



## **AEROMONAS, UN MICROORGANISMO AMBIENTAL DE IMPORTANCIA EN SALUD HUMANA Y ANIMAL.**

**Fadua Leila Latif Eugén**

**Dipòsit Legal: T 73-2016**

**ADVERTIMENT.** L'accés als continguts d'aquesta tesi doctoral i la seva utilització ha de respectar els drets de la persona autora. Pot ser utilitzada per a consulta o estudi personal, així com en activitats o materials d'investigació i docència en els termes establerts a l'art. 32 del Text Refós de la Llei de Propietat Intel·lectual (RDL 1/1996). Per altres utilitzacions es requereix l'autorització prèvia i expressa de la persona autora. En qualsevol cas, en la utilització dels seus continguts caldrà indicar de forma clara el nom i cognoms de la persona autora i el títol de la tesi doctoral. No s'autoritza la seva reproducció o altres formes d'explotació efectuades amb finalitats de lucre ni la seva comunicació pública des d'un lloc aliè al servei TDX. Tampoc s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant als continguts de la tesi com als seus resums i índexs.

**ADVERTENCIA.** El acceso a los contenidos de esta tesis doctoral y su utilización debe respetar los derechos de la persona autora. Puede ser utilizada para consulta o estudio personal, así como en actividades o materiales de investigación y docencia en los términos establecidos en el art. 32 del Texto Refundido de la Ley de Propiedad Intelectual (RDL 1/1996). Para otros usos se requiere la autorización previa y expresa de la persona autora. En cualquier caso, en la utilización de sus contenidos se deberá indicar de forma clara el nombre y apellidos de la persona autora y el título de la tesis doctoral. No se autoriza su reproducción u otras formas de explotación efectuadas con fines lucrativos ni su comunicación pública desde un sitio ajeno al servicio TDR. Tampoco se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al contenido de la tesis como a sus resúmenes e índices.

**WARNING.** Access to the contents of this doctoral thesis and its use must respect the rights of the author. It can be used for reference or private study, as well as research and learning activities or materials in the terms established by the 32nd article of the Spanish Consolidated Copyright Act (RDL 1/1996). Express and previous authorization of the author is required for any other uses. In any case, when using its content, full name of the author and title of the thesis must be clearly indicated. Reproduction or other forms of for profit use or public communication from outside TDX service is not allowed. Presentation of its content in a window or frame external to TDX (framing) is not authorized either. These rights affect both the content of the thesis and its abstracts and indexes.

**Universitat Rovira i Virgili**

**Facultat de Medicina i Ciències de la Salut**



# ***Aeromonas*, un microorganismo ambiental de importancia en salud humana y animal**

**FADUA LEILA LATIF EUGENÍN**

Tesis Doctoral

2015

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI  
AEROMONAS, UN MICROORGANISMO AMBIENTAL DE IMPORTANCIA EN SALUD HUMANA Y ANIMAL.  
Fadua Leila Latif Eugenín  
Dipòsit Legal: T 73-2016

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI  
AEROMONAS, UN MICROORGANISMO AMBIENTAL DE IMPORTANCIA EN SALUD HUMANA Y ANIMAL.  
Fadua Leila Latif Eugenín  
Dipòsit Legal: T 73-2016

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI  
AEROMONAS, UN MICROORGANISMO AMBIENTAL DE IMPORTANCIA EN SALUD HUMANA Y ANIMAL.  
Fadua Leila Latif Eugenín  
Dipòsit Legal: T 73-2016

**Fadua Leila LATIF EUGENÍN**

***Aeromonas*, un microorganismo  
ambiental de importancia en salud  
humana y animal**

**TESIS DOCTORAL**

**Dirigida por**

**M<sup>a</sup> José Figueras Salvat y Roxana Beaz Hidalgo**

**Departamento de Ciencias Médicas Básicas**

**Unidad de Biología y Microbiología**



UNIVERSITAT  
ROVIRA I VIRGILI

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI  
AEROMONAS, UN MICROORGANISMO AMBIENTAL DE IMPORTANCIA EN SALUD HUMANA Y ANIMAL.  
Fadua Leila Latif Eugenín  
Dipòsit Legal: T 73-2016



**M<sup>a</sup> José Figueras Salvat y Roxana Beaz Hidalgo**, ambas doctoras en Biología e investigadoras del grupo de Microbiología Ambiental y Micología de la Facultad de Medicina de la Universidad Rovira i Virgili

**HACEN CONSTAR** que el presente trabajo, titulado **”Aeromonas un microorganismo ambiental de importancia en salud humana y animal”**, que presenta Fadua Latif Eugenín para la obtención del título de Doctor, ha sido realizado bajo mi dirección en el Departamento de Ciencias Médicas Básicas de esta universidad.

Y para que así conste las directoras de la tesis doctoral firman la presente en Reus 3 de Septiembre de 2015

Dra. M<sup>a</sup> José Figueras Salvat

Dra. Roxana Beaz Hidalgo



UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI  
AEROMONAS, UN MICROORGANISMO AMBIENTAL DE IMPORTANCIA EN SALUD HUMANA Y ANIMAL.  
Fadua Leila Latif Eugenín  
Dipòsit Legal: T 73-2016

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI  
AEROMONAS, UN MICROORGANISMO AMBIENTAL DE IMPORTANCIA EN SALUD HUMANA Y ANIMAL.  
Fadua Leila Latif Eugenín  
Dipòsit Legal: T 73-2016

## **INDICE**

<b>1. INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>1</b>
1.1. <i>Aeromonas</i> , perspectivas históricas .....	3
1.2. Taxonomía del género <i>Aeromonas</i> .....	6
1.2.1. Especie procariota .....	6
1.2.2. Identificación fenotípica.....	8
1.2.2.1. Características fenotípicas clásicas .....	9
1.2.2.2. Sistemas no automatizados .....	9
1.2.2.3. Sistemas automatizados .....	10
1.2.3. Identificación molecular.....	11
1.2.3.1. Gen ARN ribosómico 16S .....	11
1.2.3.2. Técnicas de identificación basadas en el gen ARNr 16S.....	12
Secuencias del gen ARNr 16S.....	12
Polimorfismo de Longitud de los Fragmentos de Restricción (RFLP) 13	
Desorción/Ionización Láser Asistida por Matriz (MALDI-TOF) .....	14
Análisis de proteínas ribosomales .....	16
1.2.4. Hibridación ADN-ADN .....	17
1.2.4.1. DDH en <i>Aeromonas</i> .....	18
1.2.5. Secuenciación del genoma completo (Whole Genome Sequences, WGS)...	19
1.2.5.1. Hibridación ADN-ADN <i>in silico</i> (DDHis) .....	25
1.2.5.2. Identidad Nucleotídica Media (ANI) .....	26
1.2.6. Genes Housekeeping .....	28
1.2.7. Técnicas de tipado molecular.....	33
1.2.7.1. Enterobacterial Repetitive Intergenic Concensus basado en la PCR (ERIC-PCR) .....	33
1.2.7.2. Multilocus Sequences Typing (MLST).....	35
1.3. Ecología y epidemiología del género <i>Aeromonas</i> .....	38
1.3.1. Presencia de <i>Aeromonas</i> en el medio acuático.....	38

1.3.1.1. Legislación actual sobre las aguas regeneradas .....	39
1.3.2. Presencia de <i>Aeromonas</i> en animales.....	40
1.3.3. Presencia de <i>Aeromonas</i> en alimentos .....	42
1.3.4. Estudios de metagenómica en comunidades bacterianas .....	44
1.3.5. Infecciones en humanos .....	46
1.3.5.1. Intestinales .....	50
Diarrea en niños.....	51
Diarrea en adultos.....	52
1.3.5.2. Infección de heridas.....	54
Infecciones de herida quirúrgica y asociadas a terapia con sanguijuela .....	56
1.3.5.3. Bacteremia/septicemia.....	58
1.3.5.4. Pneumonía y otras infecciones del tracto respiratorio.....	60
1.3.5.5. Peritonitis bacteriana espontánea (PBE) y empiema.....	62
1.3.5.6. Infecciones del tracto urinario .....	62
<b>2. INTERÉS Y OBJETIVOS .....</b>	<b>65</b>
<b>3. MATERIALES y MÉTODOS.....</b>	<b>71</b>
3.1. Muestras analizadas y cepas utilizadas .....	73
3.1.1 Cepas tipo y de referencia .....	73
3.1.2. Cepas clínicas.....	73
3.1.3. Muestras de agua.....	73
3.1.4. Muestras de mariscos y vegetales .....	75
3.1.5. Conservación de las cepas.....	76
3.2. Cultivo e identificación.....	76
3.2.1. Extracción de ADN y caracterización molecular de los aislados.....	76
3.2.1.1. Identificación a nivel de género .....	76
3.2.1.2. Genotipado .....	77

3.2.1.3. Identificación a nivel de especie .....	77
3.3. Caracterización fenotípica y molecular de las especies nuevas.....	77
3.3.1. Caracterización molecular.....	79
3.3.1.1. Secuenciación del gen ARNr del 16S y MLPA.....	79
3.3.1.2. Secuenciación del genoma completo (WGS).....	79
3.3.1.3. Identidad Nucleotídica Media (ANI) .....	79
3.3.1.4. Hibridación ADN-ADN <i>in silico</i> (DDH <i>is</i> ) .....	80
3.4. Otros métodos de identificación de <i>Aeromonas</i> spp. utilizados en esta tesis doctoral. ....	80
3.4.1. Polimorfismo de Longitud de los Fragmentos de Restricción (RFLP) del gen ARN ribosómico 16S (RFLP-ADNr 16S).....	80
3.4.2. MALDI-TOF.....	81
3.5. Sensibilidad a agentes antimicrobianos y detección de genes que codifican para $\beta$ -lactamas e integrones clase 1 .....	82
3.6. Detección de genes de virulencia.....	83
3.7. Análisis estadístico.....	83
<b>4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....</b>	<b>85</b>
4.1. Métodos de detección, recuperación e identificación de <i>Aeromonas</i> .....	89
4.1.1. The improved PCR of the <i>fstA</i> (ferric siderophore receptor) gene differentiates the fish pathogen <i>Aeromonas salmonicida</i> from other <i>Aeromonas</i> species. Beaz-Hidalgo R, Latif-Eugenín F, Figueras MJ. <i>Vet. Microbiol.</i> (2013) 166:659-563.....	89
4.1.2. A culture independent method for the detection of <i>Aeromonas</i> sp. from water samples. Latif-Eugenín F, Beaz-Hidalgo R, Figueras MJ. ( <i>Italian Journal of Food Safety, Aceptado</i> ). .....	97
4.1.3. Evaluation of different conditions and culture media for the recovery of <i>Aeromonas</i> spp. from reclaimed water and shellfish samples. (En preparación). 113	
4.2. Diversidad de especies de <i>Aeromonas</i> en aguas regeneradas, mariscos y vegetales .....	137
4.2.1. Chlorinated and UV-treated reclaimed irrigation water is the source of <i>Aeromonas</i> found in vegetables used for human consumption. Latif-Eugenín F, Beaz-Hidalgo R, Figueras MJ. ( <i>Water Research, Sometido</i> ).....	137

4.2.2. Diversidad de <i>Aeromonas</i> spp. en aguas regeneradas tras un proceso de lagunaje .....	157
4.2.3. Diversidad de <i>Aeromonas</i> spp. en moluscos bivalvos. ....	167
4.3. Identidad y caracterización de las cepas de <i>Aeromonas</i> aisladas desde peces, cetáceo y muestras clínicas .....	171
4.3.1. Re-identification of <i>Aeromonas</i> isolates from rainbow trout and incidence of class 1 integron and $\beta$ -lactamase genes. Vega-Sánchez V, Latif-Eugenín F, Soriano-Vargas E, Beaz-Hidalgo R, Figueras MJ, Aguilera-Arreola MG, Castro-Escarpulli G. <i>Vet. Microbiol.</i> (2014) 172:528-533. ....	171
4.3.2. Molecular characterization of <i>Shewanella</i> and <i>Aeromonas</i> isolates associated with spoilage of Common carp ( <i>Cyprinus carpio</i> ). Beaz-Hidalgo R, Agüeria D, Latif-Eugenín F, Yeannes MI, Figueras MJ. <i>FEMS Microbiol. Lett.</i> (2015) 362:1-8. ....	183
4.3.3. <i>Aeromonas dhakensis</i> pneumonia and sepsis in a neonatal Risso's dolphin ( <i>Grampus griseus</i> ) from the Mediterranean Sea. Pérez L, Abarca M, Latif-Eugenín F, Beaz-Hidalgo R, Figueras MJ, Domingo M. <i>Dis. Aquat. Or.</i> (En prensa, doi: 10.3354/dao02899). ....	193
4.3.4. First record of the rare species <i>Aeromonas schubertii</i> from mussels. Phenotypic and genetic reevaluation of the species and a review of the literature. Latif-Eugenín F, Beaz-Hidalgo R, Figueras MJ. ( <i>Current Microbiology</i> , Sometido) .....	201
4.3.5. Identification error of <i>Aeromonas aquariorum</i> : a causative agent of septicemia. Morinaga Y, Yanagihara K, Latif-Eugenin F, Beaz-Hidalgo R, Kohno S, Figueras MJ. <i>Diagn. Microbiol. Infect. Dis.</i> (2013) 76:106-109. ....	231
4.3.6. Diversidad de las <i>Aeromonas</i> aisladas en diversos hospitales y características de los pacientes .....	237
4.3.7. Evaluación del MALDI-TOF en la identificación de cepas clínicas de <i>Aeromonas</i> . ....	249
4.4. Estudio polifásico de potenciales nuevas líneas filogenéticas. ....	255
4.4.1. <i>Aeromonas aquatica</i> sp. nov., <i>Aeromonas finlandiensis</i> sp. nov. and <i>Aeromonas lacus</i> sp. nov. isolated from Finnish waters associated with cyanobacterial blooms. Beaz-Hidalgo R, Latif-Eugenín F, Hossain MJ, Berg K, Niemi RM, Rapala J, Lyra C, Liles MR, Figueras MJ. <i>Syst. Appl. Microbiol.</i> (2015) 38:161-168. ....	255
4.4.2. Caracterización de 4 nuevas especies de <i>Aeromonas</i> . ....	265
<b>5. DISCUSIÓN GENERAL .....</b>	<b>279</b>

<b>6. CONCLUSIONES .....</b>	<b>291</b>
<b>7. BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>295</b>
<b>8. ANEXOS.....</b>	<b>341</b>

# **1. INTRODUCCIÓN**



UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI  
AEROMONAS, UN MICROORGANISMO AMBIENTAL DE IMPORTANCIA EN SALUD HUMANA Y ANIMAL.  
Fadua Leila Latif Eugení  
Dipòsit Legal: T 73-2016

## 1.1. *Aeromonas*

El género *Aeromonas* (aer, del griego: gas; monas, unidades; unidades productoras de gas), de acuerdo con la edición más reciente del Manual de Bergey (Martin-Carnahan y Joseph, 2005), pertenece a la Clase de las Gammaproteobacterias, Orden Aeromonadales, Familia *Aeromonadaceae*, que en la actualidad incluye 3 géneros: *Aeromonas*, *Oceanimonas* y *Tulomonas* (Manual de Bergey, 2ªed.). Estos microorganismos se caracterizan por ser bacilos Gram negativos, oxidasa y catalasa generalmente positivos, capaces de degradar nitratos a nitritos, fermentadores de la glucosa y mayoritariamente resistentes al factor vibriostático O/129 (2,4-Diamino-6,7-diisopropilpteridina fosfato). A pesar de ser considerados microorganismos autóctonos del medio acuático, también han sido aislados con frecuencia en alimentos destinados al consumo humano, peces sanos y enfermos, huevos de mosquitos y en diversos procesos infecciosos en humanos (Borrell y cols., 1998; Martin-Carnahan y Joseph, 2005, Figueras 2005, Beaz-Hidalgo y cols., 2012, Figueras y Beaz-Hidalgo, 2015). Algunas de las especies son consideradas como patógeno emergente, capaces de afectar tanto a individuos inmunocompetentes como inmunodeprimidos (Castro-Escarpulli y cols., 2002; Figueras 2005; Janda y Abbott, 2010; Figueras y Beaz-Hidalgo, 2015).

### Perspectivas históricas

Se considera que la primera descripción de una cepa del género *Aeromonas* fue la realizada por Sanarelli en 1891, durante un estudio de inmunidad en ranas en el que muchas de éstas desarrollaron una septicemia que se atribuyó a *Bacillus hydrophilus fuscus*. Durante aquella época se aislaron *Aeromonas* de agua, peces enfermos y leche (Farmer y cols., 2006). La primera asociación de *A. salmonicida* con la forunculosis fue en 1894 por Emmerich y Weibel (Farmer y cols., 2006). Desde el primer aislamiento hasta 1943, año en el que se definió el género (Stainer, 1943), las cepas de *Aeromonas* han sido incluidas en diversos grupos como *Bacillus*, *Proteus*, *Pseudomonas*, *Achromobacter* o *Vibrio*, entre otros. De hecho, la definición del género *Aeromonas* se ha atribuido erróneamente a Kluyver and van Niel (1936) en numerosos manuales de microbiología, a pesar de que la comisión judicial del comité internacional de sistemática de bacteriología (1973) estableció la autoría a Stainer, 1943.

A mediados de los años 70, la mayoría de las *Aeromonas* se englobaban dentro de dos grupos principales definidos, esencialmente, en base a la temperatura de crecimiento además de diversas características como la motilidad, la producción de pigmento en TSA o la producción de indol. Estos dos grupos eran los siguientes:

- cepas mesófilas (crecimiento óptimo a 35-37°C) responsables de diversas infecciones en humanos y definidas globalmente bajo el nombre de *A. hydrophila*.
- cepas psicrófilas (crecimiento óptimo a 22-28°C) principalmente patógenas de peces e identificadas como *A. salmonicida*.

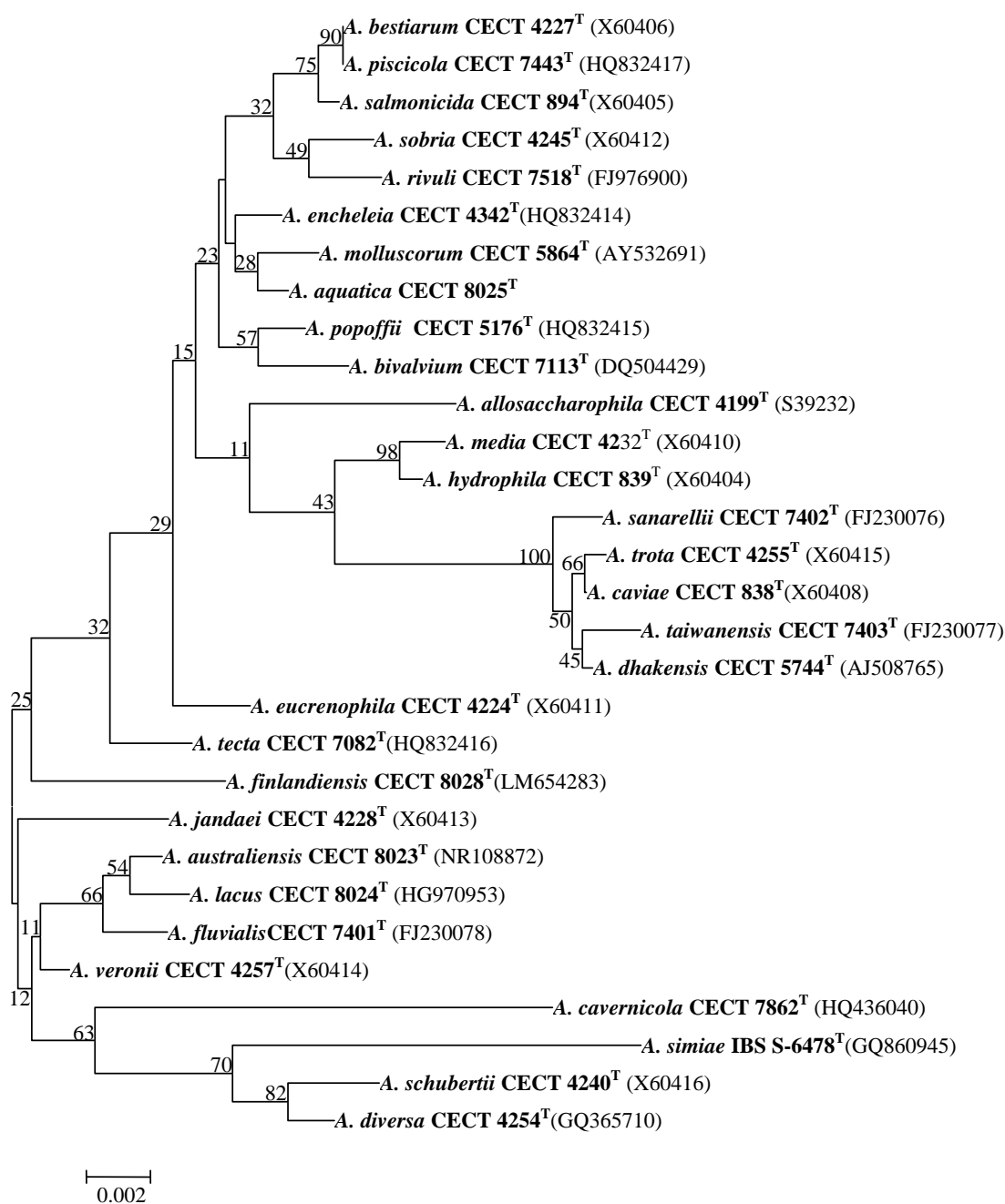
Estos dos grandes grupos se reclasificaron posteriormente por estudios de reasociación ADN-ADN (McInnes y cols., 1979; Popoff y cols., 1981; Farmer y cols., 1986). Popoff estableció 8 grupos de hibridación en 1981, por el método de la endonucleasa S1, que llegaron a 12 con los estudios posteriores (Fanning y cols., 1985; Farmer y cols., 1986), con el método de la hidroxiapatita y una temperatura de reasociación óptima de 60°C (Martin-Carnahan y Joseph, 2005).

El género *Aeromonas* estuvo incluido en la familia *Vibrionaceae* desde 1965 junto a los géneros *Vibrio* y *Plesiomonas*. Sin embargo, en 1984 Baumann y Schubert, a partir de un estudio de reasociación del ARNr-ADN entre miembros de la familia *Vibrionaceae*, observaron que el género *Aeromonas* presentaba suficientes diferencias para constituir una familia independiente. Estos resultados fueron confirmados posteriormente por Colwell y cols. en 1986, en base al análisis de secuencias de los genes del ARNr 5S y 16S, que demostraban que el género *Aeromonas* tenía una divergencia evolutiva equidistante con la Familia *Vibrionaceae* y *Enterobacteriaceae* justificando así la creación de la familia *Aeromonadaceae*. Las secuencias del gen ARNr 16S de todas las especies de *Aeromonas* definidas hasta 1992 (MartínezMurcia y cols., 1992a) corroboraron la posición del género y la propuesta de Colwell y cols. (1986).

Desde 1992 hasta la fecha se han descrito 20 (Tabla 1 y Figura 1) nuevas especies en el género *Aeromonas*: *A. allosaccharophila* (Martínez-Murcia y cols., 1992b), *A. encheleia* (Esteve y cols., 1995b), *A. bestiarum* (Ali y cols., 1996), *A. popoffii* (Huys y cols., 1997a, b), *A. simiae* (Harf-Monteil y cols., 2004), *A. molluscorum* (Miñana-Galbis y cols., 2004), *A. bivalvium* (Miñana-Galbis y cols., 2007), *A. tecta* (Demarta y cols., 2008), *A. piscicola* (Beaz-Hidalgo y cols. 2009), *A. fluvialis*,

*A. taiwanensis* y *A. sanarellii* (Alperi y cols., 2010a, b), *A. diversa* (Miñana-Galbis y cols., 2010), *A. rivuli* (Figueras y cols., 2011a), *A. cavernicola* (Martínez-Murcia y cols. 2013), *A. australiensis* (Aravena-Román y cols., 2013), *A. dhakensis* (Beaz-Hidalgo y cols., 2013), *A. finlandiensis*, *A. lacus* y *A. aquatica* (Beaz-Hidalgo y cols., 2015b). Las tres últimas especies son producto de esta tesis doctoral.

**Figura 1. Relación filogenética en base a las secuencias del gen 16S rRNA (1403 pb) entre las 30 especies de *Aeromonas* publicadas hasta la fecha. El número en los nodos indica los valores de bootstrap. Bar, 0,002 sustituciones estimadas por sitio.**



También lo son otras 4 nuevas especies que se describen en esta tesis y que al igual que *A. lusitana* están en proceso de publicación (Martínez-Murcia y cols., 2015 sometido) y que por tanto no se ilustran en la Figura 1 que recoge solo las 30 especies ya publicadas.

En 2002, Pidiyar y cols. describieron *A. culicicola*, sin embargo, poco después de su descripción, Huys y cols. (2005) demostraron que correspondía a un sinónimo de *A. veronii*. Así mismo, Saha y Chakrabarti (2006) describieron *A. sharmana*, pero más tarde, Martínez-Murcia y cols. (2007) evidenciaron que no pertenecía al género *Aeromonas*. Además, en 2008 fue descrita *A. aquariorum* (Martínez-Murcia y cols.) que junto a *A. hydrophila* subsp. *dhakensis* (Huys y cols., 2002) fueron reclasificadas posteriormente bajo el nombre de *A. dhakensis* por Beaz-Hidalgo y cols. (2013). En la actualidad están aceptadas 7 subespecies en el género *Aeromonas*, 2 pertenecen a *A. hydrophila* (subsp. *hydrophila* y *ranae*) y 5 a *A. salmonicida* (subsp. *salmonicida*, *achromogenes*, *masoucida*, *smithia* y *pectinolytica*). Las 30 especies publicadas hasta la fecha con su origen, autor/es y fecha de descripción se muestran en la Tabla 1.

## 1.2. Taxonomía del género *Aeromonas*

### 1.2.1. Especie procariota

En el año 2002, Stackebrandt y cols. recogen las recomendaciones del Comité Internacional de Sistemática de Procariotas (*International Committee on Systematic of Prokaryotes* o ICSP) para la definición de especies procariotas que incluyen un estudio polifásico con una diferenciación fenotípica, genotípica y filogenética. La diferenciación fenotípica debería estar basada en exámenes bioquímicos, morfológicos, fisiológicos, análisis de perfiles de proteínas y/o ácidos grasos; mientras que la diferenciación filogenética debería incluir la secuencia de al menos 1300 nucleótidos (nt) del gen ARNr 16S.

El grado de similitud de esta secuencia con las especies más cercanas debería ser inferior al 97% y en los casos en los que esta similitud fuera mayor, debería evaluarse el grado de similitud de los genomas completos por reasociación ADN-ADN (DDH), que es la técnica de referencia o *gold standard* en la definición de especies procariotas. Un valor de DDH inferior al 70% con el resto de especies descritas es el

establecido para definir una nueva especie, que además debe presentar como mínimo una característica fenotípica que la diferencie del resto de especies del género.

**Tabla 1. Especies aceptadas en el género *Aeromonas*.**

Especie	Cepa tipo	Otras designaciones	Origen	Autores
<i>A. hydrophila</i> <sup>a</sup>	CECT 839 <sup>T</sup>	ATCC 7966 <sup>T</sup>	Leche	Stainer, 1943
<i>A. salmonicida</i> <sup>b</sup>	CECT 894 <sup>T</sup>	ATCC 33658 <sup>T</sup>	Salmón	Griffin y col., 1953
<i>A. sobria</i>	CECT 4245 <sup>T</sup>	ATCC 43979 <sup>T</sup>	Pez	Popoff y Veron, 1981
<i>A. media</i>	CECT 4232 <sup>T</sup>	ATCC33907 <sup>T</sup>	Agua de piscifactoría	Allen y cols., 1983
<i>A. veronii</i> <sup>c</sup>	CECT 4257 <sup>T</sup>	ATCC 35624 <sup>T</sup>	Espudo	Hickman-Brenner y cols., 1987
<i>A. caviae</i>	CECT 838 <sup>T</sup>	ATCC 15468 <sup>T</sup>	Cobaya	Schubert y Hegazi, 1988
<i>A. eucrenophila</i>	CECT 4224 <sup>T</sup>	ATCC 23309 <sup>T</sup>	Pez de agua dulce	Schubert y Hegazi, 1988
<i>A. schubertii</i>	CECT 4240 <sup>T</sup>	ATCC 43700 <sup>T</sup>	Absceso cutáneo	Hickman-Brenner y cols., 1988
<i>A. jandaei</i>	CECT 4228 <sup>T</sup>	ATCC 49568 <sup>T</sup>	Heces humanas	Carnahan y cols., 1991
<i>A. trota</i> <sup>d</sup>	CECT 4255 <sup>T</sup>	ATCC 49657 <sup>T</sup>	Heces humanas	Carnahan y cols., 1991
<i>A. allossacharophila</i>	CECT 4199 <sup>T</sup>	ATCC 51208 <sup>T</sup>	Anguila	Martínez-Murcia y cols., 1992
<i>A. encheleia</i>	CECT 4342 <sup>T</sup>	ATCC 51929 <sup>T</sup>	Anguila	Esteve y cols., 1995
<i>A. bestiarum</i>	CECT 4227 <sup>T</sup>	ATCC 51108 <sup>T</sup>	Pez enfermo	Ali y cols., 1996
<i>A. popoffii</i>	CECT 5176 <sup>T</sup>	ATCC BAA-243 <sup>T</sup>	Agua potable	Huys y cols., 1997
<i>A. simiae</i>	IBS S-6874 <sup>T</sup>	CIP 107798 <sup>T</sup>	Heces de mono	Harf-Monteil y cols., 2004
<i>A. molluscorum</i>	CECT 5864 <sup>T</sup>	LMG 22214 <sup>T</sup>	Moluscos bivalvos	Miñana-Galvis y cols., 2004
<i>A. bivalvium</i>	CECT 7113 <sup>T</sup>	LMG 23376 <sup>T</sup>	Moluscos bivalvos	Miñana-Galvis y cols., 2007
<i>A. tecta</i>	CECT 7082 <sup>T</sup>	DSM 17300 <sup>T</sup>	Heces de niño con diarrea	Demarta y cols., 2008
<i>A. piscicola</i>	CECT 7443 <sup>T</sup>	LMG 24783 <sup>T</sup>	Pez enfermo	Beaz-Hidalgo y cols., 2009
<i>A. fluvialis</i>	CECT 7401 <sup>T</sup>	LMG 24681 <sup>T</sup>	Agua de río	Alperi y cols., 2010
<i>A. taiwanensis</i>	CECT 7403 <sup>T</sup>	LMG24683 <sup>T</sup>	Infección de herida	Alperi y cols., 2010
<i>A. sanarellii</i>	CECT 7402 <sup>T</sup>	LMG 24682 <sup>T</sup>	Infección de herida	Alperi y cols., 2010
<i>A. diversa</i>	CECT 4254 <sup>T</sup>	ATCC 43946 <sup>T</sup>	Infección de herida	Miñana-Galvis y cols., 2010
<i>A. rivuli</i>	CECT 7518 <sup>T</sup>	DSM 22539 <sup>T</sup>	Agua de río	Figueras y cols., 2011
<i>A. cavernicola</i>	CECT 7862 <sup>T</sup>	DSM 24474 <sup>T</sup>	Agua(arroyo en una caverna)	Martínez-Murcia y cols., 2012
<i>A. australiensis</i>	CECT 8023 <sup>T</sup>	LMG 26707 <sup>T</sup>	Agua (utilizada para riego)	Aravena-Román y cols., 2013
<i>A. dhakensis</i> <sup>e</sup>	CECT 5744 <sup>T</sup>	LMG 19562 <sup>T</sup>	Heces de niño con diarrea	Beaz-Hidalgo y cols., 2013
<i>A. finlandensis</i>	CECT 8028 <sup>T</sup>	LMG 26709 <sup>T</sup>	Agua de lago con afloramiento de cianobacterias	Beaz-Hidalgo y cols., 2015
<i>A. aquatic</i>	CECT 8025 <sup>T</sup>	LMG 26712 <sup>T</sup>	Agua de lago con afloramiento de cianobacterias	Beaz-Hidalgo y cols., 2015
<i>A. lacus</i>	CECT 8024 <sup>T</sup>	LMG 26710 <sup>T</sup>	Agua de lago con afloramiento de cianobacterias	Beaz-Hidalgo y cols., 2015

<sup>a</sup>Especie tipo del género que incluye 2 subespecies: *A. hydrophila* subsp. *hydrophila* y *A. hydrophila* subsp. *ranae* (LMG 19707<sup>T</sup>),

<sup>b</sup>Incluye 5 subespecies: *A. salmonicida* subsp. *salmonicida*, *A. salmonicida* subsp. *achromogenes* (ATCC 3659<sup>T</sup>), *A. salmonicida* subsp. *masoucida* (ATCC 27013<sup>T</sup>), *A. salmonicida* subsp. *smithia*(ATCC 49393<sup>T</sup>) y *A. salmonicida* subsp. *pectinolytica*(DSMZ 12609<sup>T</sup>),

<sup>c</sup>Incluye 2 biotipos: *A. veronii* bv. *sobria* y *A. veronii* bv. *veronii* y las especies *A. ichtiosmia* y *A. culicicola* son consideradas sinónimos de esta especie, <sup>d</sup>*A. enteropelogeneses* un sinónimo de esta especie. <sup>e</sup>Tanto *A. hydrophila* subsp. *dakhensis*(CECT 5744<sup>T</sup>, Huys y cols. 2002) y *A. aquariorum* (CECT 7289<sup>T</sup>, Martínez-Murcia y cols., 2008) fueron reclasificadas como una única especie bajo este nombre.

Además, se recomienda la secuenciación de al menos 5 genes *housekeeping* o MLSA (*Multilocus Sequences Analysis*) o como nosotros preferimos denominar MLPA (*Multilocus Phylogenetic Analysis*), que proporcionen una mayor información/diferenciación filogenética así como determinar la variabilidad intraespecífica mediante MLST (*Multilocus Sequences Typing*) o otras técnicas de tipado moleculares (RAPD, ERIC-PCR, REP-PCR, AFLP).

La aplicación de todos estos criterios para la definición de nuevas especies fueron revisados para el género *Aeromonas* por Janda y Abbott (2010) y por Figueras y cols. (2011b). Estos últimos autores compararon los elevados valores de similitud del gen ARNr 16S superiores al 99% para algunas especies consideradas distintas (Martínez-Murcia y cols., 1992a; Harayama y Kasai, 2006; Alperi y cols., 2008) con los descritos para otros géneros como *Campylobacter* (Figueras y cols., 2011b). Este comportamiento es semejante al de otros géneros como *Streptomyces* (Santpierre-Bonaccio y cols., 2004), *Mycobacterium* (Rhodes y cols., 2003) cuyas especies tienen valores de similitud del gen ARNr 16S superiores al 97% establecido para la separación de especies pertenecían a especies diferentes, incluso con similitudes del 99.8% (Stackebrandt y Goebel, 1994) o del 100% (Martínez-Murcia y cols., 1992a; Harayama y Kasai, 2006; Beaz-Hidalgo y cols. 2009). A raíz de estos datos se ha propuesto que el valor de similitud del gen ARNr 16S, a partir del cual ha de ser obligatorio determinar los valores de DDH, se debe incrementar del 97% previamente establecido (Wayne y cols., 1987) al 98,7 - 99% (Stackebrandt y Ebers, 2006; Figueras y cols., 2011b). Así mismo, en base a los valores de DDH obtenidos entre especies claramente consideradas distintas, se ha propuesto un nuevo límite de 80% para la separación de especies (Stackebrandt y Ebers, 2006; Figueras y cols., 2011b). Estas propuestas se han basado en los datos obtenidos en diversos estudios que han validado la utilidad del análisis filogenético de los genes *housekeeping* mencionados anteriormente denominado MLSA o como nosotros preferimos denominar MLPA), como técnica de sustitución al clásico método de referencia del DDH (Figueras y cols., 2011b).

### **1.2.2. Identificación fenotípica**

En este apartado se incluyen las características morfológicas, fisiológicas y

bioquímicas. En la morfología se estudió tanto, forma, presencia de flagelos, cuerpos de inclusión, endoesporas y tinción Gram; como parámetros coloniales: color, forma y dimensiones. Las características fisiológicas incluyen datos de las condiciones de crecimiento (sal, pH, temperatura, oxígeno) mientras que las bioquímicas comprenden la presencia de enzimas, metabolización de sustratos y la resistencia a agentes antimicrobianos, así como los perfiles de proteínas totales.

