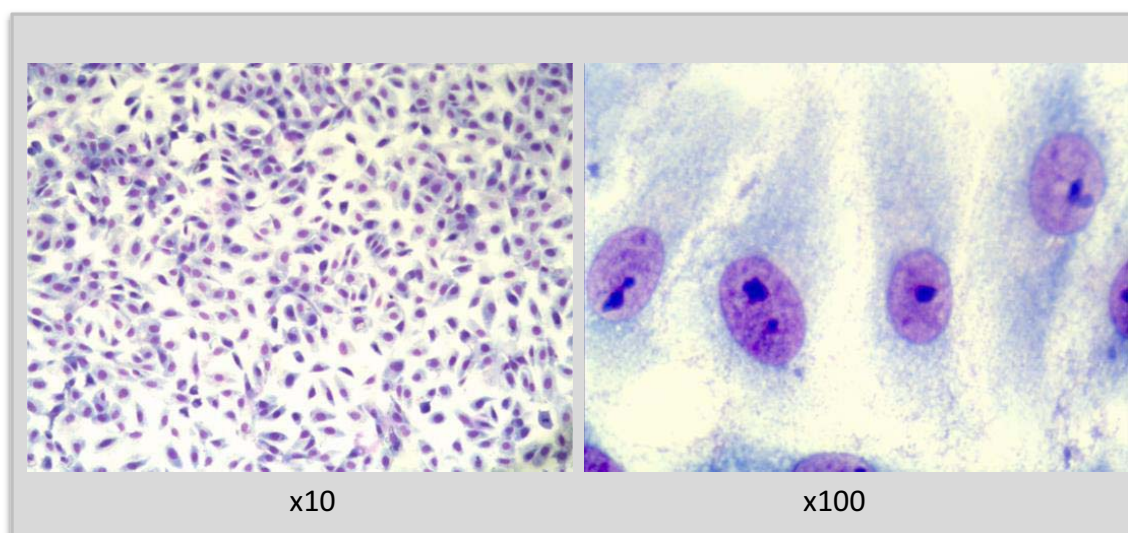
En la Tabla 58 se muestra un resumen de los datos mostrados anteriormente:

**Tabla 58.** Porcentaje de cepas por especie en el que se observó adherencia y efecto citopático.

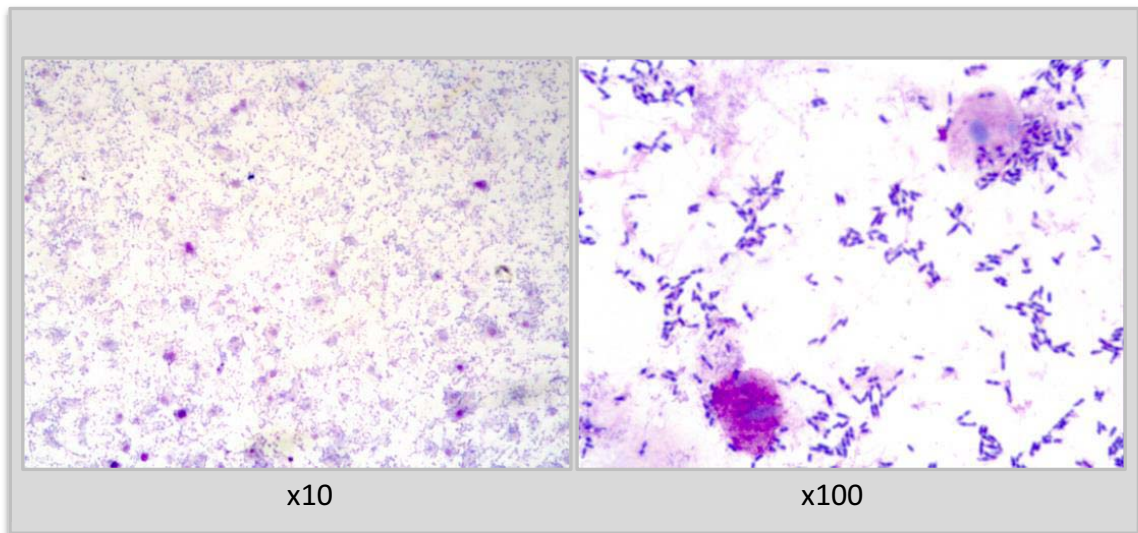
<b>Especie</b>	<b>Adherencia</b>	<b>Efecto citopático</b>
<i>A. bestiarum</i> (n=15)	80%	93%
<i>A. hydrophila</i> subsp. <i>hydrophila/ranae</i> (n=13)	84%	92%
<i>A. hydrophila</i> subsp. <i>dhakensis/A. aquariorum</i> (n=6)	100%	100%
<i>A. piscicola</i> (n=2)	100%	100%
<i>A. popoffii</i> (n=3)	33%	33%
<i>A. salmonicida</i> (n=20)	65%	95%

Todas las cepas de *A. hydrophila* subsp. *dhakensis/A. aquariorum* y *A. piscicola* tuvieron capacidad para adherirse y provocar efecto citopático a la línea celular Caco-2, en cambio sólo con la cepa LMG 17542 de *A. popoffii* se observaron estos efectos. Hay que destacar únicamente que el 65% de las cepas de *A. salmonicida* se adhirieron a la línea celular y aunque este porcentaje es menor que en la mayoría de otras especies el porcentaje de efecto citopático observado fue mayor (95%).

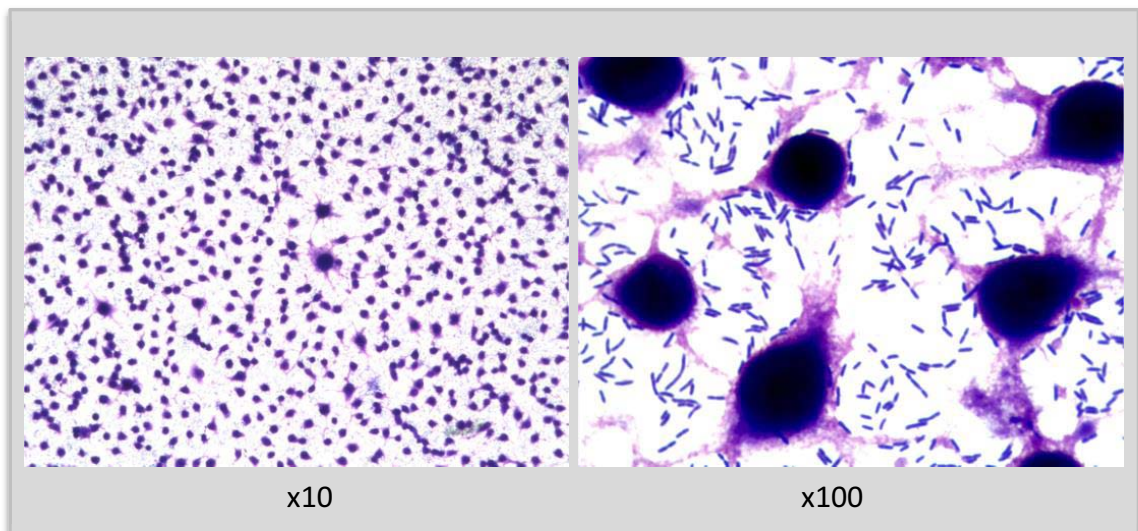
A continuación se muestran algunas de las imágenes obtenidas por microscopía óptica, en la Figura 44 se observa el control (-) y en las Figuras 45-52 los resultados de las cepas tipo de todas las especies y subespecies incluidas en el estudio.



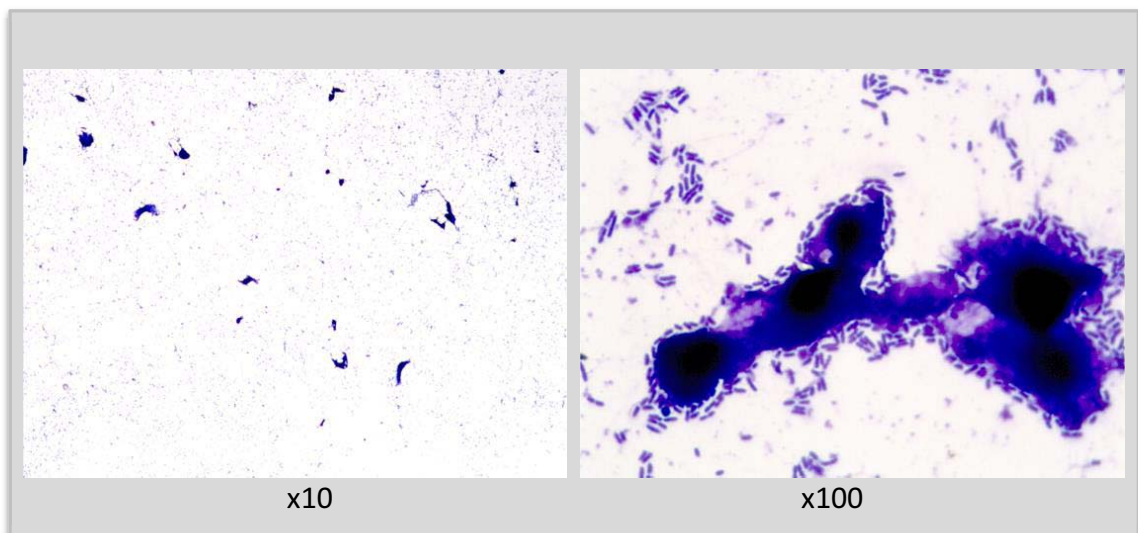
**Figura 44.** Control -, cultivo semiconfluyente de células Caco-2 sin infectar.



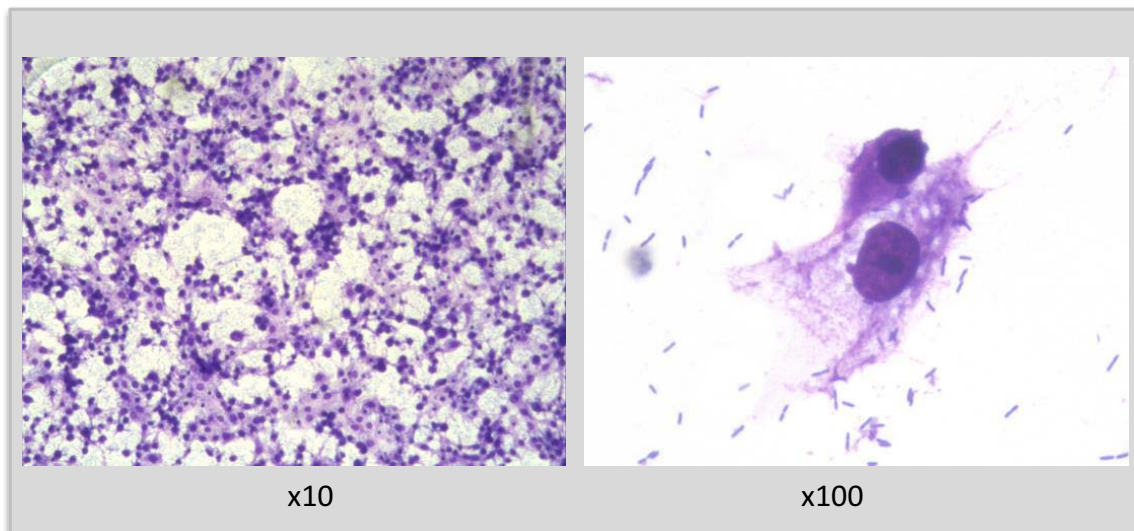
**Figura 45.** Cultivo semiconfluyente de células Caco-2 infectado durante 90 min con *A. aquariorum* MDC 47<sup>T</sup>.



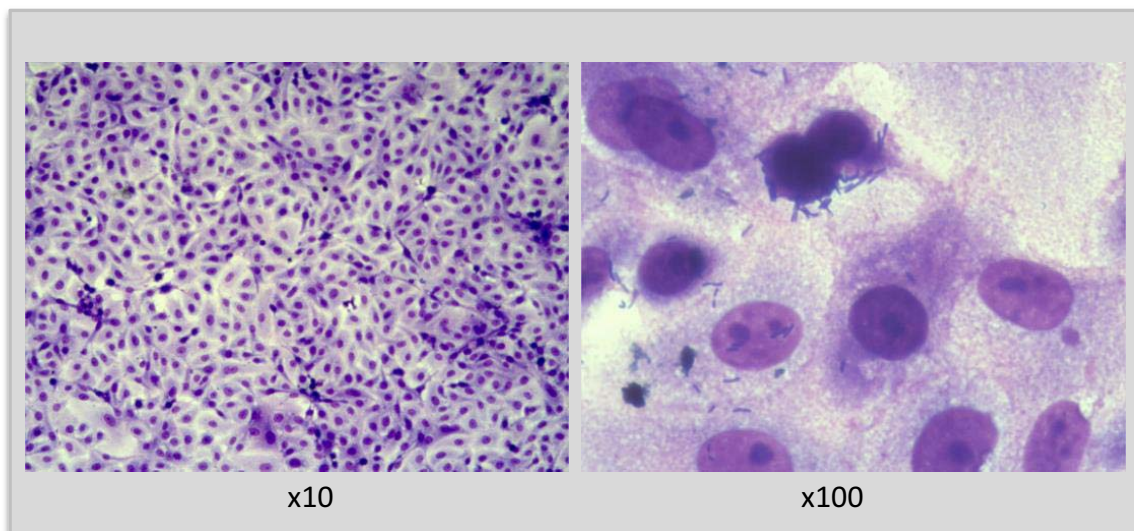
**Figura 46.** Cultivo de células Caco-2 infectado durante 90 min con *A. bestiarum* CECT 4727<sup>T</sup>.



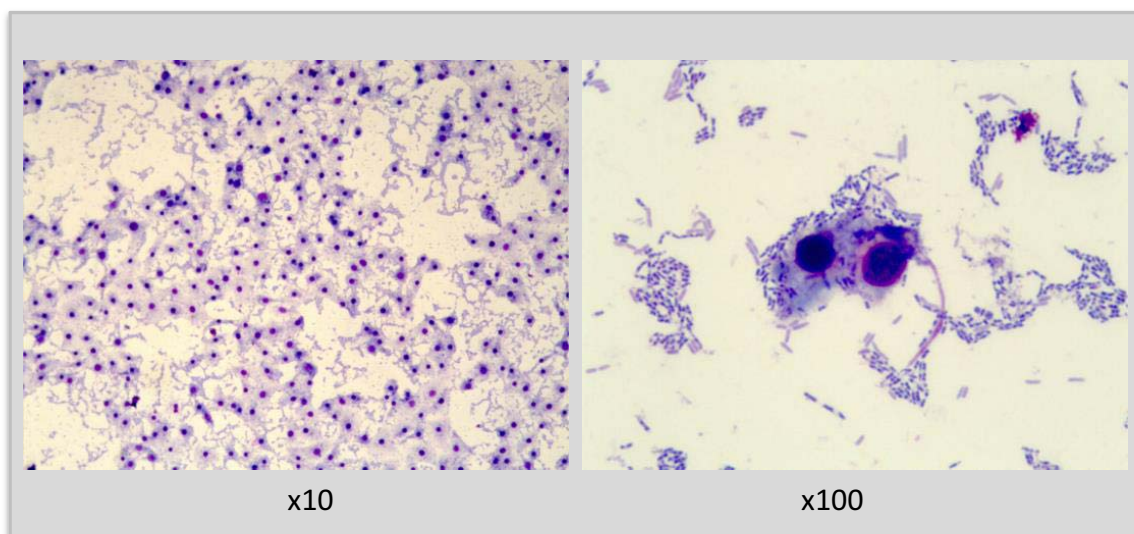
**Figura 47.** Cultivo de células Caco-2 infectado durante 90 min con *A. hydrophila* CECT 839<sup>T</sup>.



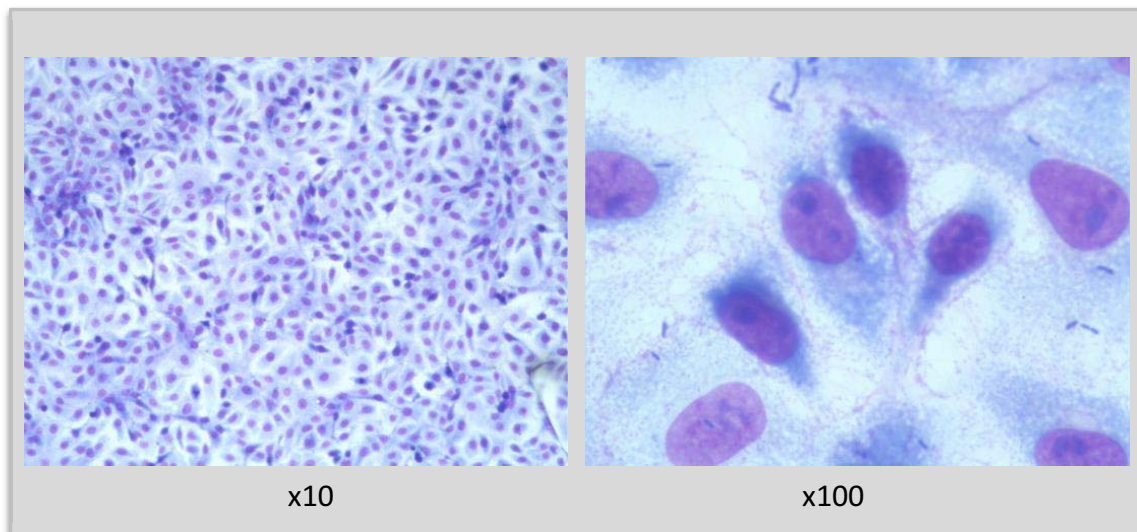
**Figura 48.** Cultivo de células Caco-2 infectado durante 90 min con *A. hydrophila* subsp. *dhakensis* CECT 5744<sup>T</sup>.



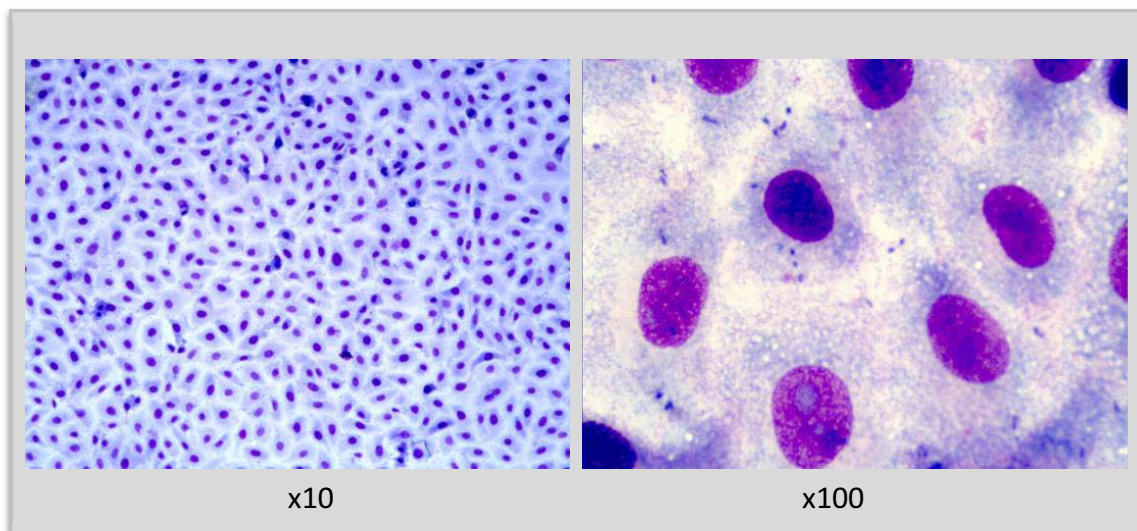
**Figura 49.** Cultivo de células Caco-2 infectado durante 90 min con *A. hydrophila* subsp. *ranae* CIP 107985<sup>T</sup>.



**Figura 50.** Cultivo de células Caco-2 infectado durante 90 min con *A. piscicola* S1.2<sup>T</sup>.



**Figura 51.** Cultivo de células Caco-2 infectado durante 90 min con *A. popoffii* LMG 17541<sup>T</sup>.



**Figura 52.** Cultivo de células Caco-2 infectado durante 90 min con *A. salmonicida* CECT 894<sup>T</sup>.

## **Capítulo 5**

---

### **Discusión**



## 5.1 Cepas bacterianas

Un paso previo al estudio filogenético y de los factores de virulencia del conjunto de especies del “complejo de especies *A. hydrophila*” (AHC), fue verificar a nivel de especie las cepas incluidas en este trabajo en base a la secuencia del gen *cpn60*, descartando aquellas cepas que no pertenecían al AHC. Para este fin se seleccionó el gen *cpn60*, ya que se trata de un gen con un buen poder discriminatorio a nivel de especie similar a los genes *gyrB* o *rpoD*. Ahora bien, el gen *cpn60* presenta una ventaja, respecto a los otros genes, ya que es suficiente utilizar una secuencia parcial de 555pb (región UT o "universal target") que es representativa de la variabilidad de la secuencia del gen completo, tal como se ha demostrado en una amplia variedad de especies de bacterias, arqueas y eucariotas (Hill y col., 2004; Thompson y col., 2005; Fares y Travers, 2006; Goyal y col., 2006; Hill y col., 2006; Gupta y Sneath, 2007; Miñana-Galbis y col., 2009) (cpnDB; <http://cpndb.cbr.nrc.ca>). Esta identificación previa al estudio permitió clasificar algunas cepas que habían sido cedidas por algunos centros como *Aeromonas* sp. y reclasificar otras que estaban mal identificadas.

Estos resultados pueden explicarse por la dificultad que existe para diferenciar las cepas de *Aeromonas* a nivel de especie mediante pruebas fenotípicas clásicas ya que se requiere un número de pruebas muy elevado (Abbott y col., 2003). Martin-Carnahan y Joseph (2005) describen 57 pruebas bioquímicas para la diferenciación de las especies móviles de *Aeromonas* y 19 para las especies psicrófilas no móviles, sin embargo Miñana-Galbis y col. (2010a) utilizan 16 pruebas bioquímicas en la descripción de *A. diversa*, y Aravena-Román y col. (2012) 10 pruebas para la diferenciación de *A. australiensis* del resto de especies del género. Esta complejidad aumenta cuando se trata de las especies del AHC, especialmente entre *A. hydrophila*, *A. bestiarum* y las cepas mesófilas de *A. salmonicida* (Miñana-Galbis y col., 2002b; Valera y Esteve, 2002; Abbott y col., 2003; Martínez-Murcia y col., 2005), ya que muy pocas pruebas bioquímicas son útiles para su diferenciación. Además, las cepas tipo de *A. bestiarum* y *A. salmonicida* presentan la misma secuencia del gen 16S rRNA y también existen discrepancias en los resultados de la



hibridación DNA-DNA entre estas dos especies, según Martínez-Murcia y col. (2005) el valor de hibridación DNA-DNA es del 75,6%, aunque posteriormente Nhung y col. (2007) publicaron que en este caso el valor oscila entre el 68 y 72%. Estas incongruencias, tanto en los resultados de la hibridación DNA-DNA como en las filogenias elaboradas a partir del gen 16S rRNA, hacen que sea necesario utilizar métodos alternativos para la delimitación de especies, como la secuenciación de genes conservados que codifican para funciones esenciales de la célula y que se encuentran en copia única en el genoma como: *cpn60*, *dnaJ*, *gyrB*, *mdh*, *recA*, *rpoD*, etc. (Yáñez y col., 2003; Soler y col., 2004; Kúpfer y col., 2006; Nhung y col., 2007; Sepe y col., 2008; Miñana-Galbis y col., 2009; Farfán y col., 2010). Distintos trabajos han demostrado que el estudio basado en secuencias parciales de genes conservados permite conseguir una buena agrupación taxonómica de las especies del género *Aeromonas* (Martínez-Murcia y col., 2011; Martino y col., 2011; Silver y col., 2011; Roger y col., 2012). Así mismo este tipo de análisis permite también una buena discriminación a nivel intraespecífico dentro del AHC (Fusté y col., 2012).

Sería interesante que las cepas de referencia depositadas en colecciones de cultivo tipo se actualizaran y controlaran con métodos más actuales, como el que acabamos de citar, que evitarían algunas clasificaciones erróneas. Un ejemplo de ello en el caso de *Aeromonas* es el de la cepa de referencia CIP 57.50 clasificada como *A. hydrophila* hasta 2010 y reclasificada como *A. salmonicida* después de un estudio basado en cuatro genes conservados (*cpn60*, *dnaJ*, *gyrB* y *rpoD*) (Miñana-Galbis y col., 2010b).

## 5.2 Características fenotípicas

### 5.2.1 Producción de melanina

Al cultivar las cepas en placas de TSA se observó que algunas de ellas producían un pigmento de color marrón, la mayoría de estas cepas pertenecían a *A. salmonicida* excepto dos identificadas como *A. bestiarum* (LMG 13663 y LMG 13664). En la bibliografía, la capacidad de producir pigmento marrón de las cepas de

*A. salmonicida* subsp. *salmonicida* se encuentra ampliamente descrita (Gibson y George, 1998; Pavan y col., 2000; Martin-Carnahan y Joseph, 2005). Una de las cepas de *A. bestiarum* que forman pigmento, la LMG 13663, fue descrita por Ross (1962) como *A. liquefaciens*, había sido aislada del tracto intestinal de un salmón plateado y depositada en la colección americana de cepas tipo como ATCC 14715. En el artículo de su descripción ya se hace referencia a que pese a la formación de pigmento, esta cepa no pertenece a *A. salmonicida*. Posteriormente, Abbott y col. (2003) realizaron un estudio para crear un esquema de identificación fenotípica útil para diferenciar las distintas especies del género *Aeromonas*, en este estudio se hace referencia a esta cepa como *A. bestiarum* y se describe su capacidad de producir pigmento marrón como una característica atípica. Este hecho es un ejemplo de la diversidad fenotípica que puede existir dentro de una misma especie, la obtención de resultados fenotípicos atípicos no característicos de una determinada especie dificulta su identificación mediante este tipo de pruebas.

### 5.2.2 Fermentación de sorbitol y uso de lactato como única fuente de carbono

Según diferentes autores, la fermentación de sorbitol y la asimilación de lactato, junto con la utilización de citrato, de ácido urocónico, la oxidación de gluconato y la fermentación de celobiosa, lactosa y L-ramnosa, forman parte de las pruebas bioquímicas clave para la diferenciación entre *A. bestiarum*, *A. hydrophila* y *A. salmonicida* (Miñana-Galbis y col., 2002b; Valera y Esteve, 2002; Abbott y col., 2003; Martínez-Murcia y col., 2005; Martin-Carnahan y Joseph, 2005), por lo que en este estudio se han utilizado estas dos primeras pruebas bioquímicas para la separación de las especies integrantes del AHC.

Los resultados de la fermentación de sorbitol y asimilación de lactato fueron los esperados según lo descrito en la bibliografía (Huys y col., 1997b; Pavan y col., 2000; Miñana-Galbis y col., 2002; Valera y Esteve, 2002; Abbott y col., 2003; Martin-Carnahan y Joseph, 2005; Beaz-Hidalgo y col., 2009), excepto para las cepas de *A. aquariorum*, ya que al igual que las de *A. hydrophila* subsp. *dhakensis*, todas las cepas ensayadas utilizaron lactato como única fuente de carbono, contradiciendo lo

publicado por Martínez-Murcia y col. (2008) en la descripción de *A. aquariorum* como nueva especie.

Analizando los resultados obtenidos se ha podido confirmar la utilidad de estas dos pruebas para diferenciar la mayoría de cepas de *A. bestiarum*, *A. hydrophila* y las cepas mesófilas de *A. salmonicida*, por el contrario no son concluyentes para la diferenciación entre las cepas de *A. hydrophila* subsp. *dhakensis*/*A. aquariorum*, *A. hydrophila*, y *A. popoffii*. Ahora bien, cabe decir que *A. popoffii* se puede diferenciar mediante otras pruebas fenotípicas clave (Tabla 2).

### 5.3 Taxonomía y filogenia molecular

Como se ha comentado anteriormente, la taxonomía del género *Aeromonas* es compleja debido a la dificultad que presenta en algunos casos la identificación fenotípica a nivel de especie. Esta complejidad se ve agravada por la falta de concordancia entre los resultados fenotípicos y genotípicos (Martino y col., 2011), las discrepancias entre los resultados de los estudios de hibridación DNA-DNA (Martínez-Murcia y col., 2005) y la imposibilidad de diferenciar a nivel de especie con las secuencias del gen del 16S rRNA, debido a que las secuencias de este gen tiene una alta similitud (98-100%) entre especies estrechamente relacionadas como *A. bestiarum*, *A. salmonicida* y *A. piscicola* (Beaz-Hidalgo y col., 2010). Además, la continua descripción de nuevas especies y la reclasificación de las ya existentes agravan aún más la clasificación de las especies de este género.

#### 5.3.1 Análisis individualizado de los genes

En este trabajo se ha llevado a cabo un estudio filogenético a partir de la secuenciación parcial de cuatro genes conservados (*cpn60*, *dnaJ*, *gyrB* y *rpoD*), que se encuentran distribuidos de forma separada en el genoma, y por lo tanto se puede asumir que su adquisición no tienen relación con elementos móviles.

Si se comparan las filogenias obtenidas a partir de la secuenciación parcial de los genes *cpn60*, *dnaJ*, *gyrB* y *rpoD*, se observa que las diferentes especies del AHC

se agrupan según lo esperado (Soler y col., 2004; Saavedra y col., 2006; Nhung y col., 2007; Miñana-Galbis y col., 2009), aunque existen algunas discrepancias que se pueden explicar debido a las diferencias en los porcentajes de divergencia obtenidos en cada uno de los genes. La principal discordancia se observa en la filogenia construida a partir de las secuencias del gen *dnaJ*, donde seis cepas (CECT 5214, CECT 5219, CECT 5742, HE73, JCM 3968, LMG 13658) se agruparon en clados distintos a los de la especie a la que pertenecen, sugiriendo la posible existencia de eventos de recombinación.

En los cuatro árboles filogenéticos se diferencian tres grandes clados que corresponden a *A. bestiarum*, *A. hydrophila* y *A. salmonicida*. En ellos, el clado *A. bestiarum* agrupa a las especies *A. bestiarum*, *A. piscicola* y *A. popoffii* que a su vez forman subgrupos diferenciados en el caso de los genes *cpn60*, *gyrB* y *rpoD*. Esta estrecha relación filogenética se había observado previamente entre *A. bestiarum* y *A. popoffii* con estos mismos genes (Saavedra y col., 2006; Miñana-Galbis y col., 2009), y también con *A. piscicola* tras su descripción como nueva especie (Beaz-Hidalgo y col., 2009). Ahora bien, cuando se tienen en cuenta las distancias génicas, en el gen *rpoD* se observa un rango de distancia interespecífica del 2,7–5% entre *A. bestiarum* y *A. piscicola* que se solapa con los rangos interespecíficos, de manera que algunas cepas no se pueden identificar inequívocamente como *A. bestiarum* o *A. piscicola*. Por otra parte, en el árbol elaborado a partir del gen *dnaJ*, las especies *A. bestiarum* y *A. piscicola* se agrupan en la misma rama formando un grupo monofilético. Este hecho se explica al comparar los porcentajes de divergencia interespecífica obtenidos para el gen *dnaJ*, ya que entre estas dos especies los valores oscilan entre el 0,7% y el 2,1%, valores que son propios de una divergencia intraespecífica (Nhung y col., 2007) y similares a los obtenidos muy recientemente por otros autores (Martínez-Murcia y col., 2011). En el árbol filogenético del gen *dnaJ* las cepas de *A. salmonicida* CECT 5219 Y CECT 5214 se agrupan en el clado de *A. bestiarum*.

En todos los casos, el clado *A. salmonicida* agrupa todas las cepas identificadas como *A. salmonicida*, incluyendo las cepas tipo de las cinco

subespecies, siendo el clado más homogéneo de los tres y con una relación filogenética más estrecha con el grupo *A. bestiarum*. Cuando se comparan las distancias génicas en el caso del gen *gyrB*, se observa que la separación entre *A. salmonicida* y las especies del clado de *A. bestiarum* presenta dificultades, especialmente entre *A. salmonicida* y *A. piscicola*, ya que los valores de distancia se sitúan entre el 1,7% y el 4,0%. Además, en el árbol filogenético del gen *dnaJ* hay cepas de otras especies (*A. bestiarum* CECT 5742 y HE73, y *A. hydrophila* subsp. *hydrophila* JCM 3968) que se agrupan en el clado *A. salmonicida*.

El clado *A. hydrophila* se divide en dos subgrupos claramente separados entre sí, uno de ellos incluye todas las cepas de *A. aquariorum* y de *A. hydrophila* subsp. *dhakensis*, y el segundo al resto de cepas de la especie *A. hydrophila*, incluyendo las cepas tipo de *A. hydrophila* subsp. *hydrophila* y *A. hydrophila* subsp. *ranae*. En los cuatro genes analizados, los rangos de valores de las distancias génicas obtenidas dentro de cada subgrupo corresponderían a valores intraespecíficos. Obteniéndose valores correspondientes a especies diferentes entre los dos grupos. Este resultado es concordante con estudios filogenéticos basados en los genes 16S rRNA y *cpn60* (Miñana-Galbis y col., 2004a; Miñana-Galbis y col., 2009), que indicaban que *A. hydrophila* subsp. *dhakensis* podía representar una especie diferente de *A. hydrophila*. Esta misma idea es la que recogen Beaz-Hidalgo y Figueras (2013), que han propuesto la reclasificación de *A. hydrophila* subsp. *dhakensis* y *A. aquariorum* en la nueva especie *A. dhakensis*. Como ocurre en los otros dos clados, en el caso del gen *dnaJ* hay cepas que no se agrupan dentro de la misma especie, se puede observar que la cepa *A. hydrophila* subsp. *hydrophila* LMG 13658 está incluida en el subgrupo *A. hydrophila* subsp. *dhakensis*.

Por consiguiente, el análisis filogenético individualizado de los cuatro genes indica que el gen *cpn60* es el único gen que ha permitido diferenciar todas las especies del AHC y que no sería recomendable utilizar el gen *dnaJ* en la realización de estudios filogenéticos en el género *Aeromonas*.

Para intentar minimizar las discrepancias observadas en los distintos genes utilizados en este análisis de acuerdo con las recomendaciones de utilizar las

secuencias concatenadas de diversos genes conservados en los estudios filogenéticos y taxonómicos (Gevers y col., 2005), se ha llevado a cabo un análisis de secuencias multilocus (MLSA).

### 5.3.2 Análisis de secuencias multilocus (MLSA)

El estudio filogenético presentado en esta tesis, forma parte de uno más amplio que incluye también los genes *mdh* y *recA* (Fusté y col., 2012), observándose que la topología del árbol construido con las secuencias concatenadas de los seis genes, es muy similar a la obtenida con los cuatro genes aquí estudiados. En ambos casos la población de AHC se divide en tres grandes clados, *A. bestiarum*, *A. hydrophila* y *A. salmonicida*.

Las cepas que en el árbol elaborado a partir de las secuencias del gen *dnaJ* se situaban en clados distintos a los de la especie a la que pertenecen, en el árbol de los genes concatenados, sí se agruparon en el clado de su misma especie. Aún así, se puede observar que algunas de estas cepas se sitúan fuera del núcleo del grupo de su especie (Figura 36). Por otro lado, y como ocurre en algunos árboles génicos, las especies *A. bestiarum* y *A. piscicola* se agrupan en la misma rama filogenética, lo cual pone en entredicho su consideración como dos especies diferentes. Fenotípicamente, *A. piscicola* únicamente puede diferenciarse de *A. bestiarum* por la prueba de fermentación de arabinosa. Si consideramos el valor de hibridación DNA-DNA (HDD) entre las cepas tipo de ambas especies vemos que es del 64.4% (Beaz-Hidalgo y col., 2009), valor que está próximo al límite establecido del 70%, pero hay que tener en cuenta que este valor es orientativo y puede haber cepas que pertenezcan a una misma especie con valores de HDD en el rango de 50–70% (Coenye y col., 2005; Gevers y col., 2005). Para resolver esta duda taxonómica sería conveniente utilizar otro tipo de aproximación que permitiera aclarar si se trata o no de especies distintas. Si consideramos los valores de distancias génicas obtenidas tanto al considerar las secuencias concatenadas como las del gen *cpn60*, vemos que los valores para la diferenciación a nivel de especie se situarían en el 3,4–4,3% y el

4,1% respectivamente (Tablas 30 y 38), valores superiores a los obtenidos al comparar *A. bestiarum* con *A. piscicola* (2,3–3,4% y 3,5–3,9%).

El análisis de secuencias multilocus ha permitido la diferenciación entre cepas de la misma especie que comparten secuencia nucleotídica en alguno de los genes secuenciados, de manera que únicamente las cepas *A. hydrophila* CECT 4330 y 5734, y las cepas *A. hydrophila* subsp. *dhakensis* LMG 19559, 19561, 19566 y 19567 presentan una secuencia concatenada idéntica (Figura 36 y Tabla 41). Estas cepas, tanto en el caso de *A. hydrophila* como de *A. hydrophila* subsp. *dhakensis* parecen tener el mismo origen y, por tanto, bien podrían tratarse de clones (Anexo 8.3).

Recientemente se han publicado otros trabajos filogenéticos donde se han realizado estudios de MLSA que incluyen todas las especies del género *Aeromonas* (Martínez-Murcia y col., 2011; Roger y col., 2012). Para comparar los árboles obtenidos por estos autores con nuestros datos, hemos construido un árbol con las secuencias concatenadas de los genes que hemos estudiado, en el que se han incluido todas las especies tipo y de referencia del género *Aeromonas* (Figura 37), La situación de las especies del AHC es muy similar en todos los árboles, formando dos clados independientes, uno que incluye a *A. salmonicida*, *A. bestiarum*, *A. piscicola* y *A. popoffii*, y otro que agrupa a *A. hydrophila* y *A. hydrophila* subsp. *dhakensis* / *A. aquariorum*. Por tanto se puede observar que el denominado “complejo de especies de *A. hydrophila*” no es monofilético y en consecuencia es cuestionable su realidad como grupo a nivel filogenético.

### 5.4 Estructura poblacional

Para determinar la estructura genética de la población de AHC, en base a las frecuencias alélicas de los cuatro genes estudiados, se calculó el índice de asociación ( $I_A$ ) (Brown y col., 1980; Smith y col., 1993) que permite calcular el grado de asociación que existe entre los loci estudiados y analiza si alguna combinación de alelos se repite con una frecuencia mayor a la esperada como consecuencia del azar. Como el valor de  $I_A$  depende del número de loci analizados, también se ha calculado

el índice de asociación estandarizado ( $I_A^S$ ) (Haubold y col., 1998) que corrige los valores de  $I_A$  en función del número de loci estudiados. Los valores de  $I_A^S$  fueron en todos los casos significativamente distintos de cero, tanto al considerar la población en su conjunto como en el caso de los tres grandes grupos establecidos a partir de las filogenias (*A. bestiarum*, *A. hydrophila*, *A. salmonicida*) (Tabla 43), indicando ausencia de recombinación y un fuerte desequilibrio de ligamiento, característicos de una población clonal. Estos resultados coinciden con los obtenidos en un estudio previo de nuestro grupo en el que se analizó una población de *Aeromonas* que incluía las especies tradicionalmente consideradas como pertenecientes al complejo *A. hydrophila* (*A. bestiarum*, *A. hydrophila* y *A. salmonicida*) mediante electroforesis de enzimas multilocus (MLEE) (Miñana-Galbis y col., 2004b), así como con el reciente estudio de Roger y col. (2012) donde analizan por MLSA una población del género *Aeromonas*.

La población de *Aeromonas* estudiada presentó una elevada diversidad genética (cercana a 1), con un gran número de alelos únicos (97%), con un 25,5% de sitios polimórficos y con un mayor número de sustituciones sinónimas que no sinónimas, indicando la presencia de selección purificadora (Tabla 42). La diversidad genética obtenida es todavía mayor a la descrita en los estudios de MLEE ( $H = 0,64-0,65$ ) (Altwegg y Luthy-Hottenstein, 1991; Tonolla y col., 1991; Miñana-Galbis y col., 2004b). En estudios recientes del género *Aeromonas* basados también en un esquema MLSA, Martino y col. (2011) obtienen un 93,7% de alelos únicos y un 34,7% de sitios polimórficos (29,3–43,3% dependiendo del locus), aunque en este trabajo no calculan la diversidad genética. Roger y col. (2012) por su parte obtienen un valor de diversidad genética de 0,92, un 93,7% de alelos únicos y un 37,5% de sitios polimórficos (23,0–70,8% dependiendo del locus). Los valores obtenidos por estos autores son coincidentes con los nuestros a pesar de analizar poblaciones de *Aeromonas* distintas. La mayor diversidad genética detectada por MLSA en comparación con el análisis por MLEE es totalmente congruente, ya que el MLSA considera como alelos diferentes aquellas secuencias que difieren entre si aunque sólo sean en un nucleótido. Por otra parte, las discrepancias encontradas en los distintos estudios de MLSA pueden deberse a las diferencias en la población de



cepas de *Aeromonas* analizadas y a los genes estudiados. Cuando estos parámetros poblacionales se analizan individualmente para cada gen, la diversidad genética y el porcentaje de sitios polimórficos son muy similares a los obtenidos en este estudio, aunque el número de alelos únicos presenta mayor diferencia, desde 96 en el gen *cpn60* hasta 110 en el caso del gen *rpoD*. Por tanto, al igual que el gen *cpn60* parece ser más indicado a nivel de identificación, como se ha mencionado en el apartado anterior, el gen *rpoD* sería el de mayor utilidad para la separación a nivel intraespecífico (Tabla 41).

### 5.5 Detección de posibles eventos de recombinación en el gen *dnaJ*

La recombinación tradicionalmente se ha detectado al observar incongruencias entre árboles filogenéticos obtenidos a partir de las secuencias de diferentes genes, a la presencia de estructuras en mosaico, a las variaciones en el contenido de G+C o al estudio del patrón del uso preferencial de codones (Lawrence y Ochman, 1997). Actualmente, para la determinación de posibles eventos de recombinación, existen numerosos programas informáticos basados en métodos de distancia, métodos filogenéticos, métodos de compatibilidad y métodos de distribución de sustituciones (Posada, 2002; Martin y col., 2010). La fiabilidad de estos métodos varía dependiendo del conjunto de secuencias con el que se trabaje, estos métodos pueden tener dificultad en detectar recombinación cuando el nivel de divergencia entre las secuencias es bajo, si por el contrario la divergencia es alta, el problema es la detección de falsos positivos. Los métodos que utilizan los patrones de sustitución o incompatibilidad entre sitios parecen ser más robustos que los basados en incongruencias filogenéticas. Esto puede explicarse parcialmente por el hecho de que, en general, los métodos filogenéticos sólo pueden detectar eventos de recombinación que cambian la topología del árbol (Posada, 2000; Posada, 2002).