### **1.2.2.1. Características fenotípicas clásicas**

Características fenotípicas clásicas para la identificación del género *Aeromonas* son la tinción de Gram negativa, presencia de la citocromo oxidasa generalmente positiva, crecimiento en caldo nutritivo al 0% de NaCl y negativo al 6%, la no producción de ácido de inositol, la capacidad de oxidar-fermentar la glucosa y el crecimiento en presencia del factor vibriostático O/129 (Altwegg, 1999, Martin-Carnahan y Joseph, 2005). Sin embargo, recientemente se describieron 2 nuevas especies, *A. cavernicola* (Martínez-Murcia y cols., 2013) y *A. australiensis* (Aravena-Román y cols., 2013), que fueron sensibles a este agente.

### **1.2.2.2. Sistemas no automatizados**

Para la identificación de las especies de *Aeromonas* se han aplicado numerosos protocolos bioquímicos, muchos de los cuales sólo discriminan a los tres grandes grupos fenotípicos tradicionales que engloban los complejos de especies “*A. hydrophila*”, “*A. caviae*” y “*A. sobria*” (Abbott y cols., 1992; Borrell y cols., 1998), mientras que otros están orientados a la identificación de cepas a nivel de especie (Carnahan y cols., 1991a; Abbott y cols., 1992; Kämpfer y Altwegg, 1992; Carnahan y Joseph, 1993; Oakey y cols., 1996; Janda y cols., 1996; Kaznowski, 1998; Altwegg, 1999, Abbott y cols., 2003). Uno de los estudios más destacado es el de Abbott y cols. en el año 2003 en el que ensayan 62 pruebas bioquímicas en 193 cepas de todas las especies de *Aeromonas* definidas y observando que sólo 9 pruebas (14.5%) generaban resultados comunes para las 193 cepas: presencia de citocromo oxidasa y nitrato reductasa, fermentación de la D-glucosa y trealosa, la no utilización del mucato y la incapacidad de fermentar el D-arabitol, dulcitol, eritritol y xilosa. Recogen además una lista de reacciones atípicas junto con distintas pruebas para la diferenciación de fenoespecies dentro de los



complejos “*A. hydrophila*, *A. caviae* y *A. sobria*”. En este estudio se observa además que existe, en todas las especies excepto en *A. jandaei*, una correlación directa entre la fermentación de melobiosa y rafinosa por lo que los que sugieren que los genes que codifican estos procesos podrían estar ligados (Abbott y cols., 2003).

En 2010, Beaz-Hidalgo y cols. re-identificaron genéticamente 119 cepas aisladas de peces e identificadas bioquímicamente como *Aeromonas* y constataron que sólo el 75,6% (90/119) de las cepas pertenecían a este género. Además se comprobó que sólo el 35,5% (32/90) de las cepas estaban correctamente identificadas a nivel de especie y que la mayoría estaban incorrectamente identificadas como *A. hydrophila* que era la especie más frecuente. Sin embargo, mediante RFLP del ADNr 16S y secuenciación del gen *rpoD* se determinó que las 5 especies más prevalentes fueron *A. sobria* (25,5%), *A. salmonicida* (18,8%), *A. hydrophila* (16,7%), *A. bestiarum* (15,6%) y *A. piscicola* (11,1%). Esta última especie se descubrió como especie nueva en este estudio.

### 1.2.2.3. Sistemas automatizados

Los sistemas miniaturizados de origen comercial son los más utilizados de forma rutinaria en los laboratorios clínicos para la identificación de bacterias. Éstos sistemas están diseñados principalmente para la identificación de bacterias Gram negativas, oxidasa negativas y aerobias o anaerobias facultativas pertenecientes a la familia Enterobacteriaceae y dan poca relevancia a bacterias oxidasa positivas pertenecientes a los géneros *Vibrio* y *Aeromonas* (Overman y cols., 1985; Abbott y cols., 1998). Los resultados obtenidos tras comparar la identificación bioquímica de las especies de *Aeromonas* utilizando sistemas no automatizados y sistemas automatizados mostraron una buena correlación (Vivas y cols., 2000). Sin embargo, cuando ésta comparación se realizó con cepas identificadas genéticamente por RFLP del ADNr 16S y/o secuenciación del gen *rpoB*, la concordancia resultó ser muy baja (Borrell, 1998, Soler y cols., 2003b; Lamy y cols., 2010). El problema más importante que presenta la identificación con los sistemas bioquímicos automatizados es la confusión de cepas de *Aeromonas* con especies del género *Vibrio* (Overman y cols., 1985, 1986; Kuijper y cols., 1989; Kuijper y Peeters, 1991; Abbott y cols., 1998; Vivas y cols., 2000, Kozinsca y cols., 2002; Figueras 2005; Janda y Abbott, 2010), en especial con las

especies *V. cholerae* y *V. fluvialis* (Soler y cols., 2003b, Lamy y cols., 2010). En su revisión Janda y Abbott (2010) categorizan los errores que se producen en la identificación de *Aeromonas* con 5 sistemas automatizados considerando un gran error la confusión con especies de *Vibrio*.

### 1.2.3. Identificación molecular

#### 1.2.3.1. Gen ARN ribosómico 16S

Las secuencias del gen ARN ribosómico 16S han sido clásicamente consideradas como marcadores moleculares estables y específicos para la identificación de especies bacterianas (Woese 1987; Martínez-Murcia y cols., 1992a; Marchandin y cols., 2003) en base a las siguientes características:

- es un gen esencial
- su distribución es universal, permitiendo la comparación de todos los microorganismos
- su tamaño (ca 1550 pb) permite la secuenciación casi completa del gen
- su estructura presenta un mosaico de regiones variables, útiles en la diferenciación de organismos estrechamente relacionados (Chakravorty y cols., 2007), y sus regiones conservadas son útiles para la comparación de organismos lejanos y han permitido el diseño de cebadores “universales” (Woese y cols., 1987).

Estos genes están organizados como una familia multigénica que incluye entre 1 y 15 copias (operones) en el genoma bacteriano (Coenye y Vandamme, 2003). Por lo general, se considera que todas las copias de un organismo son idénticas o casi idénticas en su secuencia nucleotídica, sin embargo, en varios géneros se han descrito diferencias nucleotídicas intragenómicas entre las copias del gen ARN 16S (Clayton y cols., 1995; Cilia y cols., 1996; Martínez-Murcia y cols., 1999a; Ueda y cols., 1999; Moreno y cols., 2002; Coenye y Vandamme, 2003; Marchandin y cols., 2003; Acinas y cols., 2004; Boucher y cols., 2004; Vázquez y cols., 2005; Morandi y cols., 2005; Alperi y cols., 2008; Roger y cols., 2012a). Estas diferencias entre las copias son denominadas polimorfismos, microheterogeneidades, variabilidad interoperónica o cistrónica. La estructura secundaria del gen ARNr 16S está formada por aproximadamente 50 hélices, las cuales presentan diferentes tasas evolutivas (Woese, 1987). En la mayoría de

bacterias, las microheterogeneidades se localizan en las regiones variables (RV) 1, 2, 5 y 6, y por lo general afectan a menos del 1% de las posiciones (Coenye y Vandamme, 2003; Alperi y cols., 2008). Los casos más extremos de variabilidad intragenómica se han descrito en las bacterias termófilas con un 11.6% de posiciones con microheterogeneidad (Acinas y cols., 2004). Algunos autores afirman que la existencia de variabilidad no afecta a la taxonomía (Coenye y Vandamme, 2003; Acinas y cols., 2004) mientras que otros autores han demostrado todo lo contrario, es decir, que la existencia de polimorfismos, aunque sea en menos del 1% de las posiciones, puede conducir a errores en la identificación de especies (Boucher y cols., 2004; Marchandin y cols., 2003; Vásquez y cols., 2005, Alperi y cols., 2008), especialmente en géneros con una escasa variabilidad interespecie (Ninet y cols., 1996). Dentro de este último grupo de microorganismos se incluyen las *Aeromonas* con una similitud interespecie del gen ARNr 16S del 96.7% al 100% (Saavedra y cols., 2006; Alperi y cols., 2008).

Una de las principales ventajas de este gen es la disponibilidad, en base de datos como el GenBank, de un gran número de secuencias de numerosas especies bacterianas. Esto permite la comparación de similitudes y la realización de análisis filogenéticos. Sin embargo debe tenerse en cuenta que no todas las secuencias depositadas en las bases de datos son de buena calidad o están correctamente etiquetadas, lo que puede generar interpretaciones erróneas (Janda y Abbott, 2007; Figueras y cols., 2011b). La gran cantidad de secuencias disponibles de prácticamente todos los taxones ha conducido a elegir este gen como diana para el estudio de comunidades microbianas sin necesidad de realizar técnicas de cultivo. Este mismo gen se ha seguido utilizando en las técnicas de secuenciación masiva de nueva generación (McLellan y cols., 2010; Smith y cols., 2012; Zhang y cols., 2015).

### **1.2.3.2. Técnicas de identificación basadas en el gen ARNr 16S**

#### **Secuencias del gen ARNr 16S.**

Las secuencias del gen ARNr 16S de todas las especies del género *Aeromonas* aceptadas hasta 1999 fueron realizadas por Martínez-Murcia y cols. (1992a, 1999), quienes establecieron la filogenia del género en base a este gen y determinaron que, en la mayoría de los casos, las relaciones filogenéticas obtenidas con este gen eran concordantes con los valores de DDH. Además del alto grado de similitud interespecie

(96,7% - 100%), se ha observado que las regiones del gen más variables, y en base a las cuales se diferencian la mayoría de las especies, son la RV2, RV3 y RV6 (Martínez-Murcia y cols., 1992a; Saavedra y cols., 2006). Hasta la fecha se ha descrito la existencia de microheterogeneidad o polimorfismo en varias especies del género: *A. popoffii* (Demarta y cols., 1999), *A. molluscorum* y *A. bivalvium* (Miñana-Galbis y cols., 2004, 2007), *A. veronii* y *A. media* (Morandi y cols., 2005; Figueras 2005; Alperi y cols., 2008), *A. bestiarum* y *A. salmonicida* (Martínez-Murcia y cols., 2005) y *A. allosaccharophila* (Saavedra y cols., 2006), sin embargo, esta variabilidad nunca ha sido analizada conjuntamente. En la actualidad y gracias a las secuencias de los genomas completos de *A. hydrophila* (Seshadri y cols., 2006) y *A. salmonicida* (Reith y cols., 2008) se ha observado que el número de copias del gen ARNr 16S en el genoma de *Aeromonas* podría variar entre las 9 copias de *A. salmonicida* A449 y las 10 de *A. hydrophila* ATCC7966<sup>T</sup>.

Además de la secuenciación se han descrito otras técnicas moleculares basadas en este gen para la identificación de especies de *Aeromonas*, como el Polimorfismo de Longitud de los Fragmentos de Restricción (RFLP), la Desorción/Ionización Láser Asistida por Matriz (MALDI-TOF) y más recientemente utilizando las proteínas ribosomales contenidas en los genomas de diversas bacterias para realizar análisis filogenéticos (*ribosomal* MLST, rMLST).

### **Polimorfismo de Longitud de los Fragmentos de Restricción (RFLP)**

Borrell y cols. en 1997 diseñaron un protocolo basado en el análisis de los patrones de restricción de 1503 pb del ADNr 16S, obtenidos tras la digestión con las endonucleasas AluI (AGCT) y MboI (GATC), que permitía identificar 10 de las 13 especies aceptadas (en aquel momento) en el género. La utilización de endonucleasas complementarias permitía identificar 12 de las 13 especies aceptadas (Borrell y cols., 1997). Tres años después Figueras y cols., (2000) publican una ampliación de este protocolo que permite entonces la identificación de las 14 especies aceptadas en el momento de su publicación. Hasta la fecha, este protocolo ha sido citado en numerosas ocasiones y existen multitud de publicaciones que utilizan este método de identificación de especies de *Aeromonas* (Park y cols., 2003; Abdullah y cols., 2003; Esteve y cols.,

2004; Vilches y cols., 2004, 2007; Aguilera-Arreola y cols., 2005, 2007; Nawaz y cols., 2006; Kozinska, 2007; Scoaris y cols., 2008; Krzyminska y cols., 2008, 2009; Beaz-Hidalgo y cols., 2010; Puthuchearry y cols., 2012; Jagoda y cols., 2014; Skwor y cols., 2014; Vega-Sánchez y cols., 2014), lo que indica que, tras 15 años desde su publicación, este método sigue siendo válido.

### **Desorción/Ionización Láser Asistida por Matriz (MALDI-TOF)**

La sigla MALDI-TOF deriva del inglés Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-Of-Flight (Donohue y cols., 2006; Murray, 2010). Se trata de una técnica de espectrometría de masa, basado en la determinación de pesos moleculares (principalmente de 2-20 KDa) de biomoléculas, mayoritariamente de las proteínas asociadas al gen rRNA del 16S y que se obtiene a partir de células enteras o de extractos de las mismas (Donohue y cols., 2006; Murray, 2010). Los perfiles o espectros de proteínas son específicos de cada bacteria, por lo que asemejan una huella digital para cada género y especie bacteriana (Donohue y cols., 2006; Murray, 2010). Este método es más rápido y fiable que los métodos fenotípicos convencionales, motivo por el cual, cada día es utilizado por más laboratorios de microbiología, no sólo para clasificar e identificar bacterias (Donohue y cols., 2006; Seng y cols., 2009; Murray, 2010; Deng y cols., 2014) sino que también es utilizado como un método de tipificación bacteriana (Böhme y cols., 2010; Spinali y cols., 2015).

Actualmente, hay disponibles 2 software utilizados para la identificación de diferentes grupos bacterianos, incluido el género *Aeromonas*. Uno es el SARAMIS™ (bioMérieux SA, Francia) y el otro es el MALDI Biotyper (Brucker Daltonics, Alemania). En el caso específico de *Aeromonas*, sólo existen unos pocos estudios en los que se ha utilizado este nuevo sistema para la identificación a nivel de especie (Donohue y cols., 2006, 2007; Lamy y cols., 2011; Benagli y cols., 2012; Chen y cols., 2014a; Shin y cols., 2015). Los primeros estudios fueron los realizados por Donohue y cols. (2006, 2007) quienes construyeron una base de datos que representan 17 especies de *Aeromonas* y que incluía 40 cepas (tipo, referencia y aislamientos clínicos). Esta base de datos se utilizó para la identificación específica de 52 cepas de *Aeromonas* recuperadas de sistemas de distribución de agua potable y se obtuvo un 82,7% (43/52) de concordancia cuando los resultados obtenidos mediante MALDI-TOF fueron

comparados con los resultados obtenidos mediante identificación fenotípica (Donohue y cols., 2007). Sin embargo, para lograr la validación de este nuevo método, es necesaria su comparación con los resultados obtenidos mediante métodos moleculares, como la secuenciación de genes *housekeeping*, que corresponden a los actuales métodos de referencia para la identificación de *Aeromonas*. Ejemplos de este tipo de estudios son los realizados por Lamy y cols. (2011), Benagli y cols. (2012), Chen y cols. (2014a), Shin y cols. (2015). Lamy y cols. (2011) analizaron 139 aislados de origen clínico y ambiental identificados molecularmente mediante secuenciación del gen *rpoB* y obtuvieron un 100% de identificaciones correctas a nivel de género y un 91,4% (127/139) a nivel de especie. En este estudio el software utilizado fue el Biotyper 2.0 de Bruker, demostrando la superioridad del sistema MALDI-TOF por sobre los métodos fenotípicos de identificación convencionales (Lamy y cols., 2011). En relación a la identificación a nivel de género, idéntico resultado obtuvo Benagli y cols. (2012) cuando re identificaron 741 aislados de origen clínico y ambiental, previamente identificados mediante secuenciación del gen *gyrB*. Además, este método mostró una precisión de 93% (689/741) cuando la identificación se realizó a nivel de especie utilizando una base de datos de SARAMIS<sup>TM</sup> en base a los SuperSpectros que habían creado para la identificación de 11 especies: *A. hydrophila*, *A. caviae*, *A. media*, *A. tecta*, *A. popoffii*, *A. eucrenophila*, *A. encheleia*, *A. bestiarum*, *A. salmonicida*, *A. sobria* y *A. veronii* (Benagli y cols., 2012). El 7% restante (52/741) no pudo ser identificado debido a la ausencia de SuperSpectra en la base de datos. Luego, Chen y cols. (2014a) utilizaron 217 aislados clínicos de *Aeromonas* identificados genéticamente mediante secuenciación del gen *rpoB* (61 *A. veronii*, 61 *A. caviae*, 58 *A. dhakensis*, 35 *A. hydrophila* subsp. *hydrophila*, 1 *A. sanarellii* y 1 *A. taiwanensis*), para estandarizar este nuevo método, además de crear su propia base de datos con el Biotyper de Bruker. De esta forma, cuando otros 100 aislados correspondientes a 4 especies de *Aeromonas* (30 *A. caviae*, 30 *A. veronii*, 30 *A. dhakensis* y 10 *A. hydrophila*) fueron re-identificados para validar el método de MALDI-TOF, los resultados obtenidos mostraron un 100% de correcta identificación a nivel de género y un 97% a nivel de especie (100% para *A. caviae*, un 96,7% para *A. veronii* y *A. dhakensis* y un 90% para *A. hydrophila*). Recientemente, Shin y cols. (2015) utilizaron 65 cepas de origen clínico de *Aeromonas* identificadas previamente mediante secuenciación del gen *gyrB* como: 35 *A.*

*hydrophila*, 23 *A. caviae*, 6 *A. veronii* y 1 *A. dhakensis* y obtuvieron un 98,5% de concordancia en la identificación a nivel de género y un 92,3% de coincidencia a nivel de especie (100% para *A. hydrophila* y *A. veronii*, 82,6% para *A. caviae* y 0% para *A. dhakensis*) utilizando la base de datos del Biotyper de Bruker. No es de extrañar que estos resultados sean los más desfavorables ya que por defecto las bases de datos cuentan con pocos representantes de solo alguna de la especies, y no incluyen generalmente *A. dhakensis*. Contra más robusta es la base de datos mejor es el resultado obtenido con este sistema. Un ejemplo de esto es el estudio de Vávrová y cols. (2014), quienes re-identificaron mediante MALDI-TOF Biotyper de Bruker (versión 3.4) 64 cepas de *Aeromonas*, que incluían las 26 cepas tipo de las especies válidamente aceptadas hasta el año 2014 y obtuvieron un bajo rendimiento a nivel de especie. A pesar de que el 100% de las cepas fue identificada correctamente a nivel de género, sólo el 64% (41/64) de las cepas fueron correctamente identificadas a nivel de especie. En este caso en particular, es necesario aclarar que el bajo rendimiento evidenciado, se debe principalmente a que sólo 50 (78,1%) de las 64 cepas analizadas estaban incluidas en la base de datos.

A partir de todos estos datos se puede concluir que MALDI-TOF es una herramienta útil y alternativa para la identificación de *Aeromonas* a nivel de especie, ya que genera menos de 10% de error. Su velocidad de análisis y su capacidad de manejar un gran número de muestras hacen de esta técnica útil para la monitorización. Además, este método es relativamente barato. Sin embargo, una base de datos actualizada es importante con el fin de ser capaz de identificar todas las especies del género.

### **Análisis de proteínas ribosomales**

Tal y como hemos comentado la obtención de genomas completos permite analizar sus proteínas ribosomales y realizar análisis filogenéticos rMLST (Jolley y cols., 2012; Jolley y Maiden, 2014). En estos estudios se utilizan 53 genes que codifican para proteínas ribosomales que son las que se ensamblan para formar los ribosomas y que por tanto están presentes en todas las bacterias. Esta aproximación fue validada en la discriminación de especies de *Neisseria* y de *Campylobacter* próximas y difíciles de diferenciar demostrándose la superioridad de este método al compararlo con el análisis filogenético con 7 genes del MLST (Jolley y Maiden, 2014).

En el estudio realizado de genomas del género *Aeromonas* realizado por Colston y cols. (2014) se utilizaron 47 genes de proteínas ribosomales y 16 genes *housekeeping* para determinar los borradores de los 56 genomas.

#### **1.2.4. Hibridación ADN-ADN (DDH)**

La hibridación ADN-ADN (DDH), tal y como se ha comentado previamente, es el método de referencia utilizado para determinar si dos microorganismos pertenecen o no a la misma especie procariota ya que permite conocer la similitud entre dos genomas completos (Roselló-Móra, 2006). Este método ha sido muy criticado ya que es muy laborioso y no permite generar bases de datos interactivas y acumulativas, presenta grandes diferencias entre los valores de similitud obtenidos para los mismos microorganismos al ser evaluados por distintos autores, utilizando o no el mismo método, y una elevada desviación estándar además de no proporcionar información filogenética (Stackebrandt, 2003; Roselló-Móra, 2006; Harayama, 2006; Figueras y cols., 2011b). Tal y como hemos comentado previamente algunos autores han propuesto que el análisis de las secuencias de al menos 5 genes *housekeeping* recomendada por el ICSP (Stackebrandt y cols., 2002), con los que se pueden generar bases de datos dinámicas e interactivas y que proporcionan una información filogenética, podría sustituir definitivamente la técnica de DDH en la definición de especie, siempre que los genes seleccionados fueran una muestra representativa del genoma completo (Roselló-Móra, 2006; Figueras y cols., 2011b).

Los resultados de la DDH se expresan como el porcentaje de hibridación (Relative Binding Ratio, RBR) y representa el ADN bicatenario (ADN<sub>bc</sub>) o híbrido formado al enfrentar el ADN monocatenario (ADN<sub>mc</sub>) de dos genomas en relación al grado de reasociación del ADN homólogo, esto es, el que hibrida consigo mismo. En los experimentos de DDH los factores más determinantes son las concentraciones de los ADNs a comparar, que han de ser equimolares, la pureza de los mismos ( $1.7 < \text{Abs}_{260} / \text{Abs}_{280} < 2$ , valores inferiores indican una contaminación por proteínas, mientras que valores superiores indican la presencia de ARN que pueden hibridar con el ADN e interferir en el experimento) y la temperatura de hibridación (Vandamme y cols., 1996). La temperatura de reasociación, renaturalización o hibridación depende de la temperatura de melting ( $T_m$ ). La  $T_m$  se define como la temperatura a la cual el 50%



de hebras constituyen ADN<sub>bc</sub> o como el punto medio de la curva de desnaturalización térmica. Este valor es una medida de la estabilidad del ADN<sub>bc</sub> y está relacionado directamente con la concentración de Guanina y Citosina ([G+C]) (Rosselló-Móra, 2006). Se estableció como punto de cohorte para identificar una nueva especie bacteriana un valor  $\leq$  al 70% de hibridación entre 2 hebras de ADN comparadas (Rosselló-Mora, 2006; Martin-Carnahan y Joseph, 2005). Sin embargo otros autores consideran que debería considerarse un valor más estricto del 80% (Rosselló-Móra y Amann, 2001; Rosselló-Móra, 2006; Figueras y cols., 2011b).

Entre las técnicas de DDH más referenciadas en la bibliografía se encuentran las propuestas por De Ley y cols. (1970), Ezaki y cols. (1989), Johnson (1981) y Ziemke y cols. (1998), ésta es una modificación del método de Brenner y cols. (1969). Las diferencias principales que existen entre los distintos métodos de DDH residen básicamente en el marcaje del ADN [con radioisótopos (Brenner y cols., 1969; Johnson, 1981), marcadores fluorescentes, digoxigenina y biotina (Ziemke y cols., 1998) y fotobiotina (Ezaki y cols., 1989)], el medio en que tiene lugar la hibridación [en un medio líquido (Brenner y cols., 1969; De Ley y cols., 1970; Ziemke y cols., 1998) o bien uno de los ADNs estar fijado previamente a una superficie sólida (Johnson, 1981; Ezaki y cols., 1989)] y finalmente la separación del ADN<sub>mc</sub> y ADN<sub>bc</sub> [por unión específica diferencial de los mismos con hidroxiapatita (Brenner y cols., 1969; Ziemke y cols., 1998) o bien porque el ADN<sub>mc</sub> se degrade mediante el uso de la endonucleasa S1 (Ezaki y cols., 1989)].

#### **1.2.4.1. DDH en *Aeromonas***

En los experimentos de DDH, como se ha mencionado previamente, un aspecto crítico es la determinación de la temperatura óptima de renaturalización (TOR) que se calcula a partir de la T<sub>m</sub> y por tanto de la [G+C]. En el género *Aeromonas* el contenido en % de G+C oscila entre el 57% y el 63%, con un valor medio del 60%. A partir de estos valores las temperaturas para las distintas condiciones de renaturalización se han definido como 60°C, para la renaturalización en condiciones óptimas, y 75°C en condiciones estrictas (Martin-Carnahan y Joseph, 2005). Sin embargo, dichos valores dependen del método utilizado.

En el género *Aeromonas* han existido ciertas controversias en torno a la correcta

o no definición de varias especies debido, básicamente, a los valores heterogéneos de reasociación de sus ADNs obtenidos por distintos autores (Esteve y cols., 1995c, b; Huys y cols., 1997b, 2001; Martínez-Murcia y cols., 2005; Nhung y cols., 2007; Figueras y cols., 2011b). Estas diferencias vienen dadas tanto por la utilización de métodos diferentes como por las distintas temperaturas de hibridación utilizadas en los ensayos, tal como se observa en la Tabla 2.

**Tabla 2. Valores, condiciones y métodos de DDH entre las cepas tipo de *A. veronii* y *A. allosaccharophila* descritos en la literatura (copiado de Alperi, 2009).**

Condiciones y valores de DDH (%) en distintos estudios			
Parámetros	Esteve y cols., 1995b	Huys y cols., 2001	Nhung y cols., 2007
ADN-ADN (%)	0	80	84
Temperatura °C	54	45	45
Formamida %	30	50	50
Método	Johnson, 1981	Ezaki y cols., 1989	Ezaki y cols., 1989

### 1.2.5. Secuenciación de Genomas Completo (Wole Genome Sequencing, WGS)

El avance en las técnicas utilizadas para la obtención de genomas completos ha sido espectacular en los últimos años (Bautista-Moreno 2010). En 1977 Sanger y cols. desarrollaron un método enzimático y Maxam y Gilbert un método de fragmentación química que dieron pie al desarrollo de las primeras tecnologías de secuenciación de ADN. Estas técnicas eran altamente peligrosas debido a la utilización de marcadores radiactivos y tenían una capacidad de lectura de 80 nt (Bautista-Moreno 2010). A finales de 1990 comienzan a aparecer los proyectos de secuenciación y con ellos los primeros equipos de secuenciación automática ABI Prism (Applied Biosystem, EEUU) y CEQ-Serie (Beckman Coulter, EEUU). En estos equipos los desoxinucleótidos son marcados con fluorescencia que se analiza por electroforesis capilar, generando un electroferograma a partir del cual se deduce la secuencia de nucleótidos en un ordenador. Esta tecnología permitía secuenciar hasta 96 muestras en unas pocas horas y producía secuencias con una longitud de entre 500 y 1000 nt, lo que supuso una revolución en el proceso de secuenciación (Pettersson y cols., 2009; Bautista-Moreno 2010). Esta etapa corresponde a lo que se conoce como secuenciación de primera generación (Pettersson y cols., 2009; Bautista-Moreno 2010). Luego aparecieron los

secuenciadores de segunda generación, conocidos como secuenciación masiva paralela (*massive parallel sequencing*, MPS) o secuenciación de nueva generación (*next generation sequencing*, NGS), capaces de generar miles de reacciones de secuencias en paralelo, demostrando un alto rendimiento gracias a la inmovilización de la reacción en una superficie sólida, por lo que se abarata el costo, principalmente por la disminución en los volúmenes de reacción (nanorreacción) (Bautista-Moreno 2010). Esta es una técnica que no utiliza marcadores fluorescente, sino que mide la liberación de pirofosfato (denominada por esto pirosecuenciación) mediante una serie de reacciones enzimáticas acopladas, que liberan luz cada vez que se incorpora un nucleótido, produciéndose imágenes que son captadas en un flujograma que es interpretado por un ordenador y traducido a nucleótidos (Pettersson y cols., 2009; Rodríguez-Santiago y Armengol, 2012). El primer modelo de secuenciador basado en la pirosecuenciación, fue el GS-20 (454 Life Science, que posteriormente fue adquirido por Rochecon equipos como el 454 FX+ y GS junior) es capaz de secuenciar 20 millones de bases en aproximadamente 4 horas (Pettersson y cols., 2009; Rodríguez-Santiago y Armengol, 2012). Esta tecnología ha evolucionado hasta ser capaz de secuenciar 500 millones de bases en unas pocas horas (Pettersson y cols., 2009; Rodríguez-Santiago y Armengol, 2012). La ambición por abaratar los costos y aumentar la fiabilidad de las secuencias, ha llevado a lo que se conoce como secuenciación de tercera generación, que se basa en la secuenciación en tiempo real de millones de moléculas de ADN adheridas a una superficie sólida, generando pequeños fragmentos fiables de entre 25 y 45 nt, que se alinean y se ensamblan para formar un *contig* basándose en las secuencias que se solapan. Esta es la tecnología recomendada para la secuenciación de genomas y los primeros en desarrollarla fueron Helicos Biosciences a través del HeliScope™ (Pettersson y cols., 2009; Bautista-Moreno 2010).

En 1996 el grupo del Dr. Venter (Hood y cols., 1996) publicó el primer genoma de un microorganismo de vida libre completamente secuenciado que correspondió a *Haemophilus influenzae* y ahora, 20 años después, debido principalmente a la disminución de los costos de la secuenciación y métodos más rápidos y efectivos, se observa un crecimiento exponencial en el número de genomas bacterianos secuenciados, alcanzando una cifra de aproximadamente 27.000 genomas depositados

en la base de datos de genomas del GenBank en el Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI).

Cabe destacar que la revista *Systematic and Applied Microbiology* requiere que para la publicación de nuevas especies con una única cepa se obtenga el genoma de la misma. Sin embargo, a nuestro parecer estos genomas pueden tener poco valor sino se dispone de los genomas de las cepas tipo de las especies más cercanas, ya que sin ellos no es posible un análisis comparativo que es en lo que se basa la taxonomía (Figueras y cols., 2011b; Beaz-Hidalgo y cols., 2015a).

En el caso particular del *Aeromonas*, hasta el año 2012 existían tan solo 6 genomas disponibles con un tamaño similar (4,43–4,81 Mb) que fueron comprados por Beaz-Hidalgo y Figueras (2013). No obstante en un estudio realizado por estos mismos autores y publicado a comienzos de este año pero en el que utilizaba la información depositada hasta el 23 de julio de 2014 en la base de datos de la NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/?term=Aeromonas>), ya aparecían secuenciados 44 genomas de *Aeromonas* (Beaz-Hidalgo y cols. 2015a). Sin embargo, un año después (25 de julio de 2015) este número ha aumentado exponencialmente, alcanzando los 113 genomas (Tabla 3), lo que representa un incremento del 257%. Además las cepas tipo de 29 de las 30 especies aceptadas dentro del género, excepto *A. cavernicola* CECT 7862<sup>T</sup>, tienen secuenciado el genoma, como se muestra en la Tabla 3. La mayoría de estos genomas de las cepas tipo (Tabla 3) fueron obtenidos en un estudio monográfico sobre el género *Aeromonas* realizado por Colston y cols. (2014).