Existen pocas referencias bibliográficas sobre eventos de recombinación detectados en *Aeromonas*. Silver y col. (2011) realizan un estudio con cepas del complejo *A. veronii* y detectan eventos de recombinación en los genes *ascFG*, *ascV*,

*aexU*, *dnaI* y *gyrB*, después de observar que en algunos de los árboles presentaban algunas ramas con valores de bootstrap muy bajos. Para detectar recombinación utilizan dos métodos de análisis (Gard y KH test), identificando posibles eventos de recombinación en los genes anteriormente citados y demostrando que al menos para algunas cepas, la transferencia horizontal de genes ocurre con una frecuencia suficiente para crear incongruencias en las filogenias elaboradas a partir de genes transferidos verticalmente.

Martino y col. (2011) estudiaron una colección de 23 cepas tipo y de referencia y 77 cepas aisladas de peces, crustáceos y moluscos. Mediante un análisis de eBURST, determinaron la proporción de recombinación/mutación ( $r/m$ ) para toda la población y para los tres grupos principales identificados, obteniendo un  $r/m=0,07-0,13$  lo que sugieren una tasa reducida de recombinación. El análisis con el programa SplitsTree reveló que la mayoría de los genes, aunque mostraban una estructura reticular, no fueron afectados significativamente por eventos de recombinación intragénica a excepción del gen *recA*. Cuando se analizaron las secuencias génicas con un conjunto de programas incluidos en el paquete RDP3, se identificaron varios eventos de recombinación apoyados por al menos tres de esos programas. Sin embargo, concluyeron que en el caso de *Aeromonas*, el impacto de la recombinación puede ser insignificante, ya que las topologías de los árboles filogenéticos son muy similares, la proporción  $r/m$  es baja y se obtiene una estructura de red a partir del análisis de descomposición de split.

Roger y col. (2012) realizan un estudio MLST que incluía cepas con distintos orígenes, aunque la mayor parte de ellas eran cepas de origen clínico. En este estudio determinaron que, basándose en los valores bajos de índice de asociación estandarizado ( $I_A^S$ ), se demostraba la existencia de un desequilibrio de ligamiento significativo, indicativo de una estructura de población clonal. Cuando analizaron las secuencias con cuatro métodos del software RDP, detectaron algunos eventos de recombinación en cinco de los siete loci analizados. Observaron además diferencias en la distribución de las ramas en los árboles cuando se compararon los árboles génicos con los obtenidos a partir de la secuencia concatenada, lo que sugería la

posible presencia de recombinación. Los autores concluyen que la recombinación está presente en el género *Aeromonas*, al menos en algunas cepas, pero con una frecuencia relativamente baja.

En nuestro estudio se ha determinado, tal y como se ha comentado anteriormente, la presencia de posibles fragmentos recombinantes en el gen *dnaJ*. Se investigó la posibilidad de que existieran eventos de recombinación, al observar que algunas cepas se agrupaban en clados que no correspondían a los de la especie, sin embargo cuando se generó el árbol a partir de las secuencias concatenadas estas cepas se agrupan junto a las de su misma especie. Esto confirma que la recombinación, aunque existente, no es suficiente para romper la cohesión genética de este grupo.

### 5.6 Factores de virulencia

Se ha relacionado el potencial patogénico de *Aeromonas* con distintos factores de virulencia que incluyen una gran variedad de enzimas hidrolíticas (amilasa, elastasa, lipasa, gelatinasa, DNasa...), enterotoxinas citotóxicas (Act) y citotónicas (Ast y Alt), sistemas de secreción (T2SS, T3SS, T4SS y T6SS), adhesinas, etc (Khajanchi y col., 2009; Janda y Abbott, 2010; Beaz-Hidalgo y Figueras, 2013; Igbinosa y Okoh, 2013).

En este trabajo se han estudiado distintos factores de virulencia en 128 cepas del AHC, para intentar esclarecer si existe alguna diferencia significativa entre las cepas según su fuente de aislamiento (ambiental, alimentaria, clínica) o su relación filogenética. La mayoría de estudios publicados se basan en la detección de factores de virulencia en cepas del género *Aeromonas* aisladas de diversos orígenes (ambiental, alimentaria, clínica) (Bin Kingombe y col., 1999; Chacón y col., 2003; Bin Kingombe y col., 2004; Ottaviani y col., 2011), de fuentes concretas como aguas (Scoaris de Oliveira y col., 2008; Carvalho y col., 2012), alimentos (Chang y col., 2008), pescado y marisco (Martino y col., 2011), agua y peces de piscifactorías y acuarios (Nam y Joh, 2007; Sreedharan y col., 2013), heces diarreicas (Kannan y col.,

2001), etc. En los escasos trabajos en los que se analizan especies concretas, la procedencia de las cepas está restringida a ciertos hábitats: 26 cepas de *A. popoffii* aisladas de agua dulce y marina (Soler y col., 2002), 109 cepas (51 *A. caviae*, 33 *A. hydrophila* y 25 *A. veronii*) de heces diarreicas (Aguilera-Arreola y col., 2007), y 81 cepas *A. veronii* aisladas del pez gato (*Ictalurus punctatus*) (Nawaz y col., 2010). En este trabajo, el estudio de los factores de virulencia se ha realizado desde tres perspectivas distintas, mediante técnicas clásicas de microbiología como la determinación de distintas actividades enzimáticas y sensibilidad a antibióticos, mediante técnicas de biología molecular para la detección de genes de virulencia mediante PCR y, finalmente, se han realizado ensayos “in vitro” con la línea celular Caco-2 para determinar la posible adherencia y citotoxicidad de las cepas bacterianas a las células eucariotas.

#### 5.6.1 Detección de actividades enzimáticas

La mayoría de las cepas mostraron actividad proteolítica (caseinasa, gelatinasa) y actividad amilasa, estas actividades se observaron en más del 95% de las cepas incluidas en este estudio, resultados semejantes a los descritos por otros autores (Pemberton y col., 1997; Cascón y col., 2000; Pavan y col., 2000; Soler y col., 2002; Huys y col., 2002; Chacón y col., 2003; Castro-Escarpulli y col., 2003; Huys y col., 2003; Scoaris de Oliveira y col., 2008; Beaz-Hidalgo y col., 2009; Zacarías y col., 2010). Diversos estudios consultados realizan la detección de alguna de estas actividades, aunque solo en alguno de ellos la finalidad es el estudio de los factores de virulencia (Cascón y col., 2000; Soler y col., 2002; Castro-Escarpulli y col., 2003; Chacón y col., 2003; Scoaris de Oliveira y col., 2008; Zacarías y col., 2010). El resto de los trabajos utilizan estas actividades hidrolíticas como características fenotípicas en estudios taxonómicos del género *Aeromonas* (Miñana-Galbis y col., 2002; Valera y Esteve, 2002) o en la descripción de nuevos taxones (Pavan y col., 2000; Huys y col., 2002; Huys y col., 2003; Martínez-Murcia y col., 2008; Beaz-Hidalgo y col., 2009). La incidencia de la actividad caseinasa en este estudio ha sido mayor (95%) en comparación con lo descrito por otros autores que la han detectado en el 69% de las cepas de *A. popoffii* (Soler y col., 2002), el 74% de las cepas de *A. bestiarum*, *A.*

*hydrophila*, *A. popoffii* y *A. salmonicida* (Chacón y col., 2003), y el 59% de *A. bestiarum*, *A. hydrophila* y *A. salmonicida* (Castro-Escarpulli y col., 2003). Estas diferencias podrían deberse a las metodologías utilizadas para la determinación de la actividad caseinasa como el cultivo con diferentes medios (LB, Mueller-Hinton, TSA), suplementados con “skim milk” entre el 1% y el 10% (Castro-Escarpulli y col., 2003; Zacarías y col., 2010) o mediante suspensiones de azocaseína, molécula de caseína con un grupo sulfonilamida que le confiere coloración naranja, lo que permite cuantificar la actividad por espectrofotometría (Soler y col., 2002; Chacón y col., 2003). Respecto a la actividad gelatinasa, y aunque en este caso los resultados son muy similares, también hay disparidad en los métodos utilizados: métodos de difusión en placa o por licuefacción en tubo con porcentajes del 0,4-12% de gelatina (Castro-Escarpulli y col., 2003; Reddy y col., 2007; Beaz-Hidalgo y col., 2009). La actividad amilasa, pese a que diversos autores la consideran un factor de virulencia (Campbell y col., 1990; Pemberton y col., 1997; Emele, 2001), sólo se encuentra descrita en estudios taxonómicos como los citados anteriormente. En nuestro caso el porcentaje de cepas que presentaron esta actividad fue del 97% valores que coinciden con los descritos en la bibliografía.

Donde existe una mayor controversia es en la detección de la actividad lipolítica, ya que dependiendo del medio utilizado pueden detectarse diferentes lipasas. Según Merino y col. (1999), *Aeromonas* puede generar dos tipos de fosfolipasas, la fosfolipasa A1 que no presenta actividad citotóxica ni hemolítica y cuya actividad se determina mediante agar tributirina, y la fosfolipasa C o lecitinasa que tiene mayor importancia como factor de virulencia, ya que tiene actividad citotóxica y hemolítica en peces aunque no en sangre de origen ovino; esta actividad se detecta mediante agar yema de huevo. En este estudio se ha detectado actividad lecitinasa en más del 85% de las cepas ensayadas, resultado que contrasta con el obtenido por Scoaris de Oliveira y col. (2008) con cuatro cepas negativas de las cinco cepas de *A. hydrophila* ensayadas. Sin embargo, los estudios que detectan la actividad lipolítica en agar tributirina (Soler y col., 2002; Chacón y col., 2003; Castro-Escarpulli y col., 2003) o en agar suplementado con Tween 80 (Beaz-Hidalgo y col., 2009; Carvalho y col., 2012), obtienen resultados muy similares a los del presente

trabajo, ya que en todos los casos detectan actividad lipasa con valores superiores al 90%.

Otro factor de virulencia que se ha estudiado en este trabajo es la producción de DNasa, actividad que se determina generalmente con fines taxonómicos. La actividad DNasa es importante para la nutrición bacteriana (Dodd y Pemberton, 1996; Pemberton y col., 1997; Soler y col., 2002) y, en otras bacterias como *Streptococcus*, se ha demostrado que las DNAsas están involucradas en el establecimiento de infecciones bacterianas en humanos (Podbielski y col., 1996; Chacón y col., 2003). La alta incidencia de esta actividad detectada en nuestro estudio (92%) coincide con lo publicado por otros autores, por ejemplo, Chacón y col. (2003) detectan esta actividad en el 87% de las cepas de *A. hydrophila*, *A. bestiarum*, *A. salmonicida* y *A. popoffii* y en el 91% cuando realizan la detección del gen que codifica para este enzima.

Este es el primer estudio donde se ensaya la hidrólisis de elastina en placa para el estudio de los factores de virulencia de *Aeromonas*. Sin embargo, la hidrólisis de elastina se encuentra descrita junto con la amilasa en algunas tablas de pruebas fenotípicas clave para la diferenciación de las especies del género (Miñana-Galbis y col., 2010a; Figueras y col., 2011). La actividad elastasa es esencial para la patogenicidad de *A. hydrophila* y está correlacionada con su virulencia en peces (Pemberton y col., 1997; Cascón y col., 2000; Janda y Abbott, 2010). Esta actividad se ha detectado en el 72,5% de las cepas incluidas en este estudio.

La producción de toxinas hemolíticas ha sido considerada como una evidencia del potencial patogénico de *Aeromonas*, la actividad  $\beta$ -hemolítica generalmente es debida a aerolisinas pero también a enzimas con actividad lipasa. En la mayoría de las cepas se ha detectado  $\beta$ -hemólisis (83,5%), aunque el halo de hemólisis fue discreto en la mayoría de los casos. Quizás los resultados hubiesen sido más evidentes si se hubiese utilizado otro tipo de sangre, Santos y col. (1999) describen que la sangre de conejo es más sensible que la sangre de cordero que es la que se ha utilizado en este trabajo. La incidencia de esta actividad en las cepas estudiadas ha mostrado diferencias respecto a trabajos publicados por algunos

autores. La diferencia más destacada se ha constatado en la especie *A. popoffii*, ya que si bien en este trabajo se ha detectado  $\beta$ -hemólisis (discreta) en todas las cepas, Soler y col. (2002) y Huys y col. (1997) sólo describen esta actividad en un 15% de las cepas de esta especie. En el caso de las cepas psicrófilas de *A. salmonicida* se han encontrado resultados contradictorios en la bibliografía (Pavan y col., 2000; Martin-Carnahan y Joseph, 2005), aunque en general muestran un resultado variable como el obtenido en este estudio. La variación de estos resultados puede deberse además de la ya citada anteriormente del tipo de sangre, a la diferencia entre los medios y temperaturas de incubación utilizados para detectar esta actividad. Para el resto de las especies del AHC los resultados obtenidos sí fueron semejantes a lo publicado por otros autores (Huys y col., 2002; Chacón y col., 2003; Martínez-Murcia y col., 2005; Martin-Carnahan y Joseph, 2005; Martínez-Murcia y col., 2008; Beaz-Hidalgo y col., 2009), ya que más del 85% de las cepas del resto de especies mostraron  $\beta$ -hemólisis.

### 5.6.2 Resistencia a antibióticos

El patrón de susceptibilidad a antibióticos, además de utilizarse para la selección de la terapia antimicrobiana adecuada en una infección, también se puede determinar como un carácter fenotípico en la identificación de *Aeromonas* (Awan y col., 2009; Igbiosa y col., 2012). Los antibióticos frente a los que un mayor número de cepas mostraron sensibilidad fueron el ciprofloxacino y la fosfomicina, siendo la ampicilina y la eritomicina donde se observó un mayor número de cepas resistentes. En este estudio se han realizado pruebas de sensibilidad con 21 antibióticos, mostrándose un patrón de sensibilidad diferenciado para *A. hydrophila* subsp. *dhakensis*/*A. aquariorum* y *A. popoffii* respecto del resto de especies del AHC (Figuras 38-40), pero sin encontrar diferencias según el origen de las cepas. Estos resultados coinciden con los publicados en otros trabajos por distintos autores (Huys y col., 1997b; Martínez-Murcia y col., 2008; Beaz-Hidalgo y col., 2009; Martínez-Murcia y col., 2009; Janda y Abbott, 2010).

### 5.6.3 Genes de virulencia

La detección de genes de virulencia es importante para poder establecer el potencial patogénico de las cepas de *Aeromonas* ya que la enteropatogenicidad de *Aeromonas* se ha atribuido a la producción de exoenzimas, exotoxinas y adhesinas, aunque la importancia y el mecanismo exacto de cada factor asociado con la virulencia no ha sido bien establecida (Pemberton y col., 1997). El gen de virulencia más estudiado en *Aeromonas* es el de la aerolisina, aunque en realidad podría tratarse de diferentes aerolisinas ya que en la bibliografía se pueden encontrar denominaciones distintas, como  $\beta$ -hemolisinas o enterotoxinas citolíticas. De esta manera, algunos autores consideran que tanto el gen *act* (correspondiente a la enterotoxina citolítica) como el *aerA* (correspondiente a aerolisina) codifican la misma proteína debido a la alta homología que existe en sus secuencias de nucleotídicas (Buckley y Howard, 1999; Chopra y Houston, 1999).

En este estudio hemos obtenido resultados que muestran que los genes que codifican la aerolisina (*aerA*), la toxina citotónica termolábil (*alt*) y la toxina citotónica termoestable (*ast*) tienen una elevada prevalencia en las cepas del AHC, ya que se han detectado en todas las cepas, a excepción de cuatro cepas de *A. hydrophila* que fueron negativas para el gen *aerA*. Otros autores que han realizado la detección del gen *aerA* (Chacón y col., 2003; Sen y Rodgers, 2004; Wu y col., 2007; Aguilera-Arreola y col., 2007; Khajanchi y col., 2010; Ottaviani y col., 2011; Carvalho y col., 2012) también obtienen valores muy elevados (> 70%), excepto Wu y col. (2007) que sólo detecta el gen en el 45% de las cepas.

Donde se observan mayores diferencias entre los trabajos consultados, es en los resultados obtenidos en la detección de los genes *ast* y *alt*. Wu y col. (2007), Ottaviani y col. (2011), y Carvalho y col. (2012) detectan el gen *ast* sólo en el 27,5%, 25% y 27,9% de las cepas, respectivamente. En cambio, Aguilera-Arreola y col. (2007) y Khajanchi y col. (2010) obtienen unos resultados más próximos a los obtenidos en esta tesis, ya que detectan el gen entre el 80% y el 90% de las cepas. Los porcentajes de detección del gen *alt* publicados por distintos autores (Wu y col.,



2007; Aguilera-Arreola y col., 2007; Khajanchi y col., 2010; Bin Kingombe y col., 2010; Ottaviani y col., 2011) son elevados, entre el 64 y 97% de las cepas.

Cabe destacar que la detección mediante PCR de estos tres genes de virulencia tiene limitaciones inherentes a la técnica, ya que cabe la posibilidad de obtener falsos negativos, como se ha comprobado en este trabajo. En todos los casos los resultados positivos obtenidos en este trabajo son superiores a los descritos por otros autores, esto puede deberse a que se han utilizado diferentes alternativas en aquellos casos en que los resultados eran negativos o dudosos, como la adición de aditivos a la PCR como el DMSO o la realización de PCR anidada, lo que nos ha permitido obtener un mayor número de resultados positivos.

### 5.6.4 Pruebas de adherencia en células Caco-2

La capacidad de adherencia de *Aeromonas* se puede ensayar con distintas líneas celulares como Caco-2 (Guimarães y col., 2002; Castro-Escarpulli y col., 2003; Harf-Monteil y col., 2004; Nam y Joh, 2007) o HEp-2 (Rabaan y col., 2001; Castro-Escarpulli y col., 2003; Ottaviani y col., 2011).

Este es el primer estudio que determina las propiedades de adherencia y efecto citopático en células Caco-2 a partir de un número elevado de cepas ( $n = 59$ ), representativas de todas las especies del AHC. Estas cepas se seleccionaron del total de 128 en base a su grado de patogenicidad establecido a partir de los resultados obtenidos en la detección de los factores de virulencia estudiados (actividades enzimáticas, perfiles de sensibilidad a antibióticos y detección de los genes *aer*, *alt* y *ast*), seleccionando dos grupos de cepas correspondientes a las de menor y mayor potencial patogénico. El porcentaje de aislados que mostraron capacidad de adherencia resultó ser del 75%, porcentaje variable según las especies (del 33% de *A. popoffii* al 100% de *A. piscicola* y *A. hydrophila* subsp. *dhakensis* / *A. aquariorum*). En el caso de *A. hydrophila*, el 84% de las cepas fueron adherentes lo que supone un porcentaje inferior al descrito por Couto y col. (2007), que determinan que todas las cepas *A. hydrophila* ensayadas ( $n = 23$ ) mostraron esta capacidad. Esta diferencia puede deberse a que estos autores, dan como positiva la adherencia cuando hay

menos de 10 bacterias por célula huésped, mientras que en el presente estudio el criterio para considerar la existencia de adherencia fue a partir de 10 bacterias por célula huésped tal como describen Ottaviani y col. (2011). Por otra parte, algunos autores establecen dos patrones de adherencia, difusa y agregativa, dependiendo de la disposición de las bacterias alrededor de la célula (Nishikawa y col., 1994; Thornley y col., 1996; Castro-Escarpulli y col., 2003; Couto y col., 2007). Después de analizar los cultivos infectados por medio de las imágenes obtenidas por microscopía óptica, se pudo observar que una misma cepa bacteriana se puede adherir alrededor de las células Caco-2 tanto de manera difusa como agregativa según la densidad de células bacterianas, por lo que la división entre adherencia difusa y agregativa habría que cuestionarla. En cuanto al origen de las cepas ensayadas, Ottaviani y col. (2011) encontraron una mayor adherencia en cultivos de HEP-2 en las cepas clínicas de *A. hydrophila* que en las cepas ambientales, sin embargo en este estudio no se observaron diferencias según el origen de las cepas, si bien la línea celular utilizada fue diferente.

En nuestro estudio, el porcentaje de cepas del AHC que causó efectos citopáticos (91,5%) fue mayor que de las que presentaron adherencia (75%). Los efectos citopáticos observados fueron redondeamiento celular, vacuolización del citoplasma, picnosis nuclear, así como destrucción de la monocapa. Estos resultados son difíciles de comparar con otros estudios, ya que en la bibliografía consultada, únicamente se ha encontrado un trabajo en el que se describan los efectos citopáticos causados por cepas del género *Aeromonas*, incluyendo la lisis casi completa de las células Caco-2 (Nam y Joh, 2007).

## 5.7 Importancia de AHC en salud pública

Las especies del AHC habitan en diferentes ambientes acuáticos, pudiendo infectar al hombre cuando este realiza actividades como la pesca o la natación. Otra vía de infección es mediante el consumo de alimentos o agua contaminada (Kirov y col., 1993; September y col., 2007; Razzolini y col., 2008; Khajanchi y col., 2010;

Igbinosa y Okoh, 2013). Este hecho se encuentra agravado por la resistencia de *Aeromonas* a algunos tratamientos convencionales para el tratamiento de aguas como es la cloración (Burke y col., 1984). No existe correlación entre el recuento de *Aeromonas* y los indicadores fecales de aguas potables y recreativas, recomendando algunos autores la monitorización de *Aeromonas* en el análisis microbiológico de las aguas (Burke y col., 1984; Araujo y col., 1989; Massa y col., 2001; Igbinosa y Okoh, 2013).

Las cepas de AHC también se han aislado de diversos tipos de alimentos, tanto crudos como cocinados (Bin Kingombe y col., 2004; Balakrishna y col., 2010; Nagar y col., 2011; Nyenje y col., 2012), especialmente cuando estos han estado almacenados incluso en refrigeración (Palumbo y col., 1989; Kirov y col., 1993), ya que *Aeromonas* puede crecer a bajas temperaturas (Janda y Abbott, 2010) y producir toxinas a 5°C (Olafsen y col., 1993; Tsai y Chen, 1996).

Las cepas del AHC poseen un número elevado de factores de virulencia y los resultados de este estudio demuestran que éstos se encuentran de manera generalizada independientemente de que las cepas sean de origen clínico, alimentario o ambiental. Por consiguiente, las cepas que no tienen un origen clínico pueden actuar como reservorio de cepas de *Aeromonas* patógenas, suponiendo un riesgo para la salud pública.

## **Capítulo 6**

---

### **Conclusiones**



1.- En la caracterización de las cepas utilizadas en nuestro estudio, las pruebas de fermentación de sorbitol y utilización de lactato han permitido la diferenciación de las cepas pertenecientes a las especies *A. hydrophila*, *A. bestiarum*, *A. salmonicida*, *A. piscicola* y *A. popofii*.

2.- Este trabajo ha puesto de manifiesto la utilidad del análisis de las secuencias de genes conservados para poder clasificar las cepas de *Aeromonas* del AHC, algunas de las cuales son difíciles de separar por caracterización fenotípica o mediante las secuencias del gen 16S rRNA.

3.- El estudio de los distintos genes utilizados ha revelado que el gen *cpn60* es el más útil para la identificación a nivel de especie, siendo el gen *rpoD* el que permitió una mayor discriminación a nivel intraespecífico.

4.- Los árboles obtenidos a partir de las secuencias de cada uno de los genes y de las secuencias concatenadas junto con los valores de distancia inter e intraespecíficos obtenidos, han confirmado la reciente propuesta de que *A. aquariorum* y *A. hydrophila* subsp. *dhakensis* constituyen una nueva especie (*A. dhakensis*), separada de *A. hydrophila*. Así mismo, los resultados obtenidos ponen en entredicho que *A. bestiarum* y *A. piscicola* sean especies distintas.

5.- Al analizar las secuencias del gen *dnaI* se ha detectado un posible evento de recombinación en algunas cepas del AHC.

6.- El denominado AHC ha demostrado poseer un origen polifilético, cuestionándose la posible existencia del grupo como tal.

7.- La diversidad genética de la población de *Aeromonas* analizada es una de las más altas descritas hasta el momento para una población bacteriana.

8.- La población estudiada presenta un fuerte desequilibrio de ligamiento, típico de una población clonal.

9.- El estudio de los factores de virulencia llevado a cabo ha revelado un elevado potencial patogénico de las cepas de *Aeromonas* estudiadas, independientemente de su origen.

10.- Este trabajo constituye el primer estudio de la capacidad de adherencia y efecto citopático llevado a cabo con las especies del AHC, observándose que el 75% de las cepas estudiadas presentan capacidad de adherencia a las células Caco-2 y el 91,5% efecto citopático.

## **Capítulo 7**

---

## **Bibliografía**





- Abbott, S. L., Cheung, W. K., Kroske-Bystrom, S., Malekzadeh, T. y Janda, J. M. (1992).** Identification of *Aeromonas* strains to the genospecies level in the clinical laboratory. *J Clin Microbiol* **30**, 1262–1266.
- Abbott, S. L., Cheung, W. K. W. y Janda, J. M. (2003).** The genus *Aeromonas*: biochemical characteristics, atypical reactions, and phenotypic identification schemes. *J Clin Microbiol* **41**, 2348–2357.
- Aguilera-Arreola, M. G., Hernández-Rodríguez, C., Zúñiga, G., Figueras, M. J. y Castro-Escarpulli, G. (2005).** *Aeromonas hydrophila* clinical and environmental ecotypes as revealed by genetic diversity and virulence genes. *FEMS Microbiol Lett* **242**, 231–240.
- Aguilera-Arreola, M. G., Hernández-Rodríguez, C., Zúñiga, G., Figueras, M. J., Garduño, R. A. y 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.
- Ali, A., Carnahan, A., Altwegg, M., Lüthy-Hottenstein, J. y Joseph, S. (1996).** *Aeromonas bestiarum* sp. nov. (formerly genomospecies DNA group 2 *A. hydrophila*), a new species isolated from non-human sources. *Med Microbiol Lett* **5**, 156–165.
- Allen, D., Austin, B. y Colwell, R. (1983).** *Aeromonas media*, a new species isolated from river water. *Int J Syst Bacteriol* **33**, 599–604.
- Alperi, A. y Figueras, M. J. (2010).** Human isolates of *Aeromonas* possess Shiga toxin genes (*stx1* and *stx2*) highly similar to the most virulent gene variants of *Escherichia coli*. *Clin Microbiol Infect* **16**, 1563–1567.
- Alperi, A., Martínez-Murcia, A., Ko, W. C., Monera, A., Saavedra, M. J. y Figueras, M. J. (2010b).** *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, A., Monera, A., Saavedra, M. J. y Figueras, M. J. (2010a).** *Aeromonas fluvialis* sp. nov., isolated from a Spanish river. *Int J Syst Evol Microbiol* **60**, 72–77.
- Altwegg, M. y Geiss, H. K. (1989).** *Aeromonas* as a human pathogen. *Crit Rev Microbiol* **16**, 253–286.
- Altwegg, M. y Luthy-Hottenstein, J. (1991).** Methods for the identification of DNA hybridization groups in the genus *Aeromonas*. *Experientia* **47**, 403–406.
- Araujo, R. M., Arribas, R. M., Lucena, F. y Parés, R. (1989).** Relation between *Aeromonas* and faecal coliforms in fresh waters. *J Appl Bacteriol* **67**, 213–217.
- Aravena-Román, M., Beaz-Hidalgo, R., Inglis, T. J., Riley, T. V., Martínez-Murcia, A., Chang, B. J. y Figueras, M. J. (2013).** *Aeromonas australiensis* sp. nov., isolated from irrigation water in Western Australia. *Int J Syst Evol Microbiol* **63**, 2270–2276.

- Austin, D., McIntosh, D. y Austin, B. (1989).** Taxonomy of fish associated *Aeromonas* spp., with the description of *Aeromonas salmonicida* subsp. *smithia* subsp. nov. *Syst Appl Microbiol* **11**, 277–290.
- Awan, M. B., Maqbool, A., Bari, A. y Krovacek, K. (2009).** Antibiotic susceptibility profile of *Aeromonas* spp. isolates from food in Abu Dhabi, United Arab Emirates. *New Microbiol* **32**, 17–23.
- Balakrishna, K., Murali, H. y Batra, H. (2010).** Detection of toxigenic strains of *Aeromonas* species in foods by a multiplex PCR assay. *Indian J Microbiol* **50**, 139–139–44.
- Beaz-Hidalgo, R., Alperi, A., Figueras, M. J. y 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. y 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. y Figueras, M. J. (2013).** *Aeromonas* spp. whole genomes and virulence factors implicated in fish disease. *J Fish Dis* **36**, 371–388.
- Beaz-Hidalgo, R., Martínez-Murcia, A. y 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.
- Bin Kingombe, C. I., Huys, G., Tonolla, M., Albert, M. J., Swings, J., Peduzzi, R. y Jemmi, T. (1999).** PCR detection, characterization, and distribution of virulence genes in *Aeromonas* spp. *Appl Environ Microbiol* **65**, 5293–5302.
- Bin Kingombe, C. I., Huys, G., Howald, D., Luthi, E., Swings, J. y Jemmi, T. (2004).** The usefulness of molecular techniques to assess the presence of *Aeromonas* spp. harboring virulence markers in foods. *Int J Food Microbiol* **94**, 113–121.
- Bin Kingombe, C. I., D'Aoust, J. Y., Huys, G., Hofmann, L., Rao, M. y Kwan, J. (2010).** Multiplex PCR method for detection of three *Aeromonas* enterotoxin genes. *Appl Environ Microbiol* **76**, 425–433.
- Borrell, N., Acinas, S. G., Figueras, M. J. y 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.
- Boyd, J. M., Dacanay, A., Knickle, L. C., Touhami, A., Brown, L. L., Jericho, M. H., Johnson, S. C. y Reith, M. (2008).** Contribution of type IV pili to the virulence of *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida* in Atlantic Salmon (*Salmo salar* L.). *Infection and Immunity* **76**, 1445–1455.
- Breed, R., Murray, E. y Smith, N. (1966).** *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, 7<sup>a</sup> ed. Baltimore: Williams y Wilkins.
- Madigan, M., Martinko, J. y Parker, J. (2009).** *Brock: Biología de los microorganismos*. 12<sup>a</sup> ed. Madrid: Pearson Prentice Hall.

- Brown, A. H., Feldman, M. W. y Nevo, E. (1980).** Multilocus structure of natural populations of *Hordeum Spontaneum*. *Genetics* **96**, 523–536.
- Buckley, J. T. y Howard, S. P. (1999).** The cytotoxic enterotoxin of *Aeromonas hydrophila* is aerolysin. *Infect Immun* **67**, 466–467.
- Burke, V., Cooper, M., Robinson, J., Gracey, M., Lesmana, M., Echeverria, P. y Janda, J. M. (1984).** Hemagglutination patterns of *Aeromonas* spp. in relation to biotype and source. *J Clin Microbiol* **19**, 39–43.
- Campbell, C., Duncan, D., Price, N. y Stevens, L. (1990).** The secretion of amylase, phospholipase and protease from *Aeromonas salmonicida*, and the correlation with membrane-associated ribosomes. *J Fish Dis* **13**, 463–474.
- Canals, R., Vilches, S., Wilhelms, M., Shaw, J. G., Merino, S. y Tomás, J. M. (2007).** Non-structural flagella genes affecting both polar and lateral flagella-mediated motility in *Aeromonas hydrophila*. *Microbiology* **153**, 1165–1175.
- Carnahan, A., Fanning, G. R. y Joseph, S. W. (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, A. M., Chakraborty, T., Fanning, G. R., Verma, D., Ali, A., Janda, J. M. y Joseph, S. W. (1991b).** *Aeromonas trota* sp. nov., an ampicillin-susceptible species isolated from clinical specimens. *J Clin Microbiol* **29**, 1206–1210.
- Carvalho, M. J., Martínez-Murcia, A., Esteves, A. C., Correia, A. y Saavedra, M. J. (2012).** Phylogenetic diversity, antibiotic resistance and virulence traits of *Aeromonas* spp. from untreated waters for human consumption. *Int J Food Microbiol* **159**, 230–239.
- Cascón, A., Yugueros, J., Temprano, A., Sánchez, M., Hernanz, C., Luengo, J. M. y Naharro, G. (2000).** A major secreted elastase is essential for pathogenicity of *Aeromonas hydrophila*. *Infect Immun* **68**, 3233–3241.
- Castro-Escarpulli, G., Figueras, M. J., Aguilera-Arreola, G., Soler, L., Fernández-Rendón, E., Aparicio, G. O., Guarro, J. y Chacón, M. R. (2003).** Characterisation of *Aeromonas* spp. isolated from frozen fish intended for human consumption in Mexico. *Int J Food Microbiol* **84**, 41–49.
- Coenye, T., Gevers, D., Peer, Y. V., Vandamme, P. y Swings, J. (2005).** Towards a prokaryotic genomic taxonomy. *FEMS Microbiol Rev* **29**, 147–167.
- Colwell, R., MacDonell, M. y De Ley, J. (1986).** Proposal to recognize the family *Aeromonadaceae* fam. nov. *Int J Syst Bacteriol* **36**, 473–477.
- Conn, H. (1964).** Spontaneous peritonitis and bacteremia in laennec's cirrhosis caused by enteric organisms: A relatively common but rarely recognized syndrome. *Ann Intern Med* **60**, 568–580.
- Couto, C. R., Oliveira, S. S., Queiroz, M. L. y Freitas-Almeida, A. C. (2007).** Interactions of clinical and environmental *Aeromonas* isolates with Caco-2 and HT29 intestinal epithelial cells. *Lett Appl Microbiol* **45**, 405–410.

- Chacón, M. R., Figueras, M. J., Castro-Escarpulli, G., Soler, L. y Guarro, J. (2003).** Distribution of virulence genes in clinical and environmental isolates of *Aeromonas* spp. *Antonie Van Leeuwenhoek* **84**, 269–278.
- Chang, Y. C., Wang, J. Y., Selvam, A., Kao, S. C., Yang, S. S. y Shih, D. Y. (2008).** Multiplex PCR detection of enterotoxin genes in *Aeromonas* spp. from suspect food samples in northern Taiwan. *J Food Prot* **71**, 2094–2099.
- Chao, C., Lai, C., Tang, H., Ko, W. y Hsueh, P. (2013).** Biliary tract infections caused by *Aeromonas* species. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* **32**, 245–
- Chopra, A. K., Houston, C. W. y Kurosky, A. (1991).** Genetic variation in related cytolytic toxins produced by different species of *Aeromonas*. *FEMS Microbiol Lett* **62**, 231–237.
- Chopra, A. K., Vo, T. N. y Houston, C. W. (1992).** Mechanism of action of a cytotoxic enterotoxin produced by *Aeromonas hydrophila*. *FEMS Microbiol Lett* **70**, 15–19.
- Chopra, A. K. y Houston, C. W. (1999).** Enterotoxins in *Aeromonas*-associated gastroenteritis. *Microb Infect* **1**, 1129–1137.
- Chopra, A. K., Graf, J., Horneman, A. J. y Johnson, J. A. (2009).** Virulence factor-activity relationships (VFAR) with specific emphasis on *Aeromonas* species (spp.). *J Water Health* **7 Suppl 1**, S29–54.
- Chu, S., Cavaignac, S., Feutrier, J., Phipps, B. M., Kostrzynska, M., Kay, W. W. y Trust, T. J. (1991).** Structure of the tetragonal surface virulence array protein and gene of *Aeromonas salmonicida*. *J Biol Chem* **266**, 15258–15265.
- Darveau, R. P., MacIntyre, S., Buckley, J. T. y Hancock, R. E. (1983).** Purification and reconstitution in lipid bilayer membranes of an outer membrane, pore-forming protein of *Aeromonas salmonicida*. *J Bacteriol* **156**, 1006–1011.
- Demarta, A., Tonolla, M., Caminada, A. P., Ruggeri, N. y Peduzzi, R. (1999).** Signature region within the 16S rDNA sequences of *Aeromonas popoffii*. *FEMS Microbiol Lett* **172**, 239–246.
- Demarta, A., Küpfer, M., Riegel, P., Harf-Monteil, C., Tonolla, M., Peduzzi, R., Monera, A., Jose Saavedra, M. y Martínez-Murcia, A. (2008).** *Aeromonas tecta* sp. nov., isolated from clinical and environmental sources. *Syst Appl Microbiol* **31**, 278–286.
- Dodd, H. N. y Pemberton, J. M. (1996).** Cloning, sequencing, and characterization of the *nucH* gene encoding an extracellular nuclease from *Aeromonas hydrophila* JMP636. *J Bacteriol* **178**, 3926–3933.
- Ebanks, R. O., Goguen, M., McKinnon, S., Pinto, D. M. y Ross, N. W. (2005).** Identification of the major outer membrane proteins of *Aeromonas salmonicida*. *Dis Aquat Organ* **68**, 29–38.
- Ellis, A. (1991).** An appraisal of the extracellular toxins of *Aeromonas salmonicida* ssp. *salmonicida*. *J Fish Dis* **14**, 265–277.
- Emele, F. E. (2001).** Rapid iodometric detection of *Aeromonas* amylase and its diagnostic significance. *Diagn Microbiol Infect Dis* **40**, 91–94.

- Esselmann, M. T. y Liu, P. V. (1961).** Lecithinase production by gramnegative bacteria. *J Bacteriol* **81**, 939–945.
- Esteve, C., Gutiérrez, M. C. y Ventosa, A. (1995).** *Aeromonas encheleia* sp. nov., isolated from European eels. *Int J Syst Bacteriol* **45**, 462–466.
- Fares, M. A. y Travers, S. A. (2006).** A novel method for detecting intramolecular coevolution: Adding a further dimension to selective constraints analyses. *Genetics* **173**, 9–23.
- Farfán, M., Miñana-Galbis, D., Garreta, A., Lorén, J. G. y Fusté, M. C. (2010).** Malate dehydrogenase: A useful phylogenetic marker for the genus *Aeromonas*. *Syst Appl Microbiol* **33**, 427–435.
- Farfán, M., Albarral, V., Sanglas, A. y Lorén, J. G. y Fusté, M. C. (2013).** The effect of recombination in *Aeromonas*. In *Recent Advances in Pharmaceutical Sciences III*, Ch. 11, pp. 179–193. Edited by D. Muñoz-Torrero, A. Cortés y E. Mariño. Kerala: Transworld Research Network.
- Farmer III, J., Arduino, M. y Hickman-Brenner, F. (2006).** The genera *Aeromonas* and *Plesiomonas*. In *The Prokaryotes: A Handbook on the Biology of Bacteria*, pp. 564–596. New York: Springer.
- Figueras, M. J., Guarro, J. y Martínez-Murcia, A. (2000).** Clinically relevant *Aeromonas* species. *Clin Infect Dis* **30**, 988–989.
- Figueras, M. J., Horneman, A. J., Martínez-Murcia, A. y Guarro, J. (2007).** Controversial data on the association of *Aeromonas* with diarrhoea in a recent Hong Kong study. *J Med Microbiol* **56**, 996–998.
- Figueras, M. J., Alperi, A., Beaz-Hidalgo, R., Stackebrandt, E., Brambilla, E., Monera, A. y Martínez-Murcia, A. (2011).** *Aeromonas rivuli* sp. nov., isolated from the upstream region of a karst water rivulet. *Int J Syst Evol Microbiol* **61**, 242–248.
- Freshney, R. I. (2005).** *Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique*, 5ª ed. Hoboken N.J.: Wiley-Blackwell.
- Fusté, M. C., Farfán, M., Miñana-Galbis, D., Albarral, V., Sanglas, A. y Lorén, J. G. (2012).** Population Genetics of the “*Aeromonas hydrophila* species complex”. In *Population Genetics*, pp. 39–54. Edited by M.C. Fusté. Croatia: In Tech.
- Galindo, C. L., Fadl, A. A., Sha, J., Gutiérrez, C., Popov, V. L., Boldogh, I., Aggarwal, B. B. y Chopra, A. K. (2004).** *Aeromonas hydrophila* cytotoxic enterotoxin activates mitogen-activated protein kinases and induces apoptosis in murine macrophages and human intestinal epithelial cells. *J Biol Chem* **279**, 37597–37612.
- Garduño, R. A., Moore, A. R., Olivier, G., Lizama, A. L., Garduño, E. y Kay, W. W. (2000).** Host cell invasion and intracellular residence by *Aeromonas salmonicida*: Role of the S-layer. *Can J Microbiol* **46**, 660–668.
- Gevers, D., Cohan, F. M., Lawrence, J. G. y otros autores (2005).** Opinion: Re-evaluating prokaryotic species. *Nat Rev Microbiol* **3**, 733–739.

- Gibson, L. F. y George, A. M. (1998).** Melanin and novel melanin precursors from *Aeromonas media*. *FEMS Microbiol Lett* **169**, 261–268.
- Gillis, M., Vandamme, P., De Vos, P., Swings, J. y Kersters, K. (2001).** Polyphasic taxonomy. In *Bergey's Manual® of Systematic Bacteriology*, 2ª ed. vol.1, pp. 43-48. Edited by G. M. Garrity. New York: Springer.
- Goyal, K., Qamra, R. y Mande, S. C. (2006).** Multiple gene duplication and rapid evolution in the *groEL* gene: Functional implications. *J Mol Evol* **63**, 781–787.
- Green, M. R. y Sambrook, J. (2012).** *Molecular Cloning: A laboratory manual*, 4ª ed. Cold Spring Harbor, N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Guimarães, M. S., Andrade, J. R., Freitas-Almeida, A. C. y Ferreira, M. C. (2002).** *Aeromonas hydrophila* vacuolating activity in the Caco-2 human enterocyte cell line as a putative virulence factor. *FEMS Microbiol Lett* **207**, 127–131.
- Gupta, R. S. y Sneath, P. H. (2007).** Application of the character compatibility approach to generalized molecular sequence data: Branching order of the proteobacterial subdivisions. *J Mol Evol* **64**, 90–100.
- Hadi, N., Yang, Q., Barnett, T. C., Tabei, S. M., Kirov, S. M. y Shaw, J. G. (2012).** Bundle-forming pilus locus of *Aeromonas veronii* bv. *Sobria*. *Infect Immun* **80**, 1351–1360.
- Harf-Monteil, C., Fleche, A. L., Riegel, P., Prevost, G., Bermond, D., Grimont, P. A. y Monteil, H. (2004).** *Aeromonas simiae* sp. nov., isolated from monkey faeces. *Int J Syst Evol Microbiol* **54**, 481–485.
- Harf-Monteil, C., Prevost, G. y Monteil, H. (2004).** Virulence factors of clinical *Aeromonas caviae* isolates. *Pathol Biol (Paris)* **52**, 21–25.
- Haubold, B., Travisano, M., Rainey, P. B. y Hudson, R. R. (1998).** Detecting linkage disequilibrium in bacterial populations. *Genetics* **150**, 1341–1348.
- Hickman-Brenner, F., MacDonald, K., Steigerwalt, A., Fanning, G., Brenner, D. J. y Farmer, J. J. (1987).** *Aeromonas veronii*, a new ornithine decarboxylase-positive species that may cause diarrhea. *J Clin Microbiol* **25**, 900–906.
- Hickman-Brenner, F. W., Fanning, G. R., Arduino, M. J., Brenner, D. J. y Farmer, J. J., 3rd (1988).** *Aeromonas schubertii*, a new mannitol-negative species found in human clinical specimens. *J Clin Microbiol* **26**, 1561–1564.
- Hill, J. E., Penny, S. L., Crowell, K. G., Goh, S. H. y Hemmingsen, S. M. (2004).** *cpnDB*: A chaperonin sequence database. *Genome Res* **14**, 1669–1675.
- Hill, J. E., Paccagnella, A., Law, K. y otros autores (2006).** Identification of *Campylobacter* spp. and discrimination from *Helicobacter* and *Arcobacter* spp. by direct sequencing of PCR-amplified *cpn60* sequences and comparison to *cpnDB*, a chaperonin reference sequence database. *J Med Microbiol* **55**, 393–399.
- Huys, G., Coopman, R., Janssen, P. y Kersters, K. (1996).** High-resolution genotypic analysis of the genus *Aeromonas* by AFLP fingerprinting. *Int J Syst Bacteriol* **46**, 572–580.