**Tabla 3. Genomas disponibles de *Aeromonas* en el GenBank hasta 25/06/2015.**

<i>Aeromonas</i> spp.(número total de genomas) <sup>a</sup>	Referencia	Origen (País)	Referencia Bio proyecto	Estado de la secuenciación
<i>A. hydrophila</i> (37)	ATCC 7966 <sup>Tb</sup>	Leche (EEUU)	PRJNA58617	100%
	ML09-119	Pez gato enfermo (EEUU)	PRJNA205540	100%
	4AK4	Agua residual no tratada (China)	PRJNA224116	100%
	YL17	Abono (Malasia)	PRJNA224116	100%
	AL09-71	Pez gato enfermo (EEUU)	PRJNA224116	100%
	pc104A	Suelo del estanque del pez gato	PRJNA224116	100%
	J-1	ND (China)	PRJNA224116	100%
	AL06-06	Pez (goldfish, EEUU)	PRJNA224116	100%
	AH10	Pez (grass carp, China)	PRJNA224116	100%
	NJ-35	ND (China)	PRJNA224116	100%
	SSU <sup>c</sup>	Heces (EEUU)	PRJNA181618	50%
	BWH65	Humano (EEUU)	PRJNA224116	50%
	SNUFPC-A8	Salmón (Korea del sur)	PRJNA199785	25%
	116	Bilis (Malasia)	PRJNA199909	25%
	187	Pus (Malasia)	PRJNA199913	25%

**Tabla 3 (continuación 1). Genomas disponibles de *Aeromonas* en el GenBank hasta 25/06/2015.**

<i>Aeromonas</i> spp.(número total de genomas) <sup>a</sup>	Referencia	Origen (País)	Referencia Bio proyecto	Estado de la secuenciación
	<u>14</u>	Fluido peritoneal (Malasia)	PRJNA199911	25%
	<u>173</u>	Fluido peritoneal (Malasia)	PRJNA199912	25%
	<u>259</u>	Sangre (Malasia)	PRJNA199914	25%
	<u>277</u>	Pus (Malasia)	PRJNA199915	25%
	<u>145</u>	Pus (Malasia)	PRJNA224116	25%
	226	Orina (Malasia)	PRJNA224116	25%
	AD9	Humedales (sedimentos, EEUU)	PRJNA224116	25%
	Ae34	Riñón, carpa ( <i>Cyprinus carpio koi</i> ) moribunda, Sri Lanka	PRJNA224116	25%
	NF2	Humano (EEUU)	PRJNA224116	25%
	NF1	Humano (EEUU)	PRJNA224116	25%
	RB-AH	Suelo (Malasia)	PRJNA224116	25%
	M013	Agua (Malasia)	PRJNA224116	25%
	FDAARGOS_78	Heces de niño con diarrea (EEUU)	PRJNA231221	25%
	M023	Agua (Malasia)	PRJNA224116	25%
	M062	Agua (Malasia)	PRJNA224116	25%
	L14f	Agua de lago (Malasia)	PRJNA224116	25%
	<b>CIP107985<sup>Td</sup></b>	<b>Rana (septicemia, Bélgica)</b>	<b>PRJEB7049</b>	<b>25%</b>
	50_AHYD	ND (EEUU)	PRJNA267549	25%
	53_AHYD	ND (EEUU)	PRJNA267549	25%
	48_AHYD	ND (EEUU)	PRJNA267549	25%
	52_AHYD	ND (EEUU)	PRJNA267549	25%
	56_AHYD	ND (EEUU)	PRJNA267549	25%
	B565	Sedimento de estanques de acuicultura (China)	PRJNA66323	100%
	AER39	Sangre (EEUU)	PRJNA181619	50%
	AER397	Sangre (EEUU)	PRJNA181621	50%
	<u>AMC34</u>	Heces (EEUU)	PRJNA181620	50%
	AMC35	Herida bajo el ojo (EEUU)	PRJNA175686	50%
	Phln2	Intestino de pez (India)	PRJNA208188	25%
<i>A. veronii</i> (12)	Hm21	Tracto digestivo de sanguijuela (Francia)	PRJNA220270	25%
	ARB3	Agua de pozo (Japón)	PRJNA224116	25%
	<b>CECT4257<sup>Te</sup></b>	<b>Espudo (EEUU)</b>	<b>PRJEB7044</b>	<b>25%</b>
	CIP107763	Intestino de mosquito (India)	PRJNA224116	25%
	CECT4486	Agua superficial (Alemania)	PRJNA224116	25%
	LMG13067 <sup>f</sup>	Ambiental (Alemania)	PRJNA224116	25%
	<u>159</u>	Heces (Malasia)	PRJNA199562	25%
	HZM	Suelo de bosque tropical (Malasia)	PRJNA224116	25%
<i>Aeromonas</i> sp. (6)	ZOR002	Intestino de pez cebra ( <i>Danio rerio</i> , EEUU)	PRJNA224116	25%
	ZOR001	Intestino de pez cebra ( <i>Danio rerio</i> , EEUU)	PRJNA224116	25%
	L_1B5_3	Agua superficial (Malasia)	PRJNA224116	25%
	<u>MDS8</u>	Lodo (India)	PRJNA201370	25%
<i>A. salmonicida</i> (10)	A449 <sup>e</sup>	Trucha con furunculosis (Francia)	PRJNA58631	100%
	01-B526 <sup>e</sup>	Trucha (Canadá)	PRJNA180007	25%
	AS03 <sup>h</sup>	Úlcera de carpa ( <i>Carassius carassius</i> , Korea)	PRJNA199786	25%
	<b>34MEL<sup>Ti</sup></b>	<b>Agua de río contaminado (Argentina)</b>	<b>PRJNA220217</b>	<b>25%</b>
	NBRC13784 <sup>j</sup>	Sangre de pez enfermo (Japón)	PRJNA224116	25%
	CBA100	Trucha (Chile)	PRJNA224116	25%
	2009-144K3 <sup>e</sup>	Pez enfermo (Canadá)	PRJNA224116	25%

**Tabla 3 (continuación 2). Genomas disponibles de *Aeromonas* en el GenBank hasta 25/06/2015.**

<i>Aeromonas</i> spp.(número total de genomas) <sup>a</sup>	Referencia	Origen (País)	Referencia Bio proyecto	Estado de la secuenciación
	2004-05MF26 <sup>g</sup>	Pez enfermo (Canadá)	PRJNA224116	25%
	<b>CIP103209<sup>Te</sup></b>	<b>Salmón (Reino Unido)</b>	<b>PRJEB7036</b>	<b>25%</b>
	JF3224 <sup>g</sup>	Trucha salvaje (Suiza)	PRJNA224116	25%
	AAK1	Sangre de paciente con septicemia y fascitis necrotizante (Taiwan)	PRJDA178353	25%
<i>A. dhakensis</i> (4)	SSU	Heces (EEUU)	PRJNA224116	25%
	CECT7289	Agua de acuario (Potugal)	PRJNA224116	25%
	<b>CIP107500<sup>T</sup></b>	<b>Heces de niño con diarrea (Bangladesh)</b>	<b>PRJEB7048</b>	<b>25%</b>
	Riv2	Agua de río (EEUU)	PRJNA224116	25%
<i>A. jandaei</i> (3)	L14h	Agua de lao (Malasia)	PRJNA224116	25%
	<b>CECT4228<sup>T</sup></b>	<b>Heces de paciente con diarrea (EEUU)</b>	<b>PRJEB7031</b>	<b>25%</b>
<i>A. diversa</i> (2)	<b>2478-85<sup>T</sup></b>	<b>Herida de pierna (EEUU)</b>	<b>PRJNA224116</b>	<b>25%</b>
	<b>CECT4254<sup>T</sup></b>	<b>Herida de pierna (EEUU)</b>	<b>PRJEB7026</b>	<b>25%</b>
<i>A. molluscorum</i> (1)	<b>848<sup>T</sup></b>	<b>Molusco bivalvo (España)</b>	<b>PRJNA201681</b>	<b>25%</b>
	WS	Agua de lago (China)	PRJNA180868	100%
<i>A. media</i> (4)	ARB13	Agua de río (Japón)	PRJNA224116	25%
	ARB20	Agua de río (Japón)	PRJNA224116	25%
	<b>CECT4232<sup>T</sup></b>	<b>Agua de piscifactoría (Reino Unido)</b>	<b>PRJEB7032</b>	<b>25%</b>
	Ae398	Heces de un niño de 17 meses con gastroenteritis (Brasil)	PRJNA67585	25%
	YL12	Abono (Malasia)	PRJNA224116	25%
	FDAARGOS_76	Heces de una niña de 12 meses con diarrea (EEUU)	PRJNA231221	25%
	FDAARGOS_75	Heces de una mujer de 16 años con diarrea (EEUU)	PRJNA224116	25%
<i>A. caviae</i> (10)	FDAARGOS_72	Heces de un niño de 11 meses con diarrea (EEUU)	PRJNA224116	25%
	L12	Agua de lago (Malasia)	PRJNA224116	25%
	<b>CECT838<sup>T</sup></b>	<b>Cobaya (EEUU)</b>	<b>PRJEB7024</b>	<b>25%</b>
	CECT4221	Aceite emulsionado usado (EEUU)	PRJEB7046	25%
	8LM	Heces diarreicas (Brasil)	PRJNA224116	25%
	A23	Alimento (China)	PRJNA287226	25%
<i>A. taiwanensis</i> (2)	<b>LMG24683<sup>T</sup></b>	<b>Infección de herida (Taiwan)</b>	<b>PRJEB7041</b>	<b>25%</b>
	<b>LMG24683<sup>T</sup></b>	<b>Herida (Taiwan)</b>	<b>PRJNA224116</b>	<b>25%</b>
	CECT4487	Heces (India)	PRJEB7028	25%
<i>A. trota</i> (4) <sup>k</sup>	<b>CECT4255<sup>T</sup></b>	<b>Heces (India)</b>	<b>PRJEB7043</b>	<b>25%</b>
	LK14	Vegetal (Malasia)	PRJNA224116	25%
	1999lcr	Líquido céfalo raquídeo (Brasil)	PRJNA245216	25%
<i>A. lacus</i> (1)	<b>AE122<sup>T</sup></b>	<b>Agua de lago con afloramiento de cianobacterias (Finlandia)</b>	<b>PRJNA224116</b>	<b>25%</b>
<i>A. aquatica</i> (1)	<b>AE235<sup>T</sup></b>	<b>Agua de lago con afloramiento de cianobacterias (Finlandia)</b>	<b>PRJNA224116</b>	<b>25%</b>

**Tabla 3 (continuación 3). Genomas disponibles de *Aeromonas* en el GenBank hasta 25/06/2015.**

<i>Aeromonas</i> spp.(número total de genomas) <sup>a</sup>	Referencia	Origen (País)	Referencia Bio proyecto	Estado de la secuenciación
<i>A. finlandensis</i> (1)	4287D <sup>T</sup>	Agua de lago con afloramiento de cianobacterias (Finlandia)	PRJNA224116	25%
<i>A. simiae</i> (1)	CIP107798 <sup>T</sup>	Heces de mono (Macaca fascicularis, Francia)	PRJEB7039	25%
<i>A. schubertii</i> (1)	CECT 4240 <sup>T</sup>	Absceso cutáneo (EEUU)	PRJEB7038	25%
<i>A. sanarellii</i> (1)	LMG24682 <sup>T</sup>	Infección de herida (Taiwan)	PRJEB7037	25%
<i>A. rivuli</i> (1)	DSM22539 <sup>T</sup>	Agua de río (Alemania)	PRJEB7035	25%
<i>A. popoffii</i> (1)	CIP105493 <sup>T</sup>	Agua potable (Bélgica)	PRJEB7034	25%
<i>A. piscicola</i> (1)	LMG24783 <sup>T</sup>	Pez enfermo (España)	PRJEB7033	25%
<i>A. fluvialis</i> (1)	LMG 24681 <sup>T</sup>	Agua de río (España)	PRJEB7030	25%
<i>A. eucrenophila</i> (1)	CECT4224 <sup>T</sup>	Pez de agua dulce (Alemania)	PRJEB7029	25%
<i>A. encheleia</i> (1)	CECT4342 <sup>T</sup>	Anguila (España)	PRJEB7027	25%
<i>A. bivalvium</i> (1)	CECT7113 <sup>T</sup>	Moluscos bivalvos (España)	PRJEB7023	25%
<i>A. australiensis</i> (1)	CECT8023 <sup>T</sup>	Agua para riego (Australia)	PRJEB7021	25%
<i>A. allosaccharophila</i> (2)	CECT 4199 <sup>T</sup> BVH88	Anguila (España) ND (ND)	PRJEB7019 PRJEB7045	25% 25%
<i>A. sobria</i> (1)	CECT4245 <sup>T</sup>	Pez (ND)	PRJEB7040	25%
<i>A. bestiarum</i> (1)	CECT 4227 <sup>T</sup>	Pez enfermo (ND)	PRJEB7022	25%
<i>A. tecta</i> (1)	CECT 7082 <sup>T</sup>	Heces de niño con diarrea (Suiza)	PRJEB7042	25%

<sup>a</sup>La cepa tipo de cada especie de *Aeromonas* aparece en negrita; <sup>b</sup>*A. hydrophila* subsp. *hydrophila*; <sup>c</sup>Corresponde a la actual especie *A. dhakensis*; <sup>d</sup>*A. hydrophila* subsp. *ranae*; <sup>e</sup>*A. veronii* bv. *veronii*; <sup>f</sup>*A. veronii* bv. *sobria*; <sup>g</sup>*A. salmonicida* subsp. *salmonicida*; <sup>h</sup>*A. salmonicida* subsp. *achromogenes*; <sup>i</sup>*A. salmonicida* subsp. *pectinolytica*; <sup>j</sup>*A. salmonicida* subsp. *masoucida*; <sup>k</sup>Este es el nombre oficialmente aceptado, sin embargo en la base de datos del GenBank aparecen etiquetados como *A. enteropelogenes*.

Estos autores determinaron que el tamaño estimado a partir de los genomas incompletos o borradores (de las cepas tipo) oscilaba entre 3,90 Mbp (*A. fluvialis*) y 5,18 Mbp (*A. piscicola*), con un tamaño medio de 4,51 Mbp. Así mismo el contenido medio de % de G+C era del 60,2% oscilando entre el 58,1% de *A. australiensis* y el 62,8% de *A. taiwanensis*.

Estos valores de % G+C estarían totalmente de acuerdo establecidos para el género del 57–63% (Martin-Carnahan y Joseph, 2005) y cumplirían las premisas establecidas que indican que la diferencias de 10% son las características entre especies del mismo género y de 5% entre cepas de una misma especie (Figueras y cols., 2011b).

Llama la atención el uso de nomenclatura obsoleta en la base de datos de los genomas, como es el caso de *A. enteropelogenes*, siendo el sinónimo reconocido *A. trota*. Además, la dualidad de cepas, por ejemplo la cepa SSU aparece etiquetada tanto bajo el nombre de *A. hydrophila* como *A. dhakensis*, siendo este último nombre el correcto (Beaz-Hidalgo y cols., 2013). Beaz-Hidalgo y cols. (2015a) re-identificaron

mediante MLSA y ANI de las 44 cepas (5 cepas tipo incluidas) que tenían depositado el genoma en la base de datos GenBank (hasta julio de 2014) y encontraron que 14 (35,9%) de los genomas provenientes de las 39 cepas que no se eran la cepa tipo estaban mal etiquetadas (y que se corresponden con las subrayadas en la Tabla 3). Teniendo en cuentas estos errores se ha publicado una estrategia basada en la re-identificación mediante MLSA y ANI para verificar o determinar la identidad real de un genoma (Figueras y cols., 2014). Otro punto a tener en consideración, es que para la mayoría de los genomas publicados (Beatson y cols., 2011; Li y cols., 2011; Charette y cols., 2012; Han y cols., 2013; Hossain y cols., 2014; Chan y cols., 2015; Valdés y cols., 2015; Vincent y cols., 2015) los datos disponibles son sólo preliminares y no contienen la descripción de los genes. A pesar de esto, el poder disponer de estos genomas en un espacio de acceso público, significa un gran avance, ya que permite el acceso a estos datos facilitando la comparación de los mismos entre laboratorios de manera interactiva y rápida. Esta última ventaja ha permitido comprender mejor las características asociadas a la virulencia y resistencia antimicrobiana, mediante la comparación de secuencias (Seshadri y cols., 2006; Reith y cols., 2008, Beaz-Hidalgo y Figueras, 2013; Grim y cols., 2013, 2014; Tan y cols., 2015 a,b). Así mismo se han podido obtener datos utilizando las nuevas herramientas desarrolladas para la identificación bacteriana por comparación de genomas, como por ejemplo la hibridación ADN-ADN *in silico* (DDH<sub>is</sub>) y la identidad nucleotídica media (ANI) que son cada vez más utilizadas para la comparación de genomas de distintas especies bacterianas (Scortichini y cols., 2013; Colston y cols., 2014; Creason y cols., 2014; Figueras y cols., 2014; Beaz-Hidalgo y cols., 2015a,b) que se presentan a continuación. Así mismo también se han podido realizar estudios filogenéticos con genomas completos o con proteínas ribosómicas (rMLST).

#### **1.2.5.1. Hibridación ADN-ADN *in silico* (DDH<sub>is</sub>)**

El *genome to genome distance calculator* permite determinar el grado de reasociación o similitud genética entre 2 ADN procedentes de aislados bacterianos diferentes (DDH *in silico*, DDH<sub>is</sub>) y es una herramienta informática desarrollada por el DSMZ (*Leibniz-Institut DSMZ - Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH*) de acceso público (Auch y cols., 2010a,b; Meier-Kolthoff y cols.,



2013). Este cálculo es posible gracias al gran número de genomas bacterianos secuenciados (completos y/o parciales) y disponibles en base de datos como el GenBank. El DDH<sub>is</sub> calcular el porcentaje de homología y por ende el porcentaje de reasociación existente entre 2 genomas, generando porcentajes de similitud concordantes con los valores experimentales de DDH (Auch y cols., 2010a,b; Meier-Kolthoff y cols., 2013). Esta herramienta ha sido recientemente utilizada por Colston y cols. (2014) quienes compararon los borradores los genomas de 56 cepas de *Aeromonas* (incluidas las cepas tipo de 26 de las 27 especies descritas hasta el año 2014, excepto *A. cavernicola* CECT 7862<sup>T</sup>) y determinaron que valores de DDH<sub>is</sub> ≥ al 70% fueron consistentes para genomas correspondientes a una misma especie. Además, en este mismo estudio, cuando los genomas de las cepas tipo de las especies *A. salmonicida*, *A. bestiarum* y *A. piscicola*, que de acuerdo a lo descrito por Beaz-Hidalgo y cols. (2009) presentan secuencias del gen ARNr 16S altamente similares (99,8% y 100%) fueron comparados, valores de DDH<sub>is</sub> entre 43% y 64% fueron obtenidos, en concordancia con los valores experimentales de DDH (entre 49,9% y 65,4%) publicados por Beaz-Hidalgo y cols. (2009). Así mismo ocurrió cuando los genomas de las cepas tipo de las especies *A. veronii* y *A. allosaccharophila* fueron comparados, obteniendo porcentajes de DDH<sub>is</sub> de 57%. Ambas especies presentan una similitud del gen ARNr 16S de 99,2% (Martínez-Murcia y cols., 1992b) y los porcentajes de DDH experimental han variado de 0% (Esteve y cols., 1995b) a 80-84% (Huys y cols., 2001; Nhung y cols., 2007). Sin embargo, los resultados obtenidos por Colston y cols. (2014), en donde ambas cepas corresponden a especies diferentes, se correlacionan con la filogenia obtenida por Saavedra y cols. (2006), Martínez-Murcia y cols. (2011), Martino y cols. (2011) y Roger y cols. (2012b).

Así mismo estos valores se determinaron también en la definición de las 3 últimas especies propuestas en el género *A. finlandensis*, *A. lacus* y *A. aquatica* (Beaz-Hidalgo y cols., 2015b) para las que se obtuvo su genoma parcial (Hossain y cols., 2014a).

#### **1.2.5.2. Identidad Nucleotídica Media (ANI)**

La identidad nucleotídica media (ANI) es definida como el porcentaje promedio de identidad que existe en la secuencia nucleotídica de los genes ortólogos (genes altamente similares o conservados debido a que se han originado de un ancestro común)

compartidos por dos genomas (Konstantinidis y Tiedje, 2005; Goris y cols., 2007; Richter y Roselló-Móra, 2009). Los estudios de ANI se realizan *in silico* utilizando softwares y bases de datos públicas. Diversos estudios realizados con diferentes géneros bacterianos, demostraron que porcentajes de ANI equivalentes al 95-96% se correlacionan positivamente con los resultados > 70% obtenidos mediante DDH y que además los valores de ANI son independientes del contenido Guanina-Citosina [G + C] (Konstantinidis y Tiedje, 2005; Konstantinidis y cols., 2006; Goris y cols., 2007; Richter y Roselló-Móra, 2009; Kim y cols., 2014). Por esta razón se ha propuesto el uso del ANI como nuevo método de referencia, sustituyendo a la DDH, para la delineación de especies bacterianas. De acuerdo con Richter y Roselló-Móra (2009) para el cálculo del ANI deberían compararse secuencias nucleotídicas equivalentes, como mínimo, al 20% de cada genoma.

De acuerdo con Beaz-Hidalgo y cols. (2015a) actualmente existe 2 sistemas para calcular el ANI: 1) el ANIm, basado en un sistema que es capaz de alinear rápida y eficazmente secuencias que contienen millones de nucleótidos utilizando un software llamado MUMer y 2) ANIb que se basa en un BLAST, siendo este último el más utilizado para la identificación bacteriana. Además, hay 3 sitios web disponibles para calcular el ANI denominados JSpecies, ANI calculator y el EzGenome. El JSpecies (<http://www.imedia.uib.es/jspecies>) fue desarrollado por Richter y Roselló-Móra (2009) y permite calcular simultáneamente tanto el ANIm como el ANIb entre múltiples genomas. Los otros 2 sitios web sólo realizan el cálculo del ANIb entre 2 genomas. El ANI calculator es una herramienta desarrollada por el grupo del Prof. Konstantinidis (Rodríguez y Konstantinidis, 2014) del Laboratorio de Genómica Microbiana Ambiental del Instituto de Tecnología de Georgia (<http://www.enveomics.ce.gatech.edu/ani/index>). La web del EzGenome disponible en el EZBIOCLAUD (<http://www.ezbiocloud.net/ezgenome/ani>) fue creada por el Prof. Chun en *the Seoul National University*, en la República de Corea (Kim y cols., 2012).

Como se trata de un método nuevo, sólo hay unos pocos trabajos en donde se ha usado el ANI para analizar la taxonomía de *Aeromonas*. El primero, realizado el año 2014 por Colston y cols. en donde analizaron 56 genomas de *Aeromonas* (incluidos los genomas de las cepas tipo de 26 de las 27 especies descritas hasta el año 2014, excepto *A. cavernicola* CECT 7862<sup>T</sup>) y determinaron que valores de ANI  $\geq$  al 96% eran

congruentes con la taxonomía y filogenia de este género. En el trabajo realizado por Beaz-Hidalgo y cols. (2015a) se compararon los valores de ANI (obtenidos mediante las 3 herramientas existentes para su cálculo) con los resultados obtenidos del análisis filogenético o MLPA utilizando 3879 nt pertenecientes a las secuencias parciales de 6 genes (*gyrB*, *rpoD*, *recA*, *dnaJ*, *gyrA* y *dnaX*), obtenidos a partir de 41 genomas de *Aeromonas* (incluidos los de 5 cepas tipo) depositados en la base de datos del GenBank y determinaron que el 36% (14/39) de los genomas correspondientes a cepas no tipo estaban mal etiquetados, es decir no se correspondían con la especie a las que se decía que correspondían ya que mostraron valores de ANI <95%. Sin embargo los valores de ANI fueron superiores al 96% al compararse el genomas de estas cepas mal etiquetadas con los de la cepa de referencia con las que se habían agrupado en el análisis filogenético. La concordancia obtenida entre los resultados obtenidos mediante el ANI y MLPA, ratifican que el ANI es una buena alternativa, para ser utilizado como *gold standar* en la delimitación de especies bacterianas. Además en el caso concreto de *Aeromonas* se ha establecido de forma independiente en dos trabajos distintos que el punto de corte del ANI para la separación de especies debe ser superior al 96% (Colston y cols., 2014; Beaz-Hidalgo y cols., 2015a,b).

#### **1.2.6. Genes *housekeeping*: genes que codifican proteínas esenciales**

Los genes *housekeeping* son genes que codifican proteínas con funciones esenciales para la supervivencia de la bacteria (Stackebrandt y cols., 2002). La información filogenética que contienen es mayor que la del ARNr, ya que tienen una tasa evolutiva mayor y sus variaciones se encuentran distribuidas por todo el gen. Existen una serie de condiciones recomendadas para la selección de estos genes (Harayama y Kasai, 2006):

- No estar influidos por la Transferencia Génica Horizontal (HGT)
- Estar presentes en todas las bacterias
- Existir en copia única en el genoma
- Poseer al menos dos regiones altamente conservadas en el gen para el diseño cebadores (PCR).

La HGT es un proceso común entre bacterias, frecuente en los genes que codifican proteínas implicadas en funciones metabólicas y raro en los genes

informativos (Harayama Kasai, 2006). Se han propuesto una serie de genes *housekeeping* que cumplen los requisitos enunciados y que ya han sido utilizados en distintos grupos bacterianos obteniéndose resultados favorables: gen de la proteína RecA (*recA*), chaperonas (*cpn*), ARN polimerasa (*rpo*), Factor elongación G (*efg*) y girasa (*gyr*) entre otros (Harayama Kasai, 2006).

En el género *Aeromonas* se han evaluado hasta la fecha 18 genes *housekeeping*: *gyrB*, *rpoD*, *rpoB*, *recA*, *dnaJ*, *cpn60*, *mdh*, *gyrA*, *dnaX*, *atpD*, *groL*, *gltA*, *metG*, *ppsA*, *dnaK*, *radA*, *tsf* y *zipA* (Yáñez y cols., 2003; Soler y cols., 2004; Küpfer y cols., 2006; Nhung y cols., 2007; Sepe y cols., 2008; Miñana-Galbis y cols., 2009, 2010; Martínez-Murcia y cols., 2011; Martino y cols., 2011; Roger y cols., 2012b) y las características más importantes de estos aparecen resumidas en la Tabla 4.

El primer gen estructural estudiado en el género fue el *gyrB* (Yáñez y cols., 2003) demostrándose que este gen proporcionaba resultados congruentes con los obtenidos con el análisis del gen ARNr 16S, por lo que fue considerado un buen cronómetro molecular para realizar estudios filogenéticos en *Aeromonas*. Idénticos resultados fueron publicados en estudios posteriores, en donde se analizaron otros genes esenciales como por ejemplo *rpoD*, *rpoB*, *dnaJ*, *recA*, *cpn60* y *mdh* (Soler y cols., 2004; Küpfer y cols., 2006; Nhung y cols., 2007; Sepe y cols., 2008; Miñana-Galbis y cols., 2009, 2010; Lamy y cols., 2010) como se observa en la Tabla 4.

Además es importante destacar, que el análisis filogenético de las secuencias de uno solo de estos genes (*rpoD* o *gyrB* etc.) no sólo ha agrupado correctamente las cepas dentro de las diferentes especies, sino que también han permitido la detección de numerosas especies nuevas durante los últimos años: *A. tecta*, *A. piscicola*, *A. fluvialis*; *A. taiwanensis*, *A. sanarellii*, *A. diversa*, *A. rivuli*, *A. cavernicola*, *A. australiensis*, *A. dhakensis*, *A. finlandensis*, *A. aquatica* y *A. lacus*, siendo estas 3 últimas especies producto de este trabajo de investigación (Demarta y cols., 2008; Beaz-Hidalgo y cols., 2009, Alperi y cols., 2010a, b; Miñana-Galbis y cols., 2010; Figueras y cols., 2011a; Martínez-Murcia y cols., 2013, Aravena-Román y cols., 2013, Beaz-Hidalgo y cols., 2013, 2015b).

La secuenciación de un único gen *housekeeping* puede presentar limitaciones, como por ejemplo no diferenciar especies filogenéticamente similares, como ocurre entre *A. veronii* y *A. allosaccharophila* o entre el grupo *A. salmonicida*, *A. bestiarum* y

*A. piscicola* (ver Tabla 4). Sin embargo, esto puede ser solventado con la secuenciación de varios genes *housekeeping* realizando el estudio filogenético basado en las secuencias concatenadas de los diferentes genes, tal como ha sido recomendado por el ICSP (Stackebrandt y col., 2002) así como por otros autores (Figueras y cols., 2005, 2011b) tal y como hemos comentado previamente y que tienen un mayor poder resolutivo para discriminar las especies de *Aeromonas*.

Hasta la fecha, se han descrito tres esquemas basados en estudios multilocus en el género *Aeromonas*. Sin embargo, sólo en dos de estos se estudio la filogenia basada en el análisis de las secuencias nucleotídicas de diferentes genes (Martínez-Murcia y cols., 2011; Roger y cols., 2012b), mientras que el tercero, desarrollado por Martino y cols. (2011) corresponde a una técnica de tipificación que será abordado en el apartado 1.7.2.7 El primer MLPA fue desarrollado por Martínez-Murcia y cols. (2011) para analizar la filogenia de este género y además pretendía resolver las controversias taxonómicas dentro del mismo. En este estudio se analizaron 115 cepas de *Aeromonas* (incluyendo las cepas tipo de las 24 especies descritas hasta esa fecha, además de las cepa tipo de *A. cavernicola* y 5 cepas incluida la tipo de *A. lusitana*, que en ese momento se encontraban en proceso de descripción) de origen clínico y ambiental. Para esto utilizaron 7 genes (*rpoD*, *gyrB*, *gyrA*, *recA*, *dnaJ*, *dnaX* y *atpD*, 4705 bp) *housekeeping*, resultando ser una herramienta filogenética más discriminativa que el gen rRNA 16S y mostrando concordancia con la taxonomía del género basada en la DDH, proponiendo al MLPA como una alternativa al DDH para la definición de nuevas especies. El segundo MLPA fue diseñado por Roger y cols. (2012b) quienes estudiaron 195 (incluidas 62 cepas tipo y de referencia) cepas de *Aeromonas* aisladas a partir de muestras de origen humano, animal y ambiental. Este estudio se basó en el análisis de 7 genes (*dnaK*, *gltA*, *gyrB*, *radA*, *rpoB*, *tsf* y *zipA*, 4155 pb) y los resultados fueron concordantes con los obtenidos por Martínez-Murcia y cols. (2011). Además, es rescatable el hecho de que se describe a *A. media* como un grupo polifilético, o sea, que comprende a más de un taxón, los que deberían ser clasificados y caracterizados.

Por otro lado, la cepa CCM 1271 etiquetada como *A. bestiarum* en la Colección Checa de Microorganismos, forma una rama independiente de esta especie, representando una potencial nueva especie.

**Tabla 4. Genes *housekeeping* estudiados en el género *Aeromonas*.**

Gen (tamaño del amplicón en pb)	Producto que codifica	Porcentaje de similitud		Porcentaje de posiciones variables	Limitaciones	Autores
		Intra-especie	Inter-especie			
<i>gyrB</i> (1100) <sup>a,b,c</sup>	Subunidad β de la ADN girasa (topoisomerasa II) durante la replicación	> 98	< 97	32	No presenta	Yáñez y cols., 2003
<i>rpoD</i> (830) <sup>a</sup>	Subunidad o factor σ <sup>70</sup> de la RNA polimerasa, en el inicio de la transcripción	> 98	< 97	34	No presenta	Soler y cols., 2004
<i>rpoB</i> (558) <sup>c,d</sup>	Subunidad β de la RNA polimerasa en el proceso de transcripción	> 95	87 - 94	ND	No diferencia <i>A. bestiarum</i> de <i>A. salmonicida</i>	Kupfer y cols., 2006
<i>dnaJ</i> (891) <sup>a</sup>	Proteína de choque térmico 40 (Hsp40) que actúa como una cohorte funcional de la proteína DnaK	> 96,7	< 98,4	ND	No diferencia <i>A. allosaccharophila</i> de <i>A. veronii</i>	Nhung y cols., 2007
<i>recA</i> (462) <sup>a,b</sup>	Proteína multifuncional implicada en la recombinación homóloga del ADN y respuesta SOS. Se une a regiones del ADNmc, relaja los dúplex de ADN y reconoce regiones de los cromosomas homólogos en el proceso de recombinación	ND	92,2	ND	No presenta	Sepe y cols., 2008
<i>cpn60</i> (555)	Chaperonina tipo I (Hsp60 o GroE1)	≥ 96,5	< 96,3	34,1	No diferencia <i>A. allosaccharophila</i> de <i>A. veronii</i>	Miñana-Galbis y cols., 2009
<i>mdh</i> (936)	Enzima malato deshidrogenasa	ND	ND	34,01	No presenta	Miñana-Galbis y cols., 2010
<i>gyrA</i> (750)	Subunidad A de la ADN girasa, que actúa durante la replicación	99,1 - 99,8	87,6 - 96,6	28,2	No diferencia <i>A. piscicola</i> de <i>A. bestiarum</i>	Martínez-Murcia y cols., 2011
<i>dnaX</i> (1000)	Factores de elongación (subunidades τ y γ) de la DNA polimerasa III	97,6 - 99,1	86,4 - 95,6	37,7	No diferencia <i>A. allosaccharophila</i> de <i>A. veronii</i> , ni <i>A. lusitana</i> de <i>A. eucrenophila</i>	Martínez-Murcia y cols., 2011
<i>atpD</i> (600)	Sector F1 de la subunidad β de la ATP sintetasa ligada a la membrana	ND	ND	23,6	Bajo poder resolutivo dentro de este género, confunde varias especies	Martínez-Murcia y cols., 2011

**Tabla 4 (continuación). Genes housekeeping estudiados en el género *Aeromonas*.**

Gen (tamaño del amplicón en pb)	Producto que codifica	Porcentaje de similitud		Porcentaje de posiciones variables	Limitaciones	Autores
		Intra-especie	Inter-especie			
<i>groL</i> (782)	Chaperonina GroEL	ND	ND	39	Las cepas tipo de <i>A. caviae</i> , <i>A. media</i> , <i>A. eucrenophila</i> y <i>A. encheleia</i> se agrupan con la cepa tipo de <i>A. schubertii</i> (en este estudio no se utilizaron cepas de <i>A. simiae</i> ni <i>A. diversa</i> )	Martino y cols., 2011
<i>gltA</i> (626)	Enzima citrato sintetasa I utilizada en la vía glicolítica	ND	ND	30,3	No presenta	Martino y cols., 2011
<i>dnaK</i> (816)	Proteína de shock térmico 70 (Hsp70) como respuesta a stress	ND	ND	33,5	No presenta	Roger y cols., 2012
<i>radA</i> (420)	Proteína de reparación del DNA	ND	ND	46,6	No presenta	Roger y cols., 2012
<i>tsf</i> (702)	Factor de elongación Ts (proteína de traslación)	ND	ND	27,1	No presenta	Roger y cols., 2012
<i>zipA</i>	Proteína de división celular ZipA	ND	ND	70,8	No presenta	Roger y cols., 2012

<sup>a</sup>Estos genes fueron también utilizados por Martínez-Murcia y cols. (2011) y los porcentajes de similitud intraespecie e interespecie y el porcentaje de variabilidad de los genes fueron: para *gyrB* (98,3%, 91,4% y 36,8%), *rpoD* (98,7%, 87,1%; 49,7%), *dnaJ* (98,4%, 88,6%, 42,06%) y *recA* (98,2%, 90,3%, 35,3%). Además, los genes *gyrB* y *recA* diferenciaron todas las especies del género, mientras del el gen *rpoD* no diferenció todas las cepas de *A. veronii* con *A. allosaccharophila* ni de *A. lusitana* con *A. tecta*. El gen *dnaJ* no diferenció todas las cepas de *A. veronii* con *A. allosaccharophila* ni *A. bestiarum* con *A. piscicola*; <sup>b</sup>Estos genes fueron también utilizados por Martino y cols. (2011) y sólo indican el porcentaje de variabilidad o regiones polimórficas, siendo de 29,3% para *gyrB* y de 31,3% para *recA*; <sup>c</sup>Estos genes fueron también utilizados por Roger y cols. (2012b) y los porcentajes de variabilidad fueron de 35,1% para el *gyrB* y de 23% para el *rpoB*. Los porcentajes de similitud intraespecie e interespecie no están disponibles; <sup>d</sup>Este gen fue utilizado más tarde por Lamy y cols. (2010) y el porcentaje de similitud interespecie fue de 78,4% con un porcentaje de variabilidad de 26%. El porcentaje de similitud intraespecie no está disponible; ND: no disponible.

Por otra parte, hay estudios en donde utilizan fragmentos de estos genes para la identificación rápida y específica de una especie de *Aeromonas* en concreto, como es el caso de la detección de los genes *gyrB* y *fstA* (receptor de sideróforo férrico), mediante PCR, específico para la identificación de *A. salmonicida* tanto en peces infectados como en peces asintomáticos (Beaz-Hidalgo y cols., 2008b). En este trabajo, cuando 69 cepas de *A. salmonicida* y 38 cepas de otras especies de bacterianas fueron investigadas, los cebadores utilizados demostraron ser específicos y fueron capaces de diferenciar *A. salmonicida* de *A. bestiarum*. Sin embargo, el posterior descubrimiento de *A. piscicola*, hace necesario la re-evaluación de este método, debido a que estas tres especies están estrechamente relacionadas, tal como se explicó en el apartado 1.2.5.1.

### **1.2.7. Técnicas de tipado molecular**

Las técnicas de tipado molecular son esenciales para determinar las relaciones epidemiológicas entre las cepas y permiten reconocer cuales son la fuentes de contagio en caso de brotes epidemiológicos. Estas técnicas también permiten reconocer si los aislados incluidos en la descripción de nuevas especies son o no idénticas o derivan del mismo clon (Stackebrandt y cols. 2002; Figueras y cols., 2006; 2011b). Se han descrito diferentes métodos dependiendo de si se utiliza el genoma completo, por ejemplo: PFGE, RAPD-PCR, AFLP, REP-PCR, BOX-PCR y ERIC-PCR o un grupo de genes, como es el caso del ribotipado y el MLST (Figueras y cols., 2009). En el género *Aeromonas* las técnicas más utilizadas han sido el AFLP (Huys y cols., 2002, 2003) y el ERIC-PCR. Esta última se corresponde a la empleada en esta investigación. Considerando esto, esta será la única técnica que presentaremos en detalle conjuntamente con el MLST, por tratarse de una técnica recientemente descrita para *Aeromonas* y las ventajas que representa, serán abordadas a continuación.

#### **1.2.7.1. Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus basado en la PCR (ERIC-PCR)**

Existen múltiples estudios en los que se han utilizado la técnicas de ERIC-PCR sola o en combinación con otras técnicas de tipado en *Aeromonas* (DavinRegli y cols., 1998; Huys y cols., 2002; Sechi y cols., 2002; Huys y cols., 2003; Soler y cols., 2003a; Szczuka y Kaznowski, 2004; Aguilera-Arreola y cols., 2005; Figueras y cols., 2006; Beaz-Hidalgo y



cols., 2008a; Nocáková y cols., 2009; Maiti y cols., 2009; Fontes y cols., 2010; Figueras y cols., 2011d).

El ERIC-PCR fue aplicada en un estudio de cepas de *A. hydrophila* aisladas de 4 pacientes durante un mismo periodo y del agua de suministro del hospital. Aunque no se pudo demostrar la relación entre las cepas aisladas del agua y las de los pacientes, sí se encontraron 2 pacientes colonizados por la misma cepa que habían utilizado la misma habitación, demostrándose la eficacia de esta técnica en estudios epidemiológicos (DavinRegli y cols., 1998).

El estudio comparativo de Soler y cols. (2003a) en 26 aislados de *A. popoffii* de diferentes orígenes geográficos mostró que el ERIC-PCR era más discriminatorio que el REP-PCR, el RFLP, o el RFLP del ITS 16S-23S mientras que al combinar estas técnicas los mejores resultados se obtenían de la combinación del ERIC-PCR con el REP-PCR. Todas las técnicas tendían a agrupar las cepas en función de su origen geográfico (Soler y cols., 2003a). En los estudios de Huys y cols. (2002, 2003) se observa una buena correlación entre el ERIC-PCR y el FAFLP. Szczuka y Kaznowski en el 2004 tiparon mediante ERIC-PCR, REP-PCR y RAPD-PCR 120 cepas de *Aeromonas* de origen clínico y ambiental observando que ERIC-PCR y RAPD eran las más discriminatorias ya que con el REP-PCR, 25 cepas no se pudieron diferenciar. En este estudio, los autores no pudieron asignar un genotipo determinado de *Aeromonas* a cepas implicadas en gastroenteritis. Resultados congruentes entre ERIC-PCR y RAPD se observaron también en el estudio de Aguilera-Arreola y cols. en el 2005, en el que evalúan el genotipo de cepas de *A. hydrophila*. En este estudio se pudieron observar agrupaciones diferentes entre las cepas de *A. hydrophila* de origen clínico y las ambientales. En el estudio realizado por Figueras y cols. (2006) el ERIC-PCR produjo los mismos resultados que el PFGE y el AFLP. Maiti y cols. en 2009, al tipificar 42 aislados de origen clínico y ambiental no encontraron diferentes agrupaciones entre los genotipos. Estudios publicados en el año 2008 muestran que el ERIC-PCR podría ser útil para el tipado a nivel de especie (Nováková y cols., 2009) y subespecie (Beaz-Hidalgo y cols., 2008a). En el estudio realizado por Fontes y cols. (2010) se analizaron los ERICs de cepas de *Aeromonas* aisladas tanto de carne como de heces de cerdo, así como del suelo del matadero en donde permanecían estos animales y se demostró que cepas de *A. hydrophila* recuperadas del diafragma y las heces de un mismo animal

presentaron idénticos patrones de ERIC-PCR, al igual que las cepas de *A. caviae* aisladas desde heces de cerdo y del suelo del matadero. Por otra parte, Figueras y cols. (2012d) encontraron que 23 aislados identificados como *A. aquariorum*, ahora *A. dhakensis*, de distintos orígenes pertenecían a 11 genotipos diferentes en base a sus patrones de ERIC-PCR (47,8% variabilidad genética) y se demostró la efectividad del este método para reconocer cepas redundantes así como para determinar la variabilidad genética intraespecífica.