- Huys, G., Kampfer, P., Altwegg, M., Coopman, R., Janssen, P., Gillis, M. y Kersters, K. (1997a). Inclusion of *Aeromonas* DNA hybridization group 11 in *Aeromonas encheleia* and extended descriptions of the species *Aeromonas eucrenophila* and *A. encheleia*. *Int J Syst Bacteriol* **47**, 1157–1164.
- Huys, G., Kampfer, P., Altwegg, M. y otros autores (1997b). *Aeromonas popoffii* sp. nov., a mesophilic bacterium isolated from drinking water production plants and reservoirs. *Int J Syst Bacteriol* **47**, 1165–1171.
- Huys, G., Kampfer, P., Albert, M. J., Kuhn, I., Denys, R. y 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., Pearson, M., Kampfer, P., Denys, R., Cnockaert, M., Inglis, V. y Swings, J. (2003). *Aeromonas hydrophila* subsp. *ranae* subsp. nov., isolated from septicaemic farmed frogs in Thailand. *Int J Syst Evol Microbiol* **53**, 885–891.
- Igbinosa, I.H., Igumbor, E.U., Aghdasi, F., Tom, M., Okoh, A.I., (2012). Emerging *Aeromonas* species infections and their significance in public health. *The Scientific World Journal* 625023.
- Igbinosa, I.H. y Okoh, A. I. (2013). Detection and distribution of putative virulence associated genes in *Aeromonas* species from freshwater and wastewater treatment plant. *J Basic Microbiol* 1-7.
- Ingham, A. B. y Pemberton, J. M. (1995). A lipase of *Aeromonas hydrophila* showing nonhemolytic phospholipase C activity. *Curr Microbiol* **31**, 28–33.
- Ishiguro, E. E., Kay, W. W., Ainsworth, T., Chamberlain, J. B., Austen, R. A., Buckley, J. T. y Trust, T. J. (1981). Loss of virulence during culture of *Aeromonas salmonicida* at high temperature. *J Bacteriol* **148**, 333–340.
- Itoh, Y., Kawamura, Y., Kasai, H. y otros autores (2006). *dnaJ* and *gyrB* gene sequence relationship among species and strains of genus *Streptococcus*. *Syst Appl Microbiol* **29**, 368–374.
- Janda, J. M. (2001). *Aeromonas* y *Plesiomonas*. In *Molecular Medical Microbiology*, pp. 1237–1270. Edited by M. Sussman. San Diego: Academic Press.
- Janda, J. M. y Abbott, S. L. (2010). The genus *Aeromonas*: Taxonomy, pathogenicity, and infection. *Clin Microbiol Rev* **23**, 35–73.
- Jiménez, N., Lacasta, A., Vilches, S., Reyes, M., Vázquez, J., Aquillini, E., Merino, S., Regué, M. y Tomás, J. M. (2009). Genetics and proteomics of *Aeromonas salmonicida* lipopolysaccharide core biosynthesis. *J Bacteriol* **191**, 2228–2236.
- Jolley, K. A., Feil, E. J., Chan, M. S. y Maiden, M. C. (2001). Sequence type analysis and recombinational tests (START). *Bioinformatics* **17**, 1230–1231.
- Joseph, S. W. y Carnahan, A. (1994). The isolation, identification, and systematics of the motile *Aeromonas* species. *Annu Rev Fish Dis* **4**, 315–343.



**Kannan, S., Suresh Kanna, P., Karkuzhali, K., Chattopadhyay, U. K. y Pal, D. (2001).** Direct detection of diarrheagenic *Aeromonas* from faeces by polymerase chain reaction (PCR) targeting aerolysin toxin gene. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* **5**, 91–94.

**Kaznowski, A. (1998).** Identification of *Aeromonas* strains of different origin to the genomic species level. *J Appl Microbiol* **84**, 423–430.

**Khajanchi, B. K., Sha, J., Kozlova, E. V., Erova, T. E., Suarez, G., Sierra, J. C., Popov, V. L., Horneman, A. J. y Chopra, A. K. (2009).** N-acylhomoserine lactones involved in quorum sensing control the type VI secretion system, biofilm formation, protease production, and in vivo virulence in a clinical isolate of *Aeromonas hydrophila*. *Microbiology* **155**, 3518–3531.

**Khajanchi, B. K., Fadl, A. A., Borchardt, M. A. y other authors (2010).** Distribution of virulence factors and molecular fingerprinting of *Aeromonas* species isolates from water and clinical samples: suggestive evidence of water-to-human transmission. *Appl Environ Microbiol* **76**, 2313–2325.

**Khushiramani, R. M., Maiti, B., Shekar, M., Girisha, S. K., Akash, N., Deepanjali, A., Karunasagar, I. y Karunasagar, I. (2012).** Recombinant *Aeromonas hydrophila* outer membrane protein 48 (Omp48) induces a protective immune response against *Aeromonas hydrophila* and *Edwardsiella tarda*. *Res Microbiol* **163**, 286–291.

**Kirov, S. M., Ardestani, E. K. y Hayward, L. J. (1993).** The growth and expression of virulence factors at refrigeration temperature by *Aeromonas* strains isolated from foods. *Int J Food Microbiol* **20**, 159–168.

**Kirov, S. M., Barnett, T. C., Pepe, C. M., Strom, M. S. y Albert, M. J. (2000).** Investigation of the role of type IV *Aeromonas pilus* (Tap) in the pathogenesis of *Aeromonas* gastrointestinal infection. *Infect Immun* **68**, 4040–4048.

**Kokka, R. P., Vedros, N. A. y Janda, J. M. (1991).** Characterization of classic and atypical serogroup O:11 *Aeromonas*: Evidence that the surface array protein is not directly involved in mouse pathogenicity. *Microb Pathog* **10**, 71–79.

**Küpfer, M., Kuhnert, P., Korczak, B. M., Peduzzi, R. y Demarta, A. (2006).** Genetic relationships of *Aeromonas* strains inferred from 16S rRNA, *gyrB* and *rpoB* gene sequences. *Int J Syst Evol Microbiol* **56**, 2743–2751.

**Lallier, R. y Higgins, R. (1988).** Biochemical and toxigenic characteristics of *Aeromonas* spp. isolated from diseased mammals, moribund and healthy fish. *Vet Microbiol* **18**, 63–71.

**Lawrence, J. G. y Ochman, H. (1997).** Amelioration of bacterial genomes: rates of change and exchange. *J Mol Evol* **44**, 383–397.

**Librado, P. y Rozas, J. (2009).** DnaSP v5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics* **25**, 1451–1452.

**Liu, H., Li, Y., Huang, X., Kawamura, Y. y Ezaki, T. (2003).** Use of the *dnaI* gene for the detection and identification of all *Legionella pneumophila* serogroups and description of the primers used to detect 16S rDNA gene sequences of major members of the genus *Legionella*. *Microbiol Immunol* **47**, 859–869.

- Maiden, M. C., Bygraves, J. A., Feil, E. y otros autores (1998).** Multilocus sequence typing: A portable approach to the identification of clones within populations of pathogenic microorganisms. *Proc Natl Acad Sci USA* **95**, 3140–3145.
- Maiden, M. C. (2006).** Multilocus sequence typing of bacteria. *Annu Rev Microbiol* **60**, 561–588.
- Martens, M., Dawyndt, P., Coopman, R., Gillis, M., De Vos, P. y Willems, A. (2008).** Advantages of multilocus sequence analysis for taxonomic studies: A case study using 10 housekeeping genes in the genus *Ensifer* (including former *Sinorhizobium*). *Int J Syst Evol Microbiol* **58**, 200–214.
- Martin, D. P., Lemey, P., Lott, M., Moulton, V., Posada, D. y Lefevre, P. (2010).** RDP3: A flexible and fast computer program for analyzing recombination. *Bioinformatics* **26**, 2462–2463.
- Martin-Carnahan, A. y Joseph, S. W. (2005).** Order XII. *Aeromonadales* ord. nov. In *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, 2<sup>a</sup> ed, vol. 2, Part B, pp. 556–578. Edited by D. J. Brenner, N. R. Krieg, J. T. Staley. New York: Springer.
- Martínez-Murcia, A., Benlloch, S. y Collins, M. D. (1992a).** Phylogenetic interrelationships of members of the genera *Aeromonas* and *Plesiomonas* as determined by 16S ribosomal DNA sequencing: lack of congruence with results of DNA-DNA hybridizations. *Int J Syst Bacteriol* **42**, 412–421.
- Martínez-Murcia, A., Esteve, C., Garay, E. y Collins, M. D. (1992b).** *Aeromonas allosaccharophila* sp. nov., a new mesophilic member of the genus *Aeromonas*. *FEMS Microbiol Lett* **70**, 199–205.
- Martínez-Murcia, A. (1999).** Phylogenetic positions of *Aeromonas encheleia*, *Aeromonas popoffii*, *Aeromonas* DNA hybridization group 11 and *Aeromonas* group 501. *Int J Syst Bacteriol* **49 Pt 4**, 1403–1408.
- Martínez-Murcia, A., Soler, L., Saavedra, M. J., Chacón, M. R., Guarro, J., Stackebrandt, E. y Figueras, M. J. (2005).** Phenotypic, genotypic, and phylogenetic discrepancies to differentiate *Aeromonas salmonicida* from *Aeromonas bestiarum*. *Int Microbiol* **8**, 259–269.
- Martínez-Murcia, A., Figueras, M. J., Saavedra, M. J. y Stackebrandt, E. (2007).** The recently proposed species *Aeromonas sharmansp. nov.*, isolate GPTSA-6T, is not a member of the genus *Aeromonas*. *Int Microbiol* **10**, 61–64.
- Martínez-Murcia, A., Saavedra, M. J., Mota, V. R., Maier, T., Stackebrandt, E. y Cousin, S. (2008).** *Aeromonas aquariorum* sp. nov., isolated from aquaria of ornamental fish. *Int J Syst Evol Microbiol* **58**, 1169–1175.
- Martínez-Murcia, A., Monera, A., Alperi, A., Figueras, M. J. y Saavedra, M. J. (2009).** Phylogenetic evidence suggests that strains of *Aeromonas hydrophila* subsp. *dhakensis* belong to the species *Aeromonas aquariorum* sp. nov. *Curr Microbiol* **58**, 76–80.
- Martínez-Murcia, A., Monera, A., Saavedra, M. J., Oncina, R., López-Álvarez, M., Lara, E. y Figueras, M. J. (2011).** Multilocus phylogenetic analysis of the genus *Aeromonas*. *Syst Appl Microbiol* **34**, 189–199.

- Martino, M. E., Fasolato, L., Montemurro, F., Rosteghin, M., Manfrin, A., Patarnello, T., Novelli, E. y Cardazzo, B. (2011).** Determination of microbial diversity of *Aeromonas* strains on the basis of multilocus sequence typing, phenotype, and presence of putative virulence genes. *Appl Environ Microbiol* **77**, 4986–5000.
- Masada, C. L., LaPatra, S. E., Morton, A. W. y Strom, M. S. (2002).** An *Aeromonas salmonicida* type IV pilin is required for virulence in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *Dis Aquat Organ* **51**, 13–25.
- Massa, S., Altieri, C. y D'Angela, A. (2001).** The occurrence of *Aeromonas* spp. in natural mineral water and well water. *Int J Food Microbiol* **63**, 169–173.
- McMahon, M. A. y Wilson, I. G. (2001).** The occurrence of enteric pathogens and *Aeromonas* species in organic vegetables. *Int J Food Microbiol* **70**, 155–162.
- Merino, S., Rubires, X., Knochel, S. y Tomás, J. M. (1995).** Emerging pathogens: *Aeromonas* spp. *Int J Food Microbiol* **28**, 157–168.
- Merino, S., Aguilar, A., Noguerras, M. M., Regué, M., Swift, S. y Tomás, J. M. (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., Gavin, R., Vilches, S., Shaw, J. G. y Tomás, J. M. (2003).** A colonization factor (production of lateral flagella) of mesophilic *Aeromonas* spp. is inactive in *Aeromonas salmonicida* strains. *Appl Environ Microbiol* **69**, 663–667.
- Miñana-Galbis, D. (2002).** Diversitat fenotípica i genotípica del gènere "*Aeromonas*". Universitat de Barcelona. Departament de Microbiologia i Parasitologia Sanitàries.
- Miñana-Galbis, D., Farfán, M., Lorén, J. G. y Fusté, M. C. (2002).** Biochemical identification and numerical taxonomy of *Aeromonas* spp. isolated from environmental and clinical samples in Spain. *J Appl Microbiol* **93**, 420–430.
- Miñana-Galbis, D., Farfán, M., Fusté, M. C. y Lorén, J. G. (2004a).** *Aeromonas molluscorum* sp. nov., isolated from bivalve molluscs. *Int J Syst Evol Microbiol* **54**, 2073–2078.
- Miñana-Galbis, D., Farfán, M., Fusté, M. C. y Lorén, J. G. (2004b).** Genetic diversity and population structure of *Aeromonas hydrophila*, *Aer. bestiarum*, *Aer. salmonicida* and *Aer. popoffii* by multilocus enzyme electrophoresis (MLEE). *Environ Microbiol* **6**, 198–208.
- Miñana-Galbis, D., Farfán, M., Fusté, M. C. y Lorén, J. G. (2007).** *Aeromonas bivalvium* sp. nov., isolated from bivalve molluscs. *Int J Syst Evol Microbiol* **57**, 582–587.
- Miñana-Galbis, D., Urbizu-Serrano, A., Farfán, M., Fusté, M. C. y Lorén, J. G. (2009).** Phylogenetic analysis and identification of *Aeromonas* species based on sequencing of the *cpn60* universal target. *Int J Syst Evol Microbiol* **59**, 1976–1983.
- Miñana-Galbis, D., Farfán, M., Lorén, J. G. y Fusté, M. C. (2010a).** 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, J. G. y Fusté, M. C. (2010b). The reference strain *Aeromonas hydrophila* CIP 57.50 should be reclassified as *Aeromonas salmonicida* CIP 57.50. *Int J Syst Evol Microbiol* **60**, 715–717.
- Murray, P. R. y Baron, E. J. (2003). *Manual of Clinical Microbiology*, 8ª ed. Washington, D.C.: ASM Press.
- Nagar, V., Shashidhar, R. y Bandekar, J. R. (2011). Prevalence, characterization, and antimicrobial resistance of *Aeromonas* strains from various retail food products in Mumbai, India. *J Food Sci* **76**, M486–92.
- Najimi, M., Lemos, M. L. y Osorio, C. R. (2008). Identification of siderophore biosynthesis genes essential for growth of *Aeromonas salmonicida* under iron limitation conditions. *Appl Environ Microbiol* **74**, 2341–2348.
- Nam, I. Y. y Joh, K. (2007). Rapid detection of virulence factors of *Aeromonas* isolated from a trout farm by hexaplex-PCR. *J Microbiol* **45**, 297–304.
- Nawaz, M., Khan, S. A., Khan, A. A., Sung, K., Tran, Q., Kerdahi, K. y Steele, R. (2010). Detection and characterization of virulence genes and integrons in *Aeromonas veronii* isolated from catfish. *Food Microbiol* **27**, 327–331.
- Nhung, P. H., Hata, H., Ohkusu, K., Noda, M., Shah, M. M., Goto, K. y Ezaki, T. (2007). Use of the novel phylogenetic marker *dnal* and DNA-DNA hybridization to clarify interrelationships within the genus *Aeromonas*. *Int J Syst Evol Microbiol* **57**, 1232–1237.
- Nishikawa, Y., Hase, A., Ogawasara, J., Scotland, S. M., Smith, H. R. y Kimura, T. (1994). Adhesion to and invasion of human colon carcinoma Caco-2 cells by *Aeromonas* strains. *J Med Microbiol* **40**, 55–61.
- Noonin, C., Jiravanichpaisal, P., Soderhall, I., Merino, S., Tomás, J. M. y Soderhall, K. (2010). Melanization and Pathogenicity in the Insect, *Tenebrio molitor*, and the Crustacean, *Pacifastacus leniusculus*, by *Aeromonas hydrophila* AH-3. *PLoS One* **5**, e15728.
- Nyenje, M. E., Odjadjare, C. E., Tanih, N. F., Green, E. y Ndip, R. N. (2012). Foodborne pathogens recovered from ready-to-eat foods from roadside cafeterias and retail outlets in Alice, Eastern Cape Province, South Africa: Public health implications. *Int J Environ Res Public Health* **9**, 2608–2619.
- Olafsen, J. A., Mikkelsen, H. V., Giaever, H. M. y Hovik Hansen, G. (1993). Indigenous bacteria in hemolymph and tissues of marine bivalves at low temperatures. *Appl Environ Microbiol* **59**, 1848–1854.
- Orozova, P., Sirakov, I., Petkov, I., Crumlish, M. y Austin, B. (2012). Recovery of *Aeromonas hydrophila* associated with bacteraemia in captive snakes. *FEMS Microbiol Lett* **334**, 22–26.
- Ottaviani, D., Parlani, C., Citterio, B., Masini, L., Leoni, F., Canonico, C., Sabatini, L., Bruscolini, F. y Pianetti, A. (2011). Putative virulence properties of *Aeromonas* strains isolated from food, environmental and clinical sources in Italy: A comparative study. *Int J Food Microbiol* **144**, 538–545.

- Palumbo, S. A., Maxino, F., Williams, A. C., Buchanan, R. L. y Thayer, D. W. (1985).** Starch-ampicillin agar for the quantitative detection of *Aeromonas hydrophila*. *Appl Environ Microbiol* **50**, 1027–1030.
- Palumbo, S. A., Bencivengo, M. M., Del Corral, F., Williams, A. C. y Buchanan, R. L. (1989).** Characterization of the *Aeromonas hydrophila* group isolated from retail foods of animal origin. *J Clin Microbiol* **27**, 854–859.
- Pavan, M. E., Abbott, S. L., Zorzopulos, J. y Janda, J. M. (2000).** *Aeromonas salmonicida* subsp. *pectinolytica* subsp. nov., a new pectinase-positive subspecies isolated from a heavily polluted river. *Int J Syst Evol Microbiol* **50**, 1119–1124.
- Pedersen, K., Dalsgaard, I. y Larsen, J. L. (1996).** Characterization of atypical *Aeromonas salmonicida* isolates by ribotyping and plasmid profiling. *J Appl Bacteriol* **80**, 37–44.
- Pemberton, J. M., Kidd, S. P. y Schmidt, R. (1997).** Secreted enzymes of *Aeromonas*. *FEMS Microbiol Lett* **152**, 1–10.
- Pickett, M. J., Greenwood, J. R. y Harvey, S. M. (1991).** Tests for detecting degradation of gelatin: Comparison of five methods. *J Clin Microbiol* **29**, 2322–2325.
- Pierce, R. L., Daley, C. A., Gates, C. E. y Wohlgenuth, K. (1973).** *Aeromonas hydrophila* septicemia in a dog. *J Am Vet Med Assoc* **162**, 469.
- Podbielski, A., Zarges, I., Flosdorff, A. y Weber-Heynemann, J. (1996).** Molecular characterization of a major serotype M49 group A streptococcal DNase gene (*sdaD*). *Infect Immun* **64**, 5349–5356.
- Popoff, M. y Veron, M. (1976).** A taxonomic study of the *Aeromonas hydrophila*-*Aeromonas punctata* group. *J Gen Microbiol* **94**, 11–22.
- Popoff, M., Coynault, C., Kiredjian, M. y Lemelin, M. (1981).** Polynucleotide sequence relatedness among motile *Aeromonas* species. *Curr Microbiol* **5**, 109–114.
- Popoff, M. (1984).** Facultative anaerobic Gram-negative rods. In: *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Vol. 1, pp. 545–548. Edited by: N. R. Krieg and J. G. Holt. Baltimore: Williams y Wilkins.
- Popoff, M. y Lallier, R. (1984).** Biochemical and serological characteristics of *Aeromonas*", *Methods in Microbiology*, 16: 127-145. *Methods in Microbiology* **16**, 127–145.
- Posada, D. (2000).** How does recombination affect phylogeny estimation? *Trends Ecol Evol* **15**, 489–490.
- Posada, D. (2002).** Evaluation of methods for detecting recombination from DNA sequences: empirical data. *Mol Biol Evol* **19**, 708–717.
- Rabaan, A. A., Gryllos, I., Tomás, J. M. y Shaw, J. G. (2001).** Motility and the polar flagellum are required for *Aeromonas caviae* adherence to HEp-2 cells. *Infect Immun* **69**, 4257–4267.

- Razzolini, M. T., Di Bari, M., Sanchez, P. S. y Sato, M. I. (2008). *Aeromonas* detection and their toxins from drinking water from reservoirs and drinking fountains. *J Water Health* **6**, 117–123.
- Reddy, C. A., Beveridge, T. J., Breznak, J. A., Marzluf, G. A., Schmidt, T. M. y Snyder, L. R. (2007). *Methods for General and Molecular Microbiology*, 3ª ed. Washington, D.C.: ASM Press.
- Reith, M., Singh, R., Curtis, B. y otros autores (2008). The genome of *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida* A449: insights into the evolution of a fish pathogen. *BMC Genomics* **9**, 427.
- Roger, F., Marchandin, H., Jumas-Bilak, E., Kodjo, A., Bvh, C. y Lamy, B. (2012). Multilocus genetics to reconstruct aeromonad evolution. *BMC Microbiol* **12**, 62.
- Ross, A. J. (1962). Isolation of a pigment-producing strain of *Aeromonas liquefaciens* from Silver Salmon (*Oncorhynchus Kisutch*). *J Bacteriol* **84**, 590–591.
- Rozen, S. y Skaletsky, H. (2000). Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. *Methods Mol Biol* **132**, 365–386.
- Saavedra, M. J., Figueras, M. J. y Martínez-Murcia, A. (2006). Updated phylogeny of the genus *Aeromonas*. *Int J Syst Evol Microbiol* **56**, 2481–2487.
- Saha, P. y Chakrabarti, T. (2006). *Aeromonas sharmana* sp. nov., isolated from a warm spring. *Int J Syst Evol Microbiol* **56**, 1905–1909.
- Santos, J. A., González, C. J., Otero, A. y García-López, M. (1999). Hemolytic activity and siderophore production in different *Aeromonas* species isolated from fish. *Appl Environ Microbiol* **65**, 5612-5614.
- Sauer, F. G., Mulvey, M. A., Schilling, J. D., Martínez, J. J. y Hultgren, S. J. (2000). Bacterial pili: Molecular mechanisms of pathogenesis. *Curr Opin Microbiol* **3**, 65–72.
- Schubert, R. H. (1967a). The taxonomy and nomenclature of the genus *Aeromonas* Kluver and van Niel 1936 Part I. Suggestions on the taxonomy and nomenclature of the aerogenic *Aeromonas* species. *Int J Syst Bacteriol* **17**, 23–37.
- Schubert, R. H. (1967b). The pathogenicity of aeromonads for man and animals. *Arch Hyg Bakteriol* **150**, 709–716.
- Schubert, R. H. (1969). On the taxonomy of *Aeromonas salmonicida* subsp. *achromogenes* (Smith 1963) Schubert 1967 and *Aeromonas salmonicida* subsp. *masoucida* Kimura 1969. *Zentralbl Bakteriol Orig* **211**, 413–417.
- Schubert, R. H. W. (1974). Genus II. *Aeromonas* Kluver and Van Niel, 1936. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, 8ª ed., pp. 345–348. Baltimore: William y Wilkins.
- Schubert, R. H. 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.

- Soaris de Oliveira, D., Colacite, J., Nakamura, C. V., Ueda-Nakamura, T., de Abreu Filho, B. A. y Dias Filho, B. P. (2008).** Virulence and antibiotic susceptibility of *Aeromonas* spp. isolated from drinking water. *Antonie Van Leeuwenhoek* **93**, 111–122.
- Sen, K. y Rodgers, M. (2004).** Distribution of six virulence factors in *Aeromonas* species isolated from US drinking water utilities: a PCR identification. *J Appl Microbiol* **97**, 1077–1086.
- Sepe, A., Barbieri, P., Peduzzi, R. y Demarta, A. (2008).** Evaluation of *recA* sequencing for the classification of *Aeromonas* strains at the genotype level. *Lett Appl Microbiol* **46**, 439–444.
- September, S. M., Els, F. A., Venter, S. N. y Brozel, V. S. (2007).** Prevalence of bacterial pathogens in biofilms of drinking water distribution systems. *J Water Health* **5**, 219–227.
- Seshadri, R., Joseph, S. W., Chopra, A. K. y other authors (2006).** Genome sequence of *Aeromonas hydrophila* ATCC 7966<sup>T</sup>: Jack of all trades. *J Bacteriol* **188**, 8272–8282.
- Silver, A. C., Williams, D., Faucher, J., Horneman, A. J., Gogarten, J. P. y Graf, J. (2011).** Complex evolutionary history of the *Aeromonas veronii* group revealed by host interaction and DNA sequence data. *PLoS One* **6**, e16751.
- Singh, D. V. y Sanyal, S. C. (1992).** Biochemical characteristics and enterotoxicity of *Aeromonas* species isolated from man and environment. *J Diarrhoeal Dis Res* **10**, 231–234.
- Smith, J. M., Smith, N. H., O'Rourke, M. y Spratt, B. G. (1993).** How clonal are bacteria? *Proceedings of the National Academy of Sciences* **90**, 4384–4388.
- Soler, L., Figueras, M. J., Chacón, M. R., Vila, J., Marco, F., Martínez-Murcia, A. y 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, M. A., Chacón, M. R., Aguilera-Arreola, M. G., Catalán, V., Figueras, M. J. y Martínez-Murcia, A. (2004).** Phylogenetic analysis of the genus *Aeromonas* based on two housekeeping genes. *Int J Syst Evol Microbiol* **54**, 1511–1519.
- Sreedharan, K., Philip, R. y Singh, I. S. (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.
- Stackebrandt, E., Frederiksen, W., Garrity, G. M. y other authors (2002).** Report of the ad hoc committee for the re-evaluation of the species definition in bacteriology. *Int J Syst Evol Microbiol* **52**, 1043–1047.
- Takewaki, S., Okuzumi, K., Ishiko, H., Nakahara, K., Ohkubo, A. y Nagai, R. (1993).** Genus-specific polymerase chain reaction for the mycobacterial *dnaJ* gene and species-specific oligonucleotide probes. *J Clin Microbiol* **31**, 446–450.
- Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M. y Kumar, S. (2011).** MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol Biol Evol* **28**, 2731–2739.

- Thomas, L. V., Gross, R. J., Cheasty, T. y Rowe, B. (1990).** Extended serogrouping scheme for motile, mesophilic *Aeromonas* species. *J Clin Microbiol* **28**, 980–984.
- Thomas, S., Austin, J. W., McCubbin, W. D., Kay, C. M. y Trust, T. J. (1992).** Roles of structural domains in the morphology and surface anchoring of the tetragonal paracrystalline array of *Aeromonas hydrophila*. Biochemical characterization of the major structural domain. *J Mol Biol* **228**, 652–661.
- Thompson, J. R., Pacocha, S., Pharino, C., Klepac-Ceraj, V., Hunt, D. E., Benoit, J., Sarma-Rupavtarm, R., Distel, D. L. y Polz, M. F. (2005).** Genotypic diversity within a natural coastal bacterioplankton population. *Science* **307**, 1311–1313.
- Thornley, J. P., Shaw, J. G., Gryllos, I. A. y Eley, A. (1996).** Adherence of *Aeromonas caviae* to human cell lines Hep-2 and Caco-2. *J Med Microbiol* **45**, 445–451.
- Tonolla, M., Demarta, A. y Peduzzi, R. (1991).** Multilocus genetic relationships between clinical and environmental *Aeromonas* strains. *FEMS Microbiol Lett* **65**, 193–200.
- Trun, N. J. y Trempy, J. E. (2004).** *Fundamental Bacterial Genetics*. Malden Mass.: Blackwell Science.
- Tsai, G. J. y Chen, T. H. (1996).** Incidence and toxigenicity of *Aeromonas hydrophila* in seafood. *Int J Food Microbiol* **31**, 121–131.
- Turska-Szewczuk, A., Lindner, B., Komaniecka, I., Kozinska, A., Pekala, A., Choma, A. y Holst, O. (2013).** Structural and immunochemical studies of the lipopolysaccharide from the fish pathogen, *Aeromonas bestiarum* strain K296, serotype O18. *Mar Drugs* **11**, 1235–1255.
- Twedt, R.M. (1984)** Recovery of *Vibrio parahaemolyticus* and related halophilic vibrios, In *Bacteriological Analytical Manual*, 6<sup>a</sup> ed. pp. 12.01–12.08. Arlington: Food y Drug Administration, Association of Official Analytical Chemists.
- Valera, L. y Esteve, C. (2002).** Phenotypic study by numerical taxonomy of strains belonging to the genus *Aeromonas*. *J Appl Microbiol* **93**, 77–95.
- Van der Goot, F. G., Hardie, K. R., Parker, M. W. y Buckley, J. T. (1994).** The C-terminal peptide produced upon proteolytic activation of the cytolytic toxin aerolysin is not involved in channel formation. *J Biol Chem* **269**, 30496–30501.
- Véron, M. (1975).** Nutrition and taxonomy of "Enterobacteriaceae" and related bacteria. I. Technical procedure for auxanograms. *Ann Microbiol (Paris)* **126**, 267–274.
- von Graevenitz, A. (2007).** The role of *Aeromonas* in diarrhea: A review. *Infection* **35**, 59–64.
- Wilhelms, M., Vilches, S., Molero, R., Shaw, J. G., Tomás, J. M. y Merino, S. (2009).** Two redundant sodium-driven stator motor proteins are involved in *Aeromonas hydrophila* polar flagellum rotation. *J Bacteriol* **191**, 2206–2217.
- Woese, C. R. (1987).** Bacterial evolution. *Microbiol Rev* **51**, 221–271.



**Wu, C., Wu, J., Yan, J. y other authors (2007).** Clinical significance and distribution of putative virulence markers of 116 consecutive clinical *Aeromonas* isolates in southern Taiwan. *J Infect* **54**, 151–158.

**Xia, X. y Xie, Z. (2001).** DAMBE: software package for data analysis in molecular biology and evolution. *J Hered* **92**, 371–373.

**Yamamoto, S. y Harayama, S. (1996).** Phylogenetic analysis of *Acinetobacter* strains based on the nucleotide sequences of *gyrB* genes and on the amino acid sequences of their products. *Int J Syst Bacteriol* **46**, 506–511.

**Yamamoto, S., Kasai, H., Arnold, D. L., Jackson, R. W., Vivian, A. y Harayama, S. (2000).** Phylogeny of the genus *Pseudomonas*: intrageneric structure reconstructed from the nucleotide sequences of *gyrB* and *rpoD* genes. *Microbiology* **146 ( Pt 10)**, 2385–2394.

**Yáñez, M. A., Catalán, V., Apraiz, D., Figueras, M. J. y Martínez-Murcia, A. (2003).** Phylogenetic analysis of members of the genus *Aeromonas* based on *gyrB* gene sequences. *Int J Syst Evol Microbiol* **53**, 875–883.

**Yu, H. B., Rao, P. S., Lee, H. C., Vilches, S., Merino, S., Tomás, J. M. y Leung, K. Y. (2004).** A type III secretion system is required for *Aeromonas hydrophila* AH-1 pathogenesis. *Infect Immun* **72**, 1248–1256.

**Zacaría, J., Delamare, A. P., Costa, S. O. y Echeverrigaray, S. (2010).** Diversity of extracellular proteases among *Aeromonas* determined by zymogram analysis. *J Appl Microbiol* **109**, 212–219.

**Zeigler, D. R. (2003).** Gene sequences useful for predicting relatedness of whole genomes in bacteria. *Int J Syst Evol Microbiol* **53**, 1893–1900.

## **Capítulo 8**

---

### **Anexos**



## 8.1 Cepas utilizadas en el estudio

<b>A. aquariorum</b>	<b>Origen</b>	<b>Otras colecciones</b>
MDC47 <sup>T</sup>	Saa vedra, M.J. acuario con peces ornamentales, Maia, Oporto, Portugal, 2003	CECT 7289 <sup>T</sup> , DSM 18362 <sup>T</sup> , LMG 24688 <sup>T</sup>
MDC310	Acuario con peces ornamentales, Oporto, Portugal, 2004	-
MDC317	Acuario con peces ornamentales, Maia, Oporto, Portugal, 2004	-
MDC573	Acuario con peces ornamentales, Maia, Oporto, Portugal	-
<b>A. bestiarum</b>	<b>Origen</b>	<b>Otras colecciones</b>
CECT 4227 <sup>T</sup>	Peces enfermos, 1974	Altwegg A307 <sup>T</sup> , LMG 13444 <sup>T</sup>
112A	Miñana-Galbis, D. agua no potable, El Preventori, Alcoi, Alacant, España, 1997	-
555A	Miñana-Galbis, D. agua potable, Montseny, Barcelona, España, 1997	-
556A	Miñana-Galbis, D. agua potable, Montseny, Barcelona, España, 1997	-
559A	Miñana-Galbis, D. agua potable, Montseny, Barcelona, España, 1997	-
624A	Miñana-Galbis, D. agua potable, Montseny, Barcelona, España, 1997	-
628A	Miñana-Galbis, D. agua potable, Montseny, Barcelona, España, 1997	-
CECT 5205	Universidad Rovira i Virgili agua, Riera de Merlés, España, 1994	21
CECT 5206	Universidad Rovira i Virgili agua, Riera de Merlés, España, 1994	22
CECT 5211	Universidad Rovira i Virgili agua de mar, Grau de Cadaqués, España, 1994	37
CECT 5212	Universidad Rovira i Virgili agua, río Noguera Pallaresa, España, 1994	40
CECT 5214	Universidad Rovira i Virgili agua, embalse de Camarasa, España, 1994	48
CECT 5215	Universidad Rovira i Virgili agua, depósito de St. Antoni, España, 1994	58
CECT 5217	Universidad Rovira i Virgili agua, lago de Banyoles, España, 1994	68
CECT 5219	Universidad Rovira i Virgili pastel, España	101F, ATCCBAA-231
CECT 5222	Universidad Rovira i Virgili mejillón, España, 1995	107F
CECT 5223	Universidad Rovira i Virgili mejillón, España, 1995	108F
CECT 5226	Universidad Rovira i Virgili agua de pozo, España, 1995	116P
CECT 5233	Hospital Vall d'Hebron heces, Barcelona, España, 1992	127C
CECT 5236	Universidad Rovira i Virgili, agua del grifo, España, 1995	140P
CECT 5239	Universidad Rovira i Virgili, agua depósito de St. Antoni, España, 1994	156
CECT 5242	Universidad Rovira i Virgili, agua, embalse de Camarasa, España, 1994	161
CECT 5247	Universidad Rovira i Virgili, agua, lago de Banyoles, España, 1994	440
CECT 5741	Geiss, H. ambiental, Alemania	Altwegg A13, LMG 13446
CECT 5742	Altwegg, M. agua, Suiza, 1984	Altwegg A39, LMG 13447

<b>A. bestiarum</b>	<b>Origen</b>	<b>Otras colecciones</b>
CECT 7451	Esteve, C. Anguilla ( <i>Anguilla anguilla</i> ), Polinyà del Xúquer, València, España, 1987	S188
CECT 7453	Esteve, C. tanque agua de una granja de Anguila, Polinyà del Xúquer, València, España, 1987	TW170
LMG 13445	Geiss, H. humano, Alemania	Altwegg A2
LMG 13448	Altwegg, M. heces, Suiza, 1986	Altwegg A169
LMG 13662	Altwegg, M. heces, Suiza, 1986	Altwegg A295
LMG 13663	Intestino de salmón plateado	Altwegg A908, ATCC 14715
LMG 13664	–	Altwegg A936
LMG 13665	–	Altwegg A937
LMG 13666	Agua	Altwegg A976
LMG 13667	Moyer, N. probablemente agua, Estados Unidos, 1990	Altwegg A1613
LMG 13673	Carahan, A., agua, Estados Unidos	Altwegg A1722
LMG 14043	Hänninen, M.-L. pozo de agua potable	Hänninen KV 3
LMG 14045	Hänninen, M.-L. carne picada, Finlandia	Hänninen JA 5
<b>A. hydrophila</b>	<b>Origen</b>	<b>Otras colecciones</b>
CECT 839 <sup>T</sup>	Speck, M. L. envase de leche con olor a pescado	Altwegg A17 <sup>T</sup> , Altwegg A306 <sup>T</sup> , ATCC 7966 <sup>T</sup>
1054148	Muestra clínica, Hospital Son Llätzer, Palma de Mallorca, España	–
1073633	Muestra clínica, Hospital Son Llätzer, Palma de Mallorca, España	–
1074611	Muestra clínica, Hospital Son Llätzer, Palma de Mallorca, España	–
AE053	Agua de lago, Finlandia	–
AE150	Agua de río, Finlandia	–
AE154	Agua de río, Finlandia	–
AE180	Agua de lago, Finlandia	–
AE210	Agua de lago, Finlandia	–
AE215	Agua de lago, Finlandia	–
AE216	Agua de lago, Finlandia	–
CECT 4330 (a)	Esteve, C. tanque agua de una granja de Anguila, Polinyà del Xúquer, València, España, 1987	TW170
CECT 5174	–	Altwegg A397
CECT 5216	Hospital Vall d'Hebron heces, Barcelona, España, 1992	63C
CECT 5734	Esteve, C. Anguila enferma, València, España, 1987	A19
CECT 5738	–	–

<b>A. hydrophila</b>	<b>Origen</b>	<b>Otras colecciones</b>
JCM 3967	-	-
JCM 3968 (a)	Serpiente <i>Salvadora hexatepsis virgulata</i>	CCM 2280
JCM 3976 (a)	Rana patas rojas <i>Rana Auraa draytoni</i> , California, Estados Unidos	CCM 2278
JCM 3995 (a)	Varano del Nilo <i>Varranus nitalicus</i>	CCM 2282
LMG 3756	Humano	Lautrop AB346, CCUG 25941
LMG 3769 (a)	Agua del río, India	Sanya I AH-16
LMG 3770	Animal, India	Sanya I AH-17
LMG 12665 (a)	Hombre con enteritis repetidas incluso después del tratamiento con antibióticos, Göteborg, Suecia	CCUG 10553
LMG 13658 (a)	Altwegg, M. heces, Suiza, 1986	Altwegg A162
LMG 13660 (a)	Altwegg, M. frasco contaminados con medio Bactec, Suiza	Altwegg A188
LMG 18245(a)	-	ATCC 35654, CIP 103697
LMG 21080 (a)	Lavabo, Rabat, Marruecos	Alaoui Am1
LMG 21105 (a)	Hassani, L. Laguna de aguas residuales, Marrakech, Marruecos, 1998	mic Aé4
CIP 107985 <sup>T</sup> (b)	Pearson, M. <i>Rana rugulosa</i> hígado rana con septicemia, Kamphaeng Phet, Tailandia, 1994	AU-1D12 <sup>T</sup>
<b>A. hydrophila subsp. dhakensis</b>	<b>Origen</b>	<b>Otras colecciones</b>
CECT 5744 <sup>T</sup>	Albert, M. heces de niño con diarrea, Dhaka, Bangladesh	LMG 19562 <sup>T</sup> , CCUG 45377 <sup>T</sup>
LMG 19558	Albert, M. heces de niño con diarrea, Dhaka, Bangladesh	Huys R-1988
LMG 19559	Albert, M. heces de niño con diarrea, Dhaka, Bangladesh	Huys R-1990
LMG 19560	Albert, M. heces de niño sano, Dhaka, Bangladesh	Huys R-1993
LMG 19561	Albert, M. heces de niño con diarrea, Dhaka, Bangladesh	Huys R-1998
LMG 19564	Albert, M. heces de niño con diarrea, Dhaka, Bangladesh	Huys R-2005
LMG 19565	Albert, M. heces de niño con diarrea, Dhaka, Bangladesh	Huys R-2007
LMG 19566	Albert, M. heces de niño con diarrea, Dhaka, Bangladesh	Huys R-2008
LMG 19567	Albert, M. heces de niño con diarrea, Dhaka, Bangladesh	Huys R-2009
<b>A. piscicola</b>	<b>Origen</b>	<b>Otras colecciones</b>
S1.2 <sup>T</sup>	Núñez, S. salmón enfermo <i>Salmo salar</i> , Universidad de Santiago de Compostela, España, 2005	CECT 7443 <sup>T</sup> , LMG 24783 <sup>T</sup>
R4	-	-
R9	-	-
R94	-	-

<b>A. popoffii</b>	<b>Origen</b>	<b>Otras colecciones</b>
LMG 17541 <sup>T</sup>	Kersters, I., agua, planta potabilizadora, Oelegem, Bélgica, 1993	ATCC BAA-243 <sup>T</sup> , CECT 5176 <sup>T</sup> , CIP 105493 <sup>T</sup>
LMG 17542	Kersters, I., agua, planta potabilizadora, Blankkaart, Bélgica	CCUG 39351, Kersters B-r-15-1
LMG 17543	Kersters, I., agua, planta potabilizadora, Snellegem, Bélgica	Kersters S-a-10-2
LMG 17544	Kersters, I., agua, planta potabilizadora, Snellegem, Bélgica	Kersters E-a-14-1
LMG 17545	Kersters, I., agua, planta potabilizadora, Snellegem, Bélgica	CECT 4995, Kersters S-b-8-1
LMG 17546	Lamb, A., agua potable depósito, estación de Udny, Escocia, UK	Lamb AG-7
LMG 17547	Lamb, A., agua, planta potabilizadora, Turriff, Scotland, UK	Lamb AG-9
<b>A. salmonicida</b>	<b>Origen</b>	<b>Otras colecciones</b>
CECT 894 <sup>T</sup> (c)	Laboratorio de Salud pública Carmarthen salmón del Atlántico ( <i>Salmo salar</i> ), río Clether, UK, 1959	ATCC 33658 <sup>T</sup> , LMG 3780 <sup>T</sup> , NCIMB 1102 <sup>T</sup>
045C	Miñana-Galbis, D. almejas <i>Tapes decussatus</i> , mercado de St. Ildelfons, Cornellà, Barcelona, España, 1997	-
051C	Miñana-Galbis, D. almejas <i>Tapes decussatus</i> , mercado de St. Ildelfons, Cornellà, Barcelona, España, 1997	-
083C	Miñana-Galbis, D. almejas <i>Tapes decussatus</i> , mercado de St. Ildelfons, Cornellà, Barcelona, España, 1997	-
086C	Miñana-Galbis, D. almejas <i>Tapes decussatus</i> , mercado de St. Ildelfons, Cornellà, Barcelona, España, 1997	-
087M	Miñana-Galbis, D. mejillones <i>Mytilus sp.</i> , mercado de St. Ildelfons, Cornellà, Barcelona, España, 1997	-
089C	Miñana-Galbis, D. almejas <i>Tapes decussatus</i> , mercado de St. Ildelfons, Cornellà, Barcelona, España, 1997	-
092M	Miñana-Galbis, D. mejillones <i>Mytilus sp.</i> , mercado de St. Ildelfons, Cornellà, Barcelona, España, 1997	-
278T	Miñana-Galbis, D. tellerina <i>Donax trunculus</i> , mercado de Les Corts, Barcelona, España, 1997	-
621A	Miñana-Galbis, D. Fuente del Montseny, Barcelona, España, 1997	-
635A	Miñana-Galbis, D. balsa, Hostalets de Balenyà, Barcelona, España, 1997	-
818E	Miñana-Galbis, D. berberechos <i>Cardium sp.</i> , El Corte Inglés Diagonal, Barcelona, España, 1997	-
852T	Miñana-Galbis, D. tallerina <i>Donax trunculus</i> , El Corte Inglés Diagonal, Barcelona, España, 1997	-
856T	Miñana-Galbis, D. tallerina <i>Donax trunculus</i> , El Corte Inglés Diagonal, Barcelona, España, 1997	-
1062548	Muestra clínica, Hospital Son Llàtzer, Palma de Mallorca, España	-
AE092	Agua de lago, Finlandia	-

<i>A. salmonicida</i>	Origen	Otras colecciones
AE145	Agua de lago, Finlandia	-
AE147	Agua de río, Finlandia	-
AE163	Agua de lago, Finlandia	-
AE169	Mar báltico, Finlandia	-
AE203	Agua de lago, Finlandia	-
AE238	Agua de lago, Finlandia	-
AE258	Agua de lago, Finlandia	-
CECT 5173	Agua dulce	Popoff 316, LMG 13451, Altwegg A308
CECT 5201	Olivier, rucha marrón, Finlandia	AS24
CECT 5209 (c)	Universidad Rovira i Virgili agua de mar, playa de Gavà, Barcelona, España, 1994	27
CECT 5220	Universidad Rovira i Virgili agua de mar, playa de Torredembarra, Tarragona, España, 1994	105
CECT 5230	Universidad Rovira i Virgili agua de pozo, España, 1995	119P
CIP 57.50	-	ATCC 7965, CDC 3054-60
HE22	Agua de lago, Finlandia	-
HE73	Agua de lago, Finlandia	-
S09-32	Steinbutt (Rodaballo), Alemania	-
LMG 14900 <sup>T</sup> (d)	Smith, I. w. trucha marrón enferma ( <i>Salmo trutta</i> ), Escocia, UK, 1962	ATCC 33659 <sup>T</sup> , NCIMB 1110 <sup>T</sup> , CECT 895 <sup>T</sup>
CIP 103210 <sup>T</sup> (e)	Sakuramasou <i>Oncorhynchus masou</i> , sangre de corazón	ATCC 27013 <sup>T</sup> , NCIMB 2020 <sup>T</sup> , LMG 3782 <sup>T</sup>
CECT 5752 <sup>T</sup> (f)	Pavan, M. agua, Río de la Matanza, Buenos Aires, Argentina, 1988	LMG 19569 <sup>T</sup> , DSM 12609 <sup>T</sup>
CIP 104757 <sup>T</sup> (g)	Owen, T. ex <i>Rutilus rutilus</i> , úlcera, UK	ATCC 49393 <sup>T</sup> , LMG 20223 <sup>T</sup> , CECT 5179 <sup>T</sup>

(a) *A. hydrophila* subsp. *hydrophila*, (b) *A. hydrophila* subsp. *ranae*, (c) *A. salmonicida* subsp. *salmonicida*, (d) *A. salmonicida* subsp. *achromogenes*, (e) *A. salmonicida* subsp. *masoucida*, (f) *A. salmonicida* subsp. *pectinolytica* (g) *A. salmonicida* subsp. *smithia*



## 8.2 Medios de cultivo y soluciones salinas

### **Almidón, agar (Adsa 1–283):**

- 5 g/l Peptona.
- 3 g/l Extracto de carne.
- 2 g/l Almidón soluble.
- 15 g/l Agar.
- 1 l Agua destilada.
- +10 g/l NaCl.
- pH 7,2.