#### **1.2.7.2. Multilocus Sequence Typing (MLST)**

El MLST fue propuesto como un método de identificación de relaciones clonales entre bacterias, basado en secuencias de genes *housekeeping*, en el año 1998 por Maiden.

EL MLST utiliza la secuencia de fragmentos internos de múltiples genes *housekeeping* (450-500 pb de siete genes) y para cada gen las secuencias procedentes de diferentes cepas son comparadas y a cada secuencia única se le asigna un número específico para cada gen o alelo (en este caso 7 alelos). Las cepas que muestran un mismo perfil alélico (secuencia idéntica de todos los genes) corresponden a una misma secuencia tipo (ST) la que es identificada mediante un número específico (Maiden y cols., 1998; Maiden, 2006; Figueras y cols., 2011b; Jolley y Maiden, 2014). Aunque un ST representa un pequeño porcentaje de la parte conservada de un genoma, mientras más perfiles alélicos y por lo tanto, más ST estén disponibles para cada bacteria, más fácil será comprender la estructura de las diversas poblaciones biológicas, mediante la identificación de cepas y complejos clonales (Maiden y cols., 1998; Maiden, 2006; Figueras y Beaz-Hidalgo, 2015; Jolley y Maiden, 2014).

Dentro de las ventajas que presenta este método destaca el que es universal (es aplicable a todas las bacterias) y que genera datos de forma dinámica, o sea, que son intercambiables, comparables y fácil de interpretar utilizando las bases de datos de acceso público creadas por Jolley y Maiden y actualizadas con nuevas prestaciones en 2010 (<http://pubmlst.org/>) a partir de los estudios realizados en distintos géneros y/o especies. Sin embargo no existe un esquema global y para cada género se requieren cebadores específicos para cada gen e incluso a veces para cada especie como ocurre en el MLST de *Arcobacter* (<http://pubmlst.org/arcobacter/info/primers.shtml>). Tal y

como explican Jolley y Maiden (2014) en la actualidad los principios del MLST se han aplicado al análisis de genomas completos aumentando el número de loci comparados hasta incluir todas las secuencias codificantes de un genoma (whole-genome MLST [wgMLST]). Esta aproximación también se ha denominado análisis genómico gen-a-gen (Sheppard y cols., 2012; Maiden y cols., 2013) y es la filosofía que ha motivado el diseño de la nueva plataforma *Bacterial Isolate Genome Sequence Database* (BIGSdb) que es la plataforma que en la actualidad gestiona la base de datos del MLST (Jolley y Maiden, 2010) y que también incluye una base de datos de genomas y que es gestionado a través de la web de la Universidad de Oxford, PubMLST ya mencionada (<http://pubmlst.org/>).

El esquema de MLST de libre acceso para *Aeromonas* fue creado en 2010 (<http://pubmlst.org/aeromonas>) en base a los datos obtenidos por Martino y cols. (2011) usando seis genes (*gyrB*, *groL*, *gltA*, *metG*, *ppsA* y *recA*) para caracterizar 100 cepas de *Aeromonas* (23 cepas tipo y de referencia más 77 cepas aisladas de peces, crustáceos y moluscos). En este estudio sólo 96 (3 cepas no amplificaron el gen *ppsA* y una no amplificó el gen *gyrB*) de las 100 cepas fueron utilizadas para la construcción del MLST y se obtuvo un total de 89 ST, de los cuales 86 (96,6%) fueron reconocidos sólo una vez, lo que demuestra una gran diversidad dentro de este género. Además, de los 6 genes estudiados, el número de sitios polimórficos variaron desde 140 (29,3%) para el gen *gyrB* hasta 233 (43,3%) para el gen *ppsA*, mientras que para el concatenado de los seis genes (3.084 pb) se detectaron un total de 1.073 (34,7%) sitios polimórficos. En la actualidad esta base de datos contiene 1722 secuencias provenientes de 433 aislados que se corresponden con 377 ST.

Un segundo esquema utilizando 7 genes (*dnaK*, *gltA*, *gyrB*, *radA*, *rpoB*, *tsf* y *zipA*) fue utilizado por Roger y cols. (2012b) de los cuales dos (*gyrB* y *gltA*) eran comunes con el MLST de Martino y cols. (2011) para caracterizar 195 cepas de *Aeromonas* (incluidas 62 cepas tipo y de referencia) y de las cuales 115 (59%) eran de origen humano, 39 (20%) de origen animal y 41 (21%) de origen ambiental. Entre 195 cepas estudiadas, detectaron un total de 175 ST y de estos, 164 (93,7%) se detectaron tan sólo una vez. En relación a los sitios variables encontrados, estos variaron entre 98 (23%) para el gen *rpoB* y 380 (70,8%) para el gen *zipA*. Un inconveniente de este estudio, es que los ST no se encuentran disponibles en una base de datos como ocurre

con el MLST de Martino y cols. (2011).

En el año 2013, Martino y cols. aumentaron el tamaño de la muestra a 258 cepas de *Aeromonas*, que incluye 92 del estudio realizado en 2011. De las 258 secuencias utilizadas en este estudio, 188 provienen de cepas aisladas de alimentos (principalmente de origen marino y vegetales), 55 de cepas de origen fecal y 15 corresponden a cepas tipo y de referencia. En este estudio se obtuvo un total de 250 ST, lo que al igual que en el estudio anterior demuestra una gran variabilidad. Lo mismo ocurre con los sitios polimórficos, ya que el gen más conservado fue nuevamente *elgyrB* (33,9% de variabilidad), mientras que el más variable fue el *ppsA* (48,9% de variabilidad). Es destacable el hecho de que en base a la proximidad genética de los ST se identificaron 2 grupos de *Aeromonas* según su origen. El primer grupo formado por *A. veronii*, *A. sobria*, *A. allosaccharophila* y *A. popoffii* aisladas desde peces. El segundo grupo estuvo formado por el resto de las especies (*A. hydrophila*, *A. caviae*, *A. dhakensis*, *A. media*, *A. salmonicida*, *A. bestiarum*, *A. piscicola*, *A. simiae*, *A. diversa*, *A. schubertii*, *A. molluscorum*, *A. taiwanensis*, *A. sanarellii*, *A. tecta*, *A. trota*, *A. eurenophila*, *A. encheleia*) que fueron aisladas desde alimentos y heces, salvo *A. jandaei*, que sólo fue recuperada desde muestras humanas. Al realizar el MLPA con las secuencias de los seis genes se observó que la distribución de las cepas era consistente con la filogenia de *Aeromonas*. Sin embargo, dos cepas, la *A. veronii* CECT 4908 y la *A. bestiarum* CECT 5233, se unieron a grupos filogenéticos diferentes, siendo estos *A. allosaccharophila* y *A. hydrophila* respectivamente.

Recientemente, Hossain y cols. (2014b) utilizando la base de datos del MLST diseñada por Martino y cols. (2011) demostraron que la cepa de *A. hydrophila* ML09-119, responsable de generar diversas epidemias en el pez gato en piscifactorías de Alabama en Estados Unidos desde el año 2009, estaba relacionada con otras cepas de *A. hydrophila* (cepas S04-690, ZC1, XS91-4-1) altamente virulentas. La cepa S04-690 fue recuperada desde el año 2004 en peces enfermos en Estados Unidos, la cepa ZC1 fue aislada de carpas (*grass carp*) enfermas en la provincia de Guangdong, China el año 2009 y la cepa XS91-4-1, de origen chino fue recuperada también de carpas enfermas (*silver loweye carp*) en 2001 durante un brote epidémico. Las cuatro cepas comparten el mismo perfil alélico, correspondiente al ST 251, demostrando el origen clonal de estos cuatro aislados (Hossain y cols., 2014b). Este descubrimiento soporta la hipótesis de

que las cepas virulentas recuperadas en Estados Unidos emergieron debido a la expansión clonal de cepas patogénicas procedentes de Asia introducidas con las carpas.

### **1.3. Ecología y Epidemiología del género *Aeromonas***

#### **1.3.1. Presencia de *Aeromonas* en el medio acuático**

Las *Aeromonas* son organismos autóctonos del medio acuático, por lo que no es raro encontrarlas en diferentes tipos de agua, como: aguas superficiales, subterráneas, aguas de consumo, embotelladas, residuales tratadas y no tratadas, así como en aguas marinas y de estuarios (Holmes y cols., 1996; Borrell y cols., 1998; Bonadonna y cols., 2003; Villari y cols., 2003; Pianetti y cols., 2004; Figueras y cols., 2005; Emekdas y cols., 2006; Razzolini y cols., 2008; Rahman y cols., 2009; Martone-Rocha y cols., 2010; Figueira y cols., 2011; Aravena-Román y cols., 2013; Igbinsa y Okoh, 2013).

Considerando que en esta tesis estudiaremos la presencia de *Aeromonas* en aguas regeneradas centraremos esta introducción básicamente en estas últimas sin tratar en profundidad la presencia de *Aeromonas* en otros ambientes acuáticos.

Debido a factores como el aumento de la población, alteración de los patrones pluviométricos y contaminación de las fuentes naturales de agua, esta es cada vez un recurso más escaso. Esto ha llevado a reutilizar el agua residual, generándose la que se conoce como agua regenerada o reciclada tras someterla a distintos tratamientos en una estación depuradora de aguas residuales (EDAR), también llamada planta de depuración o planta de tratamiento de aguas residuales (PTAR) que normalmente realizan un tratamiento primario seguido de uno secundario o biológico. Adicionalmente puede realizarse un tratamiento terciario, que pueden ser químico (ozono, cloración), físico (radiación ultravioleta) y natural como el lagunaje, que es un proceso de purificación, producido cuando el agua residual es almacenada temporalmente en balsas o lagunas de poca profundidad (Boussaid y cols., 1991; Hassani y cols., 1992; Jjemba y cols., 2010).

Dependiendo de la calidad microbiológica del agua regenerada, se le pueden dar diferentes usos como por ejemplo el riego de alimentos, riego de campos deportivos, uso industrial para el lavado de maquinaria o refrigeración de acuerdo con la legislación Española actual (Real Decreto 1620/2007) que comentaremos más adelante en el apartado 1.3.1.1.

La calidad microbiológica las aguas regeneradas es especialmente importante cuando esta se utiliza para el riego de frutas y verduras que se consumen crudas ya pueden contaminarse con microorganismo capaces de producir brotes epidémicos y tener una importante implicación en la salud pública. Esta problemática ha llevado a que cada vez se investigue más la calidad microbiológica de las aguas residuales tratadas y no tratadas. Las *Aeromonas* ha sido detectada en altas concentraciones ( $5,63 \times 10^6$  ufc/100ml a  $10^8$  ufc/100ml o  $3 \times 10^9$  NMP/100ml) en aguas residuales no tratadas (Boussaid y cols., 1991; Monfort y Baleaux., 1991; Hassani y cols., 1992; Holmes et al., 1996; Martone -Rocha y cols., 2010; Figueira y cols., 2011; Carvalho y cols., 2012; Igbinosa y Okoh, 2012). Sin embargo, después del tratamiento terciario, *Aeromonas*, aunque en menor cantidad, siguió estando presente con recuentos que oscilaron entre  $1,04 \times 10^5$  ufc/100ml y  $10^6$  ufc/100ml o  $< 3 - 9 \times 10^5$  NMP/100ml (Boussaid y cols., 1991; Monfort y Baleaux., 1991; Hassani y cols., 1992; Jjemba y cols., 2010; Martone -Rocha y cols., 2010; Figueira y cols., 2011; Carvalho y cols., 2012; Igbinosa y Okoh, 2012). Además existe evidencia de que *Aeromonas* es capaz de recrecer en los sistemas de distribución de agua utilizada para riego (Holmes et al., 1996; Pianetti y cols., 2004; Al-Jassim y col., 2015). Este recrecimiento se considera que puede estar relacionado con la disminución en la concentración de cloro durante el almacenaje del agua regenerada, con la capacidad de *Aeromonas* de producir biopelículas y con la presencia de altas concentraciones de materia orgánica en el agua regenerada (Jjemba y cols., 2010).

Tal y como hemos comentado previamente las aguas de regadío que contienen *Aeromonas* pueden contaminar frutas y vegetales (Pianetti y cols., 2004), pudiendo causar infección en el hombre. En relación a esto último, hay evidencias epidemiológicas que demuestran que el agua actúa como vehículo de diseminación de estos patógenos, ya que se ha logrado identificar la misma cepa de *Aeromonas* tanto de muestras de agua potable como de las heces de individuos con diarrea (Khajanchi y cols., 2010; Pablos y cols., 2011).

### **1.3.1.1. Legislación actual sobre las aguas regeneradas**

En el caso específico de España, los criterios para la utilización de aguas regeneradas, están estipulados en el Real Decreto 1620/2007 ( capítulo 2, anexo I.A)

donde se establece que los parámetros microbiológicos a determinar incluyen la cuantificación de nematodos intestinales, *Escherichia coli* además de la determinación de la cantidad de sólidos en suspensión y turbidez.

Para el caso puntual de usos agrícolas, especifica que para "riego de cultivos con sistema de aplicación de agua que permita el contacto directo del agua regenerada con las partes comestibles para alimentación humana en fresco" los valores máximos admisibles para los parámetros microbiológicos son: 1 huevo de nematodo intestinal/10l y una concentración de *E. coli* equivalente a 100 ufc/100ml. Además es obligatorio la detección cualitativa (presencia/ausencia) de *Salmonella* sp. Sin embargo, a pesar de las publicaciones que evidencian que microorganismos potencialmente patógenos como *Aeromonas* están presentes en este tipo de aguas y que su presencia no se correlaciona positivamente con la presencia de *E. coli* (Jjemba y cols., 2010), el análisis de la presencia de esta bacteria no es exigido por la legislación vigente a pesar de que su presencia puede significar un riesgo para la salud humana.

En algunos países como Canadá y USA se realiza un control de la presencia de *Aeromonas* en las aguas embotelladas, que están clasificadas como alimentos (EPA, 2006), mientras que en otros, como Holanda, se han establecido criterios de calidad en base a la presencia de *Aeromonas* en el agua potable destinada al consumo de 20 ufc/100ml y en los sistemas de almacenaje de agua potable de 200 ufc/100ml (Figueras y Borrego, 2010; Figueras y Beaz-Hidalgo, 2014).

### **1.3.2. Presencia de *Aeromonas* en Animales**

El género *Aeromonas* es considerado patógeno de animales desde sus primeros aislamientos en septicemias de ranas y peces enfermos (Farmer y cols., 2006). *A. salmonicida* y *A. hydrophila* son patógenos reconocidos de peces, en especial de la familia de los salmónidos en los que generan úlceras, hemorragias, furunculosis y septicemias, produciendo grandes pérdidas en la industria de la acuicultura (Pylkkö y cols., 2005, 2006; Treasurer y cols., 2007; Reith y cols., 2008; Beaz-Hidalgo y Figueras, 2012, 2013; Figueras y cols., 2011c). Sin embargo, otras especies de *Aeromonas* también han sido aisladas de peces, principalmente enfermos, por ejemplo *A. allosaccharophila*, *A. dhakensis*, *A. caviae*, *A. veronii*, *A. hydrophila*, *A. jandaei*, *A. media* y *A. trola* han sido aisladas de anguila (Martínez-Murcia y cols., 1992b; Esteve y

cols., 1995a,b, 2012; Yi y cols., 2013), *A. veronii*, *A. bestiarum*, *A. encheleia* y *A. sobria* han sido recuperadas de carpa común (*Cyprinus carpio*, Kozinska y col., 2002; Soriano-Vargas y cols., 2010), *A. veronii* de pez gato (Nawaz y col., 2006, 2010), *A. piscicola* de salmónidos (Beaz-Hidalgo y cols., 2009, 2010), *A. sobria* de tilapia (*Oreochromis niloticus*, Li y Cai, 2011) y *A. schubertii* de pez cabeza de serpiente (*Channa maculata* y *Ophiocephalus argos*, Chen y col., 2012, Liu y Li, 2012). Recientemente, tal y como hemos comentado una cepa de *A. hydrophila* altamente virulenta, causó mortalidad masiva en piscifactorias de pez gato en Alabama, Estados Unidos (Hossain y cols., 2013, 2014b).

También se han detectado como patógenos de equinodermos (Yang y cols., 2008), moluscos (Miñana-Galbis y cols., 2004, 2007) y asociados a copépodos (Glugliandolo y cols., 2008). *A. hydrophila* es un reconocido patógeno de ranas que causa la denominada “pata roja” (Paerson y cols., 2000; Mauel y cols., 2002; Millers y cols., 2008) y recientemente se ha descrito que esta especie forma parte de la microbiota intestinal normal en cocodrilos del Nilo (Lovely y cols., 2008). También pueden causar septicemia en aves de corral, sin embargo, en gaviotas también se han definido como microbiota normal (Kinzelman y cols., 2008).

Existen diversas publicaciones que describen las *Aeromonas* como microbiota normal de los dípteros. En este sentido *A. caviae* se ha aislado del tracto digestivo de moscas comunes (Nayduch y cols., 2002) mientras que la especie *A. culicicola* (en la actualidad sinonimizada con la especie *A. veronii*) se aisló del intestino de mosquitos hembra de las especies *Culex quinquefasciatus* y *Aedes aegyptii* en la India (Pidiyar y cols., 2002). El año 2008 se propuso a las masas de huevos de dípteros acuáticos como un reservorio de *Aeromonas* (Senderovich y cols., 2008). Más tarde, a partir de estos, se recuperaron cepas de *A. aquariorum*, ahora *A. dhakensis* (Figueras y cols., 2011d, Beaz-Hidalgo y cols., 2013) así como nuevas cepas de *A. sanarellii* y *A. taiwanensis* (Beaz-Hidalgo y cols., 2012).

*Aeromonas* también ha sido recuperada de mamíferos, como es el caso de *A. veronii* aislada de lobos marinos (*Otaria flavescens*), *A. hydrophila* ha sido recuperada de ovinos (Ilhan y cols., 2006; Gonzales y cols., 2009) y *A. dhakensis* fue recientemente aislada de un cetáceo neonato muerto (Pérez y cols., 2015).

Por otra parte, la asociación simbiótica entre *Aeromonas* y sanguijuelas es



reconocida, tal como será explicada en el apartado 1.3.5.2.

### 1.3.3. Presencia de *Aeromonas* en alimentos

Las *Aeromonas* se han aisladas de una amplia variedad de alimentos, principalmente pescados, mariscos, productos cárnicos y embutidos, frutas, verduras y productos lácteos (Borrell y cols., 1998; Neyts y cols., 2000a; Bashir Awan y cols., 2006; Chang y cols., 2008; Yücel y Erdogan, 2010; Ottaviani y cols., 2011; Nagar y cols., 2011, 2013; Beaz-Hidalgo y cols., 2009, 2010; Beaz-Hidalgo y Figueras, 2012, 2013; Figueras y Beaz-Hidalgo, 2014).

En el caso de los pescado destinados al consumo humano, los más afectados son los pertenecientes al género Tilapia y los salmónidos (Figueras y Beaz-Hidalgo, 2014; Beaz-Hidalgo y Figueras, 2012, 2013). Las especies de *Aeromonas* más detectadas, cuando métodos fenotípicos y secuenciación del gen rRNA 16S fueron utilizados, fueron *A. hydrophila*, *A. veronii* bv. *sobria*, *A. caviae* y *A. dhakensis* (Neyts y cols., 2000a; Radu y cols., 2003; Bashir Awan y cols., 2006; Chang cols., 2008; Yücel y Balci, 2010; Yücel y Erdogan, 2010; Nagar y cols., 2011; Soto-Rodríguez y cols., 2013; Figueras y Beaz-Hidalgo, 2014). Sin embargo, cuando métodos moleculares (rRNA 16S-RFLP y secuenciación del gen *rpoD*) fueron utilizados las especies más prevalente fue *A. salmonicida*, seguida por *A. bestiarum*, *A. veronii*, *A. encheleia*, *A. hydrophila*, *A. allosacharophila* y *A. bivalvium* (Castro-Escarpulli y cols., 2003; Nagar y cols., 2013; Figueras y Beaz-Hidalgo, 2014).

En relación a los mariscos, *Aeromonas* es frecuentemente aislada desde mejillones, ostras, camarones y berberechos con concentraciones que varían entre  $< 10^2$  y  $1,5 \times 10^6$  ufc/g de alimento. La diversidad de especies de *Aeromonas* es similar a la encontrada en pescado cuando se utilizaron métodos de identificación moleculares (secuenciación de los genes *gyrB* y *cpn60*), siendo las especies más frecuentemente encontradas *A. veronii*, *A. dhakensis*, *A. caviae*, *A. jandaei* y *A. schubertii* (Neyts y cols., 2000; Bashir Awan y cols., 2006; Evangelista-Barreto y cols., 2006; Ottavianni y cols., 2006; Woodring y cols., 2012; ; Figueras y Beaz-Hidalgo, 2014; Yano y cols., 2015).

Generalmente se han detectado *Aeromonas* en los productos cárnicos (vacuno, cerdo, pollo y conejo) con una incidencia que oscila entre 3-70% de las muestras

dependiendo del estudio (Figueras y Beaz-Hidalgo, 2014). En estas muestras y en los embutidos *A. hydrophila* y *A. caviae* corresponden a las especies más frecuentemente identificadas por métodos fenotípicos en una concentración que oscilan entre  $10^2$  -  $10^3$  ufc/g (Borrell y cols., 1998; Neyts y cols., 2000a; Bashir Awan y cols., 2006; Rodríguez-Calleja cols., 2006; Chang y cols., 2008; Yücel y Erdogan, 2010, Nagar y cols., 2011). Pero esta diversidad aumenta al utilizar los genes *rpoD* y *gyrB*, identificándose entonces *A. veronii*, *A. salmonicida*, *A. jandaei* y *A. simiae* además de *A. hydrophila* y *A. caviae* (Fontes y cols., 2010; Nagar y cols., 2013). Es importante destacar, que en el estudio realizado por Fontes y cols. (2010) que ya hemos comentado antes en el apartado 1.2.7.1 se genotiparon por ERIC-PCR aislados de *Aeromonas* recuperados de cerdos y suelo del matadero en donde estos eran mantenidos, demostrándose que un aislado de *A. caviae* recuperado desde heces de cerdo mostraba idéntico genotipo que otro aislado recuperado del suelo del matadero. Además dos aislados de *A. hydrophila* recuperadas del diafragma y heces de un mismo animal presentaron el mismo patrón de ERIC-PCR. Esto sugiere el rol directo de las heces en la contaminación de la carne.

Los tipos de frutas y vegetales estudiados hasta la fecha en los estudios en los que se especifican corresponden a: brotes de alfalfa, zanahoria, tomate, lechuga, pepino, patata, cebolla y apio. Sólo dos especies, *A. caviae* y *A. hydrophila* fueron identificadas cuando la secuenciación del gen *rpoD* fue realizada a aislados recuperados de brotes de alfalfa (Nagar y cols., 2013). Esto concuerda con la mayoría de los estudios que han utilizado métodos fenotípicos de identificación, en los cuales las mismas especies de *Aeromonas* han sido aisladas desde frutas y vegetales (Neyts y cols., 2000a; Bashir Awan y cols., 2006; Chang y cols., 2008; Nagar y cols., 2011), con excepción del realizado por McMahon y Wilson (2001) en donde *A. schubertii* fue la especie más prevalente, seguida por *A. hydrophila*, *A. caviae*, *A. trota* y *A. veronii*.

Estos alimentos junto con el agua contaminada corresponden a la principal fuente de infección con *Aeromonas* en los procesos diarreicos (Figueras y Borrego, 2010; Figueras y Beaz-Hidalgo, 2014). Parámetros como la temperatura, salinidad, pH, y variación en las concentraciones de CO<sub>2</sub> y O<sub>2</sub> son factores que se modifican para evitar la proliferación de *Aeromonas* en estos alimentos (Figueras y Beaz-Hidalgo, 2014). Si bien la mayoría de las *Aeromonas* son mesófilas (28-30°C), existen algunas

especies que son capaces no sólo de sobrevivir, sino también de multiplicarse a temperaturas de refrigeración (2-10°C), de ahí la importancia de monitorizar la presencia de *Aeromonas* en alimentos que requieren cadena de frío (Figueras y Beaz-Hidalgo, 2014). El número de *Aeromonas* en estos alimentos varía entre  $10^2$  y  $10^5$  ufc/g, pero *Aeromonas* es capaz de multiplicarse entre 10 y 1000 veces en alimentos almacenados hasta 10 días a 5°C y es capaz de sobrevivir a temperaturas más bajas, entre 0 y -3°C (Figueras y Beaz-Hidalgo, 2014).

*Aeromonas* también es capaz de sobrevivir a otras condiciones usadas para preservar los alimentos, como el vacío y modificación de los gases atmosféricos. Sin embargo, al modificar las condiciones atmosféricas (60% CO<sub>2</sub>/40% O<sub>2</sub>) del embalaje de un pez (*Etroplus suratensis*) autóctono de India, el crecimiento de *Aeromonas* fue inhibido, favoreciendo la duración del producto (Figueras y Beaz-Hidalgo, 2014).

La sal o cloruro de sodio (NaCl) es un preservante habitual de productos cárnicos y pescados crudos. En general *Aeromonas* es capaz de crecer en concentraciones de NaCl de hasta 4%, sin embargo, hay cepas tolerantes a mayores concentraciones (6% de NaCl) detectándose niveles de  $10^5$  células viables/ml mediante citometría de flujo (Figueras y Beaz-Hidalgo, 2014). Además se demostró que esta tolerancia se ve favorecida por las bajas temperaturas (4°C) de refrigeración, la que no asegura la calidad de los alimentos (Figueras y Beaz-Hidalgo, 2014).

El pH es otro parámetro utilizado para controlar el crecimiento de bacterias patógenas en los alimentos. Sin embargo, se ha demostrado que *Aeromonas* es capaz de sobrevivir a pH= 5, que es el obtenido cuando se utiliza jugo de limón, por ejemplo en el cebiche (Figueras y Beaz-Hidalgo, 2014).

La radiación gamma es altamente efectiva en la eliminación de patógenos en alimentos como vegetales, carnes y pescado. Se ha demostrado que dosis equivalentes a 1,5 kGy eliminaban las altas concentraciones de *Aeromonas* ( $10^5$  ufc/g) presentes en brotes de vegetales, en pollo y en pescado (Figueras y Beaz-Hidalgo, 2014).

#### **1.3.4. Estudios de metagenómica en comunidades bacterianas**

Cada vez son más los estudios enfocados a entender la composición de las comunidades bacterianas, principalmente en flujos de agua. Es así, como en un estudio ambiental realizado en Alemania por Cousin y cols. (2008), en donde se analizaron

muestras de agua Karsticas, 681 aislados bacterianos fueron recuperados e identificados mediante secuenciación parcial del gen ARNr 16S (432 pb). Un total de 40 géneros bacterianos fueron identificados y de estos *Flavobacterium* (362/681, 53,2%), *Pseudomonas* (109/681, 16%), *Stenotrophomonas* (49/681, 7,2%) y *Aeromonas* (15/681, 2,2%) fueron los más prevalentes. Estos 15 aislados de *Aeromonas* fueron enviados a nuestro laboratorio en donde fueron re-identificados mediante secuenciación del gen *rpoD*, a partir del cual se hizo la descripción de una nueva especie denominada *A. rivuli* (Figueras y cols., 2011a). Posteriormente, en el año 2009, Berg y cols. utilizando la misma metodología que en el estudio anterior, identificaron 460 aislados recuperados a partir de 212 muestras de agua (río (n= 7), lago (n= 144), mar (n= 32) y agua potable (n= 29)) en Finlandia. De los 460 aislados, 195 (42%) correspondieron a *Gammaproteobacterias*, 100 (22%) a *Alphaproteobacterias* y 55 (12%) *Betaproteobacterias*, siendo estas las tres clases dominantes. En el caso específico del orden *Gammaproteobacteria*, *Aeromonas* (121/195, 62%) fue el género más frecuentemente identificado, seguido por *Pseudomonas* (31/195, 15,9%) y *Acinetobacter* (21/195, 10,8%). Las cepas de *Aeromonas* fueron también enviadas a nuestro laboratorio para ser re-identificadas mediante secuenciación del gen *rpoD*. En este caso, también se encontraron especies nuevas que serán descritas en los apartados 4.4.1 y 4.4.2.

Tal como se explicó previamente en el apartado 1.2.5, las técnicas de secuenciación masiva o secuenciación de nueva generación, debido principalmente a su bajo costo y alto rendimiento, han sido cada vez más utilizadas principalmente en el estudio de microbiomas o comunidades bacterianas asociadas a matrices complejas como por ejemplo agua residual, siendo las regiones variables V3, V4 y V6 del gen rRNA 16S las dianas más utilizadas (McLellan y cols., 2010; Ye y Zhang, 2011; VandeWalle y cols., 2012; Lu y Lu, 2014; Lu y cols., 2015; Al-Jassin y cols., 2015). Esta tecnología ha permitido la rápida detección de bacterias patógenas, siendo los géneros *Arcobacter* y *Aeromonas* los más prevalentes en este tipo de muestras (McLellan y cols., 2010; VandeWalle y cols., 2011; Lu y Lu, 2014; Al-Jassim y cols., 2015). En el caso específico de *Aeromonas*, esta ha sido detectada a lo largo de todo el proceso de tratamiento de las aguas residuales, sin embargo, su prevalencia va aumentando hacia el final de este proceso (Ye y Zhang, 2011; Lu y cols., 2015), lo que

implica que *Aeromonas* es capaz de resistir los tratamientos de purificación empleados. Esto hecho también fue detectado por Al-Jassim y col. (2015) en donde los mismos 45 OTUs correspondientes a bacterias patógenas fueron detectados tanto en la entrada como en la salida de la planta (post tratamiento de cloración) de tratamiento de aguas residuales. Además, siete de estos 45 OTUs fueron identificados como *Aeromonas*. Por otra parte, en el estudio realizado por McLellan y cols. (2010), se empleó pirosecuenciación para analizar muestras de aguas residual, aguas superficiales y heces humanas. Al comparar los grupos taxonómicos prevalentes en cada una de estas muestras, se observó que *Acinetobacter*, *Aeromonas* y *Trichococcus* fueron abundantes en agua residual, pero no en los otros dos tipos de muestras, en donde no fueron detectados o estuvieron en muy bajos niveles, sugiriendo que estos organismos son específicos de este tipo de agua. La capacidad de *Aeromonas* de proliferar en el agua residual ya había sido comentado previamente ya que se consideraba que su elevada presencia y concentración en las aguas residuales urbana no podía explicarse únicamente como un aporte de origen fecal humano, ya que su presencia en las heces humanas es relativamente baja (Holmes y cols., 1996). Esta característica hace que se mencionen como indicadores alternativos de calidad del agua.

### **1.3.5. Infecciones en humanos**

Las *Aeromonas* son consideradas, actualmente, como un patógeno oportunista emergente habiéndose asilado como agente etiológico en diversos procesos infecciosos, principalmente gastroenteritis, septicemia e infecciones de heridas, así como en otras infecciones que afectan al sistema hepatobiliar, tracto respiratorio, huesos y articulaciones, como se muestra en la Tabla 5 (actualizado de Figueras y Beaz-Hidalgo, 2015). Las *Aeromonas* son principalmente patógenos entéricos que afectan con mayor frecuencia a niños, ancianos e individuos inmunocomprometidos (Figueras, 2005; Janda y Abbott, 2010; Igbiosa y cols., 2012; Figueras y Beaz-Hidalgo, 2015). Se han descrito numerosos casos de bacteriemias e infecciones extraintestinales tales como meningitis, neumonía, queratitis y osteomielitis causadas por *Aeromonas* en paciente sanos e inmunocompetentes (Figueras, 2005; Dwivedi y cols., 2008; Gunasekaran y cols., 2009; Janda y Abbott, 2010; Figueras y Beaz-Hidalgo, 2015).

Además, *Aeromonas* fue el microorganismo más aislado después de desastres naturales como el tsunami en Tailandia el año 2001 (*Aeromonas* correspondió al 22,6% de todos los aislados) y el huracán Katrina en el sureste de Estados Unidos (2005), asociada principalmente a infección de heridas (Hiransuthikul y cols., 2005; Presley y cols., 2006). De hecho, tanto las inundaciones como las sequías, son consideradas las principales repercusiones del cambio climático y hay evidencia de que tanto el aumento como la disminución del volumen de lluvia caída, preceden los brotes de *Aeromonas* asociado al consumo de agua (Figueras y Borrego, 2010). Además, *Aeromonas* ha sido aislada junto con *Vibrio cholerae* en brotes ocurridos en Haití (Hasan y cols., 2012; Mendes-Marquez y cols., 2012; Figueras y Beaz-Hidalgo, 2015).

Se han descrito múltiples factores de virulencia en *Aeromonas* en relación con estas infecciones incluyendo aerolisinas, hemolisinas, lipasas, enterotoxinas citolíticas y citotónicas (Martin-Carnahan y Joseph, 2005; Igbinosa y cols., 2012; Beaz-Hidalgo y Figueras, 2012, 2013; dos Santos y cols., 2015) así como la existencia de diversos Sistemas de Secreción (Vilches y cols., 2004; Seshadri y cols., 2006; Retih y cols., 2008; Beaz-Hidalgo y Figueras, 2012, 2013; dos Santos et al., 2015), que permiten la colonización, invasión y proliferación de esta bacteria durante el establecimiento de la infección, siendo capaz de dañar los tejidos del hospedero y evadir la respuesta inmune generada por este.

Hasta hace poco tiempo, eran sólo tres especies, *A. caviae*, *A. veronii* y *A. hydrophila*, las predominantes en muestras clínicas, correspondiendo aproximadamente al 92% de los aislados (Figueras, 2005; Janda y Abbott, 2010; Igbinosa y cols., 2012; Figueras y Beaz-Hidalgo, 2015). Sin embargo, desde la descripción de *A. dhakensis* (que resultó de la reclasificación de *A. aquariorum* y *A. hydrophila* subsp. *dhakensis*) esta especie a resultado ser muy prevalente en muestras clínica. En realidad hasta la fecha las cepas pertenecientes a esta especie se identificaban erróneamente como *A. caviae*, *A. hydrophila* y *A. veronii* mediante métodos bioquímicos (Martínez-Murcia y cols., 2008; Figueras y cols., 2009; Aravena-Román y cols., 2011a; Puthucheary y cols., 2012, Roger y cols., 2012b; Wu y cols., 2012a; Beaz-Hidalgo y cols., 2013, Morinaga y cols., 2013; Chen y cols., 2013; Pérez-Valdespino y cols., 2014). Podemos decir que la prevalencia de las especies predominantes en clínica a cambiado con la descripción de *A. dhakensis* y con la introducción de los métodos moleculares de identificación.