Hervir.

Añadirlo a una botella de vidrio.

Esterilizar en autoclave (20 min a 121°C).

Distribuir en placas de Petri.

### **Columbia, agar sangre (Oxoid PB503A):**

- 15 g/l Triptona.
- 5 g/l Peptona de soja.
- 5 g/l NaCl.
- 15 g/l Agar-agar.
- 1 l Agua destilada.
- 50 ml Sangre de cordero.
- pH 6,8.

### **DNA, Agar (Difco 0632–17–7).**

- 20 g/l Triptona.
- 2 g/l DNA.
- 5 g/l Cloruro sódico.
- 15 g/l Agar.
- 1 l Agua destilada.
- +5 g/l NaCl.
- pH 7,3.

Añadir 0,1 g/l Azul de toluidina.

Hervir

Añadirlo a una botella de vidrio.

Esterilizar en autoclave (20 min a 121°C).

Distribuir en placas de Petri.

**Elastina, agar**

10 g/l Peptona (Difco 0118-01).

10 g/l Elastina (Sigma E1625).

11,6 g/l CaCl<sub>2</sub> (Fluka141219).

7,2 g/l Tris (Sigma 93352).

10 g/l NaCl (Panreac 141659).

20 g/l Agar-agar (Oxoid LP001).

1 l Agua destilada.

pH 7,8.

Hervir.

Añadirlo a una botella de vidrio.

Esterilizar en autoclave (20 min a 121°C).

Distribuir en placas de Petri.

**Fermentación** Caldo base (Twedt, 1984):

10 g/l Peptona (Difco 0118-01).

3 g/l Extracto de carne (Scharlau 07-075-005).

0,04 g/l Purpura de bromocresol (Panreac 171546).

10 g/l Cloruro sódico (Panreac 141659).

1l Agua destilada.

pH 6,8.

Hervir.

Añadirlo a una botella de vidrio.

Añadir 5 g/l de sorbitol (Farmitalia 484705) esterilizado mediante filtración.

Esterilizar en autoclave (20 min a 121°C).

Distribuir en tubos asépticos de poliestireno.

## **M-70 Solución**

### Solución A1:

1960 mg  $\text{H}_3\text{PO}_4$  (Fluka 79622).  
29 mg  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (Fluka 96500).  
22 mg  $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  (Panreac 131413).  
6 mg  $\text{H}_3\text{BO}_3$  (Panreac 131015).  
3 mg  $\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  (Merck 2536).  
2,5 mg  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  (Probys 26199).  
800 ml Agua destilada.

Añadir a una botella de vidrio

Esterilizar en autoclave (15 min a 115°C).

### Solución A2:

56 mg  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (Merck 3965).  
200 ml Agua destilada.

Añadir a una botella de vidrio.

Esterilizar en autoclave (15 min a 115°C).

### Solución A = A1 + A2.

### Solución B1:

123 mg  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (Merck 5886).  
15 mg  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  (Panreac 141232).  
250 ml Agua destilada.

Añadir a una botella de vidrio.

Esterilizar en autoclave (15 min a 115°C).

Solución B2:

2610 mg  $K_2HPO_4$  (Fluka 60355).  
680 mg  $KH_2PO_4$  (Fluka 60230).  
240 ml Agua destilada.

Añadir a una botella de vidrio.

Esterilizar en autoclave (15 min a 115°C).

Solución B3:

10 g NaCl (Panreac 141659).  
1 g  $(NH_4)_2SO_4$  (Panreac 131140).  
500 ml Agua destilada.

Añadir a una botella de vidrio.

Esterilizar en autoclave (15 min a 115°C).

Solución B = B1 + B2 + B3.

Solución M-70 (pH 7,2) = solución B + 10 ml solución A.

Añadir en proporción 10:1 la solución de L-Lactato al 1%, esterilizar por filtración (filtro de jeringa de 0,2 $\mu$ m, Nalgene 190-2520), de manera que la concentración final de L-Lactato sea de 0,1% (Popoff y Davaine, 1971; Veron, 1975; Popoff y Lallier, 1984; Miñana i Galbis, 2002).

Distribuir en tubos de vidrio estériles.

**Mueller Hinton**, agar (Oxoid CM337).

300 g/l Extracto de carne.  
17,5 g/l Hidrolizado de caseína.  
1,5 g/l Almidón.  
17,0 g/l Agar.  
pH 7,3  $\pm$  0.1.

Hervir.

Añadirlo a una botella de vidrio.

Esterilizar en autoclave (20 min a 121°C).

Distribuir en placas de Petri.

**Mueller Hinton**, caldo (oxoid)

300 g/l Extracto de carne.

17,5 g/l Hidrolizado de caseína.

1,5 g/l Almidón.

pH 7.3 ± 0.1

Añadirlo a una botella de vidrio.

Esterilizar en autoclave (20 min a 121°C).

Distribuir en tubos de vidrio estériles.

**Ringer** (Scharlau 6-073):

2,250 g/l NaCl.

0,105 g/l KCl.

0,120 g/l KCl<sub>2</sub>.

0,050 g/l Bicarbonato sódico.

1 l Agua destilada.

pH 7,2.

Añadirlo a una botella de vidrio.

Esterilizar en autoclave (20 min a 121°C).

Distribuir en tubos de vidrio estériles.

**STB** (caldo de tolerancia salina):

10 g/l Triptona (Adsa 7-119).

3 g/l Extracto de levadura (Difco)

10 g/l NaCl (Panreac 141659).

1 l Agua destilada.

pH 7,2.

Añadirlo a una botella de vidrio.

Esterilizar en autoclave (20 min a 121°C).

Distribuir en tubos de vidrio estériles.

**TSA** (agar triptona de soja, Conda 1068.05):

- 15 g/l Peptona de caseína.
- 5 g/l Peptona de soja.
- 5 g/l NaCl.
- 15 g/l Agar-agar.
- 1 l Agua destilada
- + 5 g/l NaCl (Panreac 141659).
- pH 7,3.

Hervir.

Añadirlo a una botella de vidrio o tubos de vidrio.

Esterilizar en autoclave (20 min a 121°C).

Distribuir en placas de Petri o inclinar los tubos.

**TSB** (caldo triptona de soja, Adsa 2-200):

- 17 g/l Peptona de caseína.
- 3 g/l Peptona de soja.
- 2,5 g/l Dextrosa.
- 2,5 g/l Fosfato monopotásico.
- 5 g/l NaCl.
- 1 l Agua destilada.
- + 5 g/l NaCl (Panreac 141659).
- pH 7,3.

Dispensar 5 ml en tubos de vidrio

Esterilizar en autoclave (20 min a 121°C).

**Yema de huevo, agar**

- 40 g/l Peptona (Difco 0118-01).
- 5 g/l Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (Panreac 141677).
- 1 g/l NaCl (Panreac 141659).
- 2 g/l Glucosa (Merk 1000).
- 0,2 ml Mg SO<sub>4</sub> al 0,5% (Merck 5886).
- 25 g/l Agar (Oxoid LP001).
- 1 l Agua destilada.

pH7,3–7,4

Hervir.

Añadirlo a una botella de vidrio.

Esterilizar en autoclave (15 min a 115°C).

Enfriar a 55–60°C.

Añadir en condiciones asépticas 10 ml emulsión estéril de yema de huevo (Oxoid SR0047).

Distribuir en placas de Petri.

### 8.3 Reactivos y colorantes

**Catalasa**, reactivo de la (Reddy y col., 2007):

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 10 vol.

**Cristal de violeta:**

Solución A:

2g Violeta cristal.

20 ml Alcohol etílico.

Solución B:

0,8 g Oxalato amónico.

80 ml Agua destilada.

Mezclar las soluciones A y B.

Filtrar.

**Lugol:**

2g KI.

2ml Agua destilada.

1g Iodo resublimado.

Aforar a 300 ml con agua destilada.

**Oxidasa**, reactivo de la (Reddy y col., 2007):

Tetrametil-*p*-fenilendiamonio (Fluka) al 1% en agua de destilada.

**Safranina:**

10 ml Solución alcohólica de safranina al 2,5% (Panreac).  
100 ml Agua destilada.

Filtrar.



## 8.4 Secuencias de los fragmentos amplificados de los genes *cpn60*, *dnaJ*, *gyrB* y *rpoD*

- *cpn60*

Se amplificó un fragmento de 764 pb. En negrita se muestra el fragmento amplificado y subrayado en negro los cebadores utilizados (C175 y C938)

ATGGCAGCTAAAGAAGTCAAGTTTGGCAACGAAGCACGCAGCAAGATGCTGGAAGGCGTAAACATCCT  
GGCCGATGCCGTCAAGGTGACCCTGGGCCCGAAAGGCCCAACGTGGTACTGGACAAGTCCTTCGGCG  
CGCCGACCATCACCAAGGACGGCGTCTCCGTTGCCCGT**GAAATCGAGCTGGAAGACAAGTTTCATGAAC**  
**ATGGGCGCCCAGATGGTCAAGGAAGTTGCTTCCAAGGCCAACGATGCCGCCGGTGACGGTACCCTAC**  
**CGCTACCGTACTGGCTCAAGCCATCGTCAACGAAGGCCGTAAGGCCGTTGCCGCCGGCATGAACCCGA**  
**TGGATCTGAAGCGCGGTATCGACAAGGCCGTAGTGGCCGCCGTTGCCGAGCTGCAAGCGCTGTCCAG**  
**CCGTGTGCTGACAACAATGCCATCGCTCAGGTCGGCACCATCTCCGCCAACTCCGACGAGAAAGTGGG**  
**CAAGCTGATTGCCGAAGCCATGGACAAAAGTCGGTCGTGACGGCGTCATCACCGTTGAAGACGGTCAGG**  
**GTCTGGACGACGAGCTGGCCGTTGGTAGAAGGCATGCAGTTCGATCGTGGCTACCTCTCCCCGTACTTC**  
**GTCAACAAGCCGGAAACCGGTGCCGTTGAGCTGGACGATCCCTTCATCCTGCTGGTCGACAAGAAAGT**  
**CTCCAACATCCGTGAAATGCTGCCGGTGTGGAAGGCCGTAGCCAAAGCAGGCAAGCCGTGATCATCG**  
**TGGCCGAAGACGTGGAAGGCCAAGCGCTGGCGACCCTGGTGGTCAACACCATGCCGTGGCATCGTAAA**  
**GTCGCGGCCGTCAAGGCACCTGGCTTCGGTGACCGTCGCAAAGCCATGCTGCAGGATATCGCCATCCT**  
**GACCGGTGGTACCGTGATCTCCGAAGAAGTGGGCA**TGGAGCTGGAAAAGCCAC****CTTGAAGACCTGG  
GCCGTGCCAAGCGCATCGTCATCACCAAAGAGAACACCACCATCATCGATGGCGTGGGTGATGCATCT  
CTGATCGAGAGCCGTGTGGCCAGATCCGTCAGCAGATCGAAGAGACCTCTTCCGATTACGACCGCGA  
GAAGCTGCAAGAGCGCGTAGCCAAACTGGCTGGCGGTGTTGCGGTGATCAAGGTTGGCGCTGCCACCG  
AAGTCGAGATGAAAGAGAAGAAAGCCCGGTTGACGACGCCCTGCACGCGACTCGCGCCGCTGTAGAA  
GAGGGTGTGGTTGCCGGTGGTGGTGTGCGCTGGTACGCGTGGCCGCCAAACTGGCCGGCTGCGTGG  
TGACAACGAAGATCAGAACGTGGGTATCAAGGTCGCTCTGCGCGCCATGGAAGCTCCGCTGCGCCAGA  
TCGTCATCAACGCCGTTGAAGAGGCCCTCCGTCATCGCCAACGCGGTGAAGAAGGTTGAAGGTAACCTC  
GGTTACAACGCCTACACCGAACAGTACGGTGACATGCTGGCCATGGGTATCCTGGATCCGACCAAGGT  
GACCCGTTCTGCCCTGCAGTTCGCCTCTCCATCGCCGGCCTGATGATCACCACCGAGTGCATGATCT  
CCGAGCTGCCGAAGAAAGATGCCCTGCCATGCCTGACATGGGCGGCATGGGCGGCATGGGCATGATG  
TAA

- *dnaJ*

Se amplificó un de entre 934 pb y 974 pb, dependiendo de los cebadores utilizados.

En negrita se muestra el fragmento amplificado y subrayado en negro los cebadores utilizados (F1 Y R3)

ATGTGCAAGCGCGATT**TCTACGAAGTCTCGGGGTAT**CCAAGGATGCCGACGAACCGGAGATCAAGAA  
GGCGTACAAGCGTCTGGCCATGAAGTATCACCCCTGACCGCAACCAGGGCGATGCCGGGGCCGAAGAGA  
AGTTCAAAGAGGTCAAGGAAGCCTACGAGATCCTGACCGATGCCAATCTGCGTGCCTGATGACCA  
GTACGGTCACGCTGGCGTGGATCAGAGCCAGGGTGGCGGTGGCCACGGCGGCTTTGGCGGGCGGCCG

ATTTTCGGCGACATCTTCGGCGACGTGTTTGGCGATATTTTTGGTGGCAGCCGTGGCGGGCCGTCGT  
GGCCCTGCCCCTGGCTCCGACCTGCGCTACCCATGGAGCTGACGCTGGAAGAGGCGGTACGCGGGGT  
CTCCAAGGAGATCAAGGTGC°3CGACCTGGTCCACTGTGAAGTCTGTAACGGCTCCGGTGCCACAC  
CGGCAGCTCGGCCAGACCTGCCCAGCTGCCACGGCTCCGGCCAGGTGCAGATGCGTCAGGGCTTCT  
TCGCGGTGCAGCAGGCCTGTCTCACTGTACGGTCCGCGCAAGATCATCAAGGATCCGTGCCGCAAG  
TGCCATGGCGAGGGTTCGCTACCAGAAAACCAAGACCCTGTCCGGTCAAGATCCCGGTGGCGTCGACAC  
CGGCGATCGGATCCGTCTCTCCGGCGAAGGGGAAGCGGGGAAGCCGGCGCACCGGCGGGCGATCTGT  
ACGTACAGGTGCACGTCAAGGAGCACGAAATCTTCGTGCGTGACGGCAACAACCTCTACTGCGAAGTG  
CCCATCAGCTTTACCGCGCAGCCCTGGGTGGCGAGATCGAAGTGCCGACCCCTGGATGGCCGGGTCAA  
GCTCAAGGTCACTCCGGAGACCCAGACCCGGCAAGATGTTCCGCATGCGGGGCAAGGGCGTGAAGTCCG  
**TGCGCTCCGGCCAGGTGGGGGATCTGATGTGCAAGGTGGTG**GTGGAGACCCCGGTCAAGCTGACCGAG  
TCCCAGAAAAGAGCTGCTGCGCCAGCTGGACGAGTCTTCAGCGGCGCCGCCCAAGACCCACAAGCC  
GAAATCGGAAGGCTTCTTCGAAGGGGTGAAACGCTTCTTCGACGATCTGACCAGCTGA

En negrita se muestra el fragmento amplificado y subrayado en negro los cebadores utilizados (F y R3)

ATGTGCAAGCGCGATTTCTACGAAGTGCTCGGGGTATCCAAGGATGCCGACGAACG**CGAGATCAAGAA**  
**GGCGTACAAG**CGTCTGGCCATGAAGTATCACCCCTGACCGCAACCAGGGCGATGCCGGGGCCGAAGAGA  
AGTTCAAAGAGGTCAAGGAAGCCTACGAGATCCTGACCGATGCCAATCTGCGTGCCCGCTATGACCAG  
TACGGTACGCTGGCGTGGATCAGAGCCAGGGTGGCGGTGGCCACGGCGGCTTTGGCGGGCGGCGCCGA  
TTTTGGCGACATCTTCGGCGACGTGTTTGGCGATATTTTTGGTGGCAGCCGTGGCGGGCGCCGTCGTG  
GCCCTGCCCCTGGCTCCGACCTGCGCTACCCATGGAGCTGACGCTGGAAGAGGCGGTACGCGGGGT  
TCCAAGGAGATCAAGGTGCCGACCCCTGGTCCACTGTGAAGTCTGTAACGGCTCCGGTGCCACACCGG  
CAGCTCGGCCAGACCTGCCCAGCTGCCACGGCTCCGGCCAGGTGCAGATGCGTCAGGGCTTCTTCG  
CGGTGCAGCAGGCCTGTCTCACTGTACGGTCCGCGCAAGATCATCAAGGATCCGTGCCGCAAGTGC  
CATGGCGAGGGTTCGCTACCAGAAAACCAAGACCCTGTCCGGTCAAGATCCCGGTGGCGTCGACACCGG  
CGATCGGATCCGTCTCTCCGGCGAAGGGGAAGCGGGGAAGCCGGCGCACCGGCGGGCGATCTGTACG  
TACAGGTGCACGTCAAGGAGCACGAAATCTTCGTGCGTGACGGCAACAACCTCTACTGCGAAGTGCC  
ATCAGCTTTACCGCGCAGCCCTGGGTGGCGAGATCGAAGTGCCGACCCCTGGATGGCCGGGTCAAGCT  
CAAGGTCACTCCGGAGACCCAGACCCGGCAAGATGTTCCGCATGCGGGGCAAGGGCGTGAAGTCCGTG  
**GCTCCGGCCAGGTGGGGGATCTGATGTGCAAGGTGGTG**GTGGAGACCCCGGTCAAGCTGACCGAGTCC  
CAGAAAAGAGCTGCTGCGCCAGCTGGACGAGTCTTCAGCGGCGCCGCCCAAGACCCACAAGCCGAA  
ATCGGAAGGCTTCTTCGAAGGGGTGAAACGCTTCTTCGACGATCTGACCAGCTGA

- *gyrB*

Este gen tiene una longitud de 2412 pb. En la PCR, dependiendo de la combinación de cebadores utilizados, se obtuvieron amplicones de entre 1124 y 1184.

Subrayado en negro se destacan los cebadores utilizados y en negrita el fragmento amplificado utilizando los cebadores 3F y 14R.

ATGAGTGAAAATACTTACGACTCCTCGAATATCAAGGTACTGAAGGGCCTGGATGCGGTCCGCAAGCG  
CCCGGGGATGTATATCGGCGATACGGATGATGGCTCGGGTCTGCACCACATGGTGTTCGAGGTCTGCG  
ACAACCTCCATTGACGAGGCTCTGGCCGGCTACTGCTCCGATATTCAGGTCAAGATCCATTCCGACGGT  
TCCGTCTCCGTCCGTGACAACGGTCTGGTATTCCTGTGACATCCACCCGGAAGAGGGTTCGCTCCGC  
TGCCGAAGTCATCATGACCGTGTGACGCGGGCGGCAAGTTCGACGACAACCTCTACAAGGTC**TCCG**

**CGGGCTGCACGGT**GTCCGGCTCTCCGTGGTAAACGCCCTCTCTGACAAGCTGCTGCTGACCATCCGT  
 CGCAACGGCCATGTCTACGAGCAGACCTATCACCTGGGTGAGCCGAGGCACCGCTCAAGCAGATTGG  
 CGACAGCACCGGCACCGGGACCGAAGTCCGCTTCTGGCCGAGCCCGACCATCTTCAGCGATACCCTGT  
 TCCACTACGAGATCCTGGCCAAGCGTCTGCGCGAGCTCTCCTTCCCTCAACTCCGGCGTCTCCATCCGC  
 CTGCTGGATGAGCGTGACGGCCGCGAGGCGCACTTCTGCTACGAAGGCGGCATCAAGGCGTTCGTGGA  
 ATACCTGAACCAGAACAAGACCCCGATCCACCCGAAGGTGTTCCACTTCACCACCGAGCAGGATGGCA  
 TCGGTGTGGAAGTAGCGATGCAGTGAACGACGCCTATCAGGAAGGGTCTACTGCTTCACCAACAAC  
 ATTCCGACGCGGATGGTGGTACCCACCTGGTGGGCTTCCGTACCGCGCTGACCCGTACTCTGAACTC  
 CTACATGGACAAAGAGGACTACAGCAAGAAGGCCAAGTCTGCCGCCAGTGGCGACGACGTGCGTGAAG  
 GTCTGATTGCCGTTATCTCCGTCAAGGTACCGGATCCCAAGTTCCTCCAGACCAAGGACAAGCTG  
 GTCTCTTCCGAAGTGAAGACCGCCGTGGAACAGGCGATGGGTGAGAAGCTGGCCGACTTCTGCTGGA  
 AAACCCGGGCGACGCCAAGATCGTGGTCAACAAGATCATCGATGCGGCCCGTGCCCGGAAGCGGCC  
 GCAAGGCCCGGCAACTGACCCGCCGCAAAGGCGCGCTGGATATCGCCGGTCTGCCCGGAAGCTGGCC  
 GACTGTGAGGAAAAGACCCGGCGCTCTCCGAATCTACATAGTGAAGGGGACTCTGCTGGCGGTTTC  
 CGCCAAGCAGGGTGCACACCGGAAGAACCAGGCCATCTGCCGCTCAAGGGCAAGATCCTGAACGTGG  
 AGAAGGCCCGTTTCGACAAGATGATCTCTTCCAGGAGGTGGGCACCCGTGATCACCGCACTGGGCTGC  
**GGCATCGGTGCTGACGAGTACAACCCGGACA**AGTGTGCGTTATCACAAACATCATCATGACCGATGC  
 GGACGTCGATGGTGCACACATTCTGACCTGCTGCTGACCTTCTTCTATCGTCAGATGCCGGAATCA  
 TCGAACGTGGCTACGTCTACATCGCCAGCCGCGCTCTACAAGGTGAAGAAGGGCAAGCAGGAGCAG  
 TATCTGAAAGACGAAGATGCGCTGCTGCAGTACCAGACCGCCATGGCGCTGGACGGTGCACCCGTGA  
 CGTCAACGAGTCTGCCCCGGCCATCGGTGGCGAGGCGCTGGAGCGTCTGGTCAACCAGCATCGCTCGG  
 TGTCTACCTGATCACCCGCATGTCTCGCCGCGGCCAGAAGCCGTGCTGACCCAGCTGATCTATCAG  
 CCGGAGCTGAACGAAGCGCTGCTGAGCAGCGAGAGCGATCTGCTGGCCTGGTGCCAGAGCATGGAAGC  
 CGTGCTCAACGAGAGCAACCATGGCATCCAGTACCAGATGCAGGTTGCGCCACGACGAAGAGCGCCGTC  
 TGTTGCTGCCGACGCCGTGGTACGCCAGCACGGGTCGACCGGAATACCCGCTCAGCTACGACTTC  
 CTGCAATCCTCCGAGTACCGTCAACTGGTCTCGCTGGGCAAGGAGATCGCCAACCTGATCGAGGAAGG  
 TGTTTACATCAAGCGTGGCGAGAAGGTGAAGCCGGTTCGCCAGCTTCGTGCAAGCGGTCGAGTGGCTGA  
 TGGGCGAAGGCAAGCGCGGCATCTACATCCAGCGCTATAAAGGGCTGGGCGAGATGAACCCGGACCAG  
 CTGTGGGAAACCACCATGGATCCTGAAGCCGTCGCATGCTGCGCGTCACCATCGACGATGCCGTCGG  
 TGCCGACCAGCTCTTCTCCACCCTGATGGGTGATGCGGTTGAGCCACGCCGTGACTTCATCGAGACCA  
 ACGCCCTGCGCGTTGCCAACCTCGACGCTAA

Subrayado en negro se destacan los cebadores utilizados y en negrita el fragmento amplificado utilizando los cebadores UP-1S y 14R.

ATGAGTGAAAATACTTACGACTCCTCGAATATCAAGGTACTGAAGGGCCTGGATGCGGTCCGCAAGCG  
 CCCGGGGATGTATATCGGCGATACGGATGATGGCTCGGGTCTGCACCACATGGTGTTCGAGGTCGTGCG  
 ACAACTCCATTGACGAGGCTCTGGCCGGCTACTGCTCCGATATTCAGGTCAAGATCCATTCCGACGGT  
 TCCGTCTCCGTCCGTGACAACGGTCTGTGGTATTCCTGTGACATCCACCCGGAAGAGGGTCCGTCCGC  
 TGCC**GAAGTCATCATGACCGTCTGCA**CGCGGGCGGCAAGTTCGACGACAACCTCTACAAGGTCTCCG  
**GCGGCCTGCACGGTGTGCGGCTCTCCGTGGTAAACGCCCTCTCTGACAAGCTGCTGCTGACCATCCGT**  
**CGCAACGGCCATGTCTACGAGCAGACCTATCACCTGGGTGAGCCGAGGCACCGCTCAAGCAGATTGG**  
**CGACAGCACCGGCACCGGGACCGAAGTCCGCTTCTGGCCGAGCCCGACCATCTTCAGCGATACCCTGT**  
**TCCACTACGAGATCCTGGCCAAGCGTCTGCGCGAGCTCTCCTTCCCTCAACTCCGGCGTCTCCATCCGC**  
**CTGCTGGATGAGCGTGACGGCCGCGAGGCGCACTTCTGCTACGAAGGCGGCATCAAGGCGTTCGTGGA**  
**ATACCTGAACCAGAACAAGACCCCGATCCACCCGAAGGTGTTCCACTTCACCACCGAGCAGGATGGCA**  
**TCCGTGTGGAAGTAGCGATGCAGTGAACGACGCCTATCAGGAAGGGTCTACTGCTTCACCAACAAC**  
**ATTCCGACGCGGATGGTGGTACCCACCTGGTGGGCTTCCGTACCGCGCTGACCCGTACTCTGAACTC**  
**CTACATGGACAAAGAGGACTACAGCAAGAAGGCCAAGTCTGCCGCCAGTGGCGACGACGTGCGTGAAG**  
**GTCTGATTGCCGTTATCTCCGTCAAGGTACCGGATCCCAAGTTCCTCCAGACCAAGGACAAGCTG**  
**GTCTCTTCCGAAGTGAAGACCGCCGTGGAACAGGCGATGGGTGAGAAGCTGGCCGACTTCTGCTGGA**  
**AAACCCGGGCGACGCCAAGATCGTGGTCAACAAGATCATCGATGCGGCCCGTGCCCGGAAGCGGCC**  
**GCAAGGCCCGGCAACTGACCCGCCGCAAAGGCGCGCTGGATATCGCCGGTCTGCCCGGAAGCTGGCC**

**GA**CTGT**CAGG**AAAAAGACCCGGCGCTCTCCGA**ACTTACATAGT**GGAAGGGGACTCTGCTGGCGGTTCCGCAAGCAGGGT**CGCA**ACC**GAAGA**ACCAGGCCATCTG**CCGCTCA**AGGGCAAGATCCTGAACGTGGAGAAGGCCCGTTT**CGACA**AGATGATCTCTTCCAGGAGGTGGGCACCCTGATCACC**GCAC**TGGGCTGCGGCATCGGT**CTAC**CAACCCGGACAA**GCT**GCGTTATCACAACATCATCATCATGACCGATGCGACGTGATGGTGCGCACATTCGTACCCTGCTGCTGACCTTCTTCTATCGTCAGATGCCGGAAATCATCGAACGTGGCTACGTCTACATCGCCAGCCGCGCTCTACAAGGTGAAGAAGGGCAAGCAGGAGCAGTATCTGAAAGACGAAGATGCGCTGCTGCAGTACCAGACCGCCATGGCGCTGGACGGTGCACCC**TGCA**CGTCAACGAGTCTGCCCCGGCCATCGGTGGCGAGGCGCTGGAGCGTCTGGTCAACCAGCATCGCTCGGTGTCTCACCTGATCACCCGCATGTCTCGCCGCGCCAGAAAGCCGTGCTGACCCAGCTGATCTATCAGCCGGAGCTGAACGAAGCGCTGCTGAGCAGCGAGAGCGATCTGCTGGCCTGGTGCCAGAGCATGGAAGCCGTGCTCAACGAGAGCAACCATGGCATCCAGTACCAGATGCAGGTTCGCCACGACGAAGAGCGCCGCTCTGTTTCGTGCCGCACGCCGTGGTACGCCAGCACGGGGTCGACC**CGA**ATACCCGCTCAGCTACGACTTCTGCAATCCTCCGAGTACCGTCAACTGGTCTCGCTGGGCAAGGAGATCGCAACCTGATCGAGGAAGTGGTTACATCAAGCGTGGCGAGAAGGTGAAGCCGGTCCAGCTTCGT**CGA**AGCGGTCGAGTGGCTGATGGGCGAAGGCAAGCGCGCATCTACATCCAGCGCTATAAAGGGCTGGGCGAGATGAACCCGGACCAGCTGTGGGAAACCACCATGGATCCTGAAGCCGTCGCATGCTGCGCGTCACCATCGACGATGCCGTGCGGTGCCAGCAGCTCTTCTCCACCCTGATGGGTGATGCCGTTGAGCCAGCCGTGACTT**CA**TCGAGACCAACGCCCTGCGCGTTGCCAACCTCGACGTCTAA

- *rpoD*

En negrita se muestra el fragmento amplificado y subrayado en negro los cebadores utilizados (70Fs y 70Rs)

ATGGAGCAAACCCCGCAGTCTCAGCTTAAACTCCTCGTTGCCAAAGGTAAAGAACAGGGCTACCTGACCTATGCCGAGGTGAACGATCACCTCCCGCAAGACATTGTCGACTCTGACCAGATCGAAGACATCATCCAGATGATCAACGACATGGGCATTCAAGTGGTGGAAAACGCCCCGGATGCCGATGACCTTATCATGGCTGAAGGTGGTACCGCGATGAGGACGCTGCCGAAGCAGCGGCCAGGCACTGGCATCTGTTGAATCCGAGATTGGT**CGTACG**ACC**GATCCCGTCCGCATGTA**CATGCGGGAAATGGGTACC**GT**CGA**ACTGTTGACT**CGCAAGGCCGAATCGACATCGCCAAGCGCATCGAAGACGGTATCAACCAGGTACAGAGTTCGGTCCGGAGTACCCCGAAGCGATTACCTATCTGCTTGAGCAATACGACAAATACGAAGCGGAACAGCTGCGTCTGTCCGACATCATTTCGGCTTCATCGATCCCAACGAGACCGACGACGTCGCACCGACCGCCACTCACA**T**CCGGCTCCGAGCTCAGCGAAGAAGATCTGGCTGACGAAGACGAAGACGAAGATGAAGACGAAGACGGTGATGGT**GAT**ACTCCGACGATGATGGTGACGGTGGTCCGGACCCGGAA**GT**CGCTCGCGAGAAGTTCGGTGATCTGCGCGCC**AGT**ACGAAGTAACTCGTCTCTCCATTCAGCAGAA**TGGT**CGTGCGCACGAAGATCTCAGGCTGCGATTGCCAGCTGGCCGATGATTC**CGT**CAATTC**CGC**CTGATGCCAAGCAGTTCGATCGCCTGGTCAACAACATGCGCGAGATGATGGAGCGAGTCCGCGTGCAGGAACGCATCATCATGAACTCTGCGTTGAGCAGGCCAAGATGCCGAAGAAGACCTTCGTCGCGGCC**TT**CACCAACAACGAGTGC**GAAA**CTGCCTGGTTCGAGTACCAGAAGCAGGCCGGCAAGGCC**TGGT**CACC**CGT**CTGGT**CG**AGATGGACGAAGATGTGCTGCGCGCCATCGGCAAGCTTCAGCAGATCGAGGAAGAGACCGGTCTGTCCATCGCCAGATCAAGGACATCAACCGT**CG**CATGAGCATCGGTGAGGCCAAGGCCCGCGCC**AA**GAAGAGATGGT**CG**AGGCC**AA**CC**TGCGTCTGGTTATCTCCAT**CGCCAAGAAGTACACCAACCGTGGTCTGCAGTTCCTGGATCTGATCCAGGAGGGCAACATCGGTCTGATGAAGCGGTAGACAAGTTTGAATACCGTCTGGCTACAA**GTT**CTCGACCTATGCGACCTGGTGGATCCGTCAGGCCATTACCCGCTCCATCGCGGATCAGGCCCGAACATCCGTATCCCGGTACACATGATCGAGACCATCAACAAGCTCAACCGTATCTCCCGTCAGATGCTGCAGGAGATGGGTGTAACCGAACC**CG**GAAGAGCTGGCCATGCGCATGGGCATGCCGGAAGACAAGATCCGTAAGGTATTGAAGATCGCCAAAGAGCCATATCCATGGAGACGCCATCGGTGATGATGAAGATCCC**ACT**TGGGTGACTT**CA**TCGAAGATACCACCCTGGCTCTGCCAGCGGATGCTGCCACTAGCGAGAGCCTGCGCAACGCCACCCCGAAGT**GCT**GGCCGGCTGACC**CGCC**CGAGGCCAAGGTACTGCGCATGCGCTTTCGGTATCGACATGAACACTGACCACACCC**TC**GAGGAAGTGGGCAAGCAGTTCGACGTTACCCG**TG**AGCGTATTCTGTCAGATCGAAGCCAAGCGCTGCGCAAGCTGCGCCACCCGAGCCGCTCCGAAGTACTGCGAGTTTCTGGACGAGTAA

El gen que codifica para el factor sigma 70 de la RNA polimerasa tiene una longitud de 1857 pb, de los cuales se han amplificado fragmentos de entre 902 y 1160 pb.

En negrita se muestra el fragmento amplificado y subrayado en negro los cebadores utilizados (Fa y Ra)

ATGGAGCAAACCCCGCAGTCTCAGCTTAAACTCCTCGTTGCCAAAGGTAAAGAACAGGGCTACCTGAC  
 CTATGCCGAGGTGAACGATCACCTCCCGCAAGACATTGTCGACTCTGACCAGATCGAAGACATCAT**CC**  
**AGATGATCAACGACATGGGCATTCAAGTGGTGGAAAACGCCCGGATGCCGATGACCTTATCATGGCT**  
**GAAGGTGGTACC**CGGATGAGGACGCTGCCGAAGCAGCGGCCAGGCCTGGCATCTGTTGAATCCGA  
 GATTGGTTCGTACGACCGATCCCGTCCGCATGTACATGCGGAAATGGGTACCGTTCGAACGTGTTGACTC  
 GCGAAGGCGAAATCGACATCGCCAAGCGCATCGAAGACGGTATCAACCAGGTACAGAGTTCCGTCGCC  
 GAGTACCCGGAAGCGATTACCTATCTGCTTGAGCAATACGACAAATACGAAGCGGAACAGCTGCGTCT  
 GTCCGACATCATTTCCGGCTTCATCGATCCCAACGAGACCGACGACGTCGCACCGACCGCCACTCACA  
 TCGGCTCCGAGCTCAGCGAAGAAGATCTGGCTGACGAAGACGAAGACGAAGATGAAGACGAAGACGGT  
 GATGGTGATGACTCCGACGATGATGGTGACGGTGGTCCGGACCCGGAAGTCGCTCGCGAGAAGTTCGG  
 TGATCTGCGCGCCCAGTACGAAGTAACTCGTCTCTCCATTACGACAGAAATGGTTCGTGCGCACGAAGATA  
 CTCAGGCTGCGATTGCCAGCTGGCCGATGATTCGGTCAATTCGGCTGATGCCAAGCAGTTTCGAT  
 CGCCTGGTCAACAACATGCGCGAGATGATGGAGCGAGTCCGCGTGCAGGAACGCATCATCATGAACT  
 CTGCGTTGAGCAGGCCAAGATGCCGAAGAAGACCTTCGTCGCGGCCCTCACCAACAACGAGTGCAGAA  
 CTGCCTGGTTCGAGTACCAGAAGCAGGCCGGCAAGGCCTGGTCACCGCGTCTGGTCGAGATGGACGAA  
 GATGTGCTGCGCGCCATCGGCAAGCTTCAGCAGATCGAGGAAGAGACCGGTCTGTCCATCGCCCAGAT  
 CAAGGACATCAACCGTTCGCATGAGCATCGGTGAGGCCAAGGCCCGCCGCGCCAAGAAAGAGATGGTTCG  
 AGGCCAACCTGCGTCTGGTTATCTCCATCGCCAAGAAGTACACCAACCGTGGTCTGCAGTTCCGAT  
 CTGATCCAGGAGGGCAACATCGGTCTGATGAAGGCGGTAGACAAGTTTGA**ATAACCGTTCGTGGCTACAA**  
**GT**TCTCGACCTATGCGACCTGGTGGATCCGTCAGGCCATTACCCGCTCCATCGCGGATCAGGCCCGAA  
 CCATCCGTATCCCGGTACACATGATCGAGACCATCAACAAGCTCAACCGTATCTCCCGTCAGATGCTG  
 CAGGAGATGGGTTCGTGAACCGAACCCGGAAGAGCTGGCCATGCGCATGGGCATGCCGGAAGACAAGAT  
 CCGTAAGGTATTGAAGATCGCCAAAGAGCCATATCCATGGAGACGCCATCGGTGATGATGAAGATT  
 CCCACTTGGGTGACTTCATCGAAGATACCACCTGGCTCTGCCAGCGGATGCTGCCACTAGCGAGAGC  
 CTGCGCAACGCCACCCGGAAGTGTGGCCGGCTGACCGCCCGGAGGCCAAGGTACTGCGCATGCC  
 CTTCCGGTATCGACATGAACACTGACCACACCTTCGAGGAAGTGGGCAAGCAGTTTCGACGTTACCCGTG  
 AGCGTATTCGTGAGATCGAAGCCAAGGCCTGCGCAAGCTGCGCCACCCGAGCCGCTCCGAAGTACTG  
 CGCAGTTTCTGGACGAGTAA

## 8.5 Concentración de los antibióticos y diámetro (mm) de la zona de inhibición

Antibiótico	Dosis	Resistente	Intermedio	Sensible
Amikacina (AN30)	30 µg	≤15	15–16	≥17
Amoxicilina–Clavulánico (AMC30)	30 µg	≤14	14–17	≥18
Ampicilina (AM10)	10 µg	≤14	14–16	≥17
Amikacina (AN30)	30 µg	≤15	15–16	≥17
Aztreonam (ATM30)	30 µg	≤16	16–21	≥22
Cefalotina (CF30)	30 µg	≤15	15–17	≥18
Cefoxitina (FOX30)	30 µg	≤15	15–17	≥18
Ceftriaxona (CRO30)	30 µg	≤14	14–20	≥21
Ciprofloxacino (CIP5)	5 µg	≤16	16–20	≥21
Cloranfenicol (C30)	30 µg	≤13	13–17	≥18
Colistina (CL50)	50 µg	<15	–	>15
Eritromicina (E15)	15 µg	≤14	14–24	≥25
Estreptomicina (S10)	10 µg	≤12	12–14	≥15
Fosfomicina (FFL 50)	50 µg	≤13	13–15	≥16
Gentamicina (GM10)	10 µg	≤13	13–15	≥16
Imipenem (IMP10)	10 µg	≤14	14–15	≥16
Tetraciclina (TE30)	30 µg	≤15	15–18	≥19
Ticarcilina (TIC75)	75 µg	≤15	15–19	≥20
Tobramicina (NN10)	10 µg	≤13	13–14	≥15
Trimetoprim–Sulfametoxazol (STX)	1,25 µg – 23,75 µg	≤11	11–15	≥16

Todos los antibióticos han sido fabricados por Biomérieux.

## 8.6 Número de acceso al GenBank de las secuencias obtenidas

<i>A. bestiarum</i>	<i>cpn60</i>	<i>dnaJ</i>	<i>gyrB</i>	<i>rpoD</i>
CECT 4227 <sup>T</sup>	EU306796	JN215529	JN711732	JN215536
112A	EU741625	JN711611	JN711733	JN712315
555A	JN711508	JN711612	JN711734	JN712316
556A	JN711509	JN711613	JN711735	JN712317
559A	JN711510	JN711614	JN711736	JN712318
624A	JN711511	JN711615	JN711737	JN712319
628A	EU306797	JN711616	JN711738	JN712320
AE092	JN711512	JN711617	JN711739	JN712321
AE145	JN711513	JN711618	JN711740	JN712322
AE147	JN711514	JN711619	JN711741	JN712323
AE163	JN711515	JN711620	JN711742	JN712324
AE203	JN711516	JN711621	JN711743	JN712325
AE238	JN711517	JN711622	JN711744	JN712326
AE258	JN711518	JN711623	JN711745	JN712327
CECT 5212	JN711519	JN711624	JN711746	JN712328
CECT 5217	JN711520	JN711625	JN711747	JN712329
CECT 5226	JN711521	JN711626	JN711748	JN712330
CECT 5741	JN711522	JN711627	JN711749	JN712331
CECT 5742	JN711523	JN711628	JN711750	JN712332
CECT 7451	JN711524	JN711629	JN711751	JN712333
HE22	JN711525	JN711630	JN711752	JN712334
HE73	JN711526	JN711631	JN711753	JN712335
LMG 13445	JN711527	JN711632	JN711754	JN712336
LMG 13448	JN711528	JN711633	JN711755	JN712337
LMG 13662	JN711529	JN711634	JN711756	JN712338
LMG 13663	JN711530	JN711635	JN711757	JN712339
LMG 13664	JN711531	JN711636	JN711758	JN712340
LMG 13665	JN711532	JN711637	JN711759	JN712341
LMG 13666	JN711533	JN711638	JN711760	JN712342
LMG 13667	JN711534	JN711639	JN711761	JN712343
LMG 13673	JN711535	JN711640	JN711762	JN712344
LMG 14043	JN711536	JN711641	JN711763	JN712345
LMG 14045	JN711537	JN711642	JN711764	JN712346
<i>A. hydrophila</i>	<i>cpn60</i>	<i>dnaJ</i>	<i>gyrB</i>	<i>rpoD</i>
CECT 839 <sup>T</sup>	EU306804	JN215531	JN711776	JN215537
1054148	JN711545	JN711653	JN711777	JN712357
1073633	JN711546	JN711654	JN711778	JN712358
1074611	JN711547	JN711655	JN711779	JN712359
AE053	JN711548	JN711656	JN711780	JN712360
AE150	JN711549	JN711657	JN711781	JN712361
AE154	JN711550	JN711658	JN711782	JN712362
AE180	JN711551	JN711659	JN711783	JN712363

<i>A. hydrophila</i>	<i>cpn60</i>	<i>dnaJ</i>	<i>gyrB</i>	<i>rpoD</i>
AE210	JN711552	JN711660	JN711784	JN712364
AE215	JN711553	JN711661	JN711785	JN712365
AE216	JN711554	JN711662	JN711786	JN712366
CECT 4330	JN711555	JN711663	JN711787	JN712367
CECT 5174	JN711556	JN711664	JN711788	JN712368
CECT 5216	JN711557	JN711665	JN711789	JN712369
CECT 5233	JN711558	JN711666	JN711790	JN712370
CECT 5236	EU741635	JN711667	JN711791	JN712371
CECT 5734	JN711559	JN711668	JN711792	JN712372
CECT 5738	JN711560	JN711669	JN711793	JN712373
JCM 3967	JN711561	JN711670	JN711794	JN712374
JCM 3968	JN711562	JN711671	JN711795	JN712375
JCM 3976	JN711563	JN711672	JN711796	JN712376
JCM 3995	JN711564	JN711673	JN711797	JN712377
LMG 12665	JN711565	JN711674	JN711798	JN712378
LMG 13658	JN711566	JN711675	JN711799	JN712379
LMG 13660	JN711567	JN711676	JN711800	JN712380
LMG 18245	JN711568	JN711677	JN711801	JN712381
LMG 21080	JN711569	JN711678	JN711802	JN712382
LMG 21105	JN711570	JN711679	JN711803	JN712383
CIP 107985 <sup>T</sup>	EU306805	JN711680	JN711804	EF465509
<b><i>A. hydrophila</i> subsp. <i>dhakensis</i>/</b>				
<i>A. aquariorum</i>	<i>cpn60</i>	<i>dnaJ</i>	<i>gyrB</i>	<i>rpoD</i>
CECT 5744 <sup>T</sup>	EU306806	JN215530	JN711805	EF465510
LMG 3769	JN711571	JN711681	JN711806	JN712384
LMG 3770	JN711572	JN711682	JN711807	JN712385
LMG 19558	EU741636	JN711683	JN711808	JN712386
LMG 19559	JN711573	JN711684	JN711809	JN712387
LMG 19560	JN711574	JN711685	JN711810	JN712388
LMG 19561	JN711575	JN711686	JN711811	JN712389
LMG 19564	JN711576	JN711687	JN711812	JN712390
LMG 19565	JN711577	JN711688	JN711813	JN712391
LMG 19566	JN711578	JN711689	JN711814	JN712392
LMG 19567	JN711579	JN711690	JN711815	JN712393
MDC47 <sup>T</sup>	FJ936120	FJ936122	JN711816	FJ936132
MDC310	JN711580	JN711691	JN711817	JN712394
MDC317	JN711581	JN711692	JN711818	JN712395
MDC573	JN711582	JN711693	JN711819	JN712396
<i>A. piscicola</i>	<i>cpn60</i>	<i>dnaJ</i>	<i>gyrB</i>	<i>rpoD</i>
S1.2 <sup>T</sup>	GU062399	JN215532	JN711765	JN215538
R4	JN711538	JN711643	JN711766	JN712347
R9	JN711539	JN711644	JN711767	JN712348
R94	JN711540	JN711645	JN711768	JN712349



<i>A. popoffii</i>	<i>cpn60</i>	<i>dnaJ</i>	<i>gyrB</i>	<i>rpoD</i>
LMG 17541 <sup>T</sup>	EU306814	JN711646	JN711769	JN712350
LMG 17542	EU306815	JN711647	JN711770	JN712351
LMG 17543	EU306816	JN711648	JN711771	JN712352
LMG 17544	JN711541	JN711649	JN711772	JN712353
LMG 17545	JN711542	JN711650	JN711773	JN712354
LMG 17546	JN711543	JN711651	JN711774	JN712355
LMG 17547	JN711544	JN711652	JN711775	JN712356
<i>A. salmonicida</i>	<i>cpn60</i>	<i>dnaJ</i>	<i>gyrB</i>	<i>rpoD</i>
CECT 894 <sup>T</sup>	EU306828	JN215534	JN711820	JN215541
045C	JN711583	JN711694	JN711821	JN712397
051C	JN711584	JN711695	JN711822	JN712398
083C	EU306817	JN711696	JN711823	JN712399
086C	JN711585	JN711697	JN711824	JN712400
087M	EU306818	JN711698	JN711825	JN712401
089C	JN711586	JN711699	JN711826	JN712402
092M	JN711587	JN711700	JN711827	JN712403
278T	JN711588	JN711701	JN711828	JN712404
621A	EU306819	JN711702	JN711829	JN712405
635A	EU306820	JN711703	JN711830	JN712406
818E	EU306822	JN711704	JN711831	JN712407
852T	JN711589	JN711705	JN711832	JN712408
856T	EU306823	JN711706	JN711833	JN712409
1062548	JN711590	JN711707	JN711834	JN712410
A449	JN711591	JN711708	JN711835	JN712411
AE169	JN711592	JN711709	JN711836	JN712412
CECT 5173	EU741642	JN711710	JN711837	JN712413
CECT 5201	JN711593	JN711711	JN711838	JN712414
CECT 5205	JN711594	JN711712	JN711839	JN712415
CECT 5206	JN711595	JN711713	JN711840	JN712416
CECT 5209	JN711596	JN711714	JN711841	JN712417
CECT 5211	JN711597	JN711715	JN711842	JN712418
CECT 5214	JN711598	JN711716	JN711843	JN712419
CECT 5215	JN711599	JN711717	JN711844	JN712420
CECT 5219	JN711600	JN711718	JN711845	JN712421
CECT 5220	JN711601	JN711719	JN711846	JN712422
CECT 5222	JN711602	JN711720	JN711847	JN712423
CECT 5223	JN711603	JN711721	JN711848	JN712424
CECT 5230	JN711604	JN711722	JN711849	JN712425
CECT 5239	JN711605	JN711723	JN711850	JN712426
CECT 5242	JN711606	JN711724	JN711851	JN712427
CECT 5247	JN711607	JN711725	JN711852	JN712428
CECT 7453	JN711608	JN711726	JN711853	JN712429
CIP 57.50	FJ936135	FJ936136	FJ936137	FJ936138
LMG 3756	JN711609	JN711727	JN711854	JN712430

<i>A. salmonicida</i>	<i>cpn60</i>	<i>dnaJ</i>	<i>gyrB</i>	<i>rpoD</i>
S09-32	JN711610	JN711728	JN711855	JN712431
LMG 14900 <sup>T</sup>	EU306824	JN711729	JN711856	JN215539
CIP 103210 <sup>T</sup>	EU306826	JN711730	JN711857	JN712432
CIP 107036 <sup>T</sup>	EU306827	JN215533	JN215535	JN215540
CIP 104757 <sup>T</sup>	EU306829	JN711731	JN711858	JN712433

## Cepa tipo del resto de especies del género

<i>Aeromonas</i>	<i>cpn60</i>	<i>dnaJ</i>	<i>gyrB</i>	<i>rpoD</i>
<i>Aeromonas</i> sp. HG11	EU306802	HQ443028	AJ964951	AY169343
<i>A. allosaccharophila</i> CECT 4199 <sup>T</sup>	EU306795	AB280553	AJ868385	AY169348
<i>A. bivalvium</i> 868E <sup>T</sup>	EU306799	FJ936124	EF465525	EF465512
<i>A. caviae</i> CECT 838 <sup>T</sup>	EU306800	AB280555	AJ868400	AY169337
<i>A. culicicola</i> CIP 107763 <sup>R</sup>	EU306840	AB280556	AJ868386	DQ411505
<i>A. diversa</i> CECT 4254 <sup>T</sup>	EU306835	FJ936129	GU062400	AY169345
<i>A. encheleia</i> CECT 4342 <sup>T</sup>	EU306801	AB280557	AJ868375	AY169346
<i>A. enteropelogenes</i> CECT 4487 <sup>R</sup>	EU306837	AB280558	EF465526	EF465508
<i>A. eucrenophila</i> CECT 4224 <sup>T</sup>	EU306803	AB280559	AJ868378	AY169339
<i>A. fluvialis</i> 717 <sup>T</sup>	GU062398	FJ603454	FJ603455	FJ603453
<i>A. hydrophila</i> subsp. <i>anaerogenes</i> CECT 4221 <sup>R</sup>	JN215525	FJ999991	AM262164	AY185587
<i>A. ichthiosmia</i> CECT 4486 <sup>R</sup>	EU306841	AB280563	EF465527	AY169342
<i>A. jandaei</i> CECT 4228 <sup>T</sup>	EU306807	AB280564	AJ868391	AY169341
<i>A. media</i> CECT 4232 <sup>T</sup>	EU306808	AB280565	AF417627	AY169338
<i>A. molluscorum</i> 848T <sup>T</sup>	EU306811	AB280566	EF465521	EF465515
<i>A. rivuli</i> CECT 7518 <sup>T</sup>	JN215526	FJ969432	FJ969434	FJ969433
<i>A. sanarellii</i> A2-67 <sup>T</sup>	JN215527	FJ807279	FJ807277	FJ472929
<i>A. schubertii</i> CIP 103437 <sup>T</sup>	EU306830	AB280574	AJ868402	AY169336
<i>A. simiae</i> CIP 107798 <sup>T</sup>	EU306833	AB280573	AJ632224	DQ411508
<i>A. sobria</i> CECT 4245 <sup>T</sup>	EU306834	AB280575	AF417631	AY169340
<i>A. taiwanensis</i> A2-50 <sup>T</sup>	JN215528	FJ807270	FJ807272	FJ472928
<i>A. tecta</i> MDC 91 <sup>T</sup>	FJ936121	FJ936130	AJ964952	FJ936133
<i>A. trota</i> CECT 4255 <sup>T</sup>	EU306836	AB280576	AJ868392	AY169344
<i>A. veronii</i> bv. <i>Sobria</i> CECT 4246 <sup>R</sup>	EU306838	AB280578	AY987514	AY169333
<i>A. veronii</i> bv. <i>Veronii</i> CECT 4257 <sup>T</sup>	EU306839	AB280577	AF417626	AY127862

## 8.7 Resultados de las actividades enzimáticas

	sorbitol (a)	lactato	$\beta$ -hemólisis	DNAasa	gelatinasa	elastasa	amilasa	caseinasa	lecitinasa
<b><i>A. bestiarum</i></b>									
CECT 4227 <sup>T</sup>	-	-	+	+	+	+	+	+	+
112A	-	-	+	+	+	+	+	+	+
555A	-	-	+	+	+	+	+	+	+
556A	-	-	+	+	+	-	+	+	-
559A	-	-	-	+	+	-	+	+	+
624A	+	-	+	+	+	+	+	+	+
628A	-	-	+	+	+	-	+	+	+
AE145	-	-	+	+	+	-	+	+	-
AE147	-	+	+	+	+	-	+	+	+
AE238	-	-	$\alpha$	+	+	+	+	+	-
CECT 5212	-	-	+	+	+	+	+	+	+
CECT 5217	-	-	+	-	-	+	+	+	+
CECT 5226	-	-	+	+	+	+	+	+	+
CECT 5741	-	-	+	+	+	-	+	+	-
CECT 5742	-	-	+	+	+	-	+	+	+
CECT 7451	-	-	+	+	+	+	+	+	+
HE73	-	-	+	+	+	+	+	+	+
LMG 13448	-	-	+	+	+	+	+	+	+
LMG 13662	-	-	+	+	+	+	+	+	+
LMG 13663	-	-	+	+	+	-	+	+	+
LMG 13664	-	-	+	+	+	-	+	+	+
LMG 13665	-	-	-	-	+	-	+	+	+
LMG 13666	-	-	+	+	+	+	+	+	+
LMG 13667	-	-	+	-	+	+	+	+	+
LMG 13673	-	-	+	+	+	+	+	+	+
LMG 14045	-	-	-	+	+	+	+	+	+
<b><i>A. hydrophila</i></b>									
CECT 839 <sup>T</sup>	-	+	+	+	+	+	+	+	+
1054148	-	+	+	+	+	+	+	+	+
1073633	-	+	+	+	+	-	+	+	+
1074611	-	+	+	+	+	+	+	+	+
AE053	-	+	+	+	+	+	+	+	+
AE150	-	+	-	+	+	-	+	+	+
AE154	-	+	+	+	+	+	+	+	+
AE180	-	-	+	+	+	+	+	+	+
AE210	-	+	-	+	+	+	+	+	+
AE215	-	+	-	-	-	-	-	-	-
AE216	-	+	-	-	-	-	-	-	-
CECT 4330	-	+	+	+	+	+	+	+	+
CECT 5174	-	+	+	+	+	+	+	+	+
CECT 5216	-	+	+	+	+	+	+	+	+
CECT 5233	-	+	+	+	+	+	+	+	+
CECT 5236	-	+	+	+	+	+	+	+	+
CECT 5734	-	+	+	+	+	+	+	+	+
CECT 5738	-	+	+	+	+	+	+	+	+
CIP 107985 <sup>T</sup>	-	+	+	+	+	+	+	+	+
JCM 3967	-	+	+	+	+	+	+	+	+
JCM 3968	-	+	+	+	+	+	+	+	+
JCM 3976	-	+	$\alpha$	+	+	+	+	+	+
JCM 3995	-	-	+	+	+	+	+	+	-

	sorbitol (a)	lactato (b)	$\beta$ -hemólisis	DNAasa	gelatinasa	elastasa	amilasa	caseinasa	lecitinasa
<b><i>A. hydrophila</i></b>									
LMG 12665	-	+	-	+	+	+	+	+	+
LMG 13658	-	+	+	+	+	+	+	+	+
LMG 13660	-	+	+	+	+	+	+	+	+
LMG 18245	-	+	-	+	+	+	+	+	-
LMG 21080	-	+	-	+	+	+	+	+	+
LMG 21105	-	+	-	+	+	+	+	+	+
<b><i>A. hydrophila</i> subsp. dhakensis</b>									
CECT 5744 <sup>T</sup>	-	+	+	+	+	+	+	+	+
LMG 3769	-	+	+	+	+	-	+	+	-
LMG 3770	-	+	+	+	+	+	+	+	+
LMG 19558	-	+	+	+	+	+	+	+	+
LMG 19559	-	+	+	+	+	+	+	+	+
LMG 19560	-	+	+	+	+	+	+	+	+
LMG 19561	-	+	+	+	+	+	+	+	+
LMG 19564	-	+	+	+	+	+	+	+	+
LMG 19565	-	+	+	+	+	+	+	+	+
LMG 19566	-	+	+	+	+	+	+	+	+
LMG 19567	-	+	+	+	+	+	+	+	+
MDC47 <sup>T</sup> (x2)	-	+	+	+	+	+	+	+	+
MDC310	-	+	+	+	+	+	+	+	+
MDC317	-	+	+	+	+	+	+	+	+
MDC573	-	+	+	+	+	+	+	+	+
<b><i>A. piscicola</i></b>									
S1.2T	-	-	+	+	+	+	+	+	+
AE092	-	-	+	+	+	+	+	+	+
AE163	+	-	+	+	+	+	+	+	+
AE203	-	-	+	+	+	+	+	+	+
AE258	+	-	-	+	+	+	+	+	+
HE22	+	-	+	-	+	-	+	+	+
LMG 13445	+	-	+	+	+	-	+	+	+
LMG 14043	+	-	+	+	+	-	+	+	+
R 4	-	-	+	+	+	-	+	+	+
R 9	-	-	+	+	+	-	+	+	-
R 94	-	-	+	+	+	+	+	+	+
<b><i>A. popoffii</i></b>									
LMG 17541	-	+	+	+	+	-	+	+	+
LMG 17542	-	+	+	+	+	-	+	+	+
LMG 17543	-	+	+	+	+	-	+	+	+
LMG 17545	-	+	+	+	+	-	+	+	+
LMG 17546	-	+	+	+	+	-	+	+	+
LMG 17547	-	+	+	+	+	-	+	+	+

(a) fermentación de sorbitol, (b) asimilación de lactato

<i>A. salmonicida</i>	sorbitol (a)	lactato (b)	$\beta$ -hemólisis	DNAasa	gelatinasa	elastasa	amilasa	caseinasa	lecitinasa
CECT 894T	-	-	+	+	+	+	+	+	+
045C	+	-	+	+	+	-	+	+	+
051C	+	-	+	+	+	+	+	+	+
083C	+	-	+	+	+	+	+	+	+
086C	+	-	+	+	+	+	+	+	+
087M	+	-	+	+	+	-	+	+	+
089C	+	-	+	+	+	+	+	+	+
092M	+	-	+	+	+	+	+	+	+
278A	+	-	+	+	+	+	+	+	+
621A	+	-	+	+	+	+	+	+	+
635A	+	-	+	+	+	+	+	+	+
818E	+	-	+	-	+	+	+	+	+
852T	+	-	+	+	+	+	+	+	+
856T	+	-	+	+	+	+	+	+	+
1062548	+	-	-	+	+	+	+	+	+
AE169	+	-	-	+	+	+	+	+	+
CECT 5173	+	-	+	+	+	+	+	+	+
CECT 5201	-	-	+	+	+	+	+	+	+
CECT 5205	+	-	+	+	+	+	+	+	+
CECT 5206	+	-	+	+	+	+	+	+	+
CECT 5209	+	-	$\alpha$	+	+	+	+	+	+
CECT 5211	+	-	+	+	+	+	+	+	+
CECT 5214	+	-	+	-	+	+	+	+	+
CECT 5215	+	-	+	+	+	+	+	+	+
CECT 5219	+	-	-	+	+	-	+	-	+
CECT 5220	+	-	+	+	+	+	+	+	+
CECT 5222	+	-	+	+	+	+	+	+	+
CECT 5223	+	-	+	+	+	+	+	+	+
CECT 5230	+	-	+	+	+	+	+	+	+
CECT 5239	-	-	+	+	+	+	+	+	+
CECT 5242	+	-	+	+	+	+	+	+	+
CECE 5247	+	-	-	-	+	-	+	+	+
CECT 5752T	+	-	+	+	+	+	+	+	+
CECT 7453	+	-	+	+	+	+	+	+	+
CIP 57.50	+	-	+	+	+	+	+	+	+
CECT 896T	+	-	-	+	+	-	+	-	+
CIP 104757T	-	-	+	+	+	-	+	+	-
LMG 3756	+	-	+	+	+	-	+	+	+
LMG 14900 <sup>T</sup>	-	-	-	+	-	-	-	-	-
S09-32	-	-	+	+	+	+	+	+	+

(a) fermentación de sorbitol, (b) asimilación de lactato

## 8.8 Resultados de los antibiogramas

<i>A. bestiarum</i>	Amikacina (AN30)	Amoxicilina-Clavulánico (AMC30)	Amoxicilina (AM10)	Aztreonam (ATM30)	Cefalotina (CF30)	Cefoxitina (FOX30)	Ceftriaxona (CRO30)	Ciprofloxacino (CIP5)	Cloranfenicol (C30)	Colistina (CL50)	Eritromicina (E15)	Estreptomina (S10)	Fosfomicina (FFL 50)	Gentamicina (GM10)	Imipenem (IMP10)	Tetraciclina (TE30)	Ticarcilina (TIC75)	Tobramicina (NN10)	TrimetoPrim-Sulfametoxazol (STX)
CECT 4227 <sup>T</sup>	S	I	R	S	I	S	S	S	S	R	I	R	S	S	R	S	I	I	S
112A	I	I	R	S	R	S	S	S	S	S	I	R	S	S	R	S	I	I	S
555A	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	I	I	S	S	S	S	S	S	S
556A	I	R	R	S	R	S	S	S	S	R	I	R	S	I	S	S	R	R	S
559A	S	I	R	S	I	S	S	S	S	S	I	R	S	S	S	S	I	S	S
624A	S	I	R	S	R	S	S	S	S	S	I	R	S	S	S	S	R	S	S
628A	S	I	R	S	R	I	S	S	S	S	I	I	S	S	S	S	R	S	S
AE145	I	S	R	S	I	S	S	S	S	S	R	R	S	S	S	S	S	I	S
AE147	S	I	R	S	I	S	S	S	S	S	R	R	S	S	S	S	I	I	S
AE238	S	R	R	S	R	S	S	S	S	S	I	R	S	S	S	S	I	S	S
CECT 5212	S	S	R	S	R	S	S	S	S	R	I	R	S	S	S	S	R	I	S
CECT 5217	S	R	R	S	R	S	S	S	S	R	I	R	S	R	S	S	I	I	S
CECT 5226	S	I	R	S	R	S	S	S	S	S	R	R	S	S	S	S	I	S	S
CECT 5741	S	S	R	S	R	S	S	S	S	S	I	R	S	S	S	S	I	S	S
CECT 5742	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	R	R	S	S	S	I	S	S	S
CECT 7451	I	S	R	S	R	S	S	S	S	S	I	R	S	I	S	S	S	I	R
HE73	I	I	R	S	R	S	S	S	S	R	R	R	S	I	S	S	S	I	S
LMG 13448	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	I	R	S	S	S	S	S	S	S
LMG 13662	S	I	R	S	I	S	S	S	S	R	R	I	S	S	S	S	I	S	S
LMG 13663	S	I	R	S	R	I	S	S	S	S	I	I	S	S	S	S	I	S	S
LMG 13664	S	S	R	S	R	R	S	S	S	R	R	R	S	S	S	S	I	S	S
LMG 13665	S	S	R	S	R	S	S	S	S	R	I	R	S	S	S	S	S	S	S
LMG 13666	S	S	R	S	I	S	S	S	S	S	I	I	S	S	S	S	S	S	S
LMG 13667	I	I	R	S	R	R	S	S	S	R	I	R	S	S	S	S	R	S	S
LMG 13673	I	S	R	S	R	S	S	S	S	S	R	R	S	S	S	R	S	S	S
LMG 14045	S	R	R	S	I	S	S	S	S	S	I	R	S	S	S	S	I	S	S

<i>A. hydrophila</i>	Amikacina (AN30)	Amoxicilina-Clavulánico (AMC30)	Amoxicilina (AM10)	Aztreonam (ATM30)	Cefalotina (CF30)	Cefoxitina (FOX30)	Ceftriaxona (CRO30)	Ciprofloxacino (CIP5)	Cloranfenicol (C30)	Colistina (CL50)	Eritromicina (E15)	Estreptomina (S10)	Fosfomicina (FFL 50)	Gentamicina (GM10)	Imipenem (IMP10)	Tetraciclina (TE30)	Ticarclina (TIC75)	Tobramicina (NN10)	TrimetoPrim-Sulfametoxazol (STX)
CECT 839 <sup>T</sup>	S	I	R	S	I	S	S	S	S	S	R	R	S	S	S	S	I	R	S
1054148	S	R	R	S	I	S	S	S	S	S	R	I	S	S	S	S	R	I	S
1073633	S	I	R	S	S	S	S	S	S	S	R	R	S	S	S	S	S	R	S
1074611	S	I	R	S	R	S	S	S	S	S	R	R	S	S	S	S	R	S	S
AE053	S	I	R	S	S	S	S	S	S	S	R	R	S	S	S	S	S	S	S
AE150	S	I	R	S	I	S	S	S	S	S	R	R	S	S	S	S	R	S	S
AE154	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	R	R	S	S	S	S	I	S	S
AE180	I	R	R	S	R	S	S	S	S	S	R	R	S	S	S	S	I	I	S
AE210	S	R	R	S	S	S	S	S	S	S	R	R	S	S	S	S	S	R	S
AE215	S	R	R	S	R	S	S	S	S	S	R	R	S	S	S	S	I	R	S
AE216	I	I	R	S	S	S	S	S	S	S	R	R	S	S	S	I	I	R	S
CECT 4330	S	I	R	S	S	S	S	S	S	S	R	I	S	S	S	S	I	S	S
CECT 5174	S	R	R	S	I	S	S	S	S	S	R	R	S	S	S	S	I	R	S
CECT 5216	S	I	R	S	S	S	S	S	S	I	R	R	S	S	S	S	S	S	S
CECT 5233	S	R	R	S	S	S	S	S	S	S	R	R	S	S	S	S	S	R	S
CECT 5236	S	R	R	S	R	S	S	S	S	R	R	S	S	S	S	S	R	S	S
CECT 5734	S	R	R	S	I	S	S	S	S	S	R	I	S	S	S	S	I	S	S
CECT 5738	S	R	R	S	I	S	S	S	S	R	R	S	S	S	S	S	R	S	S
CIP 107985 <sup>T</sup>	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	R
JCM 3967	S	R	R	S	S	S	S	S	S	S	R	R	S	S	S	S	R	I	S
JCM 3968	S	S	R	S	S	S	S	S	S	R	R	I	S	S	S	I	R	S	S
JCM 3976	S	R	R	S	I	S	S	S	S	S	R	I	S	S	S	S	R	S	S
JCM 3995	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	R	R	S	S	S	S	I	S	S
LMG 12665	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	R	R	S	S	S	S	S	I	S
LMG 13658	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	R	R	S	S	S	S	S	S	S
LMG 13660	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	R	R	S	S	R	S	R	R	S
LMG 18245	S	I	R	S	I	S	S	S	S	S	R	R	S	S	S	S	R	R	S
LMG 21080	R	I	R	S	R	S	I	S	S	S	I	R	S	R	S	S	R	R	S
LMG 21105	S	R	R	S	S	S	S	S	S	S	R	I	S	S	I	S	I	S	S

<i>A. hydrophila</i> subsp. <i>dhakensis</i>	Amikacina (AN30)	Amoxicilina-Clavulánico (AMC30)	Amoxicilina (AM10)	Aztreonam (ATM30)	Cefalotina (CF30)	Cefoxitina (FOX30)	Ceftriaxona (CRO30)	Ciprofloxacino (CIP5)	Cloranfenicol (C30)	Colistina (CL50)	Eritromicina (E15)	Estreptomina (S10)	Fosfomicina (FFL 50)	Gentamicina (GM10)	Imipenem (IMP10)	Tetraciclina (TE30)	Ticarcilina (TIC75)	Tobramicina (NN10)	TrimetoPrim-Sulfametoxazol (STX)
CECT 5744 <sup>T</sup>	I	I	R	S	I	R	S	S	S	S	R	R	S	S	S	S	I	S	S
LMG 3769	S	I	R	S	R	R	R	S	S	R	I	I	S	S	S	S	I	S	S
LMG 3770	S	R	R	S	R	R	I	S	S	R	R	I	S	S	I	S	R	S	S
LMG 19558	S	I	R	S	R	R	S	S	S	S	R	R	S	S	R	S	R	S	S
LMG 19559	S	R	R	S	R	R	S	S	I	S	R	R	S	S	R	R	S	S	R
LMG 19560	S	R	R	S	R	R	S	S	S	S	R	R	R	S	S	S	R	I	S
LMG 19561	S	R	R	S	R	R	I	I	R	R	R	R	S	S	R	R	R	S	R
LMG 19564	S	I	R	S	R	R	S	S	I	S	R	R	S	S	S	R	R	S	R
LMG 19565	I	R	R	S	I	R	S	S	S	S	R	R	S	S	S	S	R	I	S
LMG 19566	S	R	R	S	R	R	I	I	R	R	S	R	S	S	I	R	R	S	R
LMG 19567	S	R	R	S	R	R	I	S	I	I	I	R	S	S	I	R	R	I	R
MDC47 <sup>T</sup> (x2)	S	I	R	S	R	R	S	S	S	S	R	R	S	S	S	S	I	S	S
MDC310	S	R	R	S	R	R	S	S	I	S	I	R	S	R	S	R	I	R	R
MDC317	S	I	R	S	R	R	S	S	S	S	R	R	S	S	S	R	R	S	S
MDC573	S	R	R	S	R	R	S	S	S	S	I	R	S	S	I	S	I	S	S
<i>A. piscicola</i>																			
S1.2T	S	R	R	S	I	S	S	S	S	S	I	R	S	S	S	S	I	R	S
AE092	S	S	R	S	I	S	S	S	S	R	I	R	S	S	S	S	S	I	S
AE163	S	S	R	S	I	S	S	S	S	S	R	R	S	S	S	S	I	R	S
AE203	I	R	R	S	I	S	S	S	S	S	I	R	S	S	S	S	S	I	S
AE258	I	S	R	S	I	S	S	S	S	R	R	R	S	S	S	S	S	S	S
HE22	I	I	R	S	I	S	S	S	S	S	R	R	S	S	S	S	I	R	S
LMG 13445	S	S	R	S	R	S	S	S	S	R	R	R	S	S	S	S	I	S	S
LMG 14043	S	I	R	S	I	S	S	S	S	S	I	R	S	S	S	S	S	I	S
R 4	S	I	R	S	R	S	S	S	S	S	R	R	S	S	S	S	S	I	S
R 9	S	R	R	S	R	S	S	S	S	R	I	R	S	S	S	S	S	S	S
R 94	S	S	R	S	R	S	S	S	S	S	R	R	S	S	S	S	S	S	S
<i>A. popoffii</i>																			
LMG 17541	S	R	R	R	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	R	S	S
LMG 17542	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	I	S	S	S	S	S	S	S	S
LMG 17543	S	R	R	R	S	S	S	S	S	I	I	S	S	S	S	S	R	S	S
LMG 17545	S	I	R	R	S	S	S	S	S	I	I	S	S	S	S	S	I	S	S
LMG 17546	S	R	R	R	I	S	S	S	S	I	I	S	S	S	S	S	R	S	S
LMG 17547	S	S	R	R	S	S	S	S	S	I	I	S	S	S	S	S	S	S	S



<i>A. salmonicida</i>	Amikacina (AN30)	Amoxicilina-Clavulánico (AMC30)	Amoxicilina (AM10)	Aztreonam (ATM30)	Cefalotina (CF30)	Cefoxitina (FOX30)	Ceftriaxona (CRO30)	Ciprofloxacino (CIP5)	Cloranfenicol (C30)	Colistina (CL50)	Eritromicina (E15)	Estreptomina (S10)	Fosfomicina (FFL 50)	Gentamicina (GM10)	Imipenem (IMP10)	Tetraciclina (TE30)	Ticarcilina (TIC75)	Tobramicina (NN10)	TrimetoPrim-Sulfametoxazol (STX)	
CECT 894T	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	I	S	S	S	S	S	S	S	S	S
045C	S	S	R	S	R	S	S	S	S	S	I	R	S	S	S	S	S	S	S	S
051C	I	S	R	S	R	S	S	S	S	S	I	R	S	S	S	S	S	I	S	S
083C	S	I	R	S	R	S	S	S	S	S	R	R	S	S	S	S	I	S	S	S
086C	S	R	R	S	R	S	S	S	S	S	I	I	S	S	S	S	R	S	S	S
087M	S	R	R	S	R	S	S	S	S	S	R	R	S	S	S	S	R	S	S	S
089C	S	I	R	S	R	S	S	S	S	S	I	R	S	S	S	R	R	S	S	S
092M	S	R	R	S	R	S	S	S	S	S	R	I	S	S	S	S	R	R	S	S
278A	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	I	R	S	S	S	S	S	S	S	S
621A	I	S	R	S	R	S	S	S	S	S	R	R	S	S	S	S	S	R	S	S
635A	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	R	I	S	S	S	S	I	I	S	S
818E	S	I	R	I	R	S	S	S	S	S	R	R	S	S	S	S	I	S	S	S
852T	S	S	R	S	R	S	S	S	S	S	I	R	S	S	S	S	S	S	S	S
856T	S	S	R	S	R	S	S	S	S	S	R	R	S	S	S	S	S	R	S	S
1062548	S	S	R	S	R	S	S	S	S	S	I	R	S	I	S	I	R	R	S	S
AE169	S	I	R	S	R	R	S	S	S	S	R	R	S	S	S	S	I	S	S	S
CECT 5173	S	S	R	S	R	S	S	S	S	S	I	R	S	S	S	S	R	S	S	S
CECT 5201	S	S	R	S	R	S	S	S	S	S	I	R	S	S	S	S	R	S	S	S
CECT 5205	S	S	R	S	R	S	S	S	S	R	I	R	S	S	S	S	S	R	S	S
CECT 5206	S	S	R	S	R	S	S	S	S	S	I	R	S	S	S	S	R	S	S	S
CECT 5209	S	S	R	S	R	S	S	S	S	I	I	R	S	S	S	S	R	S	S	S
CECT 5211	S	I	R	S	R	I	S	S	S	R	I	R	S	S	S	S	R	S	S	S
CECT 5214	I	I	R	S	R	S	S	S	S	S	I	R	S	S	S	S	S	S	S	S
CECT 5215	S	I	R	S	R	S	S	S	S	S	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S
CECT 5219	S	R	R	S	R	S	S	S	S	S	I	R	S	S	S	S	R	S	S	S
CECT 5220	S	S	R	S	R	S	S	S	S	S	R	R	S	S	S	S	I	S	S	S
CECT 5222	S	I	R	S	R	S	S	S	S	S	R	R	S	I	S	S	S	S	S	S
CECT 5223	S	S	R	S	R	S	S	S	S	S	I	R	S	S	S	S	R	R	S	S
CECT 5230	S	S	R	S	I	S	S	S	S	S	I	R	S	S	S	S	S	I	S	S
CECT 5239	S	S	R	S	R	R	S	S	S	S	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S
CECT 5242	S	R	R	S	R	S	S	S	S	S	I	R	S	S	S	S	S	S	S	S
CECE 5247	R	S	R	S	R	S	S	S	S	S	R	R	S	I	S	S	I	R	S	S
CECT 5752T	S	S	R	S	R	S	S	S	S	S	I	R	S	S	S	S	S	S	S	S

<i>A. salmonicida</i>	Amikacina (AN30)	Amoxicilina-Clavulánico (AMC30)	Amoxicilina (AM10)	Aztreonam (ATM30)	Cefalotina (CF30)	Cefoxitina (FOX30)	Ceftriaxona (CRO30)	Ciprofloxacino (CIP5)	Cloranfenicol (C30)	Colistina (CL50)	Eritromicina (E15)	Estreptomina (S10)	Fosfomicina (FFL 50)	Gentamicina (GM10)	Imipenem (IMP10)	Tetraciclina (TE30)	Ticarcilina (TIC75)	Tobramicina (NN10)	TrimetoPrim-Sulfametoxazol (STX)
CECT 7453	I	I	R	S	R	I	S	S	R	R	R	S	S	S	S	R	I	S	
CIP 57.50	S	I	R	S	R	S	S	S	I	I	I	S	S	S	S	R	I	S	
CECT 896T	S	S	R	S	R	I	S	S	S	I	R	S	S	S	S	I	I	S	
LMG 3756	S	S	R	S	R	S	S	S	S	R	R	S	S	S	S	I	S	S	
LMG 14900 <sup>T</sup>	S	S	R	S	R	R	S	S	S	S	R	S	S	S	S	R	S	S	
S09-32	S	I	R	S	R	S	S	S	S	R	R	S	S	S	S	I	S	S	

## 8.9 Índice de Figuras

<b>Figura 1.</b> Clasificación del género <i>Aeromonas</i> según el “Bergey’s Manual of Determinative Bacteriology” en 1974 .....	6
<b>Figura 2.</b> Clasificación del género <i>Aeromonas</i> publicada en la primera edición del “Bergey’s Manual of Systematic Bacteriology” en 1984 .....	7
<b>Figura 3.</b> Clasificación actual del género <i>Aeromonas</i> .....	8
<b>Figura 4.</b> Mecanismos de patogénesis .....	14
<b>Figura 5.</b> Árbol filogenético neighbour-joining elaborado con las secuencias del gen 16S rRNA de las cepas tipo de las especies y subespecies de <i>Aeromonas</i> . .....	25
<b>Figura 6.</b> Situación de los genes conservados en el genoma de <i>A. hydrophila</i> .....	30
<b>Figura 7.</b> Condiciones de PCR para el gen <i>cpn60</i> .....	50
<b>Figura 8.</b> Condiciones de PCR para el gen <i>dnaJ</i> utilizando los cebadores F o F1 y R3 .....	51
<b>Figura 9.</b> Condiciones de PCR para el gen <i>gyrB</i> utilizando los cebadores 3F y 14R .....	52
<b>Figura 10.</b> Condiciones de PCR para el gen <i>gyrB</i> utilizando los cebadores UP-1S y 14R .....	52
<b>Figura 11.</b> Condiciones de PCR para el gen <i>rpoD</i> utilizando los cebadores 70Fs y 70Rs .....	53
<b>Figura 12.</b> Condiciones de PCR para el gen <i>rpoD</i> utilizando los cebadores Fa y Ra .....	53
<b>Figura 13.</b> Fragmentos de DNA pasan a través de un haz laser y son captados por el detector óptico .....	59
<b>Figura 14.</b> Condiciones de PCR para la amplificación del gen <i>aer</i> .....	64
<b>Figura 15.</b> Condiciones de PCR utilizadas en la primera amplificación de la PCR anidada .....	65
<b>Figura 16.</b> Gen <i>aer</i> donde en azul se muestra la región amplificada en la primera amplificación de la PCR anidada y en verde el segundo fragmento amplificado .....	65
<b>Figura 17.</b> Condiciones de PCR de la segunda amplificación de la PCR anidada .....	66
<b>Figura 18.</b> Condiciones de PCR para la amplificación del gen <i>alt</i> .....	67
<b>Figura 19.</b> Condiciones de PCR para el fragmento de 331 pb .....	67
<b>Figura 20.</b> Condiciones de PCR para el fragmento de 504 pb .....	68
<b>Figura 21.</b> Preparación del inóculo para el antibiograma .....	72