**Tabla 5. Distribución de *Aeromonas* spp. según origen de aislamiento e identificadas mediante métodos moleculares (actualizado de Figueras y Beaz-Hidalgo, 2015)<sup>a</sup>.**

Especies	Heces	Herida	Sangre	Tracto respiratorio <sup>b</sup>	Orina	Diálisis peritoneal	Bilis	Otros <sup>c</sup>	Total
<i>A. caviae</i>	130	36	112	3	6	4	2	6	299
<i>A. veronii</i>	99	40	96	9			2	3	249
<i>A. dhakensis</i> <sup>d</sup>	55	82	84	3	3	5	2	3	237
<i>A. hydrophila</i>	47	65	32	5	2	4	1	2	158
<i>A. media</i>	8	3	5		1				17
<i>A. trota</i>	1	2					1		4
<i>A. taiwanensis</i>	1	3							4
<i>A. salmonicida</i> <sup>e</sup>		2						1	3
<i>A. jandaei</i>	1		1		1				3
<i>A. sanarellii</i>	1	3							4
<i>A. allosaccharophila</i>	1		1						2
<i>A. tecta</i>	2								2
<i>A. diversa</i>		2							2
<i>A. schubertii</i>		1							1
<i>A. bestiarum</i>			1						1
<i>A. popoffii</i>					1				1
Total	346	239	332	20	14	13	8	15	987

<sup>a</sup>Datos obtenidos de Huys y cols. (2002), Hua y cols. (2004), Al Benwan y cols. (2007), Bossi-Küpfer y cols. (2007), Demarta y cols. (2008), Figueras y cols. (2009, Tena y cols. (2009), Alperi y Figueras (2010), Miñana-Galbis y cols. (2010), Aravena-Román y cols. (2011a), Esteve y cols. (2012), Puthuachary y cols. (2012), Roger y cols. (2012b), Sedláček y cols. (2012), Senderovich y cols. (2012), Wu y cols. (2012a, 2015), Morinaga y cols. (2013), Chen y cols. (2013, 2014b), Shin y cols. (2013), Pérez-Valdespino y cols. (2014) y los resultados de 76 aislados fecales no publicados; <sup>b</sup>10 cepas de esputo; <sup>c</sup>Otros incluye: *A. caviae* (n= 6) de: vagina (3), apéndice (1), líquido ascítico (1) y absceso (1); *A. veronii* (n= 3): líquido ascítico (2) y líquido ótico (1); *A. dhakensis* (n= 3): líquido ascítico (1), líquido articular (1) y hueso (1); *A. hydrophila* (n= 2): exudado de úlcera (1) y absceso (1) y *A. salmonicida* de absceso (1); <sup>d</sup>En muchos de los estudios *A. aquariorum* fue el nombre usado para *A. dhakensis*; <sup>e</sup>Un caso adicional asociado con líquido peritoneal fue descrito por Yang y col. (2008), pero el método de identificación empleado no fue especificado.

Ahora, el 96,5% de los aislados clínicos corresponden a cuatro especies; *A. caviae* (29,9%); *A. dhakensis* (26,3%), *A. veronii* (24,8%) y *A. hydrophila* (15,5%), como se observa en la Tabla 6 (actualizada de Figueras y Beaz-Hidalgo, 2015), que además muestra todas las especies aisladas desde muestras clínicas que han sido identificadas mediante métodos moleculares. De hecho, *A. dhakensis* es la especie clínica más prevalente en Malasia (Puthuachary y cols., 2012), estando por sobre las tradicionalmente identificadas *A. caviae* y *A. veronii*. Una situación similar se presenta en Australia (Aravena-Román y cols., 2011a) y Taiwán (Wu y cols., 2012a, 2015; Chen y cols., 2013, 2014b), lo que demuestra la importancia clínica de esta especie, la que ha sido aislada en diferentes países y a partir de distintos tipos de muestras (Tabla 5 y 6), La sospecha de que *A. dhakensis* es más prevalente en climas tropicales (Malasia,

Taiwán y Australia) requiere ser confirmada. Por otra parte, el hecho de que *A. caviae* ha sido descrita como la especie más frecuentemente aislada en muestras de sangre en Japón (Kimura y cols., 2013) y *A. hydrophila* en las islas caribeñas francesas y en Taiwán (Hodechez y cols., 2011) debería ser verificado, ya que en ambos estudios se emplearon métodos fenotípicos para la identificación.

Además, la confusión entre *A. hydrophila* y *A. dhakensis* puede tener consecuencias en clínica, debido a que la última es más virulenta y muestra mayor actividad citotóxica frente a líneas celulares de fibroblastos humanos de la piel, como fue demostrado por Chen y cols. (2013) al cuantificar los niveles de lactato deshidrogenasa leucocitaria ( $29,6 \pm 1,2\%$  vs  $20,6 \pm 0,6\%$ ,  $P < 0.0001$ ). Por otra parte, el 81% de los aislados de *A. dhakensis* recuperados desde sangre presentaron resistencia a cefotaxima, no así otras cepas clínicas de *A. hydrophila*, *A. caviae*, *A. veronii* y *A. trota* (Wu y cols., 2013). Además, se ha descrito en el genoma de la cepa clínica de *A. dhakensis* (AAK1), una  $\beta$ -lactamasas clase C codificada por el gen *blaAQU-1* (Wu y cols., 2013). Sedláček y cols. (2012) publicaron un caso de diarrea aguda atribuida a *A. dhakensis* de 10 días de duración en un hombre de 25 años, que regresaba a República Checa de un viaje a Egipto y concluyeron que se trataba de una enfermedad importada. Sin embargo, esta especie no ha sido notificada en Egipto, lo que no es raro, ya que en este país no se han publicado estudios en donde utilicen métodos moleculares de identificación. Un año más tarde, Shin y cols. (2013) publicaron un caso de sepsis debida a *A. dhakensis* con desenlace fatal. Recientemente Chen et al. (2014b) han demostrado de nuevo la mayor virulencia de *A. dhakensis* y comprobado que los pacientes que sufrían bacteremia atribuida a esta especie tenían una mayor mortandad que la producida por otras especies ( $37,5\%$  vs.  $0\%$ ,  $P = 0.028$ ).

Como se mencionó anteriormente, las principales presentaciones clínicas producidas por *Aeromonas* son la diarrea, las infección de heridas y la bacteremia (Figueras, 2005; Janda y Abbott, 2010; Igbinsa y cols., 2012; Figueras y Beaz-Hidalgo, 2015). Mientras que las diarreas afectan principalmente a niños e individuos inmunocomprometidos, las infecciones de heridas afectan principalmente a la población sana y están asociadas a accidentes o traumas, incluso, pueden ser adquiridas en el hospital, después de una cirugía o de la aplicación de terapia con sanguijuelas (Figueras, 2005; Janda y Abbott, 2010; Igbinsa y cols., 2012; Figueras y Beaz-Hidalgo, 2015;



Baruah y cols., 2015, en prensa).

En un estudio retrospectivo (9 años) realizado por Wu y cols. (2007) en Taiwán, se determinó que el espectro de enfermedades de las cuales provenían un total de 116 aislados de *Aeromonas* fue el siguiente: 40% de bacteremia, 27% de infecciones de heridas y 15% de infecciones del tracto hepatobiliar. Se observó una mortalidad de un 26%. Por otra parte, en España y comprendiendo un período de 15 años, Tena y cols. (2007) reportaron 38 casos de infecciones extraintestinal debido a *Aeromonas*. De estos, el 40% casos correspondieron a infecciones abdominales (55% (10/18) de los casos asociado al sistema hepatobiliar), el 28% a infecciones de piel y tejidos, el 7% a infección del tracto urinario y el 7% a bacteremia primaria. La mortalidad global fue de un 16,2%. En ambos estudios, un alto porcentaje de los individuos que presentaron infección de heridas o tejidos, estaban previamente sanos, variando entre un 64 % en el estudio de Tena y cols. (2007) y un 85% en el de Wu y cols. (2007). Además, en este último, el 71% de los pacientes con infección de los tejidos sufrió traumatismos relacionados con el agua y/o suelo. En estudios realizados en Francia por Fraisse y cols. (2008) y Lamy y cols. (2009) las infecciones de herida fueron las presentaciones clínicas predominantes, correspondiendo a un 44% y 50% del total respectivamente. Así mismo ocurrió en Australia, en donde un alto porcentaje de aislados fueron recuperados a partir de heridas (38%), seguido con idéntica prevalencia (23%) de las heces y sangre (Aravena-Román y cols., 2011a, b). Sin embargo, en un estudio realizado en Malasia por Puthuchear y col. (2012) la gastroenteritis (55,3%) fue la forma clínica más frecuente, seguida por infección de tejidos (23,4%), infección asociada a diálisis peritoneal (13,8%) y bacteremia primaria (4,25%). Los estudios clínicos mas recientes se resumen en la Tabla 6.

#### **1.3.5.1. Intestinales**

Tal y como se ha comentado previamente las infecciones intestinales debido a *Aeromonas* son comunes y de distribución mundial (Janda y Abbott, 1998, 2010; Figueras, 2005; von Graveniz, 2007; Ghenghesh y cols., 2008, Surek y cols., 2010; Figueras y Beaz-Hidalgo, 2015). Sin embargo, se considera que estas infecciones están subvaloradas, ya que la presencia de *Aeromonas* no se investiga de forma rutinaria en los laboratorios clínicos y la mayoría de las veces, su aislamiento ocurre desde medios

de cultivos destinados a la detección de enteropatógenos, principalmente en los medios Cefsulodin-Irgasán-Novobiocina (CIN) y Agar McConkey (Figueras, 2005; Janda y Abbott, 2010).

La presentación clínica más frecuente es la enteritis secretora (acuosa), que representa entre el 75 - 89% de todos los casos en los cuales *Aeromonas* fue el único patógeno asociado (Janda y Abbott, 2010). El rol de *Aeromonas* como agente etiológico de diarrea bacteriana ha estado cuestionado, principalmente por la carencia de brotes, el hecho de que existan portadores sanos, la falta de demostración de los postulados de Koch's de acuerdo a los resultados obtenidos en estudios con voluntarios y la carencia de un modelo animal (Janda y Abbott, 2010). Sin embargo, recientemente Figueras y Beaz-Hidalgo (2015) han defendido el rol patogénico de esta bacteria, basándose principalmente en el hecho de que la misma cepa (genotipo) que produce diarrea ha sido aislada desde agua y alimentos (Altwegg y cols., 1991; Pablos y cols., 2010, 2011; Kajhanchi y cols., 2010).

Además, en el caso de *Vibrio*, también existen los portadores sanos o asintomáticos (Grimes y cols., 2006) y esto no es razón para dudar de su rol como enteropatógeno. Por otro lado, los postulados de Koch's se cumplieron mediante la ingestión accidental de una cepa de *Aeromonas* por parte de un técnico de laboratorio, quien desarrollo una diarrea severa de 2 días de duración, aislándose en las heces la misma cepa ingerida accidentalmente (Carnahan y cols., 1991). Finalmente, un modelo murino que reproduce la enfermedad ha sido recientemente descrito por Abuelsaad y cols. (2013) y otros desarrollados por Grim y cols. (2014).

### **Diarrea en niños**

La incidencia de *Aeromonas* como agente de diarrea en niños varía de 2,3% en Taiwán a 13% en Nigeria (Esser y cols., 2000; Juan y cols., 2000; Nzeako y Okafor, 2000; Figueras, 2005; Igbiosa et al., 2012; Figueras y Beaz-Hidalgo, 2015). En dos estudios, uno realizado en Cuba por Bravo y cols. (2012) y el otro en Egipto por Mansour y cols. (2012), se demostró que la incidencia de aislamiento de *Aeromonas* fue mayor en niños con diarrea (7,15% y 1,4%) que en el grupo control (1,76% y 0,5%). Pablos y cols. (2010, 2011) encantararon que en León (España) el 4% (32/800 casos) de la diarreas eran debida a *Aeromonas* y que en el 68,8% (22/32) de los casos afectaba

a pacientes pediátricos.

Además, estudios realizados en África y sur de Asia, han demostrado que *Aeromonas* afecta principalmente a niños de entre 24 - 59 meses (Kotloff y cols., 2013).

Su incidencia a nivel mundial varía según con que otro patógeno se compare. De esta forma, en el estudio realizado por Esser y cols. (2000) *Aeromonas* ocupó el tercer lugar, después de *Campylobacter* y *Salmonella*. Sin embargo, cuando *Campylobacter* no fue investigado, *Aeromonas* prevaleció por encima de *Salmonella* y *Shigella* en Nigeria (Nzeako Okafor, 2002) y ocupó el segundo lugar, después de *Shigella*, en Irán (Soltan Dallal y Moezardalan, 2004). Incluso, hay estudios en donde *Aeromonas* es más prevalente que *E. coli* enteropatógena (Esser et al., 2000; Nzeako y Okafor, 2002; Soltan Dallal y Moezardalan, 2004; Bravo y cols., 2012).

En general, en niños, el tipo de presentación de la diarrea es aguda y acuosa, con leve aumento de la temperatura corporal vómitos menos frecuentes que en las diarreas causadas por otros patógenos (Figueras y cols., 2007).

### **Diarrea en adultos**

La incidencia de *Aeromonas* como causa de diarrea en adultos es de aproximadamente un 2%, como lo demuestran diferentes estudios realizados a nivel mundial (Svenungsson y cols., 2000; Vila y cols., 2003; Figueras, 2005; Senderovich y cols., 2012; Chen y cols., 2014b; Figueras y Beaz-Hidalgo, 2015). En el estudio realizado por Vila y cols. (2003), la incidencia de diarrea del viajero fue del 2% (18 de los 863 pacientes estudiados) y la frecuencia de aislamiento fue similar en individuos que regresaban de África (1,72%), Sudamérica (1,83%) y Asia (2,32%). Además el 50% de los pacientes presentó fiebre y dolor abdominal. Otros casos han sido reportados en Italia (Ottaviani y cols., 2013) y en España (Martín-Delgado y cols., 2001).

**Tabla 6. Distribución de las especies de *Aeromonas* identificadas mediante métodos moleculares en diferentes estudios clínicos (actualizado de Figueras y Beaz-Hidalgo, 2015).**

Especie/ país	Nº (%) de cepas en cada estudio										Total
	Figueras y cols., 2009 <sup>a</sup>	Aravena-Román y cols., 2011 <sup>b</sup>	Puthucheary y cols., 2012 <sup>c</sup>	Roger y cols., 2012b <sup>d</sup>	Senderovich y cols., 2012 <sup>e</sup>	Wu y col., 2012a <sup>f</sup>	Chen y cols., 2013 <sup>g</sup>	Pérez-Valdespino y cols., 2013 <sup>e</sup>	Chen y cols., 2014b <sup>e</sup>	Wu y cols., 2015 <sup>f, h</sup>	
	España	Australia	Malasia	Francia	Israel	Taiwán	Taiwán	México	Taiwán	Taiwán	
<i>A. caviae</i>	73 (51,8)	34 (23,8)	18 (19,1)	24 (23,5)	11 (64,7)	15 (25,0)	11 (13,7)	10 (35,7)	7 (36,8)	43 (28,1)	246 (29,9)
<i>A. dhakensis</i> <sup>i</sup>	25 (17,7)	34 (23,8)	47 (50,0)	6 (5,9)		16 (36,4)	37 (46,3)	3 (10,7)	1 (5,3)	48 (31,4)	217 (26,3)
<i>A. veronii</i>	16 (11,3)	36 (25,2)	12 (12,8)	46 (45,1)	5 (29,4)	12 (27,3)	14 (17,5)	3 (10,7)	10 (52,6)	50 (32,7)	204 (24,8)
<i>A. hydrophila</i>	17 (12,2)	33 (23,1)	16 (17,0)	23 (22,5)		5 (11,4)	13 (16,2)	11 (39,3)		10 (6,5)	128 (15,5)
<i>A. media</i>	5 (3,5)	2 (1,4)		1 (1,0)			1 (1,3)	1 (3,6)			10 (1,2)
<i>A. trota</i>	3 (2,1)		1 (1,1)								4 (0,5)
<i>A. taiwanensis</i>	1 (0,7)				1 (5,9)		2 (2,5)				4 (0,5)
<i>A. sanarellii</i>	1 (0,7)						2 (2,5)		1(5,3)		4 (0,5)
<i>A. salmonicida</i>		1 (0,7)		1 (1,0)							2 (0,2)
<i>A. allosaccharophila</i>		1 (0,7)		1 (1,0)							2 (0,2)
<i>A. schubertii</i>		1 (0,7)									1 (0,1)
<i>A. bestiarum</i>		1 (0,7)									1 (0,1)
<i>A. jandaei</i>				1 (1,0)							1 (0,1)
Total	141	143	94	103	17	48	80	28	19	151	824

<sup>a-f</sup>Origen de las cepas: <sup>a</sup>sangre (41.1%, 58/141), herida (25.5, 36/141), heces (3.6%, 5/141), otros (14.2%, 20/141); <sup>b</sup>herida (37.8%, 54/143), heces (23.1%, 33/143), sangre (23.1%, 33/143), otros (16.3%, 23/143); <sup>c</sup>heces (51.1%, 48/94), herida (23.4%, 22/94), sangre (8.5%, 8/94), otros (17.0%, 16/94); <sup>d</sup>herida (36.0%, 37/103), sangre (16.5%, 17/103), otros (15.5%, 16/103); <sup>e-h</sup>Los estudios incluyen sólo aislados de: <sup>e</sup>heces, <sup>f</sup>sangre, <sup>g</sup>herida; <sup>h</sup>En este estudio se analizó un total de 153 cepas, pero hubo 2 que se identificaron como *Aeromonas* sp.; <sup>i</sup>En muchos estudios *A. aquariorum* fue el nombre usado para la especie *A. dhakensis*.

### 1.3.5.2. Infección de heridas

Después de la gastroenteritis, la infección de heridas es el cuadro clínico más frecuente provocado por *Aeromonas* y afecta principalmente a personas sanas y suele ir asociado a eventos traumáticos y quemaduras relacionados con agua y suelo contaminado con este microorganismo (Figueras, 2005; Lamy y cols., 2009; Janda y Abbott, 2010; Aravena-Román y cols., 2011a, b; Behera y cols., 2011; Igbinosa y cols., 2012; Mahabeer y cols., 2014; Figueras y Baez-Hidalgo, 2015). Los pacientes que han sufrido quemaduras tienden a sumergir las lesiones en agua siendo ésta la fuente de infección (Figueras, 2005; Yasti y cols., 2009; Janda y Abbott, 2010). Azzopardi y cols. (2011) analizaron las infecciones en pacientes quemados, y determinaron que el 76% de estas fueron producidas por *Aeromonas*, con una mortalidad de 10,7%. Además, en el 96% de los casos, el contacto con agua no tratada y el uso de material sucio para apagar las llamas, fueron reconocidos como los factores de riesgo para adquirir una infección por *Aeromonas*. Recientemente, Sherry y cols. (2013) compararon los microorganismos asociados a las infecciones de quemaduras producidas en incendios forestales y los compararon con los de pacientes de rutina (grupo control) y encontraron que tanto las enterobacterias (5/18 vs 2/36) y las *Aeromonas* (3/18 vs 1/36) fueron más frecuentes en el primer grupo que en el grupo control.

En una revisión que analizaba las infecciones de heridas producidas por bacterias marinas, *Aeromonas* fue considerada una de las más relevantes (Finkelstein y Oren, 2011). De hecho, Tsai y cols. (2007) concluyeron que el contacto con agua de mar y mariscos crudos se relaciona principalmente con infecciones producidas por *Vibrio vulnificus*, mientras que el contacto con agua dulce, agua de estuario, suelo o madera se relaciona con *Aeromonas*. Además, ambos microbios comparten el hecho de desencadenar rápidamente en celulitis bacteriana.

En un estudio retrospectivo de 129 casos de infecciones de piel y tejidos blandos realizado en Taiwán y atribuidos a *Aeromonas*, el 78% de los pacientes habían sufrido un trauma previo y en el 30% de los casos hubo exposición al agua. Además, el 79% de los pacientes tuvo una infección polimicrobiana y el 3,1% de estos presentó simultáneamente bacteremia por *Aeromonas* (Chao y cols., 2013a). En otro estudio realizado Chen y cols. (2013), se compararon las características de *A. dhakensis* y *A.*

*hydrophila* aisladas a partir de 80 casos de infección de heridas y se demostró que *A. dhaknesis* (43,6%) no sólo fue más prevalente, sino que además esta especie presentó una mayor asociación a ambientes acuáticos (32,4% vs 0%,  $P < 0.05$ ). Recientemente e Mahabeer y cols. (2014) describieron un caso de un absceso cerebral en el que se identificó la cepa mediante Vitek como *A. hydrophila* y que se produjo tras una laceración en el cuero cabelludo y que a pesar del tratamiento antibiótico acabó con la muerte del paciente (Mahabeer y cols., 2014).

Estudios realizados en Reino Unido manifiestan el hecho de que los traumatismos asociados al contacto con ambiente acuático son la vía de entrada para generar artritis séptica debida a *Aeromonas* (Elwitigala y cols., 2005; Danaher y Mueller, 2011). Sin embargo, en el mismo país, se describió un caso de artritis séptica y bacteremia, en donde el paciente no presentó historia de trauma o factores de riesgo que permitieran la entrada de *Aeromonas* (Roberts y cols., 2006).

A pesar de que las infecciones de piel y quemados producida por *Aeromonas* simulan a las producidas por bacterias de los géneros *Streptococcus* y *Staphylococcus*, los antimicrobianos usados para tratar estos últimos, no son efectivos contra *Aeromonas* (Figueras, 2005; Elwitigala y cols., 2005). Esto se evidenció en una paciente con absceso cutáneo y un paciente con meningitis secundaria a traumatismo severo en el cráneo debido a un accidente en motocicleta, que fueron tratados con oxacilina-clindamicina y amoxicilina-ácido clavulánico respectivamente. Mientras que en el primer caso, al observar que no había remisión del cuadro clínico, se decidió cambiar el tratamiento inicial por ciprofloxacino y cefepime resultando en la cura del paciente, en el segundo caso se mantuvo la terapia inicial y terminó con la muerte del paciente (Coutinho y cols., 2012; Pampin y cols., 2012).

En un partido de football en el barro celebrado en Australia, 26 jugadores presentaron abrasiones en la piel que se infectaron con *Aeromonas*. El 35% de los pacientes presentaron fiebre y 2 pacientes desarrollaron complicaciones, necesitando intervención quirúrgica. Además, *Aeromonas* fue aislada a partir del agua de río que fue utilizada para el riego del campo de football, considerándose ésta la fuente de contaminación (Vally y cols., 2004).

Las infecciones de herida debido a *Aeromonas* pueden evolucionar de forma severa a fascitis necrotizante (Figueras, 2005; Abuhammour y cols., 2006; Tsai y cols.,

2009; Chang y cols., 2012; Kao y Kao, 2012; Kumar y cols., 2012; Sood y Nerurkar, 2014; Spadaro y cols., 2014) y ecthyma gangrenosum (Avolio y cols., 2009; García-Lozano y cols., 2012) especialmente en pacientes inmunocomprometidos (Monaghan y cols., 2008; Shak y cols., 2011).

Recientemente, Grim y cols. (2013, 2014) utilizando un modelo de infección intramuscular en ratón y estudios de genómica funcional, demostraron la existencia de cepas de *Aeromonas* spp. (patotipos) altamente infecciosas y portadoras de genes de virulencia con la habilidad de causar fascitis necrotizante.

### **Infecciones de herida quirúrgica y asociadas a terapia con sanguijuelas**

Dentro de las infecciones nosocomiales, las más comunes son las asociadas a heridas quirúrgicas y que pueden presentar una alta morbimortalidad (Tena y cols., 2009). Los agentes etiológicos involucrados pueden variar dependiendo del procedimiento y sitio anatómico y raramente son causadas por *Aeromonas* (Tena y cols., 2009). Tena y cols. (2009) revisaron una serie de nueve casos ocurridos en España (ocho en Guadalajara y uno en Zaragoza) entre los años 1990 y 2007, junto a 15 casos citados en la literatura, constatándose que la mayoría estaban asociados a la extracción del apéndice, vesícula biliar y colon. En la mayoría de estos casos, las infecciones fueron polimicrobianas con una mortalidad del 5%. Además, cuando se compararon las manifestaciones clínicas en los casos de infección por *Aeromonas* con las producidas por otros microorganismos, la principal diferencia fue la rapidez con que se instauró la infección en el caso de *Aeromonas*, ya que el 77.7% (7/9) de los pacientes desarrollaron la infección dentro del primer y segundo día post cirugía (Tena y cols., 2009). Por el contrario, en un caso ocurrido en India cuando a una mujer de 58 años se le practicó una mastectomía radical por padecer cáncer de pecho, las complicaciones debidas a una infección en el sitio de la cirugía comenzaron a los 14 días del post operatorio y *A. hydrophila* fue identificada como el único agente de infección (Khandelwal y cols., 2015).

Actualmente la utilización de sanguijuelas con fines medicinales es, en numerosos casos, seguida de una infección por *Aeromonas* (Fenollar y cols., 1999; Kalbermatten y cols., 2007; Etemadi y cols., 2008; Fraisse y cols., 2008, Sartor y cols., 2013).

La terapia con sanguijuelas es utilizada en cirugía plástica y reconstructiva para aliviar la congestión venosa y mejorar la microvascularización de injertos e implantes (Graf, 2000; Sartor y cols., 2002; Figueras, 2005; Whitaker y cols., 2011; Figueras y Beaz-Hidalgo, 2015). Aunque este tipo de terapia es exitosa en el 80-83% de los casos (Sartor y cols., 2002; Steer y cols., 2005), este porcentaje puede disminuir a menos de un 30% debido a una infección por *Aeromonas* (Sartor y cols., 2002; Figueras, 2005; Schnabl y cols., 2010; Whitaker y cols., 2011; Figueras y Beaz-Hidalgo, 2015). La incidencia de infección por *Aeromonas* en este tipo de tratamiento varía entre 7-20% y tiene dos presentaciones, una rápida que ocurre dentro del primer día post tratamiento y otra lenta después de 10 días o más de la aplicación de las sanguijuelas (Schnabl y cols., 2010; Mumcuoglu y cols., 2014; Figueras y Beaz-Hidalgo, 2015). Estas infecciones están relacionadas con la relación simbiótica entre las sanguijuelas y *Aeromonas* (Janda y Abbott, 1998, 2010; Sartor y cols., 2002; Figueras, 2005; Witaker y cols., 2010; Figueras y Beaz-Hidalgo, 2015) ya que éstas participan en la hemólisis de los glóbulos rojos. Clásicamente se pensaba que la especie simbiote de las sanguijuelas era *A. hydrophila*, sin embargo, estudios recientes, utilizando métodos moleculares, han demostrado que no se trata de esta especie sino que son *A. veronii* y *A. jandaei* las que están asociadas con sanguijuelas pertenecientes al género *Hirudo* (*H. medicinalis*, *H. orientalis* y *H. verbana*) utilizadas en medicina (Graf, 1999; Siddall y cols., 2007; Laufer y cols., 2008; Wang y cols., 2011; Giltner y cols., 2013; Ott y cols., 2015).

Las *Aeromonas* generan enzimas específicas gracias a las cuales las sanguijuelas digieren la sangre (Graf, 2000; Figueras, 2005; Figueras y Beaz-Hidalgo, 2015). Mediante secuenciación de los genes rRNA 16S y *gyrB*, se ha demostrado que las especies *A. veronii* bv *sobria* y *A. media* son las especies principalmente involucradas en esta simbiosis, contradiciendo las identificaciones fenotípicas que indicaban que se trataba de *A. hydrophila* (Graf, 2000; Mumcuoglu y cols., 2009; Figueras y Beaz-Hidalgo, 2015).

Las medidas para prevenir estas infecciones involucran la utilización de antibióticos de amplio espectro como medida profiláctica (tanto en el paciente como para las sanguijuelas) y un control de la calidad del agua en donde las sanguijuelas son mantenidas (Sartor y cols., 2002; Ouderkirk y cols., 2004; Figueras, 2005; Mumcuoglu y cols., 2009, 2014; Levine y cols., 2010; Figueras y Beaz-Hidalgo, 2015). A pesar, de



que las cefalosporinas de tercera generación, carbapenémicos y aztreonam son frecuentemente utilizados como medidas profilácticas, se ha recalado el hecho de que las quinolonas (ciprofloxacino) deberían ser empleadas tanto en la profilaxis como en el tratamiento de las infecciones, debido a que pueden ser administradas de forma oral y parenteral (Levine y cols., 2010, Maetz y cols., 2012). Sin embargo, ya se han descrito varios casos de transmisión de *Aeromonas* resistente a ciprofloxacino (Wang y cols., 2011; Giltner y cols., 2013; Pattel y cols., 2013; Sartor y cols., 2013).

En un estudio recientemente, se ha demostrado que existen diferencias en la expresión de los genes de *A. veronii* cuando esta se encuentra en el tracto digestivo de la sanguijuela (*Hirudo verbena*) y cuando se encuentra en el cultivo (Bomar y Graf, 2012).

Se ha observado que durante la simbiosis, *Aeromonas* es sometida a estrés y éste mantiene estas bacterias en fase estacionaria en la que sobreviven durante muchos meses dentro del hospedero (Bomar y Graf, 2012).

### **1.3.5.3. Bacteremia/septicemia**

La incidencia de las bacteremias producidas por *Aeromonas* es muy variable, fluctuando entre 0,12% y 3,3% (Campo y cols., 2001; Nakasome y cols., 2001; Llopis y cols., 2004; Figueras, 2005; Hochedez y col., 2010; Janda and Abbott, 2010; Figueras y Beaz-Hidalgo, 2015). Sin embargo, incidencias mucho más bajas han sido encontradas en Japón, con valores que rodean los 0,07 casos por 1000 admisiones (Morinaga y cols., 2011), y en Reino Unido y Estados Unidos con valores de 1,5 casos/millón de población (Janda y Abbott, 2010). Wu y cols. (2012a) estableció, para un período de estudio de tres años (2008-2010), que las bacteremias producidas por *Aeromonas*, *Vibrio* y *Salmonella* en el sur de Taiwán fueron de 76, 38 y 103 casos/millón de la población respectivamente. Esta mayor incidencia podría deberse a que el 10-15% de la población de Taiwán, es portadora del virus de la hepatitis C (lo que los hace más susceptibles a *Aeromonas* por tener comprometido el hígado). Además *Aeromonas* es altamente abundante en el ambiente (88% de los mariscos destinados al consumo humanos son positivo para esta bacteria) y el clima cálido es constante.

En base a los datos recopilados por Figueras (2005) y Janda y Abbott (2010) las bacteremias asociadas a *Aeromonas* son preferentemente monomicrobiana, adquiridas en la comunidad y afectan principalmente a pacientes varones. Estos datos guardan

concordancia con lo últimos datos recopilados de la literatura que se muestran en la Tabla 7 (actualizada de Figueras y Beaz-Hidalgo, 2015).

Los casos de bacteremia/septicemia debidos a *Aeromonas* publicados después de la revisión de Figueras (2005) provienen de diferentes partes del mundo, por ejemplo: India (Mukhopadhyay y cols., 2008), Francia (Lamy y cols., 2009), Islas caribeñas francesas (Hochedez y cols., 2010), España (Tena y cols., 2009; Pampin y cols., 2012), Taiwán (Tsai y cols., 2006, 2007, 2009; Wu y cols., 2007, 2011, 2012a,b,c, 2015; Lay y cols., 2010; Chuang y cols., 2011; Su y cols., 2012; Tang y cols., 2014; ) y Japón (Morinaga y cols., 2011; Shizuma y cols., 2011; Kimura y cols., 2013; Makino y cols., 2015).

Janda y Abbott (2010) clasificaron las bacteremias en cuatro grupos en base a la población afectada, siendo el principal el que engloba a individuos con enfermedades de base o a inmunocomprometidos (> 80%), seguido por los que sufrieron algún accidente traumático, los casos que afectan a personas sanas y por último los que involucran pacientes sometidos a cirugía reconstructiva y/o terapia con sanguijuelas.

De acuerdo a la revisión realizada por Figueras (2005) basándose en la revisión de Janda y Abbott (1998) las enfermedades de base más comunes fueron: neoplasias malignas (40-50%), enfermedad hepatoiliar (15-30%) y diabetes (3-5%). Sin embargo, tal como se observa en la Tabla 7 (actualizada de Figueras y Beaz-Hidalgo, 2015) desde el año 2000 han aumentado el número de pacientes con enfermedades hepatoiliarias.

Un estudio reciente realizado en Taiwán (Tang y cols., 2014) reveló que el 47,3% de los casos de bacteremia correspondieron a infecciones nosocomiales y los pacientes incluidos en este grupo tuvieron mayor porcentaje de cáncer (62,8%) y cirrosis hepática (37,2%) que los pacientes que adquirieron bacteremia en la comunidad. Los únicos estudios mostrados en la Tabla 7, en cuyos resultados las neoplasias malignas fueron más prevalentes que las enfermedades hepatoiliarias fueron los realizados por Kimura y cols. (2013) y Tang y col. (2014). Por otra parte, en un estudio realizado en Japón, el 85,7% (6/7) de los pacientes fueron mujeres, el 85% padecía neoplasias malignas (ninguna tuvo cirrosis como enfermedad de base) y la mortalidad fue de 28,6% (Morinaga y cols., 2011).

En un estudio en el que se compararon las características de los pacientes que desarrollaron bacteremia por *Aeromonas* (duración, mortalidad, falla renal, porcentaje

de pacientes con shock y falla hepática) con los afectados por bacteremias producidas por enterobacterias, se detectó que la severidad de la disfunción hepática era una característica que dominaba en los pacientes que padecían bacteremia por *Aeromonas* (Shizuma y cols., 2011).

En relación al porcentaje de mortalidad asociada a la bacteremia producida por *Aeromonas*, esta ronda el 30% (Tabla 7), sin embargo, otros trabajos han publicado valores muy superiores: 56% (Llopis y cols., 2004), 62,5% (Nakasome y cols., 2001) y 70% (Lau y cols., 2000).

#### **1.3.5.4. Pneumonia y otras infecciones del tracto respiratorio**

Aunque la neumonía debida a *Aeromonas* es un cuadro clínico raro, se han descrito diversos casos (Kao y cols., 2003; Mukhopadhyay y cols., 2003; Issa y Napolitano, 2011; Nagata y cols., 2011; Chao y cols., 2013c; Figueras y Beaz-Hidalgo, 2015) y tiende a ocurrir en pacientes inmunocomprometidos (Mukhopadhyay y cols., 2003; Nagata y cols., 2011; Chao y cols., 2013b).

A pesar de que el tratamiento con carbapenémicos es efectivo, hay casos en donde la neumonía es fulminante y fatal, ya que los pacientes mueren en un lapso de horas (4 a 6) desde su ingreso a un centro asistencial, siendo esta patología reconocida postmortem durante la autopsia (Murata y cols., 2001; Kao y cols., 2003; Nagata y cols., 2011). La neumonía por *Aeromonas* suele ir asociada a accidentes acuáticos, como ahogamiento, variando entre un 7,1% (6/84) y un 60% (3/5) de los casos (Bossi-Kupfer y cols., 2007; Lamy y cols., 2009; Nagata y cols., 2011; Chao y cols., 2013b). Sin embargo, Issa y Napolitano (2011) describen un caso de neumonía por *Aeromonas* secundario a un accidente automovilístico, en donde el paciente presentó fractura de pelvis y daño en el bazo. Considerando la asociación de a estas bacteria con los casos de ahogamiento, en año 2012, Huys y cols. desarrollaron un protocolo para la detección de *Aeromonas* en tejidos, que podría ser utilizada en estudios forensicos post mortem, para determinar si la muerte había ocurrido por ahogamiento. El método permitió la detección de *Aeromonas* en pulmón, sangre y médula ósea de los 3 casos de ahogados estudiados, sin embargo no detectaron estas bacterias en los tejidos control provenientes de fallecidos por otras causas distintas al ahogamiento, lo que indicaba la utilidad del test (Huys et al., 2012).