<b>Figura 22.</b> Antibiograma .....	72
<b>Figura 23.</b> Preparación del cultivo celular para realizar un recuento en cámara de Neubauer .	76
<b>Figura 24.</b> Preparación de la placa para realizar el ensayo .....	76
<b>Figura 25.</b> Preparación de las cepas bacterianas para realizar la infección .....	77
<b>Figura 26.</b> Inoculación de la placa de 24 pocillos .....	77
<b>Figura 27.</b> Cultivo en TSA de una cepa productora de pigmento marrón .....	82
<b>Figura 28.</b> Electroforesis en gel de agarosa del fragmento amplificado de 764 pb del gen <i>cpn60</i> , en el pocillo A se observa el marcador de pesos moleculares .....	84
<b>Figura 29.</b> Árbol obtenido mediante el método ML basado en las secuencias parciales del gen <i>cpn60</i> . .....	86
<b>Figura 30.</b> Electroforesis en gel de agarosa del fragmento amplificado correspondiente al gen <i>dnaJ</i> .....	88
<b>Figura 31.</b> Árbol obtenido mediante el método ML basado en las secuencias parciales del gen <i>dnaJ</i> . .....	89
<b>Figura 32.</b> Electroforesis en gel de agarosa del fragmento amplificado de 1124 pb del gen <i>gyrB</i> , en el pocillo H se observa el marcador de pesos moleculares .....	91
<b>Figura 33.</b> Árbol obtenido mediante el método ML basado en las secuencias parciales del gen <i>gyrB</i> .....	93
<b>Figura 34.</b> Electroforesis en gel de agarosa del fragmento amplificado de 1160 pb del gen <i>rpoD</i> en el pocillo A se observa el marcador de pesos moleculares .....	95
<b>Figura 35.</b> Árbol obtenido mediante el método ML basado en las secuencias parciales del gen <i>rpoD</i> . .....	96
<b>Figura 36.</b> Árbol obtenido mediante el método ML basado en las secuencias concatenadas. ..	99
<b>Figura 37.</b> Árbol obtenido mediante el método ML basado en las secuencias concatenadas, de todas las especies y subespecies del género <i>Aeromonas</i> .....	101
<b>Figura 38.</b> Porcentaje de sensibilidad a antibióticos $\beta$ -lactámicos .....	112
<b>Figura 39.</b> Porcentaje de sensibilidad a antibióticos aminoglucósidos .....	113
<b>Figura 40.</b> Porcentaje de sensibilidad a antibióticos distintos a $\beta$ -lactámicos y aminoglucósidos .....	113

**Figura 41.** Electroforesis en gel de agarosa del fragmento amplificado de 402 pb del gen *aer* en el pocillo L se observa el marcador de pesos moleculares ..... 114

**Figura 42.** Electroforesis en gel de agarosa del fragmento amplificado de 320 pb del gen *alt*, en el pocillo A se observa el marcador de pesos ..... 115

**Figura 43.** Electroforesis en gel de agarosa de los fragmentos amplificados del gen *ast* ..... 115

**Figura 44.** Control (-), cultivo semiconfluyente de células Caco-2 sin infectar ..... 119

**Figura 45.** Cultivo semiconfluyente de células Caco-2 infectado durante 90 min. con *A.aquariorum* MDC 47<sup>T</sup> ..... 120

**Figura 46.** Cultivo semiconfluyente de células Caco-2 infectado durante 90 min. con *A. bestiarum* CECT 4727<sup>T</sup> ..... 120

**Figura 47.** Cultivo semiconfluyente de células Caco-2 infectado durante 90 min. con *A. hydrophila* CECT 839<sup>T</sup> ..... 120

**Figura 48.** Cultivo semiconfluyente de células Caco-2 infectado durante 90 min. con *A. hydrophila* subsp. *dhakensis* CECT 5744<sup>T</sup> ..... 121

**Figura 49.** Cultivo semiconfluyente de células Caco-2 infectado durante 90 min. con *A. hydrophila* subsp. *ranae* CIP 107985<sup>T</sup> ..... 121

**Figura 50.** Cultivo semiconfluyente de células Caco-2 infectado durante 90 min. con *A. piscicola* S1.2<sup>T</sup> ..... 121

**Figura 51.** Cultivo semiconfluyente de células Caco-2 infectado durante 90 min. con *A. popoffii* LMG 17541<sup>T</sup> ..... 122

**Figura 52.** Cultivo semiconfluyente de células Caco-2 infectado durante 90 min. con *A. salmonicida* CECT 894<sup>T</sup> ..... 122

## 8.10 Índice de tablas

<b>Tabla 1.</b> Especies del género <i>Aeromonas</i> descritas actualmente .....	9
<b>Tabla 2.</b> Pruebas fenotípicas utilizadas para la diferenciación de las especies del género <i>Aeromonas</i> .....	22
<b>Tabla 3.</b> Diferencias fenotípicas de las cepas psicrófilas de <i>A. salmonicida</i> .....	23
<b>Tabla 4.</b> Genes seleccionados para realizar el estudio .....	44
<b>Tabla 5.</b> Secuencias a partir de las cuales se han diseñado los cebadores específicos. ....	49
<b>Tabla 6.</b> Cebadores utilizados en la PCR .....	49
<b>Tabla 7.</b> Mezcla de PCR para la amplificación del gen <i>cpn60</i> .....	50
<b>Tabla 8.</b> Mezcla de PCR para la amplificación del gen <i>dnaJ</i> .....	51
<b>Tabla 9.</b> Mezcla de PCR para la amplificación del gen <i>gyrB</i> .....	52
<b>Tabla 10.</b> Mezcla de PCR para la amplificación del gen <i>rpoD</i> .....	53
<b>Tabla 11.</b> Cebadores internos utilizados en la secuenciación .....	56
<b>Tabla 12.</b> Mezcla y condiciones de secuenciación para el gen <i>cpn60</i> .....	57
<b>Tabla 13.</b> Mezcla y condiciones de secuenciación para el gen <i>dnaJ</i> .....	57
<b>Tabla 14.</b> Mezcla y condiciones de secuenciación para el gen <i>gyrB</i> .....	58
<b>Tabla 15.</b> Mezcla de secuenciación para el gen <i>rpoD</i> .....	58
<b>Tabla 16.</b> Condiciones de secuenciación para el gen <i>rpoD</i> .....	58
<b>Tabla 17.</b> Cebadores utilizados para la detección del gen <i>aer</i> .....	63
<b>Tabla 18.</b> Cebadores utilizados para la detección del gen <i>alt</i> .....	63
<b>Tabla 19.</b> Cebadores utilizados para la detección del gen <i>ast</i> .....	63
<b>Tabla 20.</b> Mezcla de PCR para la detección del gen <i>aer</i> .....	64
<b>Tabla 21.</b> Mezcla de PCR utilizada para la detección del gen <i>aer</i> .....	65
<b>Tabla 22.</b> Mezcla de PCR utilizada en la segunda amplificación de la PCR anidada .....	66
<b>Tabla 23.</b> mezcla de PCR para la detección del gen <i>alt</i> .....	66
<b>Tabla 24.</b> Mezcla de PCR para la detección del gen <i>ast</i> mediante la amplificación de un fragmento de 331 pb .....	67

<b>Tabla 25.</b> Mezcla de PCR para la detección del gen <i>ast</i> mediante la amplificación de un fragmento de 504 pb .....	68
<b>Tabla 26.</b> Cepas reclasificadas en base al gen <i>cpn60</i> .....	81
<b>Tabla 27.</b> Resultados en % de cepas que fermentaron sorbitol .....	83
<b>Tabla 28.</b> Resultados en % de las cepas asimiladoras de lactato .....	83
<b>Tabla 29.</b> Distancia evolutiva media para cada uno de los 6 grupos obtenida a partir de las secuencias del gen <i>cpn60</i> .....	87
<b>Tabla 30.</b> Divergencia entre las especies del AHC obtenida a partir de las secuencias del gen <i>cpn60</i> .....	87
<b>Tabla 31.</b> Distancia evolutiva media para cada uno de los 6 grupos obtenida a partir de las secuencias del el gen <i>dnaJ</i> .....	90
<b>Tabla 32.</b> Divergencia entre las especies del AHC obtenida a partir de las secuencias del gen <i>dnaJ</i> .....	91
<b>Tabla 33.</b> Distancia evolutiva media para cada uno de los 6 grupos obtenida a partir de las secuencias del gen <i>gyrB</i> .....	94
<b>Tabla 34.</b> Divergencia entre las especies del AHC obtenida a partir de las secuencias del gen <i>gyrB</i> .....	94
<b>Tabla 35.</b> Distancia evolutiva media para cada uno de los 6 grupos obtenida a partir de las secuencias del gen <i>ropD</i> .....	97
<b>Tabla 36.</b> Divergencia entre las especies del AHC obtenida a partir de las secuencias del gen <i>rpoD</i> .....	97
<b>Tabla 37.</b> Distancia evolutiva media para cada uno de los 6 grupos obtenida a partir de la secuencia concatenada de los genes .....	100
<b>Tabla 38.</b> Divergencia entre las especies del AHC obtenida a partir de la secuencia concatenada de los genes .....	100
<b>Tabla 39.</b> Eventos de recombinación detectados con el programa RDP4, en las 128 cepas estudiadas .....	102
<b>Tabla 40.</b> Análisis de las 128 secuencias para cada uno de los genes estudiados .....	103
<b>Tabla 41.</b> Perfiles alélicos y STs .....	103
<b>Tabla 42.</b> Diversidad genética .....	107

---

<b>Tabla 43.</b> Análisis del desequilibrio de ligamiento .....	107
<b>Tabla 44.</b> Porcentaje por especies de hidrólisis de almidón.....	108
<b>Tabla 45.</b> Porcentaje por especies de hidrólisis de caseína.....	108
<b>Tabla 46.</b> Porcentaje por especies de hidrólisis de DNA .....	109
<b>Tabla 47.</b> Porcentaje por especies de hidrólisis de elastina .....	109
<b>Tabla 48.</b> Porcentaje por especies de hidrólisis de gelatina .....	110
<b>Tabla 49.</b> Porcentaje por especies de $\beta$ -hemólisis .....	110
<b>Tabla 50.</b> Porcentaje por especies de hidrólisis de lecitina .....	111
<b>Tabla 51.</b> Porcentaje de cepas en que se detectó el gen <i>aer</i> .....	114
<b>Tabla 52.</b> Efectos observados en los ensayos de adherencia en <i>A. bestiarum</i> .....	116
<b>Tabla 53.</b> Efectos observados en los ensayos de adherencia en <i>A. hydrophila</i> .....	117
<b>Tabla 54.</b> Efectos observados los ensayos de adherencia en <i>A. hydrophila</i> subsp. <i>dhakensis</i> / <i>A. aquariorum</i> .....	117
<b>Tabla 55.</b> Efectos observados los ensayos de adherencia en <i>A. piscicola</i> .....	117
<b>Tabla 56.</b> Efectos observados los ensayos de adherencia en <i>A. popoffii</i> .....	118
<b>Tabla 57.</b> Efectos observados en los ensayos de adherencia en <i>A. salmonicida</i> .....	118
<b>Tabla 58.</b> Porcentaje de cepas por especie en el que se observó adherencia y efecto citopático .....	119



## 8.11 Abreviaturas y símbolos

%	Porcentaje
°C	Grado Celsius
AHC	complejo de <i>Aeromonas hydrophila</i>
ATCC	Colección Americana de Cultivos Tipo
DDH	Hibridación DNA-DNA
DL <sub>50</sub>	Dosis letal 50
bv	Biovar
HG	Grupo de hibridación DNA-DNA
CECT	Colección Española de Cultivos Tipo
CIP	Colección del Instituto Pasteur
DMSO	Dimetilsulfóxido
G+C	Contenido guanina + citosina
JCM	Colección Japonesa de Microorganismos
Kb	Kilobase
KDa	KiloDalton
LMG	Colección Belga de Microorganismos
LPS	Lipopolisacárido
MLSA	Análisis de secuencias multilocus
nt	Nucleótido
O/129	2,4-diamino-6,7-di-iso-propilpteridina fosfato
pb	Pares de bases
qsq	Cantidad suficiente para
ST	Tipo de secuencia
subsp.	Subespecie
$T_m$	Temperatura de fusión
UFC	Unidad formadora de colonia
$\Delta T_m$	Intervalo de temperatura de fusión
$\mu\text{l}$	Micrólitro
$\mu\text{m}$	Micrómetro
$\infty$	Infinito

## **Capítulo 9**

---

### **Publicaciones**



## Population Genetics of the “*Aeromonas hydrophila* Species Complex”

M<sup>a</sup> Carmen Fusté, Maribel Farfán, David Miñana-Galbis,  
Vicenta Albarral, Ariadna Sanglas and José Gaspar Lorén  
*Department of Health Microbiology and Parasitology, Faculty of Pharmacy,  
University of Barcelona, Barcelona,  
Spain*

### 1. Introduction

Population genetics studies the genetic variability of individuals in a population based on the allele frequencies at several genes or loci and tries to explain this variability in terms of mutation, selection or genetic recombination. The statistical analysis of these frequencies allows models of evolution to be established, which will help us to understand and predict the past and present gene flow in the population (Maynard-Smith, 1991). For the most part population genetics has been designed for diploid organisms with sexual reproduction. In the words of Bruce Levin, “the genetic theory of adaptive evolution was developed by sexually reproducing eukaryotes, for sexually reproducing eukaryotes” (Levin & Bergstrom, 2000). As a consequence, before being applied to prokaryotes, population genetics needs to be adapted.

In theory the haploid nature of bacteria should simplify their analysis, since dominance or over-dominance is not an issue and the genotype can usually be deduced directly from the phenotype. However, central to classical population genetics are infinite population size, random mating, and free recombination. Consequently, as expressed by Maynard-Smith, “the alleles present at one locus are independent of those at other loci. Changes in the frequency of an allele at one locus, therefore, are independent of what is happening elsewhere in the genome: each locus can be treated individually” (Maynard-Smith, 1995). It is true that the size of bacterial populations can be practically infinite but recombination occurs extremely rarely so that changes affecting one locus can lead to the modification of others. In the succinct words of Maynard-Smith, “the genome should be treated as an inter-related whole, and not as a set of independently changing genes”. The crux of the problem is knowing the exact level of recombination in bacterial populations, since “it is considerably more challenging to elaborate a theory for a population with little recombination than for one with no recombination, or a lot” (Maynard-Smith, 1995). In bacterial population genetics, sometimes we detect a degree of recombination that is too high for a pure phylogenetic approach, but too low for assessing a random interchange.

Stronger evidence for restricted recombination comes from measurements of linkage disequilibrium: that is, the tendency for particular alleles at different loci to co-occur

(Maynard-Smith et al., 1993; Haubold et al., 1998). Linkage disequilibrium (and the too-frequent occurrence of a particular combination of alleles, which is a manifestation of such disequilibrium) shows that recombination is restricted, but not absent. The determination of the relative importance of mutation in comparison with recombination is central to bacterial population genetics (Feil et al., 1999). Previous studies have demonstrated a wide variety of situations among bacterial species ranging from the clonal diversification of *Salmonella* (Selander et al., 1990) or *Escherichia coli* (Orskov et al., 1990), which are mainly due to mutation, to the frequent recombination found in *Neisseria gonorrhoeae* (O'Rourke & Stevens, 1993) or *Helicobacter pylori* (Salaun et al., 1998). Most of the population studies done with bacterial species suggest that recombination occurs in nature, and indeed may be highly important in generating variation, but that it is infrequent compared to mutation. Consequently, bacterial populations consist largely of independent clonal lineages.

The development of protein electrophoresis was a breakthrough for the study of bacterial population genetics. A pioneer in the field, Milkman (1973) used the methodology to study whether electrophoretic variation is selective or neutral. As described by Selander et al., Multilocus Enzyme Electrophoresis (MLEE) "has long been a standard method in eukaryotic population genetics and systematics" before it was applied "for studying the genetic diversity and structure in natural populations of bacteria. This research established basic population frameworks for the analysis of variation in serotypes and other phenotypic characters and has provided extensive data for systematics and useful marker systems for epidemiology" (Selander et al., 1986).

In 1998, Maiden et al. introduced Multilocus Sequence Typing (MLST), an extension of MLEE based on nucleotide sequencing that is able to determine higher levels of discrimination (more alleles per locus). In MLST "alleles are identified directly from the nucleotide sequences of internal fragments of genes rather than by comparing the electrophoretic mobilities of the enzymes they encode" (Maiden et al., 1998). In addition, this method is fully portable between laboratories and data can be stored in a single multilocus sequence database accessible via the internet (<http://www.mlst.net>). This approach has given "a new dimension to the elucidation of genomic relatedness at the inter- and intraspecific level by sequence analysis of housekeeping genes subject to stabilising selection. This technique has been mainly used in epidemiology, but it offers the opportunity to incorporate the insights available from population genetics and phylogenetic approaches into bacterial systematics" (Stackebrandt et al., 2002; Pérez-Losada et al., 2005; Robinson et al., 2010).

The results obtained using MLST indicate that despite the high diversity observed in bacteria, it is possible to recognize clusters with a lower degree of variation. The number of sequence types (STs) obtained is less than expected if we consider the product of the individual allelic frequencies. Nevertheless, most of the strains belong to one or a few allelic profiles, whereas most of the STs are represented by one or few strains. In addition, most STs cluster in clonal complexes constituted by closely related genotypes. Typically, each clonal complex consists of a predominant ST and a varied group of less common STs, which have different alleles only in one or two loci (Feil et al., 2004). These differences could correspond to initial stages of clonal divergence from an ancestral genotype that was the origin of the clone (Vogel et al., 2010; Willems, 2010).

## 2. The genus *Aeromonas*

The genus *Aeromonas* Stanier 1943 belongs to the family *Aeromonadaceae* within the class *Gammaproteobacteria* (Martin-Carnahan & Joseph, 2005). *Aeromonads* are autochthonous inhabitants of aquatic environments including chlorinated and polluted waters, although they can also be isolated from a wide variety of environmental and clinical sources. They cause infections in vertebrates and invertebrates, such as frogs, birds, various fish species and domestic animals. In recent years, some authors have considered *Aeromonas* as an emergent pathogen in humans, producing intestinal and extraintestinal diseases. *Aeromonads* are facultative anaerobic chemoorganotrophs capable of anaerobic nitrate respiration and dissimilatory metal reduction (Martin-Carnahan & Joseph, 2005).

The interest in the taxonomy of the genus *Aeromonas* has increased markedly in recent years (Janda & Abbott, 2010), and its classification, with 25 species currently recognized, remains challenging. Novel species are continuously being described, strains and species described so far are being rearranged, and DNA-DNA hybridization studies have observed discrepancies (Janda & Abbott, 2010). Historically, the genus *Aeromonas* has been divided into two groups: nonmotile, psychrophilic species, best represented by *A. salmonicida*, which are generally associated with fish diseases and motile mesophilic species associated with human diseases, including *A. hydrophila*, *A. veronii* and *A. caviae* (Martin-Carnahan & Joseph, 2005). More species have since been described and genealogies have to be adapted accordingly, although this is not always straightforward.

Bacterial species are formally defined as a group of strains that share several phenotypical characteristics and show values of DNA-DNA hybridization  $\geq 70\%$  and a 16S rRNA sequence similarity  $\geq 97\%$  with their close relatives (Stackebrandt et al., 2002). Indeed, there are hardly any examples in which strains with divergence in the 16S rRNA sequence  $\leq 97\%$  are defined as one species (Roselló-Mora & Amann, 2001). In *Aeromonas* 16S rRNA gene sequences are highly similar, being identical in some close related species such as *A. salmonicida*, *A. bestiarum*, *A. popoffii* and *A. piscicola*, which hampers their utility in defining species in this genus (Figueras et al., 2000; Beaz-Hidalgo et al., 2009).

Several attempts have been made to generate phylogenies using DNA gene sequences to reconstruct the correct genealogical ties among species in *Aeromonas* (Küpfer et al., 2006; Saavedra et al., 2006; Miñana-Galbis et al., 2009), but the genes chosen for this purpose are not always suitable and do not give congruent phylogenies (Farfán et al., 2010; Silver et al., 2011). Recently, two papers presenting MLST schemes for *Aeromonas* have been published (Martínez-Murcia et al., 2011; Martino et al., 2011) and there is an online MLST database of the genus *Aeromonas*, managed by Keith Jolley and curated by Barbara Cardazzo (<http://pubmlst.org/aeromonas>). All this accumulated data should help to establish a reliable clustering of the *Aeromonas* species and elucidate their exact boundaries.

Finally, the availability of complete genomes of different species is also useful in this task, but unfortunately in the case of *Aeromonas* only three genomes have been completed, one corresponding to the type strain of *A. hydrophila* subsp. *hydrophila* ATCC 7966 isolated from a tin of milk (Seshadri et al., 2006), the second to a fish pathogen, the strain A449 of *A. salmonicida* subsp. *salmonicida* (Reith et al., 2008) and the third to *A. veronii* isolated from an aquaculture pond sediment (Li et al., 2011). The information given by the genomes of *A. hydrophila* and *A. salmonicida* indicate that while they are of identical size (4,7Mb) and share

multiple housekeeping and virulence genes, *A. salmonicida* has acquired several mobile genetic elements, and undergone genome rearrangements and loss of genes in the process of adapting to a specific host. The genome of *A. veronii* is smaller (4,3Mb) and contains fewer virulence genes than the others.

### 3. “*Aeromonas hydrophila* species complex”

An example of the taxonomic complexity of the genus *Aeromonas* is the difficulty in discriminating between the phenotypically and genetically closely related species belonging to the “*Aeromonas hydrophila* species complex” (AHC), which includes: *A. hydrophila*, composed by three subspecies: *A. hydrophila* subsp. *hydrophila*, *A. hydrophila* subsp. *ranae* and *A. hydrophila* subsp. *dhakensis*, *A. bestiarum*, *A. popoffii* and *A. salmonicida*, divided in five subspecies: *A. salmonicida* subsp. *salmonicida*, *A. salmonicida* subsp. *masoucida*, *A. salmonicida* subsp. *achromogenes*, *A. salmonicida* subsp. *pectinolytica* and *A. salmonicida* subsp. *smithia* (Miñana-Galbis et al., 2002; Martin-Carnahan & Joseph, 2005). Recently, two additional species have been described in this group, *A. aquariorum* and *A. piscicola* (Martínez-Murcia et al., 2008; Beaz-Hidalgo et al., 2009). Members of the AHC were first described as strains producing the enzymes elastase, lecithinase or stapholysin (Abbott et al., 2003). They are genetically closely related and share multiple phenotypic characteristics, which makes discrimination among the species included in this group extremely difficult (Miñana-Galbis et al., 2002).

Several approaches have been used to discriminate among the AHC species: Amplified Fragment Length Polymorphisms (AFLP) (Huys et al., 1997), fluorescent AFLP (FAFLP) (Huys et al., 2002), MLEE (Miñana-Galbis et al., 2004), Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) and MALDI-TOF MS analysis (Martínez-Murcia et al., 2008). Although the results obtained with these methods have been useful for the taxonomy and phylogeny of the AHC, providing a hypothesis for the genealogy of strains and detailing their patterns of descent and degree of genetic variation accumulated over time, only the MLEE study has been used to elucidate their population genetic structure.

Previous studies based on the sequence analysis of several housekeeping genes have demonstrated that the AHC is not monophyletic (Soler et al., 2004; Küpfer et al., 2006; Saavedra et al., 2006; Nhung et al., 2007; Beaz-Hidalgo et al., 2009; Miñana-Galbis et al., 2009). Nevertheless, controversially, other studies have shown the monophyly of this group (Martínez-Murcia et al., 2005; Farfán et al., 2010). This conflict could be due to the incongruence of phylogenies derived from distinct gene sequence analysis.

In order to establish the population structure and divergence of the species included in this group of *Aeromonas* we studied a set of strains representative of the AHC, in which we analyzed the nucleotide sequences (total or partial) of 6 housekeeping genes: *cpn60* (555 bp), *dnaJ* (891 bp), *gyrB* (1089 bp), *mdh* (936 bp), *recA* (1065 bp), *rpoD* (843 bp), giving a total fragment length of 5379 bp.

### 4. Phylogenetic analysis

The relationships among the analyzed *Aeromonas* isolates are represented as a genealogical tree (Fig. 1). The tree reveals that the AHC splits into three main clusters separated by a

mean genetic distance of 0.071 (Table 1). The *A. salmonicida* cluster, although comprising five subspecies, constitutes a homogeneous clade with the lowest mean genetic distance of 0.016 (Table 1). The closest relative to *A. salmonicida*, *A. bestiarum*, has a different population structure. Rather than being a single group, it is divided in three clades, one constituted by the great majority of the *A. bestiarum* strains, a second corresponding to *A. popoffii* and the third including some *A. bestiarum* strains together with isolates of *A. piscicola*. The mean genetic distance of the *A. bestiarum* cluster is higher than in *A. salmonicida* 0.029 (Table 1). The *A. hydrophila* group, which exhibits the highest genetic distance 0.037 (Table 1), clearly separates in two clades, one including the *A. hydrophila* subsp. *hydrophila* and *A. hydrophila* subsp. *ranae* and the second constituted by *A. hydrophila* subsp. *dhakensis* and *A. aquariorum*. The presence of different clades in some of these species poses questions about the clade-species relationships.

	TN93	Standard error
All sequences	0.0717	0.0024
<i>A. bestiarum</i>	0.0286	0.0014
<i>A. bestiarum</i> (clade 1)	0.0157	0.0009
<i>A. bestiarum</i> (clade 2)	0.0084	0.0008
<i>A. bestiarum</i> (clade 3)	0.0100	0.0008
<i>A. hydrophila</i>	0.0370	0.0016
<i>A. hydrophila</i> (clade 1)	0.0219	0.0010
<i>A. hydrophila</i> (clade 2)	0.0158	0.0012
<i>A. salmonicida</i>	0.0163	0.0009

Table 1. Mean genetic distances for all sequences and clusters calculated using the Tamura Nei (1993) distance. Standard error estimates were obtained by the bootstrap method with 500 replicates.

	TN93	Standard error
<i>A. bestiarum</i> vs. <i>A. salmonicida</i>	0.0655	0.0033
<i>A. bestiarum</i> vs. <i>A. hydrophila</i>	0.1042	0.0043
<i>A. hydrophila</i> vs. <i>A. salmonicida</i>	0.1101	0.0049
<i>A. bestiarum</i> (clade 1) vs. <i>A. bestiarum</i> (clade 2)	0.0507	0.0027
<i>A. bestiarum</i> (clade 1) vs. <i>A. bestiarum</i> (clade 3)	0.0279	0.0021
<i>A. bestiarum</i> (clade 2) vs. <i>A. bestiarum</i> (clade 3)	0.0526	0.0031
<i>A. hydrophila</i> (clade 1) vs. <i>A. hydrophila</i> (clade 2)	0.0558	0.0030

Table 2. Mean genetic distances among different clusters obtained using the Tamura Nei (1993) distance. Standard error estimates were obtained by the bootstrap method with 500 replicates.

Estimation of distance frequency within and between clusters from multilocus sequence data provides interesting insights into the population structure of these groups. The frequency distribution of the pairwise genetic distances clearly identifies the AHC species phylogenetic structure (Fig. 2). Within the strains of the *A. bestiarum* group (Fig. 2A), the plot shows three peaks with distance values ranging from 0 to 0.063. The lowest values correspond to pairwise comparisons among isolates within clades (1, 2 and 3) and the highest to those between clades. Distances between groups allowed a clear separation of *A.*



*bestiarum* from the other species groups. When we plotted the pairwise distance distribution within the *A. hydrophila* group (Fig. 2B) two peaks were shown and again the lowest values are those within the clades and the highest between the clades (0-0.062). *A. hydrophila* is clearly separated from *A. salmonicida* and *A. bestiarum* despite the overlap in the graph (Fig. 2B), which is a consequence of the similar distance values between *A. hydrophila* and *A. salmonicida* (0.110) and *A. hydrophila* and *A. bestiarum* (0.104). Otherwise, species boundaries are objectively defined in the phylogenetic tree (Fig. 1). In the *A. salmonicida* group, the within distance distribution (0-0.030) appears as a single peak, as does the interspecies distance.

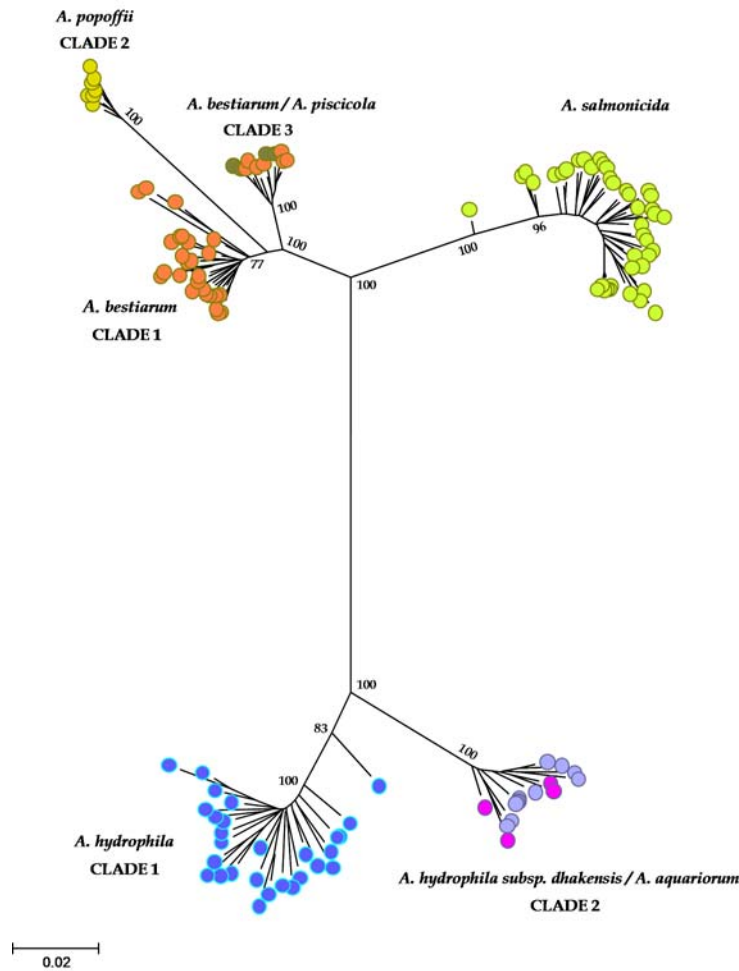


Fig. 1. Maximum likelihood tree inferred from the concatenated nucleotide sequences generated with MEGA5 software (Tamura et al., 2011). The tree was constructed using the Tamura Nei distance (TN93) and the rate of variation among sites was modelled with a gamma distribution (shape parameter = 0.5723) assuming heterogeneity of invariant sites

(best model for the data). Numbers at the branch nodes represent bootstrap values (500 replicates). The scale bar indicates the number of nucleotide substitutions per site. The GenBank/EMBL/DDBJ accession numbers of the nucleotide sequences used in this study are EU306796-EU306797, EU306804-EU306806, EU306814-EU306820, EU306822-EU306824, EU306826-EU306829, EU741625, EU741635-EU741636, EU741642, FJ936120, FJ936135, GU062399, JN711508-JN711610 (*cpn60* gene); FJ936122, FJ936136, JN215529-JN215534, JN711611-JN711731 (*dnaJ* gene); FJ936137, JN215535, JN711732-JN711858 (*gyrB* gene); HM163293-HM163294, HM163305-HM163307, HM163312-HM163318, JN660159-JN660273 (*mdh* gene); JN660274-JN660400 (*recA* gene) and EF465509-EF465510, FJ936132, FJ936138, JN215536-JN215541, JN712315-JN712433 (*rpoD* gene).

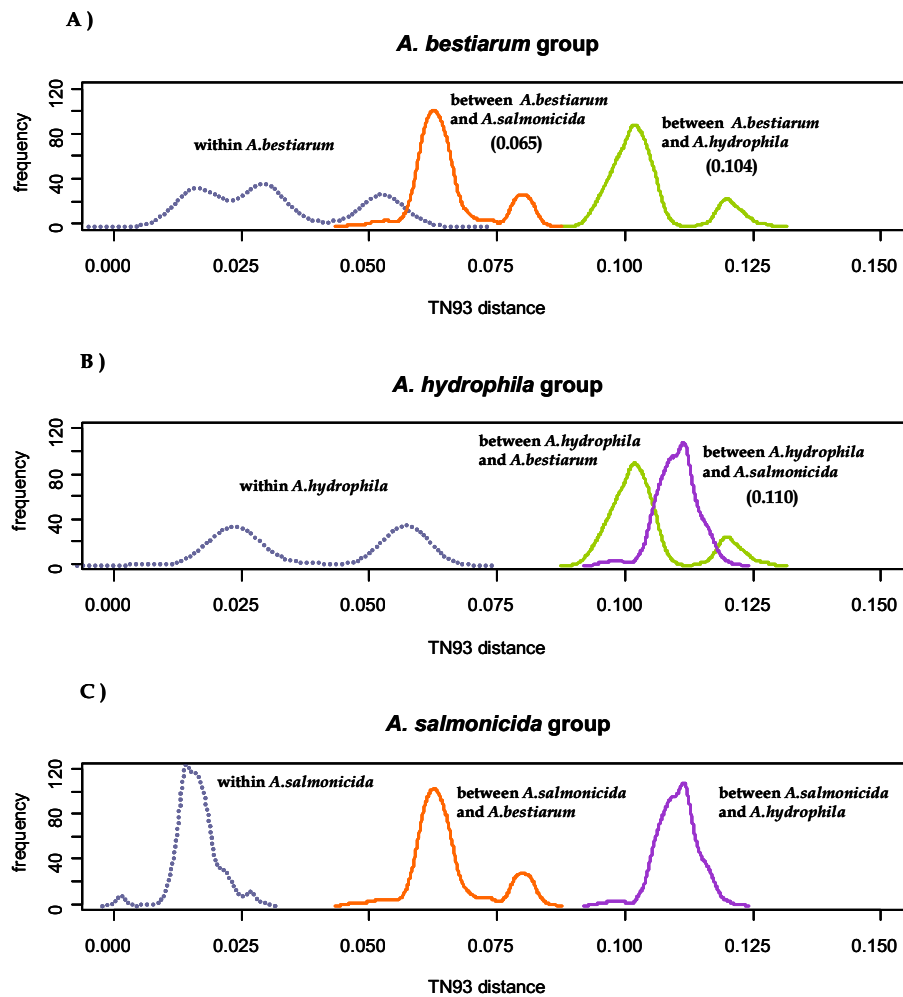


Fig. 2. Distribution of TN93 distances within and between clusters determined by pairwise comparisons. Mean distances are indicated within brackets.

Although to our knowledge there is no function that could be used to define a level of divergence for distinguishing species, it seems clear that, in bacteria, there is always an exponential relationship between interspecies recombination and sequence divergence (Roberts & Cohan, 1993; Zawadzki et al., 1995; Vulic et al., 1997). Values of divergence among clades (Table 2) seem to correspond to those of a genetically isolated biological species. The lowest value corresponds to *A. bestiarum* clade 3, indicating that its isolates are undergoing speciation, but species boundaries are not as well-defined as in the other clades.

## 5. Linkage disequilibrium and population structure

Linkage equilibrium is characterized by the statistical independence of alleles at all loci. A common method used in bacterial population genetics to quantify the degree of linkage between a set of loci in MLSA data is to use the index of association ( $I_A$ ) (Brown et al., 1980; Maynard-Smith et al., 1993). This index compares the ratio of variance calculated from the pairwise distribution of allele mismatches in the data ( $V_O$ ) and the ratio expected under a null hypothesis of linkage equilibrium ( $V_E$ ). In this case

$$E(V_O) = \sum h_i(1-h_i),$$

where  $h_i$  is an unbiased estimator of the population genetic diversity equivalent to heterozygosity in diploid organisms (Table 4). The index of association ( $I_A$ ) originally used by Brown et al. (1980) is computed as

$$I_A = V_O / V_E - 1,$$

which would give a value of zero if there is no association between loci (Maynard-Smith et al., 1993). Values of this index significantly different from zero reflect strong linkage disequilibrium (lower rates of recombination). The value of  $I_A$  depends on the number of loci analyzed. Haubold & Hudson (2000) subsequently proposed a standardized index of association ( $I_A^S$ ) defined as

$$I_A^S = (1/l-1) I_A,$$

where  $l$  is the number of loci studied. This index has the advantage of being comparable between studies as long as it can be assumed that the neutral mutation parameter  $\theta = 2Ne\mu$  is constant (Hudson, 1994). Two methods are commonly used for determining whether the computed  $I_A$  represents a significant deviation from linkage equilibrium ( $I_A \sim 0$ ): resampling from randomized data sets using Monte Carlo simulations or using the parametric method described by Haubold et al. (1998). Both methods are perfectly good alternatives.

The genetic structure of the AHC, which has been previously determined using enzyme electrophoresis (MLEE), has revealed a clear clonal structure with strong linkage disequilibrium among 15 different protein loci (Miñana-Galbis et al., 2004). Additionally, this study demonstrated the usefulness of MLEE for separating the strains belonging to *A. bestiarum* and *A. salmonicida*, which are almost indistinguishable by phenotypic characteristics and 16S rRNA sequence analysis and present borderline DNA-DNA homology values.

In a multilocus sequence analysis (using six housekeeping genes) of a new set of AHC strains in which we included representatives of *A. piscicola* and *A. aquariorum*, we obtained

$I_A^S$  values different from 0 in all cases, indicating the absence of recombination and again revealing strong linkage disequilibrium when considering both the total population and the different groups of species (Table 5). This is in spite of the high number of alleles per locus and polymorphic sites (Table 3) and huge genetic diversity (Table 4). Values of  $V_O$ ,  $V_E$ ,  $I_A^S$  and the 5% critical values as determined by the Monte Carlo process ( $L_{MC}$ ) and from the parametric approach ( $L_{para}$ ) of Haubold et al. (1998) are shown in Table 5.

Gene	Number of alleles	Number of polymorphic sites	$\pi \pm \text{s.e.}^{**}$
<i>cpn60</i>	95	144	0.075 $\pm$ 0.009
<i>dnaJ</i>	102	237	0.082 $\pm$ 0.007
<i>gyrB</i>	108	266	0.063 $\pm$ 0.005
<i>mdh</i> *	113	225	0.059 $\pm$ 0.009
<i>recA</i> *	106	282	0.071 $\pm$ 0.009
<i>rpoD</i>	110	212	0.090 $\pm$ 0.010

\* full-length sequence gene; \*\* nucleotide diversity ( $\pi$ )  $\pm$  standard error (s.e.)

Calculated by using MEGA5 software (Tamura et al., 2011).

Table 3. Sequence variation at six loci. Standard error estimates were obtained by the bootstrap method with 500 replicates.

	STs	$h_j^*$						$H \pm \text{s.e.}^{**}$
		<i>cpn60</i>	<i>dnaJ</i>	<i>gyrB</i>	<i>mdh</i>	<i>recA</i>	<i>rpoD</i>	
All STs	127	0.9931	0.9959	0.9966	0.9978	0.9945	0.9973	0.9959 $\pm$ 0.0007
<i>A. bestiarum</i>	44	0.9704	0.9863	0.9863	0.9905	0.9852	0.9873	0.9843 $\pm$ 0.0029
<i>A. hydrophila</i>	42	0.9930	0.9884	0.9954	1.0000	0.9930	0.9930	0.9938 $\pm$ 0.0015
<i>A. salmonicida</i>	41	0.9744	0.9902	0.9878	0.9890	0.9707	0.9951	0.9846 $\pm$ 0.0039

\* genetic diversity at individual loci ( $h_j$ ); \*\* mean genetic diversity ( $H$ )  $\pm$  standard error (s.e.)

$h_j = (n/n-1) \sum p_{ij}^2$ , where  $p_{ij}$  is the frequency of the  $i$ th allele at the  $j$ th locus and  $n$  the number of loci.

Data were calculated by using R statistical software (R Development Core Team, 2010).

Table 4. Genetic diversity ( $h$ ) at six loci for all STs and major species sets.

	$V_O$	$V_E$	$I_A^S$	$L_{para}$	$L_{MC}$	$P_{MC}$
All STs	0.0635	0.0248	0.3131	0.0253	0.0255	$< 1.00 \times 10^{-04}$
<i>A. bestiarum</i>	0.2314	0.0924	0.3010	0.0986	0.1001	$< 1.00 \times 10^{-04}$
<i>A. hydrophila</i>	0.1382	0.0369	0.5495	0.0395	0.0405	$< 1.00 \times 10^{-04}$
<i>A. salmonicida</i>	0.1916	0.0908	0.2222	0.0978	0.0988	$< 1.00 \times 10^{-04}$

For the meaning of acronyms, see text. The  $L_{MC}$  and  $P_{MC}$  results were obtained from 10000 resamplings.

Data were calculated by using R statistical software except for  $L_{para}$ , which was determined with the LIAN 3.5 program (Haubold & Hudson, 2000).

Table 5. Multilocus linkage disequilibrium analysis of the AHC.

During the last years, with the availability of the first DNA sequence data of individual genes, evidence of recombination at the molecular level has accumulated for *Aeromonas* in genes such as *dnaJ*, *gyrB* and *recA* (Silver et al., 2011). Incongruence between trees reconstructed from individual genes appeared as further proof of recombination at the gene level. Nevertheless, multilocus analysis with gene sequences also revealed a clear clonal

structure in this bacterial group (Table 5). The question is that although bacteria are capable of accumulating gene fragments from other bacterial species or mutations, the recombinant segments are not long enough to break the clonal structure of the population. While the absence of linkage ( $I_A^S \sim 0$ ) is difficult to explain without assuming high levels of recombination, linkage disequilibrium does not exclude the presence of significant levels of recombination (Touchon et al., 2009).

In our study we have also determined the presence of recombinant fragments in the *recA* (in four *A. bestiarum* strains) and *dnaJ* genes (five strains, 2 *A. bestiarum*, 2 *A. hydrophila* and 2 *A. salmonicida*). However, although these strains cluster separately when the corresponding tree is constructed, revealing the different origin of the gene fragments, they group together with the other strains when a concatenated tree is generated. This confirms that recombination is not sufficient to break the genetic cohesion of this group.

## 6. Gene flow and divergence

The existence of barriers to gene flow such as geographical separation, ecological adaptation or the accumulation of genetic differences ultimately leads to distinct lineages. These processes are usually more complicated in prokaryotes, since the boundaries of their species are sometimes distorted by gene transfer between divergent organisms. In addition, the mechanisms that can contribute to the cohesion of groups are very different in bacteria. We have determined the divergence among the different AHC clades using the nucleotide fixation index,  $N_{ST}$  (Nei & Kumar, 2000). The use of the  $N_{ST}$  as a measure of population differentiation under certain circumstances has been criticized (Jost, 2008), but it is still used for describing the average amount of such differentiation observed from multiple locus data (Ryman & Leimar, 2009). In our study, the determination of the  $N_{ST}$  values indicated a high level of interclade genetic differentiation ( $N_{ST} = 0.8025$ ). On average, most of the 80% of the total variance of nucleotide diversity was attributable to genetic differentiation among clades, whereas about 20% was found within populations. High levels of diversification were also found among most of the AHC groups of species (Table 6), with values always higher than 0.7 except in the case of *A. bestiarum* clade 3 / *A. bestiarum* clade 1 ( $N_{ST} = 0.5$ ) and *A. hydrophila* clade 2 / *A. hydrophila* clade 1 ( $N_{ST} = 0.6$ ). The clear divergence between the different clades described suggests they form coherent groups in which the phenomenon of recombination, if present, fails to break this consistency.