**Tabla 7. Características de la bacteremia asociadas a *Aeromonas* en diferentes investigaciones (actualizado de Figueras y Beaz-Hidalgo, 2015).**

Referencia	País	Nº de pacientes	Edad (promedio)	Ratio H/M	Infección monomicrobiana (%)	Enfermedad de base (%)			Mortalidad (%)
						Neoplasias malignas	Hepatobiliar	Diabetes mellitus	
Revisiones previas <sup>a</sup>		144	54	1,8	70	42	38	NE	31
Ko y col. (2000)	Taiwán	104	54	3,9	100 <sup>b</sup>	21	54	NE	32 <sup>c</sup>
Lau y cols. (2000)	Taiwán	42	62	2	64	33	50	NE	70
Campo y cols. (2001)	España	12 <sup>d</sup>	50	0,7	75	58	0	NE	25
Llopis y cols. (2004)	España	73 <sup>e</sup>	61	2,5	72	33	36	NE	36
Tsai y cols. (2006)	Taiwán	41	53	2	76	100 <sup>f</sup>	-	-	36/14 días
Lamy y cols. (2009)	Francia	20	72	1,2	70	40	35	10	35
Lay y cols. (2010)	Taiwán	216	60	2	71	40	49	30	32
Hochedez y cols. (2010)	Islas del caribe	37	55	2,4	62	27	32	11	27
Chuang y cols. (2011)	Taiwán	154	58	2,6	100	26	58	28	36
Kimura y cols. (2013)	Japón	36 <sup>g</sup>	63	2	55	58	36	25	19/30 días
Tang y cols. (2014)	Taiwán	91 <sup>h</sup>	64	2,4	71	44	40	29	23
Wu y cols. (2015)	Taiwán	146	60	1,5	100 <sup>b</sup>	42,5	51,6	23,5	15,2/14 días

H: hombre; M: mujer; NS: no especificado. <sup>a</sup>Valores promedio de un estudio previo realizado por Janda y Abbott (1996) evaluado en Figueras, 2005; <sup>b</sup>Estos estudios incluyeron sólo bacteremias monomicrobianas; <sup>c</sup>Peritonitis espontánea asociada con 50% de mortalidad y 67% con fascitis necrotizante; <sup>d</sup>6% de los casos ocurrieron entre julio y agosto; <sup>e</sup>72% de los casos ocurrió entre verano y otoño; <sup>f</sup>Enfermedades hematológicas fueron las más predominantes: leucemia mieloide aguda (37,8%), síndrome mielodisplásico (26,7%) y linfoma no Hodgkin (17,8%); <sup>g</sup>la mayoría de los casos entre agosto y septiembre, <sup>h</sup>30% de los casos permaneció en UCI y necesitó ventilación mecánica, 47,3% (43/90) fue clasificada como infección nosocomial y de este grupo, el 62,8% (27/43) tuvo cáncer activo vs el 27,1% (13/48) (P= 0,001) del grupo correspondiente a las infecciones adquiridas en la comunidad (48/90).

### 1.3.5.5. Peritonitis bacteriana espontánea (PBE) y empiema

La peritonitis bacteriana espontánea (PBE) es la infección del líquido ascítico (que se acumula en el abdomen de los pacientes con algunas enfermedades como la cirrosis) por una o más bacterias del líquido, sin que exista infección de órgano intraabdominal alguno, de ahí el nombre de espontánea o también primaria (Moreira y López-San Román, 2009).

Las *Aeromonas* ha sido asociada a PBE, que es una complicación que ocurre en el 15% de los pacientes con cirrosis (Figueras, 2005). Un estudio realizado con pacientes cirróticos en España por Llopis y cols. (2004), se mostró que el porcentaje de peritonitis debida a *Aeromonas* (20%) fue mayor que la provocada por *E. coli* (7%) y *Pseudomonas aeruginosa* (1,9%). En un estudio realizado en Korea por Choi y cols. (2008), se comparó la PBE producida por *Aeromonas* con la producida por otras bacterias y se encontró que la gran mayoría de las producidas por *Aeromonas* ocurrían principalmente en los meses de verano (julio-septiembre) (63% vs 25%), y que además presentaban un mayor número de episodios de diarrea (26% vs 6%).

Los porcentajes de mortalidad asociado a la PBE por *Aeromonas* varían según el estudio, fluctuando entre 20% y 56% (Figueras, 2005; Ko y cols., 2000; Choi y cols., 2008; Wu y cols., 2009; Lin y cols., 2013; Figueras y Beaz-Hidalgo, 2015). Por otra parte, peritonitis es la principal causa de morbilidad en pacientes sometidos a diálisis peritoneal (Sahin y cols., 2010; Liakopoulos y cols., 2011; Puthuchearry y cols., 2012), siendo la ceftazidima el tratamiento recomendado.

A diferencia a la PBE que es una complicación relativamente común en pacientes cirróticos, el empiema bacteriano espontáneo (EBE) es mas raro (Figueras, 2005; Chao y cols., 2012b; Figueras y Beaz-Hidalgo, 2015). Recientemente, Chao y cols. (2012b) describieron seis casos de EBE que ocurrieron en pacientes con enfermedades de base, cinco de los cuales padecían cirrosis y uno diabetes.

### 1.3.5.6. Infecciones del tracto urinario

Si bien la infección del tracto urinario debido a *Aeromonas* son raras, existen casos bien documentados (Tabla 5), en los cuales esta bacteria ha sido identificada como el agente causal (Hua y cols., 2004; Llopis y cols., 2004; Ojeda-Vargas y cols.,

2005; Tena y cols., 2007; Mandal y cols., 2010; Figueras y Beaz-Hidalgo, 2015). Al-Benwan y cols. (2007) describieron un caso de cistitis en un paciente varón de 39 años, producida por *A. caviae*. En este mismo trabajo, casos previos de infección urinaria fueron evaluados y todos compartían el hecho de que afectaban a pacientes con enfermedades de base, tales como espina bífida, un recién nacido con dilatación renal bilateral y un paciente con diabetes mellitus.

En un estudio realizado en Taiwán por Chao y cols. (2012a) se revisaron 19 casos de infección del tracto genitourinario y encontraron que más de la mitad de los pacientes eran > 65 años de edad y que en el 57,9% de los casos eran mujeres. Sólo 15,8% (3/19) de los casos fueron nosocomiales y el 47,4% de los pacientes presentaban patología de base (cáncer, cirrosis y diabetes).



## **2. INTERÉS Y OBJETIVOS**





Las bacterias del género *Aeromonas* son consideradas autóctonas del medio acuático y han sido aisladas de ríos, lagos, agua de mar, agua potable y aguas residuales tratadas y no tratadas. Además, *Aeromonas* se encuentra ampliamente distribuida en el ambiente, pudiendo recuperarse en animales, principalmente peces (sanos o enfermos), siendo capaces de producir grandes epidemias en piscifactorias y en consecuencia son responsables de producir grandes pérdidas económicas en acuicultura. La especie considerada como la responsable principal de generar estas epidemias es *A. salmonicida* habiéndose diseñado numerosos métodos moleculares para su identificación entre los que se incluyen una PCR para la detección de los genes *fstA* (codifica para el receptor de sideróforo férrico) y *gyrB* (codifica para la subunidad  $\beta$  de la ADN girasa). Sin embargo recientemente se han descrito otras especies como *A. piscícola* que son genéticamente muy semejantes a *A. salmonicida* ya otras especies cercanas a ésta como son *A. bestiarum* que podrían quizás interferir en la detección específica de *A. salmonicida* basada en el gen *fstA* y que deberían reevaluarse utilizando las especies mencionadas como posibles interferentes.

Las *Aeromonas* también se encuentran asociadas a huevos de mosquitos y a diferentes tipos de alimentos (mariscos, pescados, vegetales y productos cárnicos) y cada vez son más aisladas desde muestras clínicas de origen humano, donde se las reconocen como patógeno emergentes, siendo capaces de afectar tanto a individuos inmunocompetentes como inmunocomprometidos, en los que produce infecciones intestinales y extraintestinales. Sin embargo faltan datos fiables sobre la importancia de las distintas especies utilizando métodos de identificación molecular y sobre las características epidemiológicas de los pacientes.

Actualmente el agua es un recurso costoso y cada vez más escaso, por esta razón se han desarrollado diferentes métodos de tratamiento de aguas residuales, que permiten su reutilización, generando la que se denomina agua regenerada o reciclada. Esta agua regenerada es destinada principalmente al riego de frutas y hortalizas. Además gran parte de las aguas residuales no tratadas son vertidas en ríos y estuarios, en los que muchas veces se cultivan de forma intensiva tanto peces como moluscos bivalvos. Existen varios estudios que han detectado altas concentraciones de *Aeromonas* tanto en

aguas residuales tratadas y no tratadas, y que consideran que esta es la posible vía de diseminación de estos microorganismos a diversos tipos de alimentos, como por ejemplo verduras, peces y mariscos, destinados al consumo humano. Debido a que algunos de estos son consumidos principalmente crudos o escasamente cocidos, la presencia de estas bacterias, potencialmente patógenas, podría tener impacto en la salud pública, lo que hace necesario la rápida y correcta detección e identificación de esta bacteria.

Es bien sabido que tanto la detección y aislamiento como la correcta identificación a nivel de especies son procesos complejos en el género *Aeromonas*. A pesar de que se han descrito una gran cantidad de medios de cultivos para la detección de *Aeromonas*, estos no se han ensayado comparativamente para determinar su especificidad en matrices complejas como el agua residual y los alimentos. Además, los métodos de identificación fenotípicos clásicos, así como la utilización de sistemas comerciales miniaturizados y/o semiautomáticos (API 20E, VITEK, BBL Crystal, MicroScan) identifican erróneamente tanto a nivel de género como a nivel de especie, lo que ha generado una continua confusión con el género *Vibrio* y la sobrevaloración de la especie *A. hydrophila* tanto en muestras clínicas como en ambientales.

Teniendo en cuenta todas estas problemáticas, se hace necesario no sólo evaluar diferentes medios de cultivo, sino también que condiciones (cultivo directo vs cultivo tras un enriquecido) son las óptimas no sólo para favorecer la detección de este microorganismo, sino que también para conocer la diversidad real de sus especies en las diferentes matrices analizadas. Las técnicas moleculares son más rápidas y fiables que los métodos fenotípicos y han sido empleadas en la identificación de las colonias obtenidas tras el cultivo a nivel de género, mediante la detección por PCR del gen que codifica la Glicerofosfolípido Colesterol Acetil Transferasa (GCAT) que es específico para *Aeromonas*. Sin embargo este método no se ha ensayado todavía para la detección directa de *Aeromonas* en las muestras de agua. Este método es mucho más rápido que el cultivo y podría tener una gran utilidad en Salud Pública para el análisis rápido de *Aeromonas*. Tal y como hemos indicado la identificación fenotípica de la especie que es la que se ha utilizado mayoritariamente en la literatura ha generado una gran confusión sobre la importancia relativa de las diferentes especies del género. En este sentido cabe destacar que la utilización de las secuencias de los genes *housekeeping*,

además de identificar correctamente las especies descritas en este género, permiten el reconocimiento de potenciales nuevas especies. Por esta razón, la secuenciación del gen *rpoD*, será la estrategia de identificación que se utilizará en la presente tesis.

La identificación de *Aeromonas* en muestras clínicas mediante la utilización de métodos fenotípicos ha tendido a desvirtuar la prevalencia de especies, sin embargo tal y como hemos indicado en la introducción, hoy en día gracias a la utilización de métodos moleculares sabemos que las especies predominantes corresponden a *A. dhakensis*, *A. caviae*, *A. veronii* and *A. hydrophila*. Por esta razón es importante aplicar estos métodos en la validación de nuevas tecnologías de identificación, como es el caso del MALDI-TOF introducido como método de rutina en los laboratorios clínicos en muchos hospitales, para la identificación de los microorganismos de crecimiento lento o aquellos que son difíciles de identificar usando los métodos clásicos, como es el caso de *Aeromonas*. Otro aspecto importante es el análisis de las características epidemiológicas de los pacientes afectados por *Aeromonas* ya que conocernos nos puede permitir establecer si existe alguna tendencia específica, en cuanto a la edad, sexo y las especies asociadas.

Con la finalidad de contribuir a solucionar los problemas mencionados, los objetivos generales de este trabajo son:

- 1) Evaluar distintos métodos de detección, recuperación e identificación de *Aeromonas* a partir de muestras de aguas regeneradas, peces, mariscos y muestras clínicas para determinar cuáles pueden ser los más efectivos.
- 2) Estudiar la diversidad de especies de *Aeromonas* en aguas regeneradas, mariscos y vegetales para determinar la posible presencia de especies patógenas y las posibles vías de transmisión.
- 3) Establecer la identidad y las características de las cepas de *Aeromonas* aisladas de peces (truchas enfermas y carpas congeladas), de un cetáceo enfermo, así como de las cepas aisladas de pacientes procedentes de diversos hospitales.

- 4) Determinar en base a un estudio polifásico si las cepas que aparentemente corresponden a potenciales líneas filogenéticas en base al gen *rpoD* son efectivamente nuevas especies de *Aeromonas*.

### **3. MATERIALES Y MÉTODOS**



### **3.1. Muestras analizadas y cepas utilizadas**

#### **3.1.1 Cepas tipo y de referencia**

En el presente estudio se utilizaron las cepas tipo de las 27 especies descritas a la fecha de realización de este trabajo de investigación, además de la cepa tipo de la especie "*A. lusitana*" que se encuentra en proceso de descripción. También se utilizaron cepas de referencia pertenecientes a nuestra colección así como las procedentes de otras colecciones de cultivo, que incluyeron cepas pertenecientes al género *Aeromonas* y a otros géneros bacterianos, como se muestra en el Anexo 1.

#### **3.1.2. Cepas clínicas**

Las 429 cepas clínicas analizadas en los estudios 4.3.5, 4.3.6 y 4.3.7, descritas en los Anexos 2A y 2B, fueron facilitadas por los siguientes hospitales: Hospital Universitario de Nagasaki (Japón, n=7), Hospital Universitario Miguel de Servet de Zaragoza (n=117), Hospital Universitario de Guadalajara (n=128), Hospital Universitario Joan XXIII de Tarragona (n= 102) y Hospital Universatio Sant Joan de Reus (n=75).

#### **3.1.3. Muestras de agua**

La muestras de agua regenerada fueron recolectadas en la EDAR de Castell d' Aro, Girona (post tratamiento secundario, post tratamiento terciario y agua de riego) y a la salida de la EDAR de Reus al entrar al proceso de lagunaje de la Comunidad de Regants del Molinet (el agua de entrada que proviene de un tratamiento secundario y post tratamiento terciario que corresponde con la salida del lagunaje). Así mismo se estudiaron muestras procedentes del canal de Poble Nou y bahía de Alfacs, ambos en la zona del Delta del Ebro, que reciben aguas residuales no tratadas. También se analizaron muestras de agua procedentes de los ríos Ter, Cardener y Llobregat.

Estas muestras fueron colectadas en botellas de polipropileno estériles de 2 L, transportadas en frío al laboratorio en donde fueron procesadas dentro del mismo día del muestreo.



Para el estudio de diversidad de *Aeromonas* en aguas regeneradas (4.2.2) se analizaron un total de 20 muestras, 10 de entrada del lagunaje (EL), procedentes de un tratamiento secundario de la EDAR de Reus y 10 de salida del lagunaje (SL), utilizada para el riego de hortalizas.

El procedimiento detallado a continuación es el aplicado en los estudios 4.1.3, 4.2.1 y 4.2.2. De cada muestra de agua, 100 µl fueron sembrados directamente (sin enriquecer) en tres medios de cultivo: agar dextrina ampicilina (ADA, HiMedia, India), agar almidón ampicilina (SAA, Palumbo y cols., 1985) y agar bilis irgasán verde brillante modificado (BIBG-m, Neyts y cols., 2000) e incubadas a 30°C por 24 horas.. Paralelamente se realizó el cultivo enriquecido (10 ml de muestra) usando 90 ml de agua de peptona alcalina (pH= 8,7) suplementada con ampicilina (10mg/l), que se incubó a 30°C por 24 horas. Finalizado este paso de enriquecimiento, 100 µl de cada muestra fue inoculado en los mismos tres medios de cultivo e incubados bajo las condiciones descritas previamente. Las colonias que presentaron morfología típica de *Aeromonas* fueron repicadas en TSA e incubadas bajo las mismas condiciones mencionadas anteriormente para obtener cultivos puros. Posteriormente se realizó la extracción de ADN empleando el kit Instagene™ Matrix (Biorad, Francia) y todos los aislados fueron identificados a nivel de género mediante la detección de la GCAT-PCR, que es específica para el género *Aeromonas*. Los aislados fueron genotipados mediante ERIC-PCR y la identificación a nivel de especie se realizó a través de la secuenciación del gen *rpoD*. En paralelo se realizó la cuantificación de *Aeromonas* mediante el método del NMP.

Además, en el estudio 4.2.2 se observó que *Aeromonas* es capaz de resistir el tratamiento de lagunaje. Para comprender mejor este fenómeno, se realizó un estudio de recrecimiento. En este, dos tipos de agua, que diferían en la concentración de materia orgánica, fueron utilizadas. Una pobre en nutrientes, como es el agua mineral y la otra rica en nutrientes, como es el caso del agua regenerada. Para esta última, se utilizaron muestras colectadas en dos sitios diferentes, una procedente de un tratamiento secundario de la EDAR de Reus, denominada entrada de lagunaje (EL) y la otra correspondiente al agua generada después del tratamiento de lagunaje, llamada salida de lagunaje (SL). El agua mineral fue directamente inoculada con las cepas de *Aeromonas*, mientras que el agua regenerada fue previamente esterilizada mediante filtración

empleando botellas estériles de 500 ml con filtros de 0,22  $\mu\text{m}$  (Corning Incorporated, EEUU). Para cada tipo de muestra, tres botellas (A, B y C) que contenían un volumen final de 100 ml fueron utilizadas. Las dos cepas de *Aeromonas* empleadas en este estudio fueron aisladas a partir de agua regenerada. Una de ellas, *Aeromonas caviae* SELE10-16B fue recuperada de la entrada de lagunaje, mientras que *Aeromonas veronii* SSL7-15 fue aislada de la salida del lagunaje. Ambas cepas fueron previamente identificadas mediante secuenciación del gen *rpoD*. La concentración bacteriana inicial inoculada a cada botella fue de  $3,3 \times 10^8$  ufc/ml para *A. caviae* SELE10-16B y  $4,4 \times 10^8$  ufc/ml para *A. veronii* SSL7-15. Las botellas fueron incubadas a dos temperaturas, 20°C y 35°C por 35 días. La cuantificación de *Aeromonas* (en los días 0, 1, 3, 6, 10, 14, 21, 28 y 35) fue realizada por triplicado mediante recuento directo en placa, usando medio ADA. Las placas fueron incubadas a 30°C por 24 horas. Los resultados fueron expresados como el promedio de cada muestra.

Además, 400  $\mu\text{l}$  de cada muestra enriquecida y sin enriquecer fueron utilizados para la extracción de ADN y detección molecular directa de *Aeromonas* mediante GCAT-PCR usando los cebadores y condiciones descritas en el estudio 4.1.2.

Las cepas aisladas a partir de las muestras de agua analizadas en estos trabajos son enumeradas en el Anexo 3.

### **3.1.4. Muestras de mariscos y vegetales**

En el estudio de los moluscos bivalvos (4.2.3) se analizó un total de 11 muestras de mariscos correspondientes a una muestra de almeja y cinco muestras de mejillones y cinco muestras de ostrones. Estos fueron cultivados en la bahía de Alfacs y en el canal del Poble Nou, ambos ubicados en el Delta del río Ebro, donde son vertidas aguas residuales no tratadas. Además, tres muestras de vegetales (lechuga, tomate y perejil), regados con aguas regeneradas procedentes de la EDAR Castell d' Aro (Girona) fueron analizados en el estudio 4.2.1.

De cada muestra de alimento, 10gr fueron homogeneizados usando 90 ml de agua alcalina tamponada (pH=7,2) y 100  $\mu\text{l}$  de estos fueron directamente sembrados en ADA, SAA y BIBG-m e incubados a 30°C por 24 horas. En paralelo se realizó el cultivo enriquecido (1:10 gr/ml) empleando las mismas condiciones descritas para las

muestras de agua. Las cepas obtenidas del análisis de estas muestras son presentadas en el Anexo 4.

### **3.1.5. Conservación de las cepas**

Tanto las cepas aisladas en este trabajo como las enviadas desde diferentes instituciones fueron mantenidas a largo plazo mediante ultra congelación, en donde las cepas fueron inoculadas en viales que contenían caldo tripticasa de soya (TSB, Difco) con un 15% de glicerol. Los viales fueron congelados a -80°C.

## **3.2. Cultivo e identificación**

Todas las muestras analizadas en este estudio fueron sembradas de forma directa (sin enriquecer) y enriquecida inoculando 100 µl de estas en tres medios de cultivo: ADA, SAA y BIBG-m e incubados a 30°C por 24 horas en aerobiosis. Finalizado este paso de incubación, 8 colonias que presentaban la morfología típica de *Aeromonas* fueron repicadas en agar tripticasa de soya (TSA, Difco) e incubadas bajo idénticas condiciones con la finalidad de obtener cultivos puros y comenzar con la identificación de los aislados.

### **3.2.1. Extracción de ADN y caracterización molecular de los aislados**

La extracción de ADN se realizó a partir de una única colonia obtenida desde el TSA. Esta fue resuspendida en 1 ml de agua milliQ estéril y centrifugada 3 minutos a 13.000 RPM. Luego, el sobrenadante fue eliminado y la extracción de ADN a partir del sedimento fue llevada a cabo empleando el InstaGene™ DNA purification matrix (BioRad, Francia) siguiendo las instrucciones del fabricante.

#### **3.2.1.1. Identificación a nivel de género**

Cada aislado fue identificado como perteneciente al género *Aeromonas* mediante la detección del gen de la *gcat*, que codifica un glicerofosfolípido colesterol acil transferasa específico de este género, utilizando los cebadores y condiciones descritas por Soler y cols., 2002 (Tabla 8). Los productos de la PCR (237 pb) fueron verificados mediante electroforesis de geles de agarosa al 1%. Los geles fueron teñidos usando RedSafe™ nucleic acid staining solution (iNtRON biotechnology) y visualizados empleando un trans iluminador (Molecular Imager® Gel Doc™ XRTwith Image

Lab™Software, BioRad). El marcador de peso molecular usado como referencia fue el 100bp DNA ladder (Invitrogen, EEUU). Esta PCR fue utilizada en los estudios 4.1.3, 4.2.1, 4.2.2, 4.2.3 y 4.3.4 y además se realizó una adaptación de la misma para la detección directa de *Aeromonas* en muestras de agua, tal como se explica en el estudio 4.1.2.

### 3.2.1.2. Genotipado

Todos los aislados identificados como *Aeromonas* fueron genotipados mediante la técnica de ERIC-PCR, empleando los cebadores ERIC 1R y ERIC 2 (Tabla8) descritos por Versalovic y cols. (1991) y de acuerdo a las condiciones descritas por Houf y cols. (2002) en los estudios 4.1.3, 4.2.1, 4.2.2, 4.2.3, 4.3.1, 4.3.2, 4.3.4, 4.4.1 y 4.4.2. Los amplicones de diferentes tamaños generados durante la amplificación del ADN fueron separados usando geles de agarosa al 2%. Tanto la tinción del gel como la visualización de las bandas se realizó de la misma forma descrita anteriormente. Los patrones con al menos una banda de diferencia fueron considerados como genotipos diferentes.

**Tabla 8. Cebadores utilizados para la amplificación del gen *gcat* y ERIC-PCR.**

Método	Cebadores	Secuencia 5' - 3'	Diana	Referencia
GCAT-PCR	GCAT-1	CTCCTGGAATCCCAAGTATCAG	<i>gcat</i>	Soler y cols., 2002
	GCAT-2	GGCAGGTTGAACAGCAGTATCT		
ERIC-PCR	ERIC 1R	ATGTAAGCTCCTGGGGATTAC	genoma	Versalovic y cols., 1991
	ERIC 2	AAGTAAGTGACTGGGGTGAGCG		

### 3.2.1.3. Identificación a nivel de especie

Todas las cepas analizadas durante esta tesis doctoral (estudios 4.1.3, 4.2.1, 4.2.2, 4.2.3, 4.3.1, 4.3.2, 4.3.3, 4.3.4, 4.3.5, 4.3.6, 4.3.7, 4.4.1 y 4.4.2) fueron identificadas a nivel de especie mediante la secuenciación del gen *rpoD*, utilizando los primers (Tabla 9) y condiciones descritos por Soler y cols. (2004).

## 3.3. Caracterización fenotípica y molecular de las especies nuevas.

Después de realizar la identificación a nivel de especie mediante secuenciación del gen *rpoD* de varias cepas de *Aeromonas*, descritas en los estudios 4.4.1 y 4.4.2 y

sospechar que pertenecían a nuevas líneas filogenéticas, se realizó un estudio polifásico que comprendía tanto la caracterización fenotípica, fisiológica y genética de las mismas, como se describe a continuación.

### **Tinción de Gram:**

Todas las cepas fueron visualizadas con esta tinción para determinar su morfología, características tintoriales y agrupación.

Tanto el tamaño celular como la presencia de flagelo fueron determinadas mediante microscopía electrónica de transmisión de acuerdo a lo descrito por Collado y cols. (2009).

### **Motilidad:**

La motilidad de las bacterias fue observada a partir de cultivos de 24 horas mediante una preparación directa o en fresco con agua destilada y/o suero fisiológico empleando microscopía de contraste de fase.

### **Caracterización bioquímica y fisiológica**

Un completo estudio del metabolismo de estos microorganismos fue realizado en nuestro laboratorio, mediante la determinación de su capacidad para utilizar diferentes compuestos como fuente de carbono, de fermentar y asimilar carbohidratos, utilización de aminoácidos, producción de pigmento y crecimiento en diferentes medios de cultivo y bajo diversas condiciones (temperatura, pH y salinidad), tal como fue descrito por Alperi y cols. (2010) y Martínez-Murcia y cols. (2013). Todas las pruebas fueron realizadas por triplicado y utilizando tanto controles positivos como negativos. Adicionalmente, el kit comercial API 50CH (Biomérieux) que permite determinar la producción de ácido a partir de 50 carbohidratos fue utilizado siguiendo las instrucciones del fabricante.

Todas las pruebas se incubaron a 30°C en el caso de las cepas de origen ambiental, animal y de alimento y adicionalmente a 37°C en el caso de las cepas de origen clínico. La lectura de las diferentes pruebas fue valorada cada 24 horas hasta los 7 días de incubación.

### 3.3.1. Caracterización molecular

#### 3.3.1.1. Secuenciación del gen ARNr del 16S y MLPA

Tanto el gen ARNr del 16S y los siete genes (*rpoD*, *gyrB*, *gyrA*, *recA*, *danI*, *dnaX* y *atpD*) housekeeping (Tabla 9) que se utilizan para la construcción del multilocus fueron amplificados por separado, utilizando los primers y condiciones descritas por Martínez-Murcia y cols., 1992, Soler y cols., 2004 y Matínez-Murcia y cols., 2011).

La secuenciación de estos genes fue realizada usando los servicios de MacroGen Europe (Holanda) siguiendo las indicaciones de esta compañía.

Las secuencias fueron ensambladas empleando el software Seqman (DNASTAR Lasergene, USA). Las secuencias fueron alineadas con el software Clustal W (Thompson y cols., 1994). La distancia genética fue calculada usando el modelo de Kimura 2-parámetros (Kimuram 1980) y el árbol filogenético fue construido utilizando el método de neighbour joining (Saitou y Nei, 1987) con el programa MEGA5 (Tamura y cols., 2011). La estabilidad del análisis se evaluó con el test de bootstrap con 1000 repeticiones (Felsenstein, 1985).

#### 3.3.1.2. Secuenciación del genoma completo (WGS)

Para realizar la secuenciación del genoma completo de las cepas, es necesario extraer grandes cantidades de ADN. Este paso se realizó mediante la utilización del KIT Easy-DNA™ (Box1 y Box2, Invitrogen). El ADN extraído fue enviado a Estados Unidos, al Dr. Mark Liles, del departamento de Ciencias Biológicas de la Universidad de Auburn, Alabama, en donde fue llevado a cabo la secuenciación de los genomas mediante utilizando un equipo Illumina MiSeq (Hossain et al., 2014b).

#### 3.3.1.3. Identidad Nucleotídica Media (ANI)

Para determinar los valores de ANI entre las potenciales nuevas especies y las cepas tipo de las especies de *Aeromonas* estrechamente relacionadas, en base a la filogenia del gen ARNr del 16S y al MLPA, los genomas de estas últimas fueron descargados del GenBank. Este índice se calculó a través de tres plataformas: el ANI calculator (<http://enve-omics.ce.gatech.edu/ani/index>), el EzGenome (<http://www.ezbiocloud.net/ezgenome/ani>) y el JSpecies software

(<http://www.imedea.uib.es/jspecies>). El punto de cohorte establecido para la definición de nuevas líneas filogenéticas es < 96% (Colston y cols., 2014).

**Tabla 9. Cebadores usados para la amplificación y secuenciación del gen ARNr del 16S y otros genes housekeeping.**

Método	Cebadores	Secuencia 5' - 3'	Diana	Referencia
ARNr	Anti 1	AGA GTT TGA TCA TGG CTC AG	ARNr	Martínez-Murcia y cols., 1992
16S	S	GGT TAC CTT GTT ACG ACT T	16S	
	rpoD-F	ACG ACT GAC CCG GTA CGC ATG TAY ATG MGN GAR		
<i>rpoD</i>		ATG GGN ACN GT	<i>rpoD</i>	Soler y cols., 2004
	rpoD-R	ATA GAA ATA ACC AGA CGT AAG TTN GCY TCN ACC		
		ATY TCY TTY TT		
<i>gyrB</i>	gyrB-3F	TCC GGC GGT CTG CAC GGC GT	<i>gyrB</i>	Yañez y cols., 2003
	gyrB-14R	TTG TCC GGG TTG TAC TCG TC		
<i>gyrA</i>	gyrA-2F	ATGAGCGATATGGCCAGAGA	<i>gyrA</i>	Martínez-Murcia y cols., 2011
	gyrA-9R	CGCGCCTTGTTACCTGATA		
<i>recA</i>	recA-F	GCTGGGTCAGATTGAAAAGC	<i>recA</i>	Martínez-Murcia y cols., 2011
	recA-R	CTCGCCGTTATAGCTGTACC		
<i>dnaJ</i>	dnaJ-F	CGAGATCAAGAAGGCGTACAAG	<i>dnaJ</i>	Nhung y cols., 2007
	dnaJ-R	CACCACCTTGACATCAGATC		
<i>dnaX</i>	dnaX-1F	CCATACGTTTGAACAAGTGG	<i>dnaX</i>	Martínez-Murcia y cols., 2011
	Dnax-11R	AAGGCSAGCATSCGACG		
<i>atpD</i>	atpD-0F	CGGCATCAAGTTATCGACCT	<i>atpD</i>	Martínez-Murcia y cols., 2011
	atpD-7R	ACCAGCGGATCCAGCTGACG		

#### 3.3.1.4. Hibridación ADN-ADN *in silico* (DDH *is*)

La estimación de la DDH<sub>is</sub> se realizó mediante el programa Genome to Genome Distance Calculator (GGDC). Los genomas parciales fueron descargados desde el sitio web GGDC 2.0 ([HTTP://ggd-c.dsmz.de/distcalc2.php](http://ggd-c.dsmz.de/distcalc2.php)) y la fórmula 2 fue aplicada, tal como se recomienda para el cálculo de DDH<sub>is</sub> cuando se utilizan genomas incompletos (Auch y cols., 2010a, b; Meier-Kotloff y cols., 2013). Al igual que cuando se realiza la DDH de forma experimental, valores < 70% corresponden al punto de cohorte para la definición de nuevos taxones.

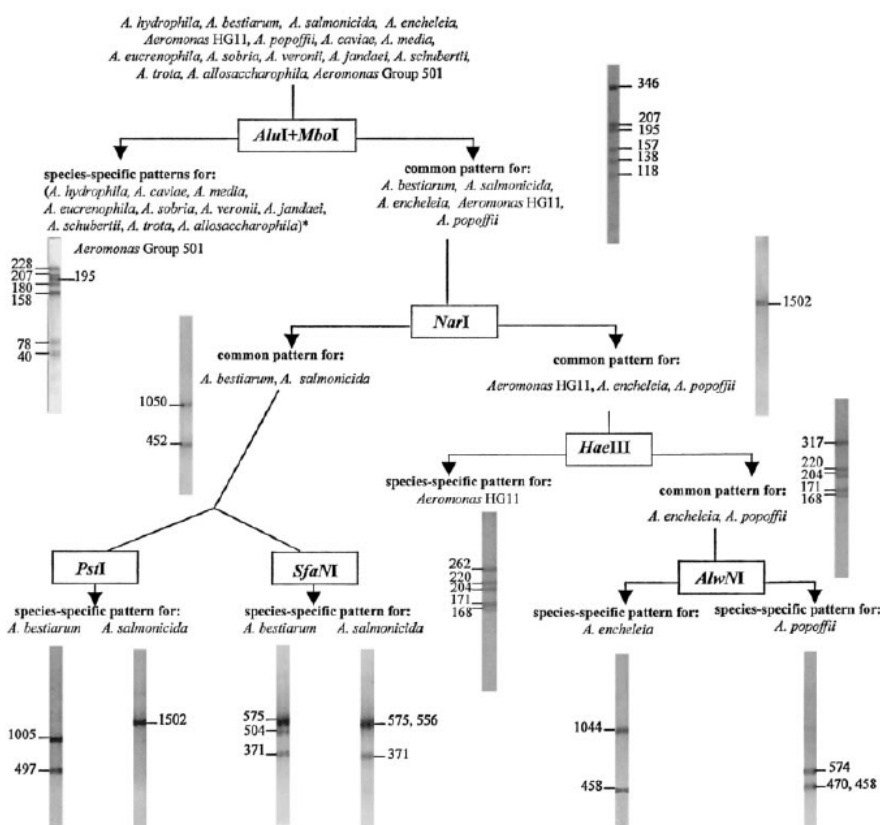
### 3.4. Otros métodos de identificación de *Aeromonas* spp. utilizados en esta tesis doctoral.

#### 3.4.1. Polimorfismo de Longitud de los Fragmentos de Restricción (RFLP) del gen ARN ribosómico 16S (RFLP-ADNr 16S).

Este método fue uno de los utilizados en la identificación de la cepa 367A aislada de mejillón (4.3.4). Para la amplificación del gen ARNr del 16S (1503 pb) se

utilizaron los cebadores y condiciones descritos por Martínez-Murcia y cols. (1992a) que aparecen en la Tabla 9. La digestión del producto de amplificación se realizó con las endonucleasas *AluI* y *MboI* de acuerdo al método desarrollado por Borrell y cols. (1997) y posteriormente ampliado por Figueras y cols. (2000), tal como se muestra en la Figura 2.

**Figura 2. Patrones de RFLP del ADNr 16S obtenidos siguiendo los protocolos establecidos por Borrell y cols. (1997) y Figueras y cols. (2000).**



### 3.4.2. MALDI-TOF

Las cepas de origen clínico utilizadas en el estudio 4.3.7 y procedentes de 2 hospitales: Hospital Universitario Miguel Servet (Zaragoza, n=117) y Hospital Universitario de Guadalajara (n=62), enviadas por los Drs. Antonio Rezusta y Daniel Tena respectivamente, fueron identificadas inicialmente mediante el método de MALDI-TOF.

Para esto, se necesitan cultivos frescos (24 horas) en TSA. De cada cultivo se tomaron tres colonias, y cada una fue puesta directamente sobre los pocillos de una



placa de aluminio y secadas al aire (temperatura ambiente). Posteriormente, 1µl de solución matriz (solución saturadas de ácido cianohidroxicinámico en solución acuosa de acetonitrilo al 50% que contiene 2.5% de ácido trifluoroacético) fue adicionada a cada muestra, permitiendo el secado de estas. La espectrometría fue realizada en el MALDI-TOF Ultraflex TOF/TOF, que detecta proteínas entre los 2 - 20 kDa. Un analito estándar fue utilizado (*Escherichia coli* DH5; Bruker, Alemania) como calibrador externo para proteínas. El resultado final fue expresado para las diferentes especies de *Aeromonas* como el promedio de tres valores de masa, con una desviación estándar de  $\pm 5$ Da y una intensidad relativa  $\geq 10\%$ , de acuerdo al criterio descrito por Donohue y cols., 2006, pero considerando los peaks  $> 3$ kDa. Los software utilizados para la comparación de los espectros generados con los almacenados en la base de datos y de esta forma identificar cada cepa fueron el Biotyper 3.0 y Biotyper 3.1 (Bruker, daltonics, Bremen, Alemania) en el Hospital Miguel Servet y Hospital de Guadalajara respectivamente. Esta comparación se traduce en una puntuación (score) acompañada de un color y dependiendo de esta, la identificación puede ser fiable a nivel de género o a nivel de especie, tal como se detalla en la Tabla 10.