In bacterial populations it seems reasonable to equate the effect of lateral gene transfer (LTG) from other species with the product  $Nm$  (effective population size  $\times$  migration rate) determined from  $N_{ST}$ . Indeed, assuming the limitations of the Wright island model (Wright, 1940), the value of  $N_{ST}$  at the equilibrium ( $1/(2Nm+1)$ ) allows  $Nm$  to be calculated. The values obtained for all AHC clades ( $N_{ST} = 0.8$ ,  $Nm \sim 0.13$ ) again suggest that gene flow (in this case, the lateral gene transfer) is insufficient to counteract their genetic differentiation.

The McDonald-Kreitman Test (MKT, McDonald & Kreitman, 1991) was applied to our data sets to detect signs of selection (Table 7). Under neutrality, the ratio of nonsynonymous-to-synonymous fixed substitutions (between species) should be the same as the ratio of nonsynonymous-to-synonymous polymorphism (within species). We observed a high level of fixed replacements between most species studied. In all comparisons the ratio of nonsynonymous-to-synonymous substitutions was higher for fixed differences than for

polymorphisms. This result agrees with the presence of mutations under positive selection spreading quickly through a population. These changes do not contribute to polymorphism but have a cumulative effect on divergence and the fixed NS/S is consequently greater than polymorphic NS/S (Egea et al., 2008). Two of the McDonald-Kreitman tests were not significant, *A. bestiarum* versus *A. salmonicida* and *A. piscicola* (*A. bestiarum* clade 3) versus the other strains of the *A. bestiarum* group.

	<i>A. best</i> clade 1	<i>A. best</i> clade 2	<i>A. best</i> clade 3	<i>A. hyd</i> clade 1	<i>A. hyd</i> clade 2	<i>A. salm</i>
<i>A. bestiarum</i> clade 1	---	0.1703	0.4532	0.1366	0.1068	0.1907
<i>A. bestiarum</i> clade 2	0.7460	---	0.1174	0.0863	0.0683	0.1051
<i>A. bestiarum</i> clade 3	0.5245	0.8099	---	0.1077	0.0833	0.1480
<i>A. hydrophila</i> clade 1	0.7854	0.8529	0.8228	---	0.1264	0.1264
<i>A. hydrophila</i> clade 2	0.8240	0.8798	0.8571	0.6428	---	0.0993
<i>A. salmonicida</i>	0.7239	0.8264	0.7716	0.7982	0.8343	---

Calculated using DnaSP v5.10 software (Librado & Rozas, 2009).

Table 6. Pairwise estimates of population differentiation,  $N_{ST}$  (lower-left) and gene flow,  $Nm$  (upper-right).

	Fixed		Polymorphic		NI	P
	S	NS	S	NS		
<i>A. bestiarum</i> vs. <i>A. hydrophila</i>	83	26	1235	88	0.227	0.000000 ***
<i>A. bestiarum</i> vs. <i>A. salmonicida</i>	57	7	964	77	0.650	0.325391 ns
<i>A. hydrophila</i> vs. <i>A. salmonicida</i>	118	36	1141	86	0.247	0.000000 ***
<i>A. bestiarum</i> (clades 1 and 3) vs. <i>A. bestiarum</i> (clade 2)	88	15	596	43	0.423	0.015757 *
<i>A. bestiarum</i> (clade 1 and 2) vs. <i>A. bestiarum</i> (clade 3)	21	3	659	48	0.510	0.402179 ns
<i>A. hydrophila</i> (clade 1) vs. <i>A. hydrophila</i> (clade 2)	56	16	803	48	0.209	0.000009 ***

Acronyms are for synonymous substitutions (S); nonsynonymous substitutions (NS); neutrality index (NI);  $P$ -value from Fisher's exact test ( $P$ ). \*  $0.01 < P < 0.05$ ; \*\*  $0.001 < P < 0.01$ ; \*\*\*  $P < 0.001$ ; not significant (ns). Calculated using DnaSP v5.10 software (Librado & Rozas, 2009).

Table 7. McDonald-Kreitman Test for molecular evidence of selection.

## 7. Conclusions

Developments in gene sequence analysis have greatly enhanced the study of bacterial population genetics. Gene-wide approaches to mapping bacterial diversity, which have already proved effective for gaining fresh insight into bacterial evolution, have the potential to reveal the phenotypic basis of genetic diversity in the AHC and to investigate the dynamics of this complex bacterial community. The general objective of the work described in this chapter has been to evaluate the suitability of combining population genetics and phylogenetic approaches for the delineation of bacterial species in the AHC, considered by many specialists a taxonomically tangled group.

The results obtained from the linkage disequilibrium analysis and sequence divergence show that the AHC is composed of four robust groups that basically correspond with the

phenotypically described species *A. hydrophila*, *A. bestiarum*, *A. popofii* and *A. salmonicida*. The average divergence between these clusters seems to exclude a significant influence of recombination in the genetic structure of this bacterial group and therefore they are valid taxonomic units, despite the extensive variability within some of them. Phenotypic characteristics lead to the differentiation of five *A. salmonicida* subspecies, but the lack of a consistent signal in our multilocus sequence analysis only allowed the possible differentiation of *A. salmonicida* subsp. *pectinolytica*. Similarly, it is impossible to differentiate between *A. hydrophila* subsp. *hydrophila* and *A. hydrophila* subsp. *ranae*. These results are in agreement with those obtained in a previous study with isolates belonging to the *A. veronii* Group, in which the authors failed to achieve the differentiation of biovars within these *Aeromonas* species (Silver et al., 2011). Nevertheless, *A. hydrophila* subsp. *dhakensis* strains, which cluster together with *A. aquariorum* isolates, exhibited the divergence levels of a biological species and hence deserve full species status. Consequently, the *A. aquariorum* isolates should be reclassified. Finally, in the *A. bestiarum* group we distinguished a clade (clade 3) that includes *A. piscicola* isolates as well as several strains probably misclassified as *A. bestiarum*. This clade seems to constitute an incipient new species with low values of differentiation and species boundaries less well defined than in *A. bestiarum* (clade 1) or *A. popofii* (clade 2).

It has been frequently postulated that in bacterial populations, lateral gene transfer is so common that it precludes the existence of true biological species. One of the aims of this study has been to verify if this hypothesis is applicable to our AHC data. Three lines of evidence suggest the contrary. First of all, using the Tamura Nei model, which best fits our data, we found considerable interspecific nucleotide diversity, suggesting a high degree of divergence that hampers recombination among AHC species. Secondly, the linkage disequilibrium analysis of six loci reveals a strong disequilibrium with  $I_A^S$  values, suggesting little or null influence of recombination in the genetic structure of AHC species. Thirdly, the  $N_{ST}$  values obtained reflect a high degree of differentiation between clades. In short, the genetic structure of the AHC appears to confirm that the entities phenotypically described as species form cohesive groups in which genetic recombination plays a limited role in reducing genetic variation and can be defined as biological species.

Like other authors (Lan & Reeves, 2001; Vinuesa et al., 2005), we agree that a combination of phylogenetic and population genetic studies is currently the best theoretical and practical approach to delineate species as natural and discrete lineages in the bacterial world.

## 8. Acknowledgments

We are very grateful to Katri Berg (University of Helsinki, Finland), Margarita Gomila (Universitat de les Illes Balears, Mallorca, Spain) and Carmen Gallegos (Hospital Sant Llàtzer, Mallorca, Spain) for kindly providing some of the strains used in this study. This research was supported by the project CGL-2008-03281/BOS from the Ministerio de Educación y Ciencia, Spain.

## 9. References

Abbott, L.S.; Cheung, W.K.W. & Janda, M.J. (2003). The genus *Aeromonas*: Biochemical characteristics, atypical reactions, and phenotypic identification schemes. *Journal of Clinical Microbiology*, Vol. 41, No. 6, pp. 2348-2357.

- Beaz-Hidalgo, R.; Alperi, A.; Figueras, M.J. & Romalde, J.L. (2009). *Aeromonas piscicola* sp. nov., isolated from diseased fish. *Systematic and Applied Microbiology*, Vol. 32, No. 7, pp. 471-479.
- Brown, A.D.; Feldman, M.W. & Nevo, E. (1980). Multilocus structure of natural populations of *Hordeum spontaneum*. *Genetics*, Vol. 96, No. 2, pp. 523-536.
- Egea, R.; Casillas, S. & Barbadilla, A. (2008). Standard and generalized McDonald-Kreitman test: a website to detect selection by comparing different classes of DNA sites. *Nucleic Acids Research*, Vol. 36, No. 2, pp. W157-W162.
- Farfán, M.; Miñana-Galbis, D.; Garreta, A.; Lorén, J.G. & Fusté, M.C. (2010). Malate dehydrogenase: a useful phylogenetic marker for the genus *Aeromonas*. *Systematic and Applied Microbiology*, Vol. 33, No. 8, pp. 427-435.
- Feil, E.J.; Maiden, M.C.J.; Achtman, M. & Spratt, B.G. (1999). The relative contributions of recombination and mutation to the divergence of clones of *Neisseria meningitidis*. *Molecular Biology and Evolution*, Vol. 16, No. 11, pp. 1496-1502.
- Feil, E.J.; LI, B.C.; Aanensen, D.M.; Hanage, W.P. & Spratt, B.G. (2004). eBURST: Inferring patterns of evolutionary descent among clusters of related bacterial genotypes from multilocus typing data. *Journal of Bacteriology*, Vol. 186, No. 5, pp. 1518-1530.
- Figueras, M.J.; Soler, L.; Chacón, M.R.; Guarro, J. & Martínez-Murcia, A.J. (2000). Extended method for discrimination of *Aeromonas* spp. by 16S rDNA RFLP analysis. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, Vol. 50, No. 6, pp. 2069-2073.
- Janda, J.M. & Abbott, S. (2010). The genus *Aeromonas*: taxonomy, pathogenicity, and infection. *Clinical Microbiology Reviews*, Vol. 23, No. 1, pp. 35-73.
- Jost, L. (2008).  $G_{ST}$  and its relatives do not measure differentiation. *Molecular Evolution*, Vol. 17, No. 18, pp. 4015-4026.
- Haubold, B.; Travisano, M.; Rainey, P.B. & Hudson, R.R. (1998). Detecting linkage disequilibrium in bacterial populations. *Genetics*, Vol. 150, No. 4, pp. 1341-1348.
- Haubold, B. & Hudson, R.R. (2000). LIAN 3.0: detecting linkage disequilibrium in multilocus data. *Bioinformatics*, Vol. 16, No. 9, pp. 847-848.
- Hudson, R.R. (1994). Analytical results concerning linkage disequilibrium in models with genetic transformation and conjugation. *Journal of Evolutionary Biology*, Vol. 7, No. 5, pp. 535-548.
- 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. *International Journal of Systematic Bacteriology*, Vol. 47, No. 4, pp. 1165-1171.
- Huys, G.; Kämpfer, P.; Albert, M.J.; 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). *International Journal of Systematic Bacteriology*, Vol. 52, No. 3, pp. 705-712.
- Küpfer, M.; Kuhnert, P.; Korczak, B.M.; Peduzzi, R. & Demarta, A. (2006). Genetic relationships of *Aeromonas* strains inferred from 16S rRNA, *gyrB* and *rpoB* gene sequences. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, Vol. 56, No. 12, pp. 2743-2751.
- Lan, R. & Reeves, P.R. (2001). When does a clone deserve a name? A perspective on bacterial species based on population genetics. *Trends in Microbiology*, Vol. 9, No. 9, pp. 419-424.
- Levin, B.R. & Bergstrom, C.T. (2000). Bacteria are different: observations, interpretations, speculations, and opinions about the mechanisms of adaptive evolution in



- prokaryotes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, Vol. 97, No. 13, pp. 6981-6985.
- Li, Y.; Liu, Y.; Zhou, Z.; Huang, H.; Ren, Y.; Zhang, Y.; Li, G.; Zhou, Z. & Wang, L. (2011). Complete genome sequence of *Aeromonas veronii* strain B565. *Journal of Bacteriology*, Vol. 193, No. 13, pp. 3389-3390.
- Librado, P. & Rozas, J. (2009). DnaSP v5: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics*, Vol. 25, No. 11, pp. 1451-1452.
- Maiden, M.C.; Bygraves, J.A.; Feil, E.; Morelli, G.; Russell, J.E.; Urwin, R.; Zhang, Q.; Zhou, J.; Zurth, K.; Caugant, D.A.; Feavers, I.M.; Achtman, M. & Spratt, B.G. (1998). Multilocus sequence typing: a portable approach to the identification of clones within populations of pathogenic microorganisms. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, Vol. 95, No. 6, pp. 3140-3145.
- Martin-Carnahan, A. & Joseph, S.W. (2005). Genus I. *Aeromonas* Stanier 1943, 213<sup>AL</sup>, In: *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Garrity, G.M.; Brenner, D.J.; Krieg, N.R. & Staley, J.T. (eds.), Vol. 2, part B, pp. 557-578, Springer, New York.
- Martínez-Murcia, A.J.; Soler, L.; Saavedra, M.J.; Chacón, M.R.; Guarro, J.; Stackebrandt, E. & Figueras, M.J. (2005). Phenotypic, genotypic, and phylogenetic discrepancies to differentiate *Aeromonas salmonicida* from *Aeromonas bestiarum*. *International Microbiology*, Vol. 8, No. 4, pp. 259-269.
- Martínez-Murcia, A.J.; Saavedra, M.J.; Mota, V.R.; Maier, T.; Stackebrandt, E. & Cousin, S. (2008). *Aeromonas aquariorum* sp. nov., isolated from aquaria of ornamental fish. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, Vol. 58, No. 5, pp. 1169-1175.
- Martínez-Murcia, A.J.; Monera, A.; Saavedra, M.J.; Oncina, R.; López-Alvarez, M.; Lara, E. & Figueras, M.J. (2011). Multilocus phylogenetic analysis of the genus *Aeromonas*. *Systematic and Applied Microbiology*, Vol. 34, No. 3, pp. 189-199.
- Martino, M.E.; Fasolato, L.; Montemurro, F.; Rosteghin, M.; Manfrin, A.; Patarnello, T.; Novelli, E. & Cardazzo, B. (2011). Determination of microbial diversity of *Aeromonas* strains on the basis of multilocus sequence typing, phenotype, and presence of putative virulence genes. *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. 77, No. 14, pp. 4986-5000.
- Maynard-Smith, J. (1991). The population genetics of bacteria. *Proceedings of the Royal Society B Biological Sciences*, Vol. 245, No. 1312, pp. 37-41.
- Maynard-Smith, J.; Smith, N.H.; O'Rourke, M. & Spratt, B.G. (1993). How clonal are bacteria? *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, Vol. 90, No. 10, pp. 4384-4388.
- Maynard-Smith, J. (1995). Do bacteria have population genetics?, In: *Population Genetics of Bacteria*, Baumberg, S.; Young, J.P.W.; Wellington, E.M.H. & Saunders, J.R. (eds.), pp. 1-12, Cambridge University Press, Cambridge.
- McDonald, J.H. & Kreitman, M. (1991). Adaptive protein evolution at the *Adh* locus in *Drosophila*. *Nature*, Vol. 351, pp. 652-654.
- Milkman, R. (1973). Electrophoretic variation in *Escherichia coli* from natural sources. *Science*, Vol. 182, No. 116, pp. 1024-1026.
- Miñana-Galbis, D.; Farfán, M.; Lorén, J.G. & Fusté, M.C. (2002). Biochemical identification and numerical taxonomy of *Aeromonas* spp. isolated from environmental and clinical samples in Spain. *Journal of Applied Microbiology*, Vol. 93, No. 3, pp. 420-430.
- Miñana-Galbis, D.; Farfán, M.; Fusté, M.C. & Lorén, J.G. (2004). Genetic diversity and population structure of *Aeromonas hydrophila*, *Aer. bestiarum*, *Aer. salmonicida* and

- Aer. popoffii* by multilocus enzyme electrophoresis (MLEE). *Environmental Microbiology*, Vol. 6, No. 3, pp. 198-208.
- Miñana-Galbis, D.; Urbizu-Serrano, A.; Farfán, M.; Fusté, M.C. & Lorén, J.G. (2009). Phylogenetic analysis and identification of *Aeromonas* species based on sequencing of the *cpn60* universal target. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, Vol. 59, No. 8, pp. 1976-1983.
- Nei, M., & Kumar, S. (2000). Genetic polymorphism and evolution, In: *Molecular Evolution and Phylogenetics*, pp. 231-264, Oxford University Press, New York.
- Nhung, P.H.; Hata, H.; Ohkusu, K.; Noda, M.; Shah, M.M.; Goto, K. & Ezaki, T. (2007). Use of the novel phylogenetic marker *dnaJ* and DNA-DNA hybridization to clarify interrelationships within the genus *Aeromonas*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, Vol. 57, No. 6, pp. 1232-1237.
- O'Rourke, M. & Stevens, E. (1993). Genetic structure of *Neisseria gonorrhoeae* populations: a non-clonal pathogen. *Journal of General Microbiology*, Vol. 139, No. 11, pp. 2603-2611.
- Orskov, F.; Whittam, T.S.; Cravioto, A. & Orskov, I. (1990). Clonal relationships among classic enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) belonging to different O groups. *The Journal of Infectious Diseases*, Vol. 162, No. 1, pp. 76-81.
- Pérez-Losada, M.; Brown, E.B.; Madsen, A.; Wirth, T.; Viscidi, R.P. & Crandall, K.A. (2006). Population genetics of microbial pathogens estimated from multilocus sequence typing (MLST) data. *Infection, Genetics and Evolution*, Vol. 6, No. 2, pp. 97-112.
- R Development Core Team (2010). *R: a language and environment for statistical computing*, R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria, URL <http://www.r-project.org/>.
- Reith, M.E.; Singh, R.K.; Curtis, B.; Boyd, J.M.; Bouevitch, A.; Kimball, J.; Munholland, J.; Murphy, C.; Sarty, D.; Williams, J.; Nash, J.H.E.; Johnson, S.C. & Brown, L.L. (2008). The genome of *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida* A449: insights into the evolution of a fish pathogen. *BMC Genomics*, Vol. 9, No. 427.
- Roberts, M.S. & Cohan, F.M. (1993). The effect of DNA sequence divergence on sexual isolation in *Bacillus*. *Genetics*, Vol. 134, No. 2, pp. 401-408.
- Robinson, A.; Falush, D. & Feil, E.J. (eds.) (2010). *Bacterial Population Genetics in Infectious Disease*, Wiley & Sons, ISBN 978-0-470-42474-2, New Jersey.
- Roselló-Mora, R. & Amann, R. (2001). The species concept for prokaryotes. *FEMS Microbiology Reviews*, Vol. 25, No. 1, pp. 39-67.
- Ryman, N. & Leimar, O. (2009).  $G_{ST}$  is still a useful measure of genetic differentiation - a comment on Jost's D. *Molecular Ecology*. Vol. 18, No. 10, pp. 2084-2087.
- Saavedra, M.J.; Figueras, M.J. & Martínez-Murcia, A.J. (2006). Updated phylogeny of the genus *Aeromonas*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, Vol. 56, No. 10, pp. 2481-2487.
- Salaun, L.; Audibert, C.; Le Lay, G.; Burocoa, C.; Fauchère, J.L. & Picard, B. (1998). Panmictic structure of *Helicobacter pylori* demonstrated by the comparative study of six genetic markers. *FEMS Microbiology Letters*, Vol. 161, No. 2, pp. 231-239.
- Seshadri, R.; Joseph, S.W.; Chopra, A.K.; Sha, J.; Shaw, J.; Graf, J.; Haft, D.; Wu, M.; Ren, Q.; Rosovitz, M.J.; Madupu, R.; Tallon, L.; Kim, M.; Jin, S.; Vuong, H.; Stine, O.C.; Ali, A.; Horneman, A.J. & Heidelberg, J.F. (2006). Genome sequence of *Aeromonas hydrophila* ATCC 7966: jack of all trades. *Journal of Bacteriology*, Vol. 188, No. 23, pp. 8272-8282.
- Selander, R.K.; Caugant, D.A.; Ochman, H.; Musser, J.M.; Gilmour, M.N. & Whittam, T.S. (1986). Methods of multilocus enzyme electrophoresis for bacterial population

- genetics and systematics. *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. 51, No. 5, pp. 873-884.
- Selander, R.K.; Beltran, P.; Smith, N.H.; Helmuth, R.; Rubin, F.A.; Kopecko, D.J.; Ferris, K.; Tall, B.D.; Cravioto, A. & Musser, J.M. (1990). Evolutionary genetic relationships of clones of *Salmonella* serovars that cause human typhoid and other enteric fevers. *Infection & Immunity*, Vol. 58, No. 7, pp. 2262-2275.
- Silver, A.C.; Williams, D.; Faucher, J.; Horneman, A.J.; Gogarten, J.P. & Graf, J. (2011). Complex evolutionary history of the *Aeromonas veronii* group revealed by host interaction and DNA sequence data. *PLoS ONE*, Vol. 6, No. 2, e16751.
- Soler, L.; Yañez, M.A.; Chacón, M.R.; Aguilera-Arreola, M.G.; Catalán, V.; Figueras, M.J. & Martínez-Murcia, A.J. (2004). Phylogenetic analysis of the genus *Aeromonas* based on two housekeeping genes. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, Vol. 54, No. 5, 1511-1519.
- Stackebrandt, E.; Frederiksen, W.; Garrity, G.M.; Grimont, P.A.D.; Kämpfer, P.; Maiden, M.C.J.; Nesme, X.; Rosselló-Mora, R.; Swings, J.; Trüper, H.G.; Vauterin, L.; Ward, A.C. & Whitman, W.B. (2002). Report of the *ad hoc* committee for the re-evaluation of the species definition in bacteriology. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, Vol. 52, No. 3, 1043-1047.
- 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. *Molecular Biology and Evolution*, DOI: 10.1093/molbev/msr121.
- Touchon, M.; Hoede, C.; Tenaillon, O.; Barbe, V.; Baeriswy, S.; Bidet, P.; Bingen, E.; Bonacorsi, S.; Bouchier, C.; Bouvet, O.; Calteau, A.; Chiapello, H.; Clermont, O.; Cruveiller, S.; Danchin, A.; Diard, M.; Dossat, C.; Karoui, M.E.; Frapy, E.; Garry, L.; Ghigo, J.M.; Gilles, A.M.; Johnson, J.; LeBouguéne, C.; Lescat, M.; Mangenot, S.; Martínez-Jéhanne, V.; Matic, I.; Nassif, X.; Oztas, S.; Petit, M.A.; Pichon, C.; Rouy, Z.; Ruf, C.S.; Schneider, D.; Turret, J.; Vacherie, B.; Vallenet, D.; Médigue, C.; Rocha, E.P.C. & Denamur, E. (2009). Organised genome dynamics in the *Escherichia coli* species results in highly diverse adaptive paths. *PLoS Genetics*, Vol. 5, No. 1, e1000344.
- Vinuesa, P.; Silva, C.; Werner, D. & Martínez-Romero, E. (2005). Population genetics and phylogenetic inference in bacterial molecular systematics: the roles of migration and recombination in *Bradyrhizobium* species cohesion and delineation. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, Vol. 34, No. 1, pp. 29-54.
- Vogel, U., Schoen, C. & Elias, J. (2010). Population genetics of *Neisseria meningitidis*. In: *Bacterial Population Genetics in Infectious Disease*, Robinson, A.; Falush, D. & Feil, E.J. (eds.), pp. 247-267, Wiley & Sons, ISBN 978-0-470-42474-2, New Jersey.
- Vulic, M.; Dionisio, F.; Taddei, F. & Radman, M. (1997). Molecular keys to speciation: DNA polymorphism and the control of genetic exchange in enterobacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, Vol. 94, No. 18, pp. 9763-9767.
- Willems, R.J. (2010). Population genetics of *Enterococcus*. In: *Bacterial Population Genetics in Infectious Disease*, Robinson, A.; Falush, D. & Feil, E.J. (eds.), pp. 195-216, Wiley & Sons, ISBN 978-0-470-42474-2, New Jersey.
- Wright, S. (1940). Breeding structure of populations in relation to speciation. *American Naturalist*, Vol. 74, No. 752, pp. 232-248.
- Zawadzki, P.; Roberts, M.S. & Cohan, F.M. (1995). The log-linear relationship between sexual isolation and sequence divergence in *Bacillus* transformation is robust. *Genetics*, Vol. 140, No. 3, pp. 917-932.



## Short communication

Reclassification of *Aeromonas hydrophila* subspecies *anaerogenes*

David Miñana-Galbis\*, Maribel Farfán, Vicenta Albarral, Ariadna Sanglas, J. Gaspar Lorén, M. Carmen Fusté

Departament de Microbiologia i Parasitologia Sanitàries, Facultat de Farmàcia, Universitat de Barcelona, Av. Joan XXIII s/n, 08028 Barcelona, Spain

## ARTICLE INFO

## Article history:

Received 15 November 2012

Received in revised form 9 April 2013

Accepted 15 April 2013

## Keywords:

*Aeromonas**Aeromonas hydrophila* subspecies *anaerogenes**Aeromonas caviae**Aeromonas hydrophila*

Taxonomy

Reclassification

Housekeeping genes

## ABSTRACT

Technological advances together with the continuous description of new taxa have led to frequent reclassifications in bacterial taxonomy. In this study, an extensive bibliographic revision, as well as a sequence analysis of nine housekeeping genes (*cpn60*, *dnaJ*, *dnaX*, *gyrA*, *gyrB*, *mdh*, *recA*, *rpoB* and *rpoD*) and a phenotypic identification of *Aeromonas hydrophila* subspecies *anaerogenes* were performed. All data obtained from previous physiological, phylogenetic, and DNA–DNA hybridization studies together with those presented in this study suggested that *A. hydrophila* subspecies *anaerogenes* belonged to the species *Aeromonas caviae* rather than *A. hydrophila*. Therefore, the inclusion of *A. hydrophila* subsp. *anaerogenes* in the species *A. caviae* is proposed.

© 2013 Elsevier GmbH. All rights reserved.

Bacterial taxonomy is constantly changing due to the large number of reclassifications and the description of novel taxa. DNA–DNA hybridization remains the gold standard technique for defining bacterial species, particularly when 16S rRNA gene sequence similarity values are higher than 97–98% [36,38]. However, the lack of comparative DNA–DNA hybridization studies on species belonging to highly related genera or the publication of conflicting data has promoted several species reassignments [1,3,18,23]. In contrast, sequence analysis of housekeeping genes provides higher discriminatory power at the interspecific and intraspecific levels than 16S rRNA gene sequence analysis. As an excellent alternative to DNA–DNA reassociation, the advantages of the housekeeping gene technique include the availability for most laboratories, high reproducibility, low cost and speed, and the open access of the resulting sequences in public databases. Analysis of a set of five, or even fewer, housekeeping genes, with a multilocus sequence analysis (MLSA) approach, is useful for species delineation, phylogenetic analysis and population genetic studies [4,9,15,17,21,34,39] and, therefore, this technique could supplant DNA–DNA hybridization.

Taxonomic reclassifications have also resulted from the application of new techniques to classical taxa and the inclusion of data from the description of novel taxa. In the present study, the taxonomic position of *Aeromonas hydrophila* subspecies *anaerogenes*

was re-evaluated and its formal inclusion in *Aeromonas caviae* is proposed.

Anaerogenic strains of *A. hydrophila* were described by Schubert in 1964 [30] under the designation *A. hydrophila* subspecies *anaerogenes*, with strain ATCC 15467<sup>T</sup> (=544<sup>T</sup> = CECT 4221<sup>T</sup> = CIP 76.15<sup>T</sup>) being designated as the type strain. This taxon was included in the description of the genus *Aeromonas* in the 8th edition of *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology* [31]. In a later taxonomic study, Popoff and Véron [27] showed that *A. hydrophila* and *Aeromonas punctata* were grouped into the same cluster in which aerogenic and anaerogenic strains could be divided into two biovars, *A. hydrophila* biovar *hydrophila* and *A. hydrophila* biovar *anaerogenes*, respectively. In this study, Popoff and Véron proposed the emendation of the *A. hydrophila* description with the consideration of *A. punctata* as an illegitimate synonym of *A. hydrophila*, the formal description of *Aeromonas sobria* sp. nov., and the exclusion of *A. hydrophila* subsp. *proteolytica* from the genus *Aeromonas*. Nevertheless, *A. hydrophila* with three subspecies (*A. hydrophila* subsp. *hydrophila*, *A. hydrophila* subsp. *anaerogenes*, and *A. hydrophila* subsp. *proteolytica*) and *A. punctata* with two subspecies (*A. punctata* subsp. *punctata*, and *A. punctata* subsp. *caviae*) were included in the *Approved Lists of Bacterial Names* [32], whereas the name *A. sobria* was not validly published until 1981 [20,28], and *A. hydrophila* subsp. *proteolytica* was reclassified as *Vibrio proteolyticus* in 1980 and validated in 1982 [2,20].

On the basis of DNA–DNA hybridization experiments, Popoff et al. [26] showed that *A. hydrophila* biovar *hydrophila* included

\* Corresponding author. Tel.: +34 93 402 44 97; fax: +34 93 402 44 98.

E-mail address: [davidminyana@ub.edu](mailto:davidminyana@ub.edu) (D. Miñana-Galbis).

three hybridization groups (HGs), *A. hydrophila* biovar *anaerogenes* had up to another three HGs and *A. sobria* two HGs. These HGs correspond to the current species *A. hydrophila* (HG1), *Aeromonas bestiarum* (HG2), *Aeromonas salmonicida* (HG3), *Aeromonas caviae* (HG4), *Aeromonas media* (HG5), *Aeromonas eucrenophila* (HG6), *A. sobria* (HG7), and *Aeromonas veronii* biovar *sobria* (HG8) [13]. In the same study by Popoff et al., the type strain of *A. hydrophila* subsp. *anaerogenes* (strain 544<sup>T</sup>) belonged to the same HG of the type strain of *A. caviae* (strain 545<sup>T</sup> = ATCC 15468<sup>T</sup> = CECT 838<sup>T</sup>), which was an *Aeromonas* species described in the first edition of *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* [25] and validly published in the same year [20]. For this reason, *A. hydrophila* subsp. *anaerogenes* has not been included in the list of species and subspecies of the genus *Aeromonas* described in the last two editions of *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* [13,25] or *The Prokaryotes* [7,8]. In 2002, Huys et al. [10] emended the description of *A. hydrophila* subsp. *hydrophila* and proposed *A. hydrophila* subsp. *dhakensis* as a new *A. hydrophila* subspecies. They also considered the taxonomical status of other *A. hydrophila* subspecies, such as *A. hydrophila* subsp. *anaerogenes* and *A. hydrophila* subsp. *proteolytica*, indicating that, following the description of the genus *Aeromonas* by Popoff [25], *A. hydrophila* subsp. *anaerogenes* should not be considered as a subspecies of *A. hydrophila*. Popoff established that *A. hydrophila* subsp. *anaerogenes* comprised three DNA–DNA hybridization groups, which were subsequently placed in *A. caviae* (groups 239 and 545) and *A. eucrenophila* (strain 546), as already mentioned above. However, as *A. hydrophila* subsp. *anaerogenes* was not validly reclassified, this *Aeromonas* subspecies is still a validated subspecies name [5].

Other evidence has suggested that *A. hydrophila* subsp. *anaerogenes* and *A. caviae* belong to the same taxon. A multilocus enzyme electrophoresis (MLEE) study of *A. hydrophila*, *A. caviae* and *A. sobria* showed that strains 544 (*A. hydrophila* subsp. *anaerogenes*) and 545 (*A. caviae*) belonged to the same zymotype (C<sub>2</sub>), and strain 543 (=ATCC 7966<sup>T</sup> = CECT 839<sup>T</sup>), the type strain of *A. hydrophila*, constituted a distinct zymotype (H<sub>3</sub>) [24]. In a phylogenetic study of the genera *Aeromonas* and *Plesiomonas* [14], the 16S rRNA gene sequence of the type strain of *A. hydrophila* subsp. *anaerogenes* (GenBank accession no. X60409) was reported to exhibit 2 and 16 nucleotide differences with those of the type strains of *A. caviae* (GenBank accession no. X60408) and *A. hydrophila* subsp. *hydrophila* (GenBank accession no. X60404), respectively. More recently, different phylogenetic studies based on sequence analysis of housekeeping genes [6,11,12,33], such as *gyrB*, *mdh*, *rpoB* and *rpoD*, and the multilocus sequence analysis (MLSA) published by Martínez-Murcia et al. [15] and Roger et al. [29], have shown that the type strain of *A. hydrophila* subsp. *anaerogenes* clusters with the *A. caviae* type strain at sequence distances within the ranges of intraspecific values, and they should be considered as synonyms.

In this current study, sequences of nine genes (*cpn60*, *dnaJ*, *dnaX*, *gyrA*, *gyrB*, *mdh*, *recA*, *rpoB* and *rpoD*) were analyzed from the type strains of *A. hydrophila* subsp. *anaerogenes*, *A. caviae* and *A. hydrophila* subsp. *hydrophila* taken from either GenBank or those previously obtained by our group (Supplementary material in SAM Online). Sequence alignments and Jukes-Cantor distances were obtained using the MEGA5 software [35]. The distance values obtained by comparing the gene sequences of *A. hydrophila* subsp. *anaerogenes* CECT 4221<sup>T</sup> and *A. caviae* CECT 838<sup>T</sup> were <3%, which was below the interspecific threshold values [6,11,15,19]. In contrast, *A. hydrophila* subsp. *anaerogenes* CECT 4221<sup>T</sup> and *A. hydrophila* subsp. *hydrophila* CECT 839<sup>T</sup> showed distance values higher than 4.5%, and therefore should be considered as different species (Table 1). Distance values from the concatenated sequences were 1.96% between *A. hydrophila* subsp. *anaerogenes* and *A. caviae*, and 7.41% between *A. hydrophila* subsp. *anaerogenes* and *A. hydrophila*

**Table 1**

Sequence distances (%) and nucleotide differences between *A. hydrophila* subsp. *anaerogenes* CECT 4221<sup>T</sup> and the type strains of *A. caviae* and *A. hydrophila*.

Genes (num. of nt analyzed)	<i>A. caviae</i>	<i>A. hydrophila</i>
Concatenated (6642 nt)		
nt differences	127	464
Jukes-Cantor distances	1.96%	7.41%
<i>cpn60</i> (555 nt)		
nt differences	3	39
Jukes-Cantor distances	0.54%	7.38%
<i>dnaJ</i> (843 nt)		
nt differences	15	78
Jukes-Cantor distances	1.80%	9.88%
<i>dnaX</i> (492 nt)		
nt differences	11	42
Jukes-Cantor distances	2.27%	9.06%
<i>gyrA</i> (705 nt)		
nt differences	4	34
Jukes-Cantor distances	0.57%	4.98%
<i>gyrB</i> (1113 nt)		
nt differences	28	56
Jukes-Cantor distances	2.56%	5.21%
<i>mdh</i> (936 nt)		
nt differences	22	68
Jukes-Cantor distances	2.39%	7.64%
<i>recA</i> (597 nt)		
nt differences	17	40
Jukes-Cantor distances	2.90%	7.02%
<i>rpoB</i> (516 nt)		
nt differences	11	24
Jukes-Cantor distances	2.16%	4.80%
<i>rpoD</i> (816 nt)		
nt differences	16	83
Jukes-Cantor distances	1.99%	10.93%

subsp. *hydrophila*. All gene sequence alignments are available as Supplementary material in SAM Online.

As the type strain of *A. hydrophila* subsp. *anaerogenes* is considered to belong to the species *A. caviae*, few phenotypic studies of the genus *Aeromonas* have included this strain in recent years [22,37]. For this reason, strains *A. hydrophila* subsp. *anaerogenes* CECT 4221<sup>T</sup>, *A. caviae* CECT 838<sup>T</sup> and *A. hydrophila* subsp. *hydrophila* CECT 839<sup>T</sup> were analyzed by 16 key phenotypic tests useful for the phenotypic differentiation of *Aeromonas* species [16]. The results obtained for the type strains of *A. caviae* and *A. hydrophila* subsp. *hydrophila* were identical to those previously described [16], and strain CECT 4221<sup>T</sup> (*A. hydrophila* subsp. *anaerogenes*) showed identical phenotypic features to those of CECT 838<sup>T</sup> (*A. caviae*). Five key tests allowed a clear phenotypic differentiation between *A. hydrophila* subsp. *hydrophila* and *A. caviae*/*A. hydrophila* subsp. *anaerogenes* type strains, whereas, in contrast to *A. hydrophila* subsp. *anaerogenes* CECT 4221<sup>T</sup> and *A. caviae* CECT 838<sup>T</sup>, *A. hydrophila* subsp. *hydrophila* CECT 839<sup>T</sup> was positive for the lysine decarboxylase and Voges–Proskauer tests and the production of gas from D-glucose, as well as hydrogen sulfide from cysteine and elastase.

On the basis of bibliographic data from previous phylogenetic, MLSA, MLEE and DNA–DNA hybridization studies and new evidence from physiological tests and distance values obtained from the housekeeping gene analysis performed in this study, the reclassification of *A. hydrophila* subsp. *anaerogenes* to *A. caviae* is proposed, with the consequent loss of its taxonomic rank as a subspecies.

## Acknowledgements

We would like to thank M. Palau for her contribution to this study. This work has been supported by a project from the Ministerio de Educación y Ciencia, Spain (CGL2008-03281/BOS).

## Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at <http://dx.doi.org/10.1016/j.syapm.2013.04.006>.