**Tabla 10. Interpretación de la identificación realizada mediante MALDI-TOF.**

Puntuación	Identificación	Símbolo	Color
2,300 - 3,000	<b>Altamente probable a nivel de especie</b>	(+++)	Verde
2,000 - 2,299	<b>Seguro a nivel de género, probable a nivel de especie</b>	(++)	Verde
1,700 - 1,999	<b>Probable a nivel de género</b>	(+)	Amarillo
0,000 - 1,699	<b>No confiable</b>	(-)	Rojo

Posteriormente y en nuestro laboratorio, todas las cepas fueron resembradas en TSA e incubadas a 30°C por 24 horas. A partir de una colonia se realizó la extracción del ADN empleando el kit Instagene™ Matrix (Biorad, Francia) siguiendo las instrucciones del fabricante. Las cepas fueron reidentificadas mediante secuenciación del gen *rpoD* (Soler y cols., 2004).

### **3.5. Sensibilidad a agentes antimicrobianos y detección de genes que codifican para $\beta$ -lactamas e integrones clase 1**

La sensibilidad a diferentes agentes antimicrobianos fue probada en los estudios 4.3.3, 4.3.4 y 4.4. El método utilizado fue el de disco difusión, de acuerdo a lo

estipulado en el formulario M45-A2 de la CLSI (2010) específico para el género *Aeromonas*. Dependiendo del grado de sensibilidad que tuvo cada cepa frente a un antibiótico, estas fueron clasificadas como sensibles (S), intermedia (I) o resistente (R).

La detección de genes que codifican para  $\beta$ -lactamasa (*bla*<sub>TEM</sub>, *bla*<sub>SHV</sub>, *bla*<sub>IMP</sub>, *bla*<sub>CphA/IMIS</sub>) e integrones clase 1 (*intl1*) fue realizada mediante PCR utilizando los cebadores y condiciones descritas por Nüesch-Inderbinen y col. (1996), Navarro y cols. (2001), Migliavacca y cols. (2002) y Henriques y cols. (2006). Estos genes fueron detectados en el estudio 4.3.1 y los cebadores utilizados son descritos en la Tabla 11.

**Tabla 11. Cebadores utilizados para la detección de genes que codifican  $\beta$ -lactamasas.**

Método	Cebadores	Secuencia 5' - 3'	Diana	Referencia
<i>intl1</i>	INTL1_F	CCTCCCGCACGATGATC	<i>intl1</i>	Kraft y cols., 1986
	INTL1_R	TCCACGCATCGTCAGGC		
<i>bla</i> <sub>TEM</sub>	TEM_F	AAAGATGCTGAAGATCA	<i>bla</i> <sub>TEM</sub>	Speldooren y cols., 1998
	TEM_R	TTTGGTATGGCTTCATTC		
<i>bla</i> <sub>IMP</sub>	IMP-DIA/f	GGAATAGAAGTGGCTTAATTCTC	<i>bla</i> <sub>IMP</sub>	Migliavacca y cols., 2002
	IMP-DIA/r	GTGATGCGTCYCCAAYTTCAC		
<i>bla</i> <sub>SHV</sub>	SHV_F	GCGAAAGCCAGCTGTCGGGC	<i>bla</i> <sub>SHV</sub>	Henriques y cols., 2006
	SHV_R	GATTGGCGGCGCTGTTATGCG		
<i>bla</i> <sub>CphA/IMIS</sub>	AER_F	GCCTTGATCAGCGTTCGTAGTG	<i>bla</i> <sub>CphA/IMIS</sub>	Henriques y cols., 2006
	AER_R	GCGGGGATGTCGCTGACGCAG		

### 3.6. Detección de genes de virulencia

La detección de 13 genes de virulencia fue realizada mediante PCR en las cepas utilizadas en los estudios 4.3.3, 4.3.4 y 4.4.2. Los cebadores utilizados son enumerados en la Tabla 12.

### 3.7. Análisis estadístico

Los datos fueron analizados mediante los modelos two-way ANOVA, three-way ANOVA y Chi-cuadrado. Además se empleó el modelo de corrección de Bonferroni en el caso de las comparaciones múltiples. El nivel de significancia fue fijado como  $P < 0.05$ . Todos los análisis fueron realizados utilizando el programa SigmaPlot 11.0 (SSI, California, USA).

**Tabla 12. Cebadores utilizados para la detección de genes de virulencia.**

Método	Cebadores	Secuencia 5' - 3'	Diana	Referencia
<i>alt</i>	alt-F	AAAGCGTCTGACAGCGAAGT	<i>alt</i>	Chopra y cols., 1996
	alt-R	AGCGCATAGGCGTTCTCTT		
AHCYTOEN	AHCF1	GAGAAGGTGACCACCAAGAAC( A )	<i>act</i>	Kimgombe y cols., 1999
	AHCF2	AACTGACATCGGCCTTGAAC( C )		
Rasexos - <i>AexT</i>	RASEXOS-L	GGCGCTTGGGCTCTACAC	SSTT	Braun y cols., 2002
	RASEXOS-R	GAGCCCGCGCATCTTCAG		
<i>aer/hemo</i>	aer-F	CCTATGGCCTGAGCGAGAAG	<i>aer/hemo</i>	Soler y cols., 2002
	aer-R	CCAGTTCAGTCCCACCACT		
<i>stx1</i>	Stx1-a	TCTCAGTGGGCGTTCTTATG	<i>stx1</i>	Wang y cols., 2002
	Stx1-b	TACCCCTCAACTGCTAATA		
<i>lip</i>	lip-F	CA(C/T)CTGGT(T/G)CCGCTCAAG	<i>lip</i>	Chacón y cols., 2003
	lip-R	GT(A/G)CCGAACCAGTCGGAGAA		
<i>ser</i>	serine-F	CACCGAAGTATTGGGTCAGG	<i>ser</i>	Chacón y cols., 2003
	serine-R	GGCTCATGCGTAACTCTGGT		
<i>lafA</i>	Laf1	GGTC TGCGCATCCAACCTC	<i>lafA</i>	Merino y cols., 2003
	Laf2	GCTCCAGACGGTTGATG		
<i>stx2</i>	S2AUP	ATGAAGTGTATATTATTTA	<i>stx2</i>	Muniesa y cols., 2003
	S2ALP	TTCTTCATGCTTAACTCCT		
<i>asc-V</i>	ascV-F	ATGGACGGCGCCATGAAGTT	SSTT	Chacón y cols., 2004
	ascV-R	TATTCGCCTTCACCCATCCC		
<i>ascF-G</i>	ascF-G-F	ATGAGGTCATCTGCTCGCGC	SSTT	Chacón y cols., 2004
	ascF-G-R	GGAGCACAACCATGGCTGAT		
<i>ast</i>	ast-F	ATCGTCAGCGACAGCTCTT	<i>ast</i>	Aguilera -Arreola y cols., 2005
	ast-R	CTCATCCCTTGGCTTGTGT		
<i>aopP</i>	Aop-1	CATTGCTTCTTATGGAACCAG	SSTT	Fehr et al., 2006
	Aop-2	CGTTGAGATTGTGCATGTTT		

SSTT: sistema de secreción tipo 3.

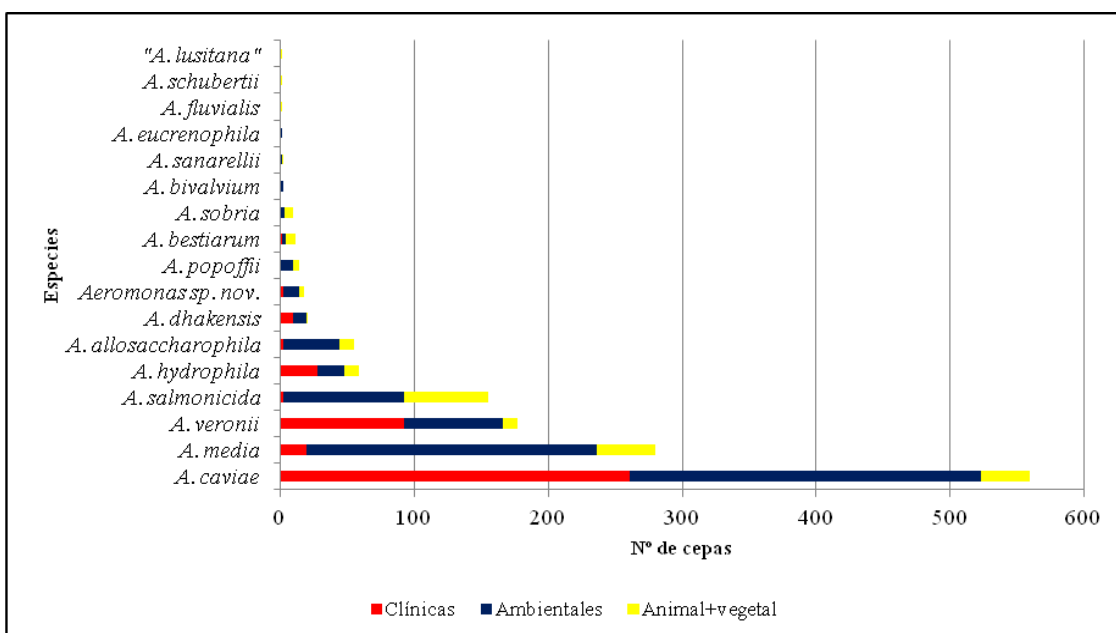
## **4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN**



En el presente trabajo de investigación se analizaron un total 1383 cepas. Sin embargo, cuando se realizó la identificación molecular mediante secuenciación del gen *rpoD*, se determinó que 18 (1,3%) de ellas no pertenecían al género *Aeromonas*. De estas 18 cepas, 13 pertenecieron a la familia de las enterobacterias y 5 al género *Shewanella*, siendo estas últimas re-identificadas mediante secuenciación de los genes RNAr del 16S y *gyrB* (estudio 4.3.2).

De las 1365 cepas (Figura 3) que si fueron identificadas como *Aeromonas*, 746 (54,7%) fueron de origen ambiental (muestras de agua regenerada), 203 (14,9%) fueron recuperadas de animales y vegetales y 416 (30,5%) de origen clínico. Estas cepas correspondieron a un total de 16 especies, además de nuevas líneas filogenéticas. Sin embargo, cuatro especies: *A. caviae* (41%), *A. media* (20,5%), *A. veronii* (13%) y *A. salmonicida* (11,4%) englobaron al 86% de la cepas. La distribución de especies por orígenes mostró que las más prevalentes en muestras clínicas fueron *A. caviae* (62,7%), *A. veronii* (22,1%) y *A. hydrophila* (6,7%), representando en conjunto el 91,5% de la cepas clínicas. En las muestras ambientales también *A. caviae* (35,1%) fue la especie más prevalente, seguida por *A. media* (29,1%), *A. salmonicida* (12,1%) y *A. veronii* (9,9%). En el caso de las muestras de origen animal y vegetal, las especies más recurrentes fueron *A. salmonicida* (31,0%), *A. media* (21,7%) y *A. caviae* (17,7%).

**Figura 3. Distribución por origen y especies de las cepas de *Aeromonas* identificadas en la presente tesis doctoral.**





## 4.1. Métodos de detección, recuperación e identificación de *Aeromonas*

**4.1.1. The improved PCR of the *fstA* (ferric siderophore receptor) gene differentiates the fish pathogen *Aeromonas salmonicida* from other *Aeromonas* species. Beaz-Hidalgo R, Latif-Eugenín F, Figueras MJ. *Vet. Microbiol.* (2013) 166:659-563.**

### Resumen

Bacterias del género *Aeromonas* son microorganismos autóctonos del medio acuático y varias especies son capaces de producir septicemia y la enfermedad hemorrágica ulcerativa en peces salvajes y de piscifactoría causando una alta mortalidad. La especie más patógena en peces es *Aeromonas salmonicida*, siendo responsable de brotes epidémicos de furunculosis en salmónidos, así como en otros peces cultivados como el rodaballo, la dorada, el halibut y el pez dorado. Nuevas especies como *Aeromonas aquariorum*, *Aeromonas tecta* y *Aeromonas piscicola* también han sido aisladas recientemente a partir de peces enfermos. Además se ha demostrado que la identificación fenotípica y genética en base a la secuenciación del gen 16S ARNr no permite diferenciar entre las especies *A. piscicola*, *A. bestiarum* y *A. salmonicida* asociadas a la patología de peces. El objetivo del presente estudio es reevaluar dos protocolos de PCR previamente descritos, basados en la detección de los genes *fstA* y *gyrB*, para la detección específica del patógeno *A. salmonicida* ensayando todas las cepas tipo del género *Aeromonas* así como varias cepas de las especies *A. piscicola* y *A. bestiarum*. A diferencia de resultados previamente publicados, se demostró que la PCR del gen *gyrB* no es específica para la detección de *A. salmonicida* ya que presenta una reacción cruzada con otras especies. Sin embargo, corroborando resultados previos se demuestra que la PCR del gen *fstA* es específica para la detección de *A. salmonicida* y se propone un protocolo más optimizado para su detección.







Contents lists available at [SciVerse ScienceDirect](#)

## Veterinary Microbiology

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/vetmic](http://www.elsevier.com/locate/vetmic)



### Short communication

# The improved PCR of the *fstA* (ferric siderophore receptor) gene differentiates the fish pathogen *Aeromonas salmonicida* from other *Aeromonas* species



Roxana Beaz-Hidalgo, Fadua Latif-Eugenín, María José Figueras\*

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

#### ARTICLE INFO

##### Article history:

Received 22 November 2012  
Received in revised form 8 May 2013  
Accepted 19 June 2013

##### Keywords:

*Aeromonas salmonicida*  
Fish pathogen  
Furunculosis  
PCR  
*fstA*  
*gyrB*

#### ABSTRACT

The members of the genus *Aeromonas* are autochthonous of aquatic ecosystems and several species have been associated to septicemia, ulcerative and haemorrhagic diseases in fish, causing significant mortality in both wild and farmed, freshwater and marine fish species. The species *Aeromonas salmonicida* is generally recognized as the most important fish pathogen responsible for epidemic outbreaks of furunculosis in salmonids, also being able to produce infections in other cultured fish such as turbot, halibut, sea bream or goldfish. New species, i.e. *Aeromonas aquariorum*, *Aeromonas tecta* and *Aeromonas piscicola*, have recently been discovered and isolated from diseased fish. The species *A. piscicola* and *Aeromonas bestiarum* are practically impossible to differentiate phenotypically and genetically (when using the 16S rRNA gene) from each other and from *A. salmonicida*. In the present study, two previously described PCR protocols, based on the *fstA* and *gyrB* genes, for the specific detection of *A. salmonicida* were re-evaluated with the type strains of all *Aeromonas* species and with a set of *A. piscicola* and *A. bestiarum* strains. Contrary to what had been published previously it was demonstrated that the *gyrB*-PCR is not specific for *A. salmonicida* because of cross-reactions with other *Aeromonas* species. However, in agreement with previous results, *A. salmonicida* was detected on the basis of the *fstA*-PCR, for which an improved protocol was proposed.

© 2013 Elsevier B.V. All rights reserved.

## 1. Introduction

The species *Aeromonas salmonicida* is the causal agent of furunculosis, a disease known to affect salmonids and other fish species such as Atlantic cod (*Gadus morhua* L.), halibut (*Hyppoglossus hyppoglossus* (L.)), turbot (*Scophthalmus maximus* (L.)) or sea bream (*Sparus aurata* L.) among others (Bernoth et al., 1997; Austin and Austin, 2007; Goldschmidt-Clermont et al., 2009; Godoy et al., 2010; Noga, 2010; Figueras et al., 2011; Beaz-Hidalgo and Figueras, 2012). Differentiation of *A. salmonicida* from its

closely related species *Aeromonas bestiarum* or *Aeromonas piscicola* (also associated with fish) on the basis of phenotypic and genetic methods is very difficult (Martínez-Murcia et al., 2005; Beaz-Hidalgo et al., 2010). For instance these species share 99.8–100% similarity among their 16S rRNA gene sequences making them not useful for their identification, a problem solved by using house-keeping genes like the *rpoD* or *gyrB* that show more interspecific differences (Soler et al., 2004; Beaz-Hidalgo et al., 2009, 2010; Figueras et al., 2011; Beaz-Hidalgo and Figueras, 2012).

Several molecular PCR methods have been described for the fast and precise detection and identification of *A. salmonicida* strains from infected fish tissue or from the water of the aquaculture facilities (reviewed in Beaz-Hidalgo

\* Corresponding author. Tel.: +34 977759321; fax: +34 977759322.  
E-mail address: [mariajose.figueras@urv.cat](mailto:mariajose.figueras@urv.cat) (M.J. Figueras).

and Figueras, 2012). One of these studies proposed two independent PCR methods that target *A. salmonicida* using the *fstA* (encoding the ferric siderophore receptor) and *gyrB* (encoding the DNA gyrase subunit B) genes respectively (Beaz-Hidalgo et al., 2008) but nothing is known about the possible cross reaction with other *Aeromonas* species, such as

*A. piscicola*, *Aeromonas tecta* and *Aeromonas aquariorum* associated with fish, that were not tested as they were not known at that time. Therefore the aim of the present study is to re-evaluate the specificity of the two PCR methods using the type strains of all *Aeromonas* species and strains of the closely related species, *A. bestiarum* and *A. piscicola*.

**Table 1**

Comparative results of the PCR amplification of the targeted *gyrB* and *fstA* genes obtained with strains of the closely related species *A. salmonicida*, *A. bestiarum* and *A. piscicola*.

Species	Strain	Host species <sup>a</sup>	PCR amplification	
			<i>gyrB</i>	<i>fstA</i>
<i>A. salmonicida</i> <sup>b</sup>	CECT 894 <sup>T</sup>	Salmon	+	+
<i>A. salmonicida</i> <sup>c</sup>	CECT 895 <sup>T</sup>	Trout	+	+
<i>A. salmonicida</i> <sup>d</sup>	CECT 896 <sup>T</sup>	Masou	+	+
<i>A. salmonicida</i> <sup>e</sup>	34MEL <sup>T</sup>	Polluted river	+	+
<i>A. salmonicida</i> <sup>e</sup>	93MEL	Polluted river	+	+
<i>A. salmonicida</i> <sup>e</sup>	85MEL	Polluted river	+	+
<i>A. salmonicida</i> <sup>f</sup>	LMG 20223 <sup>T</sup>	Common roach	+	+
<i>A. salmonicida</i>	R20	Trout	+	+
<i>A. salmonicida</i>	R21	Salmon	+	+
<i>A. salmonicida</i>	R23	Turbot	+	+
<i>A. salmonicida</i>	R25	Turbot	+	+
<i>A. salmonicida</i>	R29	Clam	+	+
<i>A. salmonicida</i>	R30	Clam	+	+
<i>A. salmonicida</i>	R64	Trout	+	+
<i>A. salmonicida</i>	R67	Turbot	+	+
<i>A. salmonicida</i>	R103	Salmon	+	+
<i>A. salmonicida</i>	LMG 18998	Wound exudate	+	+
<i>A. salmonicida</i>	CECT 5209	Seawater	+	+
<i>A. salmonicida</i>	CECT 5220	Seawater	+	+
<i>A. salmonicida</i>	CECT 5230	Well water	+	+
<i>A. salmonicida</i>	CECT 5231	Pipe water	+	+
<i>A. salmonicida</i>	CECT 5227	Mussel	+	+
<i>A. salmonicida</i>	CECT 5218	Cake	+	+
<i>A. salmonicida</i>	CECT 5221	Cake	+	+
<i>A. salmonicida</i>	CECT 5225	Mussel	+	+
<i>A. salmonicida</i>	LMG 19037	Cake	+	+
<i>A. salmonicida</i>	CECT 5249	Water	+	+
<i>A. bestiarum</i>	CECT 4227 <sup>T</sup>	Unknown fish species	+	–
<i>A. bestiarum</i>	R3	Lamprey	+	–
<i>A. bestiarum</i>	R5	Salmon	+	–
<i>A. bestiarum</i>	R54	Lamprey	+	–
<i>A. bestiarum</i>	R72	Trout	+	–
<i>A. bestiarum</i>	R77	Lamprey	+	–
<i>A. bestiarum</i>	R80	Salmon	+	–
<i>A. bestiarum</i>	R92	Trout	+	–
<i>A. bestiarum</i>	R201	Salmon	+	–
<i>A. bestiarum</i>	R208	Salmon	+	–
<i>A. bestiarum</i>	R209	Salmon	+	–
<i>A. bestiarum</i>	R215	Salmon	+	–
<i>A. bestiarum</i>	CECT 5238	Well water	+	–
<i>A. piscicola</i>	CECT 7443 <sup>T</sup>	Salmon	+	–
<i>A. piscicola</i>	R4	Lamprey	+	–
<i>A. piscicola</i>	R9	Trout	+	–
<i>A. piscicola</i>	R94	Trout	+	–
<i>A. piscicola</i>	R200	Salmon	+	–
<i>A. piscicola</i>	R210	Salmon	+	–
<i>A. piscicola</i>	R213	Trout	+	–
<i>A. piscicola</i>	R214	Salmon	+	–
<i>A. piscicola</i>	R219	Bogue	+	–

<sup>a</sup> Scientific names for fish and shellfish species are: Turbot, *Scophthalmus maximus* (L.); trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum) and *Salmo trutta* L.; masou, *Oncorhynchus masou* (Brevoort), salmon, *Salmo salar* L.; lamprey, *Petromyzon marinus* L., bogue, *Boops boops* L.; common roach, *Rutilus rutilus* Rafinesque; clam, *Venerupis philippinarum* (Adams & Reeves); mussel, *Mytilus edulis* L.

<sup>b</sup> *A. salmonicida* subsp. *salmonicida*.

<sup>c</sup> *A. salmonicida* subsp. *achromogenes*.

<sup>d</sup> *A. salmonicida* subsp. *masoucida*.

<sup>e</sup> *A. salmonicida* subsp. *pectinolytica*.

<sup>f</sup> *A. salmonicida* subsp. *smithia*.

**Table 2**Results of the PCR amplification of the *fstA* genes obtained with the type strains of remaining *Aeromonas* species that includes the genus.

Species	Strain	Origin	PCR amplification	
			<i>gyrB</i>	<i>fstA</i>
<i>A. hydrophila</i>	CECT 839 <sup>T</sup>	Milk	–	–
<i>A. caviae</i>	CECT 838 <sup>T</sup>	Guinea pig	–	–
<i>A. media</i>	CECT 4232 <sup>T</sup>	Aquaculture water	+	–
<i>A. eucrenophila</i>	CECT 4224 <sup>T</sup>	Freshwater fish	–	–
<i>A. sobria</i>	CECT 4245 <sup>T</sup>	Fish	+	–
<i>A. veronii</i>	CECT 4257 <sup>T</sup>	Sputum	–	–
<i>A. jandaei</i>	CECT 4257 <sup>T</sup>	Human faeces	–	–
<i>A. schubertii</i>	CECT 4240 <sup>T</sup>	Cutaneous abscess	–	–
<i>A. trota</i>	CECT 4255 <sup>T</sup>	Human faeces	–	–
<i>A. allosaccharophila</i>	CECT 4199 <sup>T</sup>	Eel	+	–
<i>A. encheleia</i>	CECT 4342 <sup>T</sup>	Eel	–	–
<i>A. popoffii</i>	CECT 5176 <sup>T</sup>	Drinking water	+	–
<i>A. simiae</i>	IBS S6874 <sup>T</sup>	Monkey faeces	–	–
<i>A. molluscorum</i>	CECT 5864 <sup>T</sup>	Bivalve molluscs	+	–
<i>A. bivalvium</i>	CECT 7113 <sup>T</sup>	Bivalve molluscs	+	–
<i>A. tecta</i>	CECT 7082 <sup>T</sup>	Child faeces	–	–
<i>A. aquariorum</i>	CECT 7289 <sup>T</sup>	Ornamental fish	–	–
<i>A. fluvialis</i>	CECT 7401 <sup>T</sup>	River water	–	–
<i>A. taiwanensis</i>	CECT 7403 <sup>T</sup>	Wound infection	–	–
<i>A. sanarellii</i>	CECT 7402 <sup>T</sup>	Wound infection	–	–
<i>A. diversa</i>	CECT 4254 <sup>T</sup>	Wound infection	–	–
<i>A. rivuli</i>	CECT 7518 <sup>T</sup>	River water	–	–

## 2. Materials and methods

### 2.1. Bacterial strains and growth conditions

Seventy-one strains were used in the present study (Tables 1 and 2), including all the type strains ( $n = 25$ ) and 46 reference and non-reference strains of *A. salmonicida*, *A. bestiarum* and *A. piscicola*, isolated from various sources (diseased fish, seawater, water, bivalves, cake and wound exudate), that had been identified previously by molecular methods (Beaz-Hidalgo et al., 2010). The isolates were grown for 24 h on trypticase soy agar (TSA, Pronadisa) and were incubated at 25 °C for the *A. salmonicida* strains and at 30 °C for the other *Aeromonas* strains.

### 2.2. DNA extraction and PCR amplifications

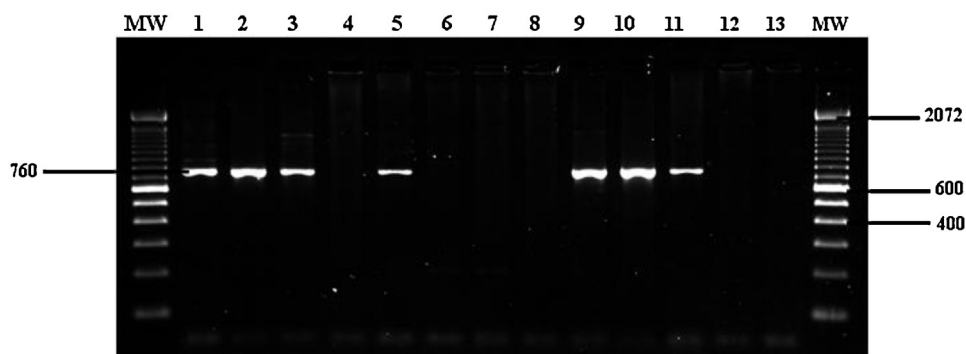
DNA was extracted from pure bacterial cultures with the Insta-Gene matrix (Bio-Rad), as recommended by the manufacturer. Conditions and primers for the amplification of the *fstA* (422 bp) and *gyrB* (760 bp) genes were as previously described (Beaz-Hidalgo et al., 2008), except that the commercial Ready-to-go PCR beads (GE Healthcare) that include all the lyophilized preparation was substituted for conventional reagents. The PCR amplifications were carried out in T-gradient Thermocycler (Biometra) in 50 µl volume containing 5 µl of DNA, 7 µl dNTP mix (10 mM, Applied Biosystems), 1 µl of each primer at 15 µM, 5 µl of 10× buffer mix, 3 µl MgCl and 0.5 µl of Taq DNA polymerase (Invitrogen). PCR products were electrophoresed at 80 V for 1.5 h through 2% agarose gels in 1× Tris Borate EDTA (TBE) buffer and the gels were stained with Red Safe™ nucleic acid staining solution (INTRON Biotechnology). Bands at the expected sizes for the *fstA* gene (422 bp) and for the *gyrB* gene (760 bp) were considered a positive result.

## 3. Results

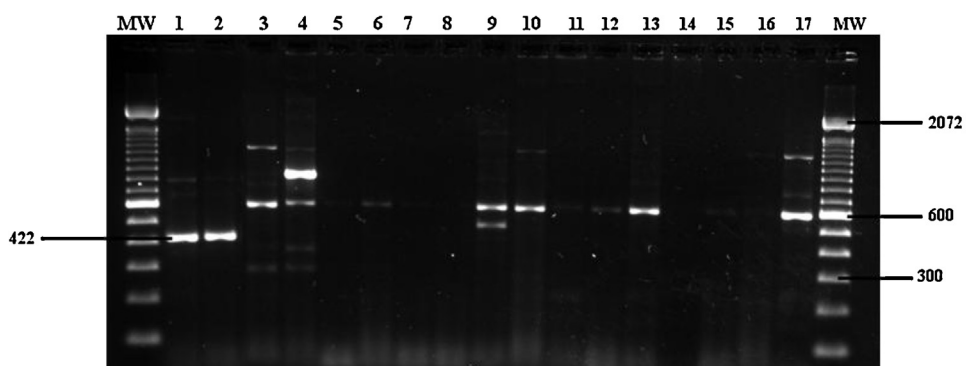
The *gyrB* primers were found to produce an amplicon of the expected size for all *A. salmonicida* strains, for all the strains of *A. bestiarum* and *A. piscicola* and for the type strains of *Aeromonas media*, *Aeromonas sobria*, *Aeromonas allosaccharophila*, *Aeromonas molluscorum*, *Aeromonas popoffii* and *Aeromonas fluvialis* (Fig. 1 and Tables 1 and 2). When the *fstA* gene was investigated, the typical 422 bp band was only observed for the *A. salmonicida* strains, although 6 *A. piscicola* and 9 *A. bestiarum* strains did show some different, unspecific bands (Fig. 2) that disappeared when the PCR conditions were optimized by reducing the amount of MgCl from 3 µl to 1.5 µl and the annealing temperature was 64.7 °C. Under these different conditions, only the *A. salmonicida* strains (including all the subspecies tested *salmonicida*, *masoucida*, *achromogenes*, *smithia* and *pectinolytica*) produced a specific and unique band of 422 bp (Fig. 3 and Table 1).

## 4. Discussion

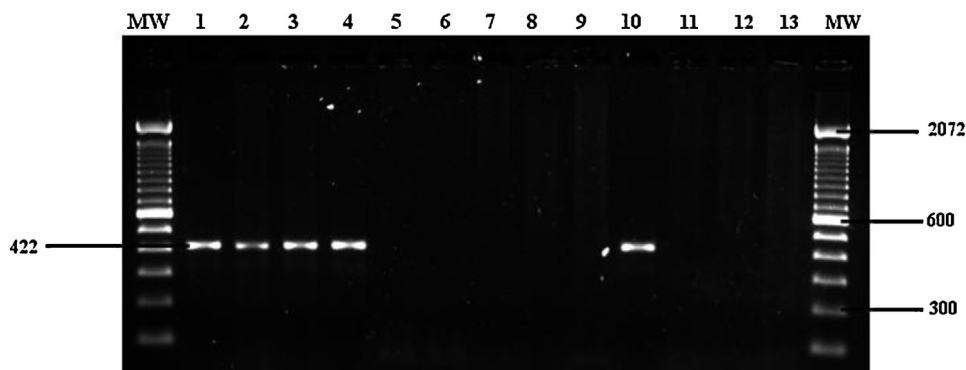
The present study has re-evaluated the PCR protocols for the *fstA* and *gyrB* genes using all the subspecies of *A. salmonicida*, all the type strains of the species of the genus *Aeromonas* and genetically identified strains of the closely related species *A. bestiarum* and *A. piscicola* to check for any cross-reactions. In contrast, in the original study of Beaz-Hidalgo et al. (2008) that proposed these PCR methods, the sensitivity and specificity was evaluated with 69 biochemically identified *A. salmonicida* strains including only two of the five subspecies (*achromogenes* and *masoucida*) and 38 strains belonging to other bacteria implicated in fish disease. The latter included several *Aeromonas* spp. i.e. *Aeromonas hydrophila* ( $n = 12$ ), *A. bestiarum* ( $n = 1$ ), *Aeromonas caviae* ( $n = 1$ ), *A. media* ( $n = 1$ ) and *A. sobria* ( $n = 1$ ),



**Fig. 1.** Specific *gyrB*-PCR products for *A. salmonicida* and for other *Aeromonas* species. Lanes: 1, *A. salmonicida* CECT 894<sup>T</sup>; 2, *A. media* CECT 4232<sup>T</sup>; 3, *A. sobria* CECT 4245<sup>T</sup>; 4, *A. trota* CECT 4255<sup>T</sup>; 5, *A. allosaccharophila* CECT 4199<sup>T</sup>; 6, *A. eucrenophila* CECT 4224<sup>T</sup>; 7, *A. bivalvium* CECT 7113<sup>T</sup>; 8, *A. caviae* CECT 838<sup>T</sup>; 9, *A. molluscorum* CECT 5864<sup>T</sup>; 10, *A. popoffii* CECT 5176<sup>T</sup>; 11, *A. fluvialis* CECT 7401<sup>T</sup>; 12, *A. taiwanensis* CECT 7403<sup>T</sup>; 13, *A. sanarellii* CECT 7402<sup>T</sup>. MW, molecular weight ladder (100–2072 bp, Invitrogen). Numbers on the right indicate the position of the molecular size marker in base pairs (bp). Numbers on the left indicate the size of the expected *gyrB* amplicon.



**Fig. 2.** *fstA*-PCR products for *A. salmonicida* and for other *Aeromonas* species. The expected specific amplicon (422 bp) was only obtained for the *A. salmonicida* strains while unspecific amplicons of other sizes were contained for *A. bestiarum* and *A. piscicola* strains. Lanes: 1–2, *A. salmonicida* strains CECT 894<sup>T</sup>, 34MEL<sup>T</sup>; 3, *A. bestiarum* CECT 4227<sup>T</sup>; 4–8, *A. bestiarum* strains R72, R201, R3, R5, R208; 9–17 *A. piscicola* strains CECT 7443<sup>T</sup>, R200, R9, R210, R214, R213, R219, R94, R4. MW, molecular weight ladder (100–2072 bp, Invitrogen). Numbers on the right indicate the position of the molecular size marker in base pairs (bp). Numbers on the left indicate the size of the expected *fstA* amplicon.



**Fig. 3.** Specific *fstA*-PCR products for *A. salmonicida* and for other *Aeromonas* species with the modified condition. With the new PCR conditions only the strains of *A. salmonicida* responded to the amplification showing the expected band of 422 bp. Lanes: 1–4, *A. salmonicida* strains CECT 894<sup>T</sup>, CECT 895<sup>T</sup>, CECT 896<sup>T</sup>, 34MEL<sup>T</sup>; 5–7, *A. bestiarum* strains CECT 4227<sup>T</sup>, R72, R201; 8–9, *A. piscicola* strains CECT 7443<sup>T</sup>, R200; 10, *A. salmonicida* strain R20; 11–13, *A. piscicola* strains R9, R210, R214. MW, molecular weight ladder (100–2072 bp, Invitrogen). Numbers on the right indicate the position of the molecular size marker in base pairs (bp).

and 22 representatives of other genera like *Vibrio* and *Pseudomonas*. The new results obtained in the present study for the *gyrB*-PCR using the primers considered specific for *A. salmonicida* (Beaz-Hidalgo et al., 2008) has

revealed that the same PCR fragment has been amplified for several other *Aeromonas* species so this target should be disregarded. However, the *fstA*-PCR was able to specifically detect only *A. salmonicida* (including strains of all

subspecies) and did not react with the closely related species *A. bestiarum* or with other recently described species, i.e. *A. piscicola*, *A. tecta* and *A. aquariorum*, which had never been tested before using this PCR diagnostic assay. Furthermore the *fstA*-PCR protocol was modified to avoid unspecific PCR amplicons, and to reduce the cost (i.e. PCR reagents were used instead of using the commercial Ready-to-go PCR beads).

The results obtained in this study for the *gyrB* and *fstA* genes are important because other studies may rely in the future on these genes for the specific detection of *A. salmonicida* (Beaz-Hidalgo et al., 2008). In fact, Kulkarni et al. (2009) targeted the *gyrB* region described previously (Beaz-Hidalgo et al., 2008) in order to develop a loop-mediated isothermal amplification (LAMP) protocol for the specific detection of furunculosis in Atlantic cod (*Gadus morhua*). A later study by Kulkarni et al. (2010) used the same *gyrB* region for the detection of *A. salmonicida* in a multiplex-PCR (m-PCR) assay that also targeted two other pathogens, *Francisella piscicida* and *Vibrio anguillarum*. However, the authors did not test any strains of the species *A. bestiarum*, *A. piscicola*, *A. media*, *A. sobria*, *A. allosaccharophila*, *A. molluscorum*, *A. popoffii* or *A. fluvialis*, which have been shown to produce the same amplicon as the one expected for *A. salmonicida*. Among them, *A. sobria*, *A. bestiarum* and *A. piscicola* have been isolated previously from various diseased fish species, including trout, salmon, bogue (*Boops boops* L.), carp, lamprey and tilapia, with a prevalence ranging from 11.7 to 25% (Koziońska et al., 2002; Koziońska, 2007; Beaz-Hidalgo et al., 2010; Soriano-Vargas et al., 2010; Li and Cai, 2011; Koziońska and Pękala, 2012). Few records exist for *A. media* isolated from trout and salmon (7% of prevalence, Beaz-Hidalgo et al., 2010) or for *A. allosaccharophila* originally discovered from eels in Spain (Martínez-Murcia et al., 1992) and detected in carp and trout (1.5% of prevalence Koziońska, 2007).