## References

- [1] Ara, I., Tsetseg, B., Daram, D., Suto, M., Ando, K. (2012) *Herbidospira mongolien-sis* sp. nov., isolated from soil, and reclassification of *Herbidospira osyris* and *Streptosporangium claviforme* as synonyms of *Herbidospira cretacea*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 62, 2322–2329.
- [2] Baumann, P., Baumann, L., Bang, S.S., Woolkalis, M.J. (1980) Reevaluation of the taxonomy of *Vibrio*, *Beneckeia*, and *Photobacterium*: abolition of the genus *Beneckeia*. *Curr. Microbiol.* 4, 127–132.
- [3] Coorevits, A., Dinsdale, A.E., Halket, G., Lebbe, L., De Vos, P., Van Landschoot, A., Logan, N.A. (2012) Taxonomic revision of the genus *Geobacillus*: emendation of *Geobacillus*, *G. stearothermophilus*, *G. jurassicus*, *G. toebii*, *G. thermodenitrificans* and *G. thermoglucosidans* (nom. corr., formerly 'thermoglucosidiasus'); transfer of *Bacillus thermantarcticus* to the genus as *G. thermantarcticus* comb. nov.; proposal of *Caldibacillus debilis* gen. nov., comb. nov.; transfer of *G. tepidamans* to *Anoxybacillus* as *A. tepidamans* comb. nov.; and proposal of *Anoxybacillus caldiproteolyticus* sp. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 62, 1470–1485.
- [4] de la Haba, R.R., Márquez, M.C., Papke, R.T., Ventosa, A. (2012) Multilocus sequence analysis of the family *Halomonadaceae*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 62, 520–538.
- [5] Euzéby, J.P. 2012 List of Prokaryotic Names with Standing in Nomenclature <http://www.bacterio.net>
- [6] Farfán, M., Miñana-Galbis, D., Garreta, A., Lorén, J.G., Fusté, M.C. (2010) Malate dehydrogenase: a useful phylogenetic marker for the genus *Aeromonas*. *Syst. Appl. Microbiol.* 33, 427–435.
- [7] Farmer, J.J., III, Arduino, M.J., Hickman-Brenner, F.W. (1992) The genera *Aeromonas* and *Plesiomonas*. In: Balows, A., Trüper, H.G., Dworkin, M., Harder, W., Schleifer, K.H. (Eds.), *The Prokaryotes: A Handbook on the Biology of Bacteria*, 2nd ed., Springer-Verlag, New York, pp. 3012–3045.
- [8] Farmer, J.J., III, Arduino, M.J., Hickman-Brenner, F.W. (2006) The genera *Aeromonas* and *Plesiomonas*. In: Dworkin, M., Falkow, S., Rosenberg, E., Schleifer, K.H., Stackebrandt, E. (Eds.), *The Prokaryotes: A Handbook on the Biology of Bacteria*, vol. 6, 3rd ed., Springer, New York, pp. 564–596.
- [9] Fusté, M.C., Farfán, M., Miñana-Galbis, D., Albarral, V., Sanglas, A., Lorén, J.G. (2012) Population genetics of the "*Aeromonas hydrophila* species complex". In: Fusté, M.C. (Ed.), *Studies in Population Genetics*, InTech, Rijeka, pp. 39–54.
- [10] Huys, G., Kämpfer, P., Albert, M.J., 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.
- [11] Küpfer, M., Kuhnert, P., Korczak, B.M., Peduzzi, R., Demarta, A. (2006) Genetic relationships of *Aeromonas* strains inferred from 16S rRNA, *gyrB* and *rpoB* gene sequences. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 56, 2743–2751.
- [12] Lamy, B., Laurent, F., Kodjo, A. (2010) Validation of a partial *rpoB* gene sequence as a tool for phylogenetic identification of aeromonads isolated from environmental sources. *Can. J. Microbiol.* 56, 217–228.
- [13] Martin-Carnahan, A., Joseph, S.W. (2005) Genus I. *Aeromonas* Stanier 1943, 213<sup>Al</sup>, in: Garrity, G.M., Brenner, D.J., Krieg, N.R., Staley, J.T. (Eds.), *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology: Part B*, vol. 2, 2nd ed., Springer, New York, pp. 557–578.
- [14] Martínez-Murcia, A.J., Benlloch, S., Collins, M.D. (1992) Phylogenetic interrelationships of members of the genera *Aeromonas* and *Plesiomonas* as determined by 16S ribosomal DNA sequencing: lack of congruence with results of DNA–DNA hybridizations. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 42, 412–421.
- [15] Martínez-Murcia, A.J., Monera, A., Saavedra, M.J., Oncina, R., López-Alvárez, M., Lara, E., Figueras, M.J. (2011) Multilocus phylogenetic analysis of the genus *Aeromonas*. *Syst. Appl. Microbiol.* 34, 189–199.
- [16] Miñana-Galbis, D., Farfán, M., Lorén, J.G., Fusté, M.C. (2010) Proposal to assign *Aeromonas diversa* sp. nov. as a novel species designation for *Aeromonas* group 501. *Syst. Appl. Microbiol.* 33, 15–19.
- [17] Miñana-Galbis, D., Farfán, M., Lorén, J.G., Fusté, M.C. (2010) The reference strain *Aeromonas hydrophila* CIP 57.50 should be reclassified as *Aeromonas salmonicida* CIP 57.50. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 60, 715–717.
- [18] Miñana-Galbis, D., Pinzón, D.L., Lorén, J.G., Manresa, À., Oliart-Ros, R.M. (2010) Reclassification of *Geobacillus pallidus* (Scholz et al. 1988) Banat et al. 2004 as *Aeribacillus pallidus* gen. nov., comb. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 60, 1600–1604.
- [19] Miñana-Galbis, D., Urbizu-Serrano, A., Farfán, M., Fusté, M.C., Lorén, J.G. (2009) Phylogenetic analysis and identification of *Aeromonas* species based on sequencing of the *cpn60* universal target. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 59, 1976–1983.
- [20] Moore, W.E.C., Cato, E.P., Moore, L.V.H. (1985) Index of the bacterial and yeast nomenclatural changes published in the *International Journal of Systematic Bacteriology* since the 1980 Approved Lists of Bacterial Names (1 January 1980 to 1 January 1985). *Int. J. Syst. Bacteriol.* 35, 382–407.
- [21] Mulet, M., Lalucat, J., García-Valdés, E. (2010) DNA sequence-based analysis of the *Pseudomonas* species. *Environ. Microbiol.* 12, 1513–1530.
- [22] Noterdaeme, L., Bigawa, S., Steigerwalt, A.G., Brenner, D.J., Ollevier, F. (1996) Numerical taxonomy and biochemical identification of fish-associated motile *Aeromonas* spp. *Syst. Appl. Microbiol.* 19, 624–633.
- [23] Pang, H., Kitahara, M., Tan, Z., Wang, Y., Qin, G., Ohkuma, M., Cai, Y. (2012) Reclassification of *Lactobacillus kimchii* and *Lactobacillus bobalius* as later subjective synonyms of *Lactobacillus paralimentarius*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 62, 2383–2387.
- [24] Picard, B., Goulet, P. (1985) Comparative electrophoretic profiles of esterases, and of glutamate, lactate and malate dehydrogenases, from *Aeromonas hydrophila*, *A. caviae* and *A. sobria*. *J. Gen. Microbiol.* 131, 3385–3391.
- [25] Popoff, M. (1984) Genus III *Aeromonas* Kluver and Van Niel 1936, 398<sup>Al</sup>, in: Krieg, N.R., Holt, J.G. (Eds.), *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, vol. 1, 1st ed., The Williams & Wilkins Co., Baltimore, pp. 545–548.
- [26] Popoff, M., Coynault, C., Kiredjian, M., Lemelin, M. (1981) Polynucleotide sequence relatedness among motile *Aeromonas* species. *Curr. Microbiol.* 5, 109–114.
- [27] Popoff, M., Véron, M. (1976) A taxonomic study of the *Aeromonas hydrophila*–*Aeromonas punctata* group. *J. Gen. Microbiol.* 94, 11–22.
- [28] Popoff, M., Véron, M. (1981) Validation of the publication of new names and new combinations previously effectively published outside the IJSB, list No. 6. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 31, 215–218.
- [29] Roger, F., Marchandin, H., Jumas-Bilak, E., Kodjo, A., the colBVH study group, Lamy, B. (2012) Multilocus genetics to reconstruct aeromonad evolution. *BMC Microbiol.* 12, 62.
- [30] Schubert, R.H.W. (1964) Zur Taxonomie der anaerogenen Aeromonaden. *Zentralbl. Bakteriol. Parasitenk. Infektionskr. Hyg. Abt. I Orig.* 193, 343–352.
- [31] Schubert, R.H.W. (1974) Genus II. *Aeromonas* Kluver and Van Niel, 1936, 398. In: Buchanan, R.E., Gibbons, N.E. (Eds.), *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, 8th ed., The Williams & Wilkins Co., Baltimore, pp. 345–348.
- [32] Skerman, V.B.D., McGowan, V., Sneath, P.H.A. (1980) Approved lists of bacterial names. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 30, 225–420.
- [33] Soler, L., Yáñez, M.A., Chacón, M.R., Aguilera-Arreola, M.G., Catalán, V., Figueras, M.J., Martínez-Murcia, A.J. (2004) Phylogenetic analysis of the genus *Aeromonas* based on two housekeeping genes. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 54, 1511–1519.
- [34] Stackebrandt, E., Frederiksen, W., Garrity, G.M., Grimont, P.A.D., Kämpfer, P., Maiden, M.C.J., Nesme, X., Rosselló-Móra, R., Swings, J., Trüper, H.G., Vauterin, L., Ward, A.C., Whitman, W.B. (2002) Report of the ad hoc committee for the re-evaluation of the species definition in bacteriology. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 52, 1043–1047.
- [35] 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.
- [36] Tindall, B.J., Rosselló-Móra, R., Busse, H.-J., Ludwig, W., Kämpfer, P. (2010) Notes on the characterization of prokaryote strains for taxonomic purposes. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 60, 249–266.
- [37] Valera, L., Esteve, C. (2002) Phenotypic study by numerical taxonomy of strains belonging to the genus *Aeromonas*. *J. Appl. Microbiol.* 93, 77–95.
- [38] Yarza, P., Ludwig, W., Euzéby, J., Amann, R., Schleifer, K.H., Glöckner, F.O., Rosselló-Móra, R. (2010) Update of the all-species living tree project based on 16S and 23S rRNA sequence analyses. *Syst. Appl. Microbiol.* 33, 291–299.
- [39] Zeigler, D. (2003) Gene sequences useful for predicting relatedness of whole genomes in bacteria. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 53, 1893–1900.





Transworld Research Network  
37/661 (2), Fort P.O.  
Trivandrum-695 023  
Kerala, India

Recent Advances in Pharmaceutical Sciences III, 2013: 179-193 ISBN: 978-81-7895-605-3  
Editors: Diego Muñoz-Torrero, Amparo Cortés and Eduardo L. Mariño

## 11. The effect of recombination in *Aeromonas*

Maribel Farfán<sup>1,2</sup>, Vicenta Albarral<sup>1,2</sup>, Ariadna Sanglas<sup>1,2</sup>, J. Gaspar Lorén<sup>1</sup>  
and M. Carmen Fusté<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Departament de Microbiologia i Parasitologia Sanitàries, Facultat de Farmàcia, Universitat de Barcelona. Av. Joan XXIII s/n, 08028 Barcelona, Spain; <sup>2</sup>Institut de Recerca de la Biodiversitat (IRBio), Universitat de Barcelona. Av. Diagonal 643, 08028 Barcelona, Spain

**Abstract.** Although several approaches have been attempted, the estimation of recombination frequencies in natural populations of bacteria remains challenging. Previous studies have demonstrated a wide variety of situations among bacterial species, ranging from the clonal diversification of *Salmonella* or *Escherichia coli*, which are mainly due to mutation, to the frequent recombination found in *Neisseria gonorrhoeae* or *Helicobacter pylori*. Most of the population studies done with bacterial species suggest that recombination occurs in nature but that it is infrequent compared to mutation. Consequently, bacterial populations consist largely of independent clonal lineages. Our research suggests little or null influence of recombination in the genetic structure of 'Aeromonas hydrophila Species Complex', despite the presence of some strains with recombinant gene fragments.

### Introduction

Bacteria reproduce asexually, giving two identical individuals after their division, with the exception of changes produced by mutation or recombination. Although this reproduction process is not associated with

Correspondence/Reprint request: Dr. Maribel Farfán, Departament de Microbiologia i Parasitologia Sanitàries Facultat de Farmàcia, Universitat de Barcelona. Av. Joan XXIII s/n, 08028 Barcelona, Spain  
E-mail: mfarfan@ub.edu



recombination, in contrast with eukaryotes, bacteria have acquired three basic mechanisms by which they can incorporate genes from other bacterial species: transformation, conjugation, and transduction. Nevertheless, although bacteria might incorporate foreign genes from other species, their genomes are not simply arbitrary assortments of genes of mixed heritage. Once the bacterial cells acquire genes by means of one of these mechanisms, they have to be incorporated into a replicon; if not, the introduced genes would become diluted in the population or degraded by the restriction endonucleases. Bacterial interchange promotes the acquisition of novel genetic elements, the impact of which has been extensively studied in human and animal pathogens and commensals, where they are often associated with the emergence of new phenotypes [1]. Recombination in bacteria is: always restricted to small DNA fragments, unidirectional, independent of reproduction, and occurs with a relatively low frequency, although genes codifying virulence factors or antibiotic resistance experiment more frequent recombination changes. The incorporation of genes or parts of genes through recombination always results in mosaic genomes that are composed of regions with different evolutionary histories [2]. Homologous recombination is widespread in the genomes of many bacteria, and is usually a consequence of *recA* mediated homology-dependant recombination. When the incorporated fragment replaces an identical DNA sequence its effect cannot be detected, although the process seems to be very frequent when the two bacteria involved in this interchange are closely related. Homologous recombination in this case might play a crucial role in DNA repair [3]. On the contrary, if recombination has a measurable effect on the genome of the recipient, it is considered as an effective recombination event.

The impact of recombination on bacterial phylogenies has been the subject of considerable discussion [4-9]. Recently, with the availability of sequencing techniques and the analytical power of new programmes, the detection of recombination events has increased dramatically. This has led to the questioning of existing phylogenies and the methods used for their construction, such as Maximum Likelihood (ML) and Maximum Parsimony (MP), which assume that the analyzed sequences have the same evolutionary history. The presence of recombination would break this assumption, since in this case sequences would have different underlying phylogenies that are more easily envisaged as a network rather than a tree. Due to the importance of recombination in evolutionary analysis, it is essential to be able to identify whether a given set of sequences has undergone recombination events, define the boundaries of the recombinational units, and evaluate the impact of recombination on our ability to reconstruct evolutionary histories and estimate population genetic parameters.

To investigate genetic exchange in bacteria, large data sources have been used, such as those deposited in the Multi Locus Sequence Typing (MLST) databases at [www.mlst.net](http://www.mlst.net) [10]. Multilocus data allow us to determine the degree of recombination based on the type of population structure. If the population shows a clonal structure (linkage disequilibrium), then recombination is absent and the accumulated genetic changes will be a consequence of mutation. However, in the case of bacteria, this assumption is not always true and the clonal structure is not always broken, even if a certain degree of recombination is present [11, 12].

The increasing availability of whole genome sequences has enabled a more complete study of the recombination process in bacteria. The genes sequenced in a MLST study (usually six or seven) are not always representative of the entire genome, and can give biased results. The analyzed sequences do not correspond to the complete gene, only fragments of about 400-500 bp, so the changes determined cannot be representative of the full gene, particularly in the case of a protein-coding gene. Unfortunately, full genome sequences that could obviate all these questions are still usually limited to a few isolates of each species and frequently have been chosen for specific reasons (clinical, environmental or industrial, etc.), so are not representative of the entire population.

In this study we will consider the impact of recombination on bacterial phylogenies and the consequences of inaccurate approaches to inferring phylogenetic relationships. Traditionally, recombination in a given set of sequences has been identified by the incongruence of the different gene trees analyzed, the presence of mosaic structures, and variations in the G+C content or the codon bias. Several methods have been developed to test the presence of recombination in a given set of sequences, and to identify the parental and recombinant individuals or the recombinational break-points. Those methods can be classified in different categories: similarity, distance, phylogenetic, compatibility, and nucleotide substitution distribution [13, 14]. The performance of these methods varies depending on the level of recombination, but in general most of them are efficient, and although they can have trouble in detecting recombination when the level of divergence is low, their discriminatory power increases when the level of recombination is high [5]. In addition, methods that use the substitution patterns or incompatibility among sites seem to be more powerful than those based on phylogenetic incongruence. This might be partially explained by the fact that, in general, phylogenetic methods can only detect recombination events that change the topology of the tree, and at high recombination rates there should be many such events [5]. What is important is to increase the chances of detecting recombination while minimizing the detection of false positives, so

the chosen method will depend on the level of divergence among the sequences analysed [15, 16]. In either case, the best option is not to rely on a single method to detect recombination [13, 17].

## 1. Recombination in bacteria

Although several approaches have been attempted, the estimation of recombination frequencies in natural populations of bacteria remains challenging. One of the parameters commonly used is the determination of the rate of recombination relative to mutation [18], but this is not always easy to calculate, except in the case of the most recent events [4], which might not be representative of the entire history of the population.

The determination of the relative importance of mutation in comparison with recombination is central to bacterial population genetics [18]. Previous studies have demonstrated a wide variety of situations among bacterial species, ranging from the clonal diversification of *Salmonella* [19] or *Escherichia coli* [20], which are mainly due to mutation, to the frequent recombination found in *Neisseria gonorrhoeae* [21] or *Helicobacter pylori* [22]. Most of the population studies done with bacterial species suggest that recombination occurs in nature, and indeed may be highly important in generating variation, but that it is infrequent compared to mutation. Consequently, bacterial populations consist largely of independent clonal lineages.

Comparison of results from analyses performed with different methodologies is problematic; nevertheless, studies using the same methods across different genera have suggested wide variation in recombination rates with value differences of two or three orders of magnitude [23]. In addition, conflicting levels of recombination have been obtained for concrete bacterial species, such as *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus* or *Haemophilus influenzae* [24], depending on the sampling and analytical methodologies used. The analyzed isolates have to be sampled carefully in order to be informative about the underlying recombination process. If they are not representative of the whole population, an important bias might be introduced. Unfortunately, in most of the populations studied, particularly in the case of pathogen bacteria, samples are not fully representative, usually with an overrepresentation of virulent strains, which are frequently under higher selective forces than the corresponding non-virulent strains.

Recombination studies using whole genome data have contributed to a better understanding of recombination in bacteria. Several studies have reported differences in the prevalence of recombination at different regions of the same bacterial genome [25], being apparently higher in those genes under

positive selection [25, 26]. Genomic regions encoding proteins with a role in pathogenicity are often under positive selection and frequently exhibit high rates of recombination, even in the case of bacteria in which recombination is relatively rare [28, 29]. A possible explanation for the relative prevalence of recombination in positive selected regions of the bacterial genome is that the only observable recombination is likely to be the one that unites beneficial mutations and removes deleterious ones.

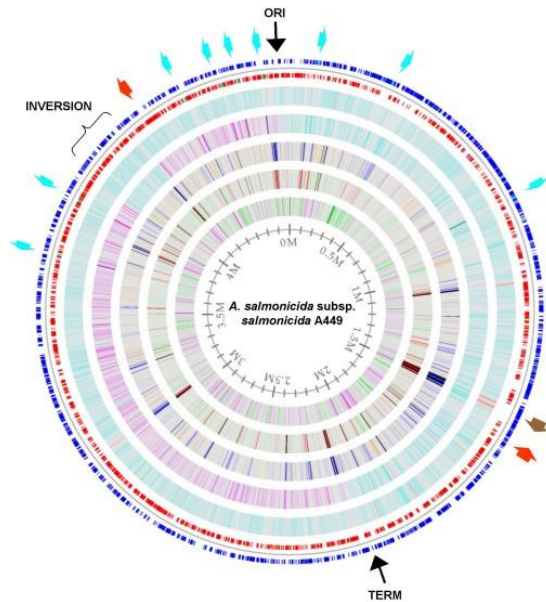
## 2. The genus *Aeromonas*

The genus *Aeromonas* Stanier 1943 belongs to the family *Aeromonadaceae* within the class *Gammaproteobacteria* [30]. Aeromonads are autochthonous inhabitants of aquatic environments, including chlorinated and polluted waters, although they can also be isolated from a wide variety of environmental and clinical sources. They cause infections in vertebrates and invertebrates, such as frogs, birds, various fish species, and domestic animals. In recent years, some authors have considered *Aeromonas* as an emergent pathogen in humans, producing intestinal and extraintestinal diseases. Aeromonads are facultative anaerobic chemoorganotrophs capable of anaerobic nitrate respiration and dissimilatory metal reduction [30].

Several attempts have been made to generate phylogenies using DNA gene sequences to reconstruct the correct genealogical ties among species in *Aeromonas* [31-33], but the genes chosen for this purpose are not always suitable, and do not necessarily give congruent phylogenies [34, 35]. Recently, two papers presenting MLST schemes for *Aeromonas* have been published [10, 36], and there is an online MLST database for the genus *Aeromonas*, managed by Keith Jolley and curated by Barbara Cardazzo (<http://pubmlst.org/aeromonas>). All this accumulated data should help to establish a reliable clustering of the *Aeromonas* species and elucidate their exact boundaries.

Finally, the availability of complete genomes of different species is also useful in this task, but unfortunately, in the case of *Aeromonas*, only six genomes have been completed to date, corresponding to: the type strain of *A. hydrophila* ATCC 7966, isolated from a tin of milk [37]; the strain A449 of *A. salmonicida*, a fish pathogen described by Reith *et al.* ([38], Fig. 1); an *A. caviae* strain Ae398 isolate from a stool sample [39]; an *A. veronii* strain B565 isolated from an aquaculture pond sediment [40]; and more recently, an *A. aquariorum* strain AAK1 isolated from blood [41] and the highly melanin-yielding *A. media* strain WS [42]. The information given by the genomes of *A. hydrophila* and *A. salmonicida* indicates that while they are of identical size (4.7Mb) and share multiple housekeeping and virulence genes, *A. salmonicida*

has acquired several mobile genetic elements, and undergone genome rearrangements and loss of genes in the process of adapting to a specific host. The genome of *A. veronii* is smaller (4.3Mb) and contains fewer virulence genes. Similarly, *A. caviae* presents a small genome (4.43Mb), but in contrast to *A. veronii* several putative virulence genes have been identified, as in *A. aquariorum*, which has the biggest genome reported for *Aeromonas* (4.81Mb). The last genome completed corresponds to an *A. media* strain (4.3Mb) in which no virulence genes have been reported.



**Figure 1.** A genome atlas representation of the *A. salmonicida* subsp. *salmonicida* A449 chromosome (ref. [38]).

### 3. The ‘*Aeromonas hydrophila* species complex’

An example of the taxonomic complexity of the genus *Aeromonas* is the difficulty in discriminating between the phenotypically and genetically closely related species belonging to the “*Aeromonas hydrophila* species complex” (AHC), which includes: *A. hydrophila*, composed of three subspecies: *A. hydrophila* subsp. *hydrophila*, *A. hydrophila* subsp. *ranae* and *A. hydrophila* subsp. *dhakensis*, *A. bestiarum*, *A. popoffii*, and *A. salmonicida*,

divided in five subspecies: *A. salmonicida* subsp. *salmonicida*, *A. salmonicida* subsp. *masoucida*, *A. salmonicida* subsp. *achromogenes*, *A. salmonicida* subsp. *pectinolytica*, and *A. salmonicida* subsp. *smithia* [30, 43]. Recently, two additional species have been described in this group, *A. aquariorum* and *A. piscicola* [44, 45]. Members of the AHC were first described as strains producing the enzymes elastase, lecithinase or stapholysin [46]. They are genetically closely related and share multiple phenotypic characteristics, which makes discrimination among the species included in this group extremely difficult [43].

In order to establish the population structure and divergence of the species included in the AHC group, Fusté *et al.* [12] studied a set of representative strains, in which they analyzed the nucleotide sequences (total or partial) of 6 housekeeping genes. The authors concluded, from the linkage disequilibrium analysis and sequence divergence results, that the AHC is composed of four robust groups that basically correspond with the phenotypically described species *A. hydrophila*, *A. bestiarum*, *A. popoffii*, and *A. salmonicida*, in which recombination, if present, does not break their clonal structure.

#### 4. Population structure and recombination in *Aeromonas*

The few references in the bibliography dealing with recombination in *Aeromonas* reach similar conclusions about its low incidence, with the exception of the study by Silver *et al.* [35], which reports a notable effect of recombination in the “*A. veronii* species complex”. In this study, the strains were obtained from patients, veterinary samples, and medicinal leeches. The aligned sequences were investigated for evidence of recombination because the maximum-likelihood inferred phylogenies for each gene family showed low bootstrap support for most clades. Applying two tests for recombination, employing a variety of approaches, it was demonstrated that at least for some strains, horizontal gene transfer occurs at a sufficient frequency to blur the signal from vertically inherited genes, despite strains being adapted to distinct niches.

Martino *et al.* [11] analyzed a collection of *Aeromonas* including 23 type and reference strains, and 77 strains isolated from fish, crustaceans and molluscs in a MLST study using 6 housekeeping genes. Based on an eBURST analysis, the authors determined the recombination/mutation ( $r/m$ ) ratio for the entire population and for the three major groups identified. The  $r/m$  values obtained (ranging between 0.07 and 0.13) suggest a reduced rate of recombination. Analysis with the SplitsTree program revealed that most of the genes, although showing a reticulate network, were not significantly affected by intragenic recombination with the exception of *recA*. When a set

of programmes included in the RDP3 package were applied to the *Aeromonas* sequences, several recombination events were identified supported by at least three of those programmes. Nevertheless, they concluded that, in the case of *Aeromonas*, the impact of recombination may be negligible, based on the very similar topologies of the phylogenetic trees, the low *r/m* rates, and the reduced network structure determined by the split decomposition analysis.

Roger *et al.* [47], in a MLST study that includes isolates from different origins but with a particularly high representation of clinical strains, determined that the standardized  $I_A$  ( $I_A^S$ ) values showed the existence of significant linkage disequilibrium, indicative of a clonal population structure. When using at least four methods of the RDP software, they detected some recombination among the population in all but two of the seven loci analyzed. In addition, the use of split decomposition determined that most of the sequence types (STs) were not affected by recombination, even though more recombination events were found within the clonal complexes, particularly for the STs in the *A. caviae* clade. Differences in branching order were observed in both distance and ML trees when gene and concatenated sequence trees were compared, suggesting the occurrence of recombination. The authors conclude that recombination is present in the genus *Aeromonas*, at least in some strains, but at a relatively low frequency.

Finally, our group determined the genetic population structure of a group of *Aeromonas* corresponding to the AHC [12], which had been previously analyzed by enzyme electrophoresis (MLEE), revealing a clear clonal structure with strong linkage disequilibrium among 15 different protein loci [48]. We used a higher number of AHC isolates including representatives of *A. piscicola* [45] and *A. aquariorum* [44], two more recently described strains grouped within the AHC. The  $I_A^S$  values obtained in this study were different from 0 in all cases, indicating the absence of recombination and again, revealing strong linkage disequilibrium when considering both the total population and the different sets of species. This is in spite of the high number of alleles per locus and polymorphic sites and huge genetic diversity.

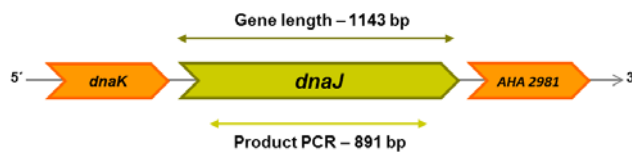
During the last years, with the availability of the first DNA sequence data of individual genes, evidence of recombination at the molecular level has accumulated for *Aeromonas* in housekeeping genes such as *dnaJ*, *gyrB* and *recA* [11, 35, 47] or structural and accessory genes [35]. In our study we have also determined the presence of potential recombinant fragments in the *recA* and *dnaJ* genes of some strains. However, although these strains cluster separately when the corresponding gene tree is constructed, revealing a possible different origin of the gene fragments, they group together with the other strains of the same species when a concatenated tree is generated. This confirms that recombination is not sufficient to break the genetic cohesion of this group.

## 5. Intragenic recombination in the *dnaJ* gene of the ‘*Aeromonas hydrophila* species complex’

We have recently studied the possible existence of recombination in the *dnaJ* gene (Fig. 2) in an AHC group with 90 strains (87% of environmental and 13% of clinical origin). Group I included 29 *A. salmonicida* strains (5 subspecies), Group II 31 strains (22 *A. bestiarum*, 5 *A. popoffii* and 4 *A. piscicola*) and Group III 30 strains (26 *A. hydrophila* and 4 *A. aquariorum*). Gene sequences used were obtained from our previous work [12]. We added a new strain *A. hydrophila* JCM 3968 (GenBank accession numbers: JN711671 (*dnaJ*), JN711562 (*cpn60*), JN711795 (*gyrB*), KC525968 (*mdh*), KC525969 (*recA*) and JN712375 (*rpoD*)). We determined the presence of mosaic structures, different G+C content and codon usage bias in the sequences but none of the results were conclusive.

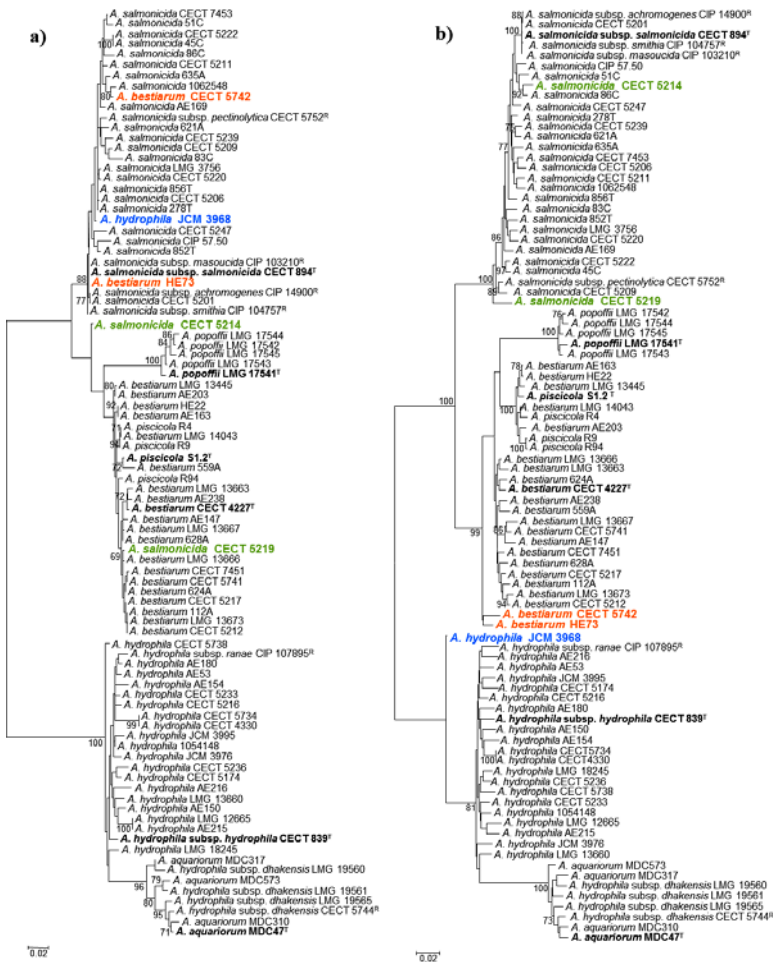
In our study we also detected incongruences in the phylogenies when the *dnaJ* gene and the concatenated trees were compared (Fig. 3). Five strains, 2 *A. bestiarum* (orange), 1 *A. hydrophila* (blue), and 2 *A. salmonicida* (green), clustered out of the corresponding species group in the *dnaJ* gene tree (Fig. 3a), revealing a possible different origin of the gene fragments. Nevertheless, they grouped together with the other strains of the same species when a concatenated tree was generated (Figs. 3b and 4).

Consequently, we also analyzed our sequences using six recombination detection programmes in the RDP4 package, which significantly detected possible recombination events in one (*A. salmonicida* CECT 5214) out of the five strains, when all strains or the corresponding species subgroups were analyzed (Table 1). The investigation also provided well-supported evidence for recombination in two *A. hydrophila* strains (CECT 4330 and CECT 5734), which clustered among the other *A. hydrophila* isolates in the *dnaJ* and the concatenated trees, although they were separated in a deeper branch. No recombination events were detected among the *A. bestiarum* isolates (Group II).

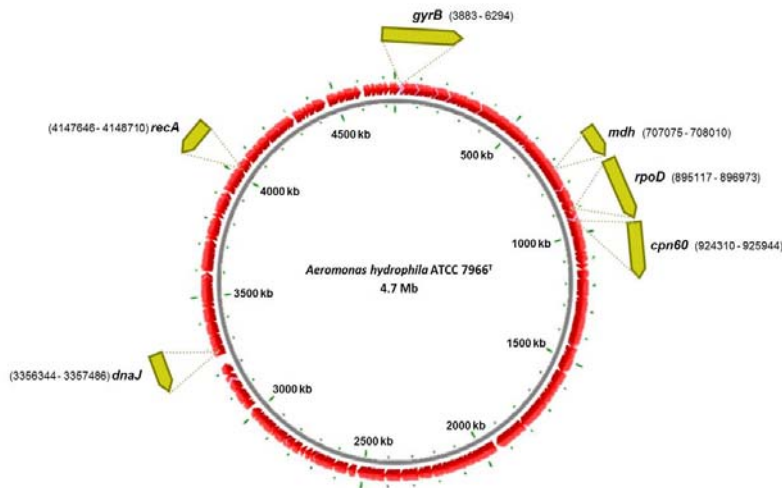


**Figure 2.** Schematic representation of the *dnaJ* locus and its flanking regions for *Aeromonas*, based on the whole genome sequence of *Aeromonas hydrophila* ATCC 7966<sup>T</sup> (GenBank accession number CP000462, [37]). Partial sequences for *dnaJ* (891 bp) were obtained from the GenBank database or determined as previously described [49].





**Figure 3.** Phylogenies of AHC species inferred from single and concatenated genes: a) Maximum likelihood (ML) tree obtained from *dnaJ* sequences (891 positions) based on the Tamura-3-parameter (T92+G+I) as a model of nucleotide substitution; b) ML tree from concatenated sequences of six genes (5,379 positions) based on the Tamura-Nei model (TN93+G+I). ML trees were constructed using MEGA5 software (<http://www.megasoftware.net>, [50]). Bootstrap values ( $\geq 70\%$ ) from 500 replications are shown at the nodes of the tree. The scale bar indicates the number of nucleotide substitutions per site. The type strains of *Aeromonas* species belonging to AHC are indicated in bold. The five strains of the AHC in which we detected incongruences in the *dnaJ* tree are shown in colours.



**Figure 4.** Distribution of six genes sequenced in the circular map of the genome of *A. hydrophila* ATCC 7966<sup>T</sup> (GenBank accession number CP000462, [37]). Genes are shown outside the circle and have standard abbreviations. Arrows indicate direction of transcription. Detailed genomic position is listed in parentheses after each gene name.

**Table 1.** Recombination analysis summary.

	Recombination sequence	Number of methods detecting recombination events with statistical significance	Recombination detection methods						Events
			1	2	3	4	5	6	
<i>All strains N=90</i>	<i>A. salmonicida</i> CECT 5214	3	■		■			■	1
<b>Group I</b> <i>A. salmonicida N=29</i>	<i>A. salmonicida</i> CECT 5214	4		■	■	■		■	1 or 2
	<i>A. salmonicida</i> CECT 5219	1				■			1
<b>Group III</b> <i>A. hydrophila N=30</i>	<i>A. hydrophila</i> CECT 4330	2				■		■	1
	<i>A. hydrophila</i> CECT 5734	2						■	1

Automated screening for recombination from multiple alignment of *dnaJ* sequences was performed using programme RDP4 (<http://darwin.uvigo.es/rdp/rdp.html>, [51]), which used six recombination detection programmes: RDP (1), GENECONV (2), BootScan (3), MaxChi (4), Chimaera (5) and 3Seq (6), with their default parameters. Sequences statistically supported by at least two recombination detection programmes ( $P$ -value <0.05) were considered as possible recombinants.

## 6. Conclusions

Developments in gene sequence analysis have greatly enhanced the study of recombination in bacterial populations. Gene-wide approaches to mapping bacterial diversity, which have already proved effective for gaining insight into bacterial evolution, have the potential to reveal the phenotypic basis of genetic diversity in *Aeromonas*, and to investigate the dynamics of this complex bacterial community. The objective of the work described in this chapter has been to evaluate the importance of the presence of recombination events and their influence on phylogenies, as it has been frequently postulated that in bacterial populations, horizontal gene transfer (HGT) is so common that it precludes the existence of biological species. Our research suggests little or null influence of recombination in the genetic structure of AHC species, despite the existence of some strains with recombinant gene fragments.

Assuming that the cohesion of major phylogenetic groups within the prokaryotes is due to vertical transmission and common ancestry rather than preferential HGT, it is possible to construct robust phylogenies reflecting the evolutionary history of bacteria, using a sufficient number of orthologous housekeeping genes (concatenated trees). In these phylogenies, bacterial species are delineable as 'classical Darwinian' evolutionary lineages [52-55].

The foregoing consideration does not exclude the existence of horizontal gene transfer, which in fact occurs, and has important evolutionary consequences, but it is doubtful that HGT is the essence of modern genome phylogeny [53]. Moreover, as demonstrated in *Salmonella*, *Streptococcus*, and *Bacillus*, homologous recombination decays exponentially with sequence divergence; in other words, a sequence divergence between two strains of 10% suppresses the recombination rate between them by a factor of about 100 [56, 57]. We are currently pursuing recombination studies in other genes of this *Aeromonas* group.

## Acknowledgements

This research was supported by projects from the Ministerio de Educación y Ciencia, Spain (CGL2008-03281/BOS), and the Universitat de Barcelona (ARZ00F01).

## References

1. Hacker, J., Carniel, E. 2001. *EMBO Rep.*, 2, 376.
2. Spratt, B. G., Bowler, L. D., Zhang, Q. Y., Zhou, J., Smith, J. M. 1992. *J. Mol. Evol.*, 34, 115.

3. Michod, R. E., Bernstein, H., Nedelcu, A. M. 2008. *Infect. Genet. Evol.*, 8, 267.
4. Feil, E. J., Holmes, E. C., Bessen, D. E., Chan, M. S., Day, N. P., Enright, M. C., Goldstein, R., Hood, D. W., Kalia, A., Moore, C. E., Zhou, J., Spratt, B. G. 2001. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 98, 182.
5. Posada, D., Crandall, K. A., Holmes, E. C. 2002. *Annu. Rev. Genet.*, 36, 75.
6. Hanage, W. P., Fraser, C., Spratt, B. G. 2005. *BMC Biol.*, 3, 6.
7. Vinuesa, P., Silva, C., Werner, D., Martínez-Romero, E. 2005. *Mol. Phylogenet. Evol.*, 34, 29.
8. Ochman, H., Lerat, E., Daubin, V. 2005. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 102, 6595.
9. Didelot, X., Maiden, M. C. 2010. *Trends Microbiol.*, 18, 315.
10. Aanensen, D. M., Spratt, B. G. 2005. *Nucleic. Acids. Res.*, 33, W728.
11. Martino, M. E., Fasolato, L., Montemurro, F., Rosteghin, M., Manfrin, A., Patarnello, T., Novelli, E., Cardazzo, B. 2011. *Appl. Environ. Microbiol.*, 77, 4986.
12. Fusté, M. C., Farfán, M., Miñana-Galbis, D., Albarral, V., Sanglas, A., Lorén, J. G. 2012. Population genetics of the 'Aeromonas hydrophila Species Complex'. In *Studies in Population Genetics*, M. C. Fusté (Ed.), InTech, Croatia, 39.
13. Posada, D., Crandall, K. A. 2001. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 98, 13757.
14. Lemey, P., Posada, D. 2009. Introduction to recombination detection. In *The Phylogenetic Handbook: A Practical Approach to Phylogenetic Analysis and Hypothesis Testing*, 2<sup>nd</sup> Ed., A. M. Vandamme, M. Salemi, P. Lemey (Eds.), Cambridge University Press, New York, 493.
15. Sawyer, S. A. 1999. GENECONV: A computer package for the statistical detection of gene conversion. Distributed by the author, Department of Mathematics, Washington University in St. Louis, available at <http://www.math.wustl.edu/~sawyer>.
16. Martin, D., Rybicki, E. 2000. *Bioinformatics*, 16, 562.
17. Wiuf, C., Christensen, T., Hein, J. 2001. *Mol. Biol. Evol.*, 18, 1929.
18. Milkman, R., Bridges, M. M. 1990. *Genetics*, 126, 505.
19. Feil, E. J., Maiden, M. C., Achtman, M., Spratt, B. G. 1999. *Mol. Biol. Evol.*, 16, 1496.
20. Selander, R. K., Beltran, P., Smith, N. H., Helmuth, R., Rubin, F. A., Kopecko, D. J., Ferris, K., Tall, B. D., Cravioto, A., Musser, J. M. 1990. *Infect. Immun.*, 58, 2262.
21. Orskov, F., Whittam, T. S., Cravioto, A., Orskov, I. 1990. *J. Infect. Dis.*, 162, 76.
22. O'Rourke, M., Stevens, E. 1993. *J. Gen. Microbiol.*, 139, 2603.
23. Salaun, L., Audibert, C., Le Lay, G., Burucoa, C., Fauchère, J. L., Picard, B. 1998. *FEMS Microbiol. Lett.*, 161, 231.
24. Pérez-Losada, M., Browne, E. B., Madsen, A., Wirth, T., Viscidi, R. P., Crandall, K. A. 2006. *Infect. Genet. Evol.*, 6, 97.
25. Denamur, E., Lécointre, G., Darlu, P., Tenailon, O., Acquaviva, C., Sayada, C., Sunjevaric, I., Rothstein, R., Elion, J., Taddei, F., Radman, M., Matic, I. 2000. *Cell*, 103, 711.
26. Lefébure, T., Stanhope, M. J. 2007. *Genome Biol.*, 8, R71.
27. Orsi, R. H., Sun, Q., Wiedmann, M. 2008. *BMC Evol. Biol.*, 8, 233.
28. Liu, X., Gutacker, M. M., Musser, J. M., Fu, Y. X. 2006. *J. Bacteriol.*, 188, 8169.
29. Gomes, J. P., Bruno, W. J., Nunes, A., Santos, N., Florindo, C., Borrego, M. J., Dean, D. 2007. *Genome Res.*, 17, 50.

30. Martin-Carnahan, A., Joseph, S. W. 2005. Genus I. *Aeromonas* Stanier 1943, 213<sup>AL</sup>. In *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, G. M. Garrity, D. J. Brenner, N. R. Krieg, J. T. Staley (Eds.), Springer, New York, Vol. 2. Part B, 557.
31. Saavedra, M. J., Figueras, M. J., Martínez-Murcia, A. J. 2006. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 56, 2481.
32. Küpfer, M., Kuhnert, P., Korczak, B. M., Peduzzi, R., Demarta, A. 2006. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 56, 2743.
33. Miñana-Galbis, D., Urbizu-Serrano, A., Farfán, M., Fusté, M. C., Lorén, J. G. 2009. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 59, 1976.
34. Farfán, M., Miñana-Galbis, D., Garreta, A., Lorén, J. G., Fusté, M. C. 2010. *Syst. Appl. Microbiol.*, 33, 427.
35. Silver, A. C., Williams, D., Faucher, J., Horneman, A. J., Gogarten, J. P., Graf, J. 2011. *PLoS One*, 6, e16751.
36. Martínez-Murcia, A. J., Monera, A., Saavedra, M. J., Oncina, R., López-Alvarez, M., Lara, E., Figueras, M. J. 2011. *Syst. Appl. Microbiol.*, 34, 189.
37. Seshadri, R., Joseph, S. W., Chopra, A. K., Sha, J., Shaw, J., Graf, J., Haft, D., Wu, M., Ren, Q., Rosovitz, M. J., Madupu, R., Tallon, L., Kim, M., Jin, S., Vuong, H., Stine, O. C., Ali, A., Horneman, A. J., Heidelberg, J. F. 2006. *J. Bacteriol.*, 188, 8272.
38. Reith, M. E., Singh, R. K., Curtis, B., Boyd, J. M., Bouevitch, A., Kimball, J., Munholland, J., Murphy, C., Sarty, D., Williams, J., Nash, J. H., Johnson, S. C., Brown, L. L. 2008. *BMC Genomics.*, 9, 427.
39. Beatson, S. A., das Graças de Luna, M., Bachmann, N. L., Alikhan, N. F., Hanks, K. R., Sullivan, M. J., Wee, B. A., Freitas-Almeida, A. C., Dos Santos, P. A., de Melo, J. T., Squire, D. J., Cunningham, A. F., Fitzgerald, J. R., Henderson, I. R. 2011. *J. Bacteriol.*, 193, 1286.
40. Li, Y., Liu, Y., Zhou, Z., Huang, H., Ren, Y., Zhang, Y., Li, G., Zhou, Z., Wang, L. 2011. *J. Bacteriol.*, 193, 3389.
41. Wu, C. J., Wang, H. C., Chen, C. S., Shu, H. Y., Kao, A. W., Chen, P. L., Ko, W. C. 2012. *J. Bacteriol.*, 194, 4114.
42. Chai, B., Wang, H., Chen, X. 2012. *J. Bacteriol.*, 194, 6693.
43. Miñana-Galbis, D., Farfán, M., Lorén, J. G., Fusté, M. C. 2002. *J. Appl. Microbiol.*, 93, 420.
44. Martínez-Murcia, A. J., Saavedra, M. J., Mota, V. R., Maier, T., Stackebrandt, E., Cousin, S. 2008. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 58, 1169.
45. Beaz-Hidalgo, R., Alperi, A., Figueras, M. J., Romalde, J. L. 2009. *Syst. Appl. Microbiol.*, 32, 471.
46. Abbott, S. L., Cheung, W. K., Janda, J. M. 2003. *J. Clin. Microbiol.*, 41, 2348.
47. Roger, F., Marchandin, H., Jumas-Bilak, E., Kodjo, A., BVH, C., Lamy, B. 2012. *BMC Microbiol.*, 12, 62.
48. Miñana-Galbis, D., Farfán, M., Fusté, M. C., Lorén, J. G. 2004. *Environ. Microbiol.*, 6, 198.
49. Nhung, P. H., Hata, H., Ohkusu, K., Noda, M., Shah, M. M., Goto, K., Ezaki, T. 2007. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 57, 1232.

50. Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M., Kumar, S. 2011. *Mol. Biol. Evol.*, 28, 2731.
51. Martin, D. P., Lemey, P., Lott, M., Moulton, V., Posada, D., Lefevre, P. 2010. *Bioinformatics*, 26, 2462.
52. Daubin, V., Gouy, M., Perrière, G. 2002. *Genome Res.*, 12, 1080.
53. Kurland, C. G., Canback, B., Berg, O. G. 2003. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 100, 9658.
54. Lerat, E., Daubin, V., Moran, N. A. 2003. *PLoS Biol.*, 1, E19.
55. Vinuesa, P., Silva, C., Werner, D., Martínez-Romero, E. 2005. *Mol. Phylogenet. Evol.*, 34, 29.
56. Majewski, J., Zawadzki, P., Pickerill, P., Cohan, F. M., Dowson, C. G. 2000. *J. Bacteriol.*, 182, 1016.
57. Fraser, C., Hanage, W. P., Spratt, B. G. 2007, *Science*, 315, 4.