It is important to consider that a quick, correct identification of *A. salmonicida* is important in order to treat the disease with the correct antimicrobials and for the early detection of covertly carrier fish for the control of furunculosis and of epidemic outbreaks. These preventive strategies for the control of furunculosis and other fish diseases are a constant challenge and need to be regularly reviewed in order to recognize the emergence of new, potentially pathogenic species, like the recently discovered *A. piscicola*. In conclusion, the present study demonstrates that the *fstA* PCR protocol is specific for detecting *A. salmonicida*, showing no cross-reactions with its closely related species *A. bestiarum* and *A. piscicola* or any other *Aeromonas* species.

## Acknowledgements

The authors thank Catalina Núñez for her technical assistance. This work was supported in part by the project with reference AGL2011-30461-C02-02 by the Ministerio de Ciencia e Innovación (Spain).

## References

- Austin, B., Austin, D.A., 2007. Bacterial Fish Pathogens. Disease of Farmed and Wild Fish. 4th ed. Springer-Praxis, Ltd., Chichester, UK.
- Beaz-Hidalgo, R., Alperi, A., Buján, N., Romalde, J.L., Figueras, M.J., 2010. Comparison of phenotypical and genetic identification of *Aeromonas* strains isolated from diseased fish. Syst. Appl. Microbiol. 33, 149–153.
- Beaz-Hidalgo, R., Alperi, A., Figueras, M.J., Romalde, J.L., 2009. *Aeromonas piscicola* sp. nov., isolated from diseased fish. Syst. Appl. Microbiol. 32, 471–479.
- Beaz-Hidalgo, R., Figueras, M.J., 2012. Molecular detection and characterization of furunculosis and other *Aeromonas* fish infections. In: Carvalho, Edmir (Ed.), Health and Environment in Aquaculture. InTech, Brazil, pp. 97–132., [http://cdn.intechopen.com/pdfs/35139/InTech-Molecular\\_detection\\_and\\_characterization\\_of\\_furunculosis\\_and\\_o-ther\\_aeromonas\\_fish\\_infections.pdf](http://cdn.intechopen.com/pdfs/35139/InTech-Molecular_detection_and_characterization_of_furunculosis_and_o-ther_aeromonas_fish_infections.pdf).
- Beaz-Hidalgo, R., Magi, G.E., Balboa, S., Barja, J.L., Romalde, J.L., 2008. Development of a PCR protocol for the detection of *Aeromonas salmonicida* in fish by amplification of the *fstA* (ferric siderophore receptor) gene. Vet. Microbiol. 128, 386–394.
- Bernoth, E.M., Ellis, A., Midtlyng, P., Olivier, G., Smith, P., 1997. Furunculosis Multidisciplinary Fish Disease Research, 1st ed. Academic Press, CA, USA.
- Figueras, M.J., Beaz-Hidalgo, R., Paredes, K., 2011. Furunculosis y otras infecciones producidas por *Aeromonas*. In: Avendaño-Herrera, R. (Ed.), Enfermedades infecciosas del cultivo de Salmónidos en Chile y el Mundo. Niva Chile S.A. Chile, pp. 285–374.
- Godoy, M., Gherardelli, V., Heisinger, A., Fernández, J., Olmos, P., Ovalle, L., Ihardi, P., Avendaño-Herrera, R., 2010. First description of atypical furunculosis in freshwater farmed Atlantic salmon, *Salmo salar* L., in Chile. J. Fish Dis. 33, 441–449.
- Goldschmidt-Clermont, E., Hochwartner, O., Demarta, A., Caminada, A.P., Frey, J., 2009. Outbreaks of an ulcerative and haemorrhagic disease in Arctic char *Salvelinus alpinus* caused by *Aeromonas salmonicida* subsp. *smithia*. Dis. Aquat. Org. 86, 81–86.
- Koziońska, A., 2007. Dominant pathogenic species of mesophilic aeromonads isolated from diseased and healthy fish cultured in Poland. J. Fish Dis. 30, 293–301.
- Koziońska, A., Figueras, M.J., Chacón, M.R., Soler, L., 2002. Phenotypic characteristics and pathogenicity of *Aeromonas* genospecies isolated from common carp (*Cyprinus carpio* L.). J. Appl. Microbiol. 93, 1034–1041.
- Koziońska, A., Pękala, A., 2012. Characteristics of disease spectrum in relation to species, serogroups, and adhesion ability of motile aeromonads in fish. Sci. World J. 949358, <http://dx.doi.org/10.1100/2012/949358>.
- Kulkarni, A., Caipang, C.M., Brinchmann, M.F., Kiron, V., 2010. Simultaneous detection of pathogens causing francisellosis, furunculosis and vibriosis in Atlantic cod by multiplex polymerase chain reaction. Aquacul. Res. 41, 1533–1538.
- Kulkarni, A., Caipang, C.M., Brinchmann, M.F., Korsnes, K., Kiron, V., 2009. Loop-mediated isothermal amplification, an assay for the detection of atypical furunculosis caused by *Aeromonas salmonicida* in Atlantic cod, *Gadus morhua*. J. Rapid Methods Automat. Microbiol. 17, 476–489.
- Li, Y., Cai, S.H., 2011. Identification and pathogenicity of *Aeromonas sobria* on tail-rot disease in juvenile tilapia *Oreochromis niloticus*. Curr. Microbiol. 62, 623–627.
- Martínez-Murcia, A.J., Esteve, C., Garay, E., Collins, M.D., 1992. *Aeromonas allosaccharophila* sp. nov., a new mesophilic member of the genus *Aeromonas*. FEMS Microbiol. Lett. 70, 199–205.
- 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*. Int. Microbiol. 8, 259–269.
- Noga, E.J., 2010. Fish Diseases, 2nd ed. Willey-Blackwell, Singapore.
- 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. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 54, 1511–1519.
- Soriano-Vargas, E., Castro-Escarpulli, G., Aguilera-Arreola, M.G., Vega-Castillo, F., Salgado-Miranda, C., 2010. Aislamiento e identificación de *Aeromonas bestiarum* a partir de carpa común de cultivo (*Cyprinus carpio* L.) procedentes de Santa María Chapa de Mota, Estado de México, México. Veterinaria México 41, 111–115.





#### **4.1.2. A culture independent method for the detection of *Aeromonas* sp. from water samples. Latif-Eugenín F, Beaz-Hidalgo R, Figueras MJ. Italian Journal of Food Safety (Sometido).**

##### **Resumen**

El género *Aeromonas* está ampliamente distribuido en el medio acuático y es reconocido como un potencial patógeno para humanos y animales. Los miembros de este género son a menudo confundidos con los del género *Vibrio* cuando se utilizan técnicas de identificación basadas en la siembra y en el cultivo de bacterias como los sistemas comerciales semi-automatizados. Este estudio describe un método de detección molecular, cultivo independiente, basado en la detección mediante PCR del gen *gcat* (Glycerofosfolípido Colesterol AcilTransferasa), que es específico para este género. La GCAT-PCR fue 100% específica en muestras de agua inoculadas artificialmente, con un límite de detección entre 2,5 y 25 ufc/ml. Mediante el método molecular descrito (GCAT-PCR) y después de un paso previo de pre-enriquecimiento se detectó la presencia de *Aeromonas* en 86 muestras de agua así como utilizando un método de cultivo convencional obteniéndose un 83,7% de muestras positivas. Sin embargo, cuando el paso de pre-enriquecimiento no se realizó, el 77,9% de las muestras fueron positivas mediante cultivo y solo 15,1% mediante la GCAT-PCR. Sin embargo, cuando el volumen de agua se aumentó de 400 µl a 4 ml para realizar la extracción de ADN se logró obtener 83,7% de muestras positivas utilizando el método molecular descrito de la GCAT-PCR (sin el paso previo de pre-enriquecimiento). El método molecular propuesto es mucho más rápido (5 ó 29 h) que el método tradicional de cultivo (24 ó 48 h), con o sin el paso de pre-enriquecimiento y permite una rápida detección de *Aeromonas* en muestras de agua, que permitiría prevenir una posible transmisión a los humanos.





**A culture independent method for the detection of *Aeromonas* sp. from water samples.**

**Fadua Latif-Eugenín, Roxana Beaz-Hidalgo, María José Figueras\***

Unit of Microbiology, Medicine and Health Science School, IISPV, Rovira i Virgili University, Sant Llorenç 21, 43201 Reus, Spain.

***Acknowledgments:*** none

\*Corresponding author: Unit of Microbiology, Medicine and Health Science School, IISPV, Rovira i Virgili University, Sant Llorenç 21, 43201 Reus, Spain. Tel: +34-977759321; Fax: +34-977759322; E-mail: mariajose.figueras@urv.cat

Key words: Detection, GCAT, PCR, *Aeromonas*, Water

***Conflicts of interest statement:*** None declared.

***Funding:***

This study was supported by *Ministerio de Ciencia e Innovación* (Spain), project reference AGL2011-30461-C02-02.



## Abstract

The genus *Aeromonas* is present in a wide variety of water environments and is recognized as potentially pathogenic to humans and animals. Members of this genus are often confused with *Vibrio* when using automated, commercial identification systems that are culture-dependent. This study describes a PCR detection method for *Aeromonas* that is culture-independent and that targets the *gcat* (Glycerophospholipid-Cholesterol Acyltransferase) gene, which is specific for this genus. The GCAT-PCR was 100% specific in artificially inoculated water samples, with a detection limit that ranged from 2.5 to 25 cfu/ml. The success at detecting this pathogen in 86 water samples using the GCAT-PCR method was identical to the conventional culturing method when a pre-enrichment step was carried out, yielding 83.7% positive samples. On the other hand, without a pre-enrichment step, only 77.9% of the samples were positive by culturing and only 15.1% with the GCAT-PCR. However, 83.7% positive samples were obtained for the GCAT-PCR when the water volume for the DNA extraction was increased from 400 µl to 4 ml. The proposed molecular method is much faster (5 or 29 h) than the culturing method (24 or 48 h) whether performed directly or after a pre-enrichment step and it will enable the fast detection of *Aeromonas* in water samples helping to prevent possible transmission to humans.



## Introduction

The genus *Aeromonas* currently includes 30 species (Beaz-Hidalgo *et al.*, 2015) that are autochthonous aquatic microorganisms found widely in the environment (Janda & Abbott, 2010; Beaz-Hidalgo & Figueras, 2013; Figueras a & Beaz-Hidalgo, 2014, 2015). These bacteria have often been recovered from different types of water, such as raw and treated sewage, drinking water, sea water and fresh water (Emekdas *et al.*, 2006; Martone-Rocha *et al.*, 2010; Figueira *et al.*, 2011; Igbinosa & Okoh, 2013; Robertson *et al.*, 2014). *Aeromonas* is also common in healthy and in diseased fish (Beaz-Hidalgo *et al.*, 2010; Lui & Li., 2012; Chen *et al.*, 2012), marine mammals (Pérez *et al.*, 2015), chironomid egg masses (Beaz-Hidalgo *et al.*, 2012) and food (Castro-Escarpulli *et al.*, 2003; Ottaviani *et al.*, 2006; Nagar *et al.*, 2013). In humans, *Aeromonas* is recognized as an opportunistic pathogen that can affect both immunocompromised and immunocompetent individuals, gastroenteritis and wound infections being the most frequent clinical presentation, followed by bacteremia (Janda & Abbott, 2010; Figueras & Beaz-Hidalgo, 2015).

Recently, an epidemiological relationship has been established between the *Aeromonas* strains recovered from drinking water and from cases of diarrhoea, thus reinforcing the waterborne and foodborne origin of *Aeromonas* infections (Altweeg *et al.*, 1991; Khajanchi *et al.*, 2010; Pablos *et al.*, 2011). Therefore, having fast and reliable methods that can trace *Aeromonas* in water systems is essential because current biochemical methods are time-consuming and not always able to correctly identify the genus, frequently being confused with *Vibrio* sp. (Abbott *et al.*, 1998; Chacón *et al.*, 2002; Soler *et al.*, 2002; Lamy *et al.*, 2010). Presently, several genetic markers have been proposed that allow molecular identification of *Aeromonas* to genus level (Cascón *et al.*, 1997; Chacón *et al.*, 2002; Arora *et al.*, 2006; Balakrishna *et al.*, 2008; Robertson *et al.*, 2014). Among them, there is one that targets the *gcat* gene (237 bp) by encoding the glycerophospholipid-cholesterol acyl transferase, developed by Chacón *et al.* (2002) as an *Aeromonas* DNA genus probe that specifically hybridized with all 14 *Aeromonas* species recognised at that time. Later, the protocol was adapted by Soler *et al.* (2002) for a PCR reaction with an annealing temperature of 56°C. The *gcat* gene was characterized by Buckley *et al.* (1982) as a leading, lethal toxin of the species *Aeromonas salmonicida*. However, Chacón *et al.* (2002, 2003) demonstrated that this

gene was present in all *Aeromonas* species and was used as a genus-specific genetic marker in the identification of the isolates in several studies (Chacón *et al.*, 2002,2003; Soler *et al.*, 2002; Beaz-Hidalgo *et al.*, 2010; Puthucheary *et al.*, 2012).

The aim of this study was to adapt the GCAT-PCR as a culture-independent method for the direct detection of *Aeromonas* from water samples.

## Materials and Methods

### *PCR specificity and sensitivity in artificially inoculated water samples*

Five reference strains (*Aeromonas hydrophila* CECT 839<sup>T</sup>, *Plesiomonas shigelloides* CECT 597, *Vibrio parahaemolyticus* CECT 588, *Escherichia coli* CECT 744 and *Pseudomonas aeruginosa* CECT 110<sup>T</sup>) were used to evaluate the specificity of molecular detection by PCR of *Aeromonas* in artificially-inoculated, distilled water samples.

All strains were inoculated into 10 ml of trypticase soy broth (TSB, Difco™, France) and incubated at 30°C for 24 hours, then concentrations were adjusted to an optical density of 1 (measured with a spectrophotometer at 450 nm), which corresponded to a concentration of approximately 10<sup>8</sup> cfu/ml. To verify this, serial 10-fold dilutions were performed in buffered peptone water (BPW) from 10<sup>8</sup> to 10<sup>0</sup> cfu/ml for each strain. All dilutions were plated in triplicate (100 µl) onto trypticase soy agar (TSA, Difco™, France) medium and incubated at 30°C for 24 hours. The concentration (cfu/ml) of each dilution was estimated by calculating the average of the three plate counts.

Three flasks (A, B and C) of 100 ml each of distilled water were artificially inoculated with 1 ml of a bacterial suspension (10<sup>8</sup> cfu/ml) that contained: A) *A. hydrophila* CECT 839<sup>T</sup> alone, B) *A. hydrophila* CECT 839<sup>T</sup>, *P. shigelloides* CECT 597, *V. parahaemolyticus* CECT 588, *E. coli* CECT 744 and *P. aeruginosa* CECT 110 and C) the same microbes as B except with *A. hydrophila* CECT 839<sup>T</sup>.

From each flask inoculated with the different bacterial mixtures, 10-fold serial dilutions were performed, and 400 µl of each dilution was used for DNA extraction using the InstaGene Matrix (BioRad, Spain) protocol. The GCAT-PCR amplification was made in a final volume of 50 µl containing 5 µl of DNA, 1 µl of each primer (GCAT-F (5'-CTCCTGGAATCCCAAGTATCAG-3') and GCAT-R (5'-GGCAGGTTGAACAGCAGTATCT-3')) described by Soler *et al.* (2002) at 15 µM, 5

$\mu\text{l}$  of dNTP mix (Applied Biosystems, UK) at 10 mM, 0.5  $\mu\text{l}$  Taq DNA Polymerase (5U/ $\mu\text{L}$ , Invitrogen, USA), 5  $\mu\text{l}$  of 10X PCR Buffer (Invitrogen, USA) 1.8  $\mu\text{l}$  of 50mM MgCl (Invitrogen, USA) and 30.7  $\mu\text{l}$  of milliQ water. PCR conditions consisted of an initial denaturation step at 95°C for 3 minutes followed by 35 cycles of amplification in which denaturation, annealing and elongation temperatures were 94°C for 1 min, 56°C for 1 min, and 72°C for 1 min, respectively. A final elongation of 72°C for 5 min was included in the programme. Amplification products were analysed on 2% (w/v) agarose gels in 1X TRIS Borate EDTA (TBE) buffer after staining with Red Safe TM nucleic acid staining solution (INTRON Biotechnology, Korea). Bands at the expected size (237 bp) were considered a positive result.

The sensitivity of the GCAT-PCR was determined by performing dilutions ( $10^6$  -  $10^0$ ) of water samples artificially inoculated with *Aeromonas* (flasks A and B), while the specificity of this method was also assessed by inoculating a bacterial mixture without *Aeromonas* into distilled water samples (flask C). Furthermore, specificity was corroborated from five randomly-selected positive samples from which the bands (237 bp) were cut out and purified using GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification Kit (GE Healthcare, UK) and sequenced. The identity of the obtained sequences was determined by BLAST with the sequences of the *gcat* gene deposited in the NCBI database,

#### *PCR sensitivity in natural water samples*

A total of 86 water samples, including waste water (n= 68), river water (n= 12) and sea water (n= 6), were collected from Catalonia, north-east Spain, between February 2012 and September 2013.

Detection of *Aeromonas* using the GCAT-PCR (237 bp) in natural water samples was evaluated directly (10 ml of water were diluted in 90 ml of BPW) and after a pre-enrichment step using Alkaline Peptone Water (APW-A) supplemented with ampicillin (10mg/l). The results were compared with those obtained by culturing with Ampicillin Dextrin Agar (ADA), Starch Ampicillin Agar (SAA) and Bile Irgasan Brilliant Green modified (BIBG-m). The pre-enrichment step was carried out with APW-A using the same dilutions (1:10 vol/vol). For both methodologies, 10-fold serial dilutions were performed and 100  $\mu\text{l}$  of each dilution was plated on ADA, SAA and BIBG-m and incubated at 30°C for 24 h.



For the molecular detection of *Aeromonas* sp., 400 µl of the enriched and non-enriched samples were used for the DNA extraction to perform the GCAT-PCR as described above. To avoid the different molecules contained in the water samples interfering with the PCR reaction, the pellet obtained after the centrifugation of the 400 µl was washed three times using 1 ml of milliQ water each time. For each wash, the pellet was resuspended in 1 ml of milliQ water and centrifuged at 13.000 RPM for three minutes.

## Results

### *PCR specificity and sensitivity in artificially inoculated water samples*

The DNA extracted from water samples inoculated with *A. hydrophila* CECT 839<sup>T</sup> yielded the expected amplification product of 237 bp of the GCAT (Fig. 1A) and when this PCR product was sequenced it showed the highest similarity (98 - 99%) with the sequences of the *gcat* gene of *A. hydrophila* CAHH2 (KM201324), *A. hydrophila* CAHH13 (KP159601) and *A. veronii* B565 (CP002607) deposited in the NCBI database. No amplification was made for the DNA extracted from water inoculated with bacterial mixtures without *A. hydrophila*. The lowest detection limit of *Aeromonas* in artificially-inoculated distilled water samples (flask A and B) ranged between 2.5 and 25 cfu/ml (Fig. 1A).

### *PCR sensitivity in natural water samples*

Table 1 shows that 83.7% (72/86) of the water samples were positive for the presence of *Aeromonas* sp. both by culturing and by the GCAT-PCR method after a pre-enrichment step, without which the number of positive samples was lower, 77.9% (67/86) by culturing and 15.1% (13/86) by the GCAT-PCR (Fig. 1B). To improve these results we have changed the original protocol, increasing 10-fold (from 400 µl to 4 ml) the water volume used for the DNA extraction. This new protocol was applied to all water samples that showed negative results with the original protocol (with 400 µl of the water sample) and then all water samples (72, 83.7%) were positive for the presence of *Aeromonas*.

**Table 1. Detection of *Aeromonas* in 86 water samples by culturing and by the GCAT-PCR.**

Water samples (n)	Number (%) of positive samples			
	Culturing		GCAT-PCR	
	Direct	Enrichment	Direct*	Enrichment
Sewage (68)	55 (80.9)	60 (88.2)	12 (17.6)	60 (88.2)
River (12)	12 (100)	12 (100)	1 (8.3)	12 (100)
Sea (6)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)

\*These results were obtained when 400 µl of water were used for the DNA extraction, but when this water volume was increased 10-fold (4 ml) all samples (72, 83.7%) were positive for the presence of *Aeromonas*.

## Discussion

This adapted GCAT-PCR method for the direct detection of *Aeromonas* without culturing, was highly sensitive (2.5 - 25 cfu/ml) when distilled water samples were inoculated with *A. hydrophila* CECT 839<sup>T</sup> alone or together with other bacterial species. These results are similar to those of other studies that have detected *Aeromonas* (10 cfu/ml or gr) by PCR using 16S rRNA and *gyrB* genes in inoculated food (raw chicken and raw milk) and drinking water samples (Arora *et al.*, 2006; Balakrishna *et al.*, 2008; Robertson *et al.*, 2014).

The 100% specificity obtained in the present study corroborates previous studies, in which colonies or isolates were verified as belonging to the genus *Aeromonas* when screening for the presence of the *gcat* gene (Chacón *et al.*, 2002, 2003; Beaz-Hidalgo *et al.*, 2010; Puthuchearry *et al.*, 2012).

The same 72 (83.7%) water samples were positive for *Aeromonas* with both methods after enrichment with APW-A, with the GCAT-PCR and by culturing. However, the sensitivity of the two methods (culturing and molecular) was lower when the samples were not pre-enriched (Table 1) with only 77.9% of the samples being positive by culturing and only 15.1% with the GCAT-PCR. The comparatively poor efficiency of the GCAT-PCR was probably due to the detection limit, because when we increased the water volume used for the DNA extraction, the percentage of positive samples increased from 15.1% to 83.7% with the new protocol.

The main advantage of the proposed molecular method is that the time required to identify strains reduces from 24 hours (culturing method) to only five hours (including DNA extraction, PCR and electrophoresis) for the unenriched water.

## Conclusion

Considering that water is the transmission route for *Aeromonas* infections, this new method will enable fast detection of the bacteria in order to be able to implement strategies that will avoid further dissemination of the bacteria in drinking, irrigating or recreational water systems.

## References

- Arora S, Agarwal RK, Bist B, 2006. Comparison of ELISA and PCR vis-à-vis cultural methods for detecting *Aeromonas* spp. in foods of animal origin. *Int J Food Microbiol* 106:177-83.
- Balakrishna K, Murali HS, Batra HV, 2008. A novel multiplex polymerase chain reaction for simultaneous detection of *Yersinia enterocolitica*, *Staphylococcus aureus*, *Aeromonas* and *Salmonella* from chicken meat and milk samples. *J Food Safety* 30: 263-75.
- Beaz-Hidalgo R, Alperi A, Buján N, Romalde JL, Figueras MJ, 2010. Comparison of phenotypical and genetic identification of *Aeromonas* strains isolated from diseased fish. *Syst Appl Microbiol* 33: 149-53.
- Beaz-Hidalgo R, Shakèd T, Laviad S, Halpern M, Figueras MJ, 2012. Chironomid egg masses harbour the clinical species *Aeromonas taiwanensis* and *Aeromonas sanarellii*. *FEMS Microbiol Lett* 337: 48-54.
- Beaz-Hidalgo R and Figueras M.J, 2013. *Aeromonas* spp. whole genomes and virulence factors implicated in fish disease. *J Fish Dis* 36: 371-88.
- Beaz-Hidalgo R, Latif-Eugenín F, Hossain MJ, Berg K, Niemi RM, Rapala J, Lyra C, Liles MR, Figueras MJ, 2015. *Aeromonas aquatica* sp. nov., *Aeromonas finlandiensis* sp. nov. and *Aeromonas lacus* sp. nov. isolated from Finnish waters associated with cyanobacterial blooms. *Syst Appl Microbiol* 38:161-8.
- Buckley JT, Halasa H, MacIntyre S, 1982. Purification and partial characterization of a bacterial phospholipid: cholesterol acyltransferase. *J Biol Chem* 257: 3320-5.

- Cascón Soriano A, Anguita Castillo J, Hernanz Moral C, Sánchez Salazar M, Yugueros Marcos J, Naharro Carrasco G, 1997. RFLP-PCR analysis of the *aroA* gene as a taxonomic tool for the genus *Aeromonas*. *FEMS Microbiol Lett* 156:199-204.
- Castro-Escarpulli G, Figueras MJ, Aguilera-Arreola G, Soler L, Fernández-Rendón E, Aparicio GO, Guarro J, Chacón MR, 2003. Characterisation of *Aeromonas* spp. isolated from frozen fish intended for human consumption in Mexico. *Int J Food Microbiol* 84: 41-9.
- Chacón MR, Castro-Escarpulli G, Soler L, Guarro J, Figueras MJ, 2002. A DNA probe specific for *Aeromonas* colonies. *Diagn Microbiol Infect Dis* 44:221-5.
- Chacón MR, Figueras MJ, Castro-Escarpulli G, Soler L, Guarro J, 2003. Distribution of virulence genes in clinical and environmental isolates of *Aeromonas* spp. *Van Leeuw J Microb* 84:269-78.
- Chen YF, Liang RS, Zhuo XL, Wu XT, Zou JX, 2012. Isolation and characterization of *Aeromonas schubertii* from diseased snakehead, *Channa maculata* (Lacepède). *J Fish Dis* 35: 421-430.
- Emekdas G, Aslan G, Tezcan S, Serin MS, Yildiz C, Ozturhan H, Durmaz R, 2006. Detection of the frequency, antimicrobial susceptibility, and genotypic discrimination of *Aeromonas* strains isolated from municipally treated tap water samples by cultivation and AP-PCR. *Int J Food Microbiol* 107:310-4.
- Figueira V, Vaz-Moreira I, Silva M, Manaia CM, 2011. Diversity and antibiotic resistance of *Aeromonas* spp. in drinking and waste water treatment plants. *Water Res* 45:5599-611.
- Figueras MJ, and Beaz-Hidalgo R, 2014. *Aeromonas*: Introduction, Detection by cultural and modern techniques. In: Batt C, Tortorello ML (eds). *Encyclopedia of food microbiology*. Elsevier Ltd, Oxford, UK, p.p. 25-30.
- Figueras MJ, and Beaz-Hidalgo R, 2015. Chapter 4. *Aeromonas* infections in humans. In: Graf J (ed). *Aeromonas*. Caister Academic Press, Connecticut, USA, p.p. 65-108.
- Igbinosa IH, Okoh AI, 2013. Detection and distribution of putative virulence associated genes in *Aeromonas* species from freshwater and wastewater treatment plant. *J Basic Microbiol* 53:895-901.

Janda JMand Abbott SL, 2010. The genus *Aeromonas*: taxonomy, pathogenicity, and infection. *Clin Microbiol Rev* 23: 35-73.

Khajanchi BK, Fadl AA, Borchardt MA, Berg RL, Horneman AJ, Stemper ME, Joseph SW, Moyer NP, Sha J, Chopra AK, 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* 76:2313-25.

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

Liu JY, Li AH, 2012. First case of *Aeromonas schubertii* infection in the freshwater cultured snakehead fish, *Ophiocephalus argus* (Cantor), in China. *J Fish Dis* 35: 335-42.

Martone-Rocha S, Piveli RP, Matté GR, Dória MC, Dropa M, Morita M, Peternella FA, Matté MH, 2010. Dynamics of *Aeromonas* species isolated from wastewater treatment system. *J Water Health* 8:703-11.

Nagar V, Shashidhar R, Bandekar JR, 2013. Characterization of *Aeromonas* strains isolated from Indian foods using rpoD gene sequencing and whole cell protein analysis. *World J Microbiol Biotechnol* 29:745-52.

Ottaviani D, Santarelli S, Bacchiocchi S, Masini L, Ghittino C, Bacchiocchi I, 2006. Occurrence and characterization of *Aeromonas* spp. in mussels from the Adriatic Sea. *Food Microbiol* 23:418-22.

Pablos M, Huys G, Cnockaert M, Rodríguez-Calleja JM, Otero A, Santos JA, García-López ML, 2011. Identification and epidemiological relationships of *Aeromonas* isolates from patients with diarrhea, drinking water and foods. *Int J Food Microbiol* 147:203-10.

Pérez L, Abarca ML, Latif-Eugenín F, Beaz-Hidalgo R, Figueras MJ, Domingo M, 2015. *Aeromonas dhakensis* pneumonia and sepsis in a neonatal Risso's dolphin (*Grampus griseus*) from the Mediterranean Sea. *Dis Aquat Organ* (In Press, doi: 10.3354/dao02899).

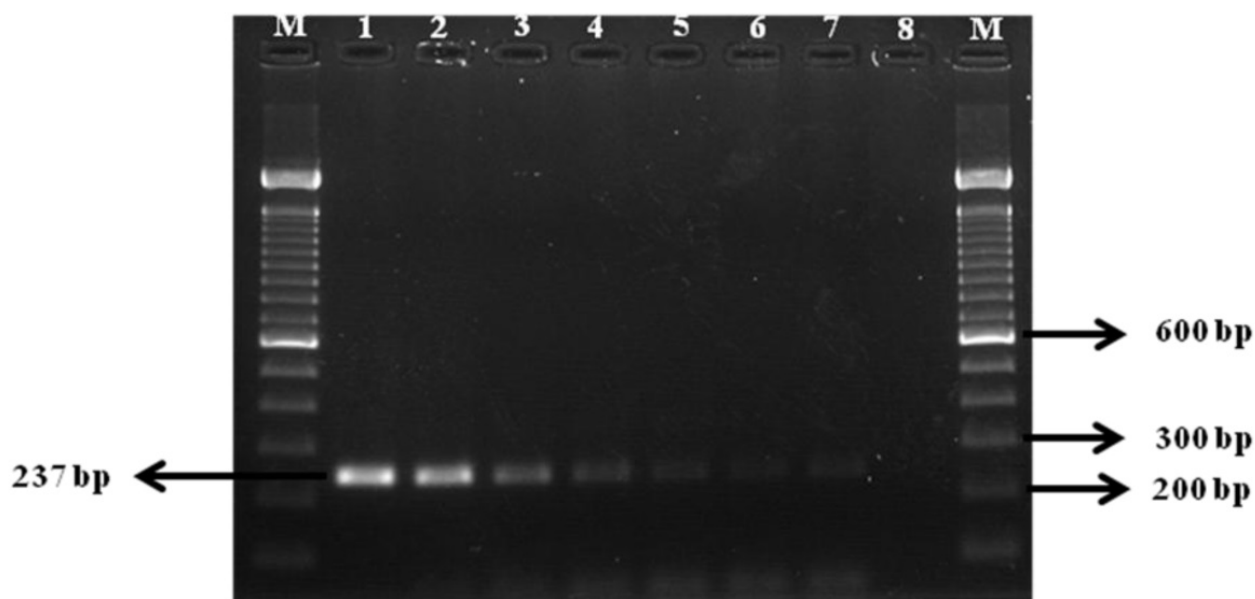
Puthucheary SD, Pua SM, Chua KH, 2012. Molecular characterization of clinical isolates of *Aeromonas* species from Malaysia. *PLoS One* 7:e30205.

Robertson BK, Harden C, Selvaraju SB, Pradhan S, Yadav JS. 2014. Molecular detection, quantification and toxigenicity profiling of *Aeromonas* spp. in source and drinking water. *Open Microbiol J* 8:32-9.

Soler L, Figueras MJ, Chacón MR, Vila J, Marco F, Martinez-Murcia AJ, Guarro J, 2002. Potential virulence and antimicrobial susceptibility of *Aeromonas popoffii* recovered from freshwater and seawater. *FEMS Immunol Med Microbiol* 32:243-7.

Vega-Sánchez V, Latif-Eugenín F, Soriano-Vargas E, Beaz-Hidalgo R, Figueras MJ, Aguilera-Arreola MG, Castro-Escarpulli G, 2014. Re-identification of *Aeromonas* isolates from rainbow trout and incidence of class 1 integron and  $\beta$ -lactamase genes. *Vet Microbiol* 172:528-33.

(A)



(B)

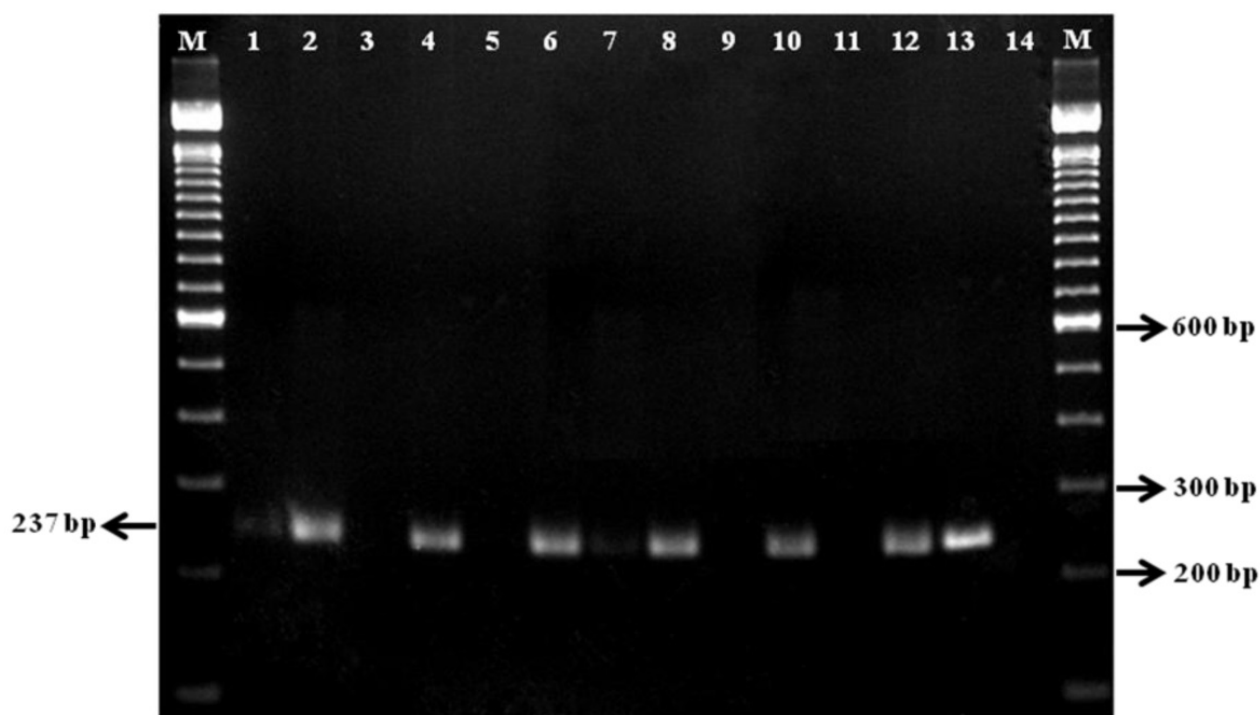


Figure 1. (A) Sensitivity and specificity of the GCAT-PCR protocol using DNA from the artificially inoculated unenriched distilled water samples with different concentrations of mixed cultures of *A. hydrophila* CECT 839<sup>T</sup>, *P. shigelloides* CECT 597, *V. parahaemolyticus* CECT 588, *E. coli* CECT 744 and *P. aeruginosa* CECT 110<sup>T</sup>. Lanes: 1-7, bacterial concentration ranged from  $2.5 \times 10^6$  to  $2.5 \times 10^0$  cfu/ml; 8, negative control; M: molecular weight ladder (100 to 2072 bp, Invitrogen); (B) Molecular detection of *Aeromonas* sp. by GCAT-PCR in water samples (Lanes 1 to 12). Lanes: 1,3,5,7,9,11: correspond to unenriched samples; 2,4,6,8,10,12: correspond to enriched samples with APW-A at 30°C for 24 hours; 13, positive control; 14, negative control; M: molecular weight ladder (100 to 2072 bp, Invitrogen). Numbers on the left indicate the size of the GCAT amplified product (237 bp) and numbers on the right indicate the position of the molecular size marker.

### **4.1.3. Evaluation of different conditions and culture media for the recovery of *Aeromonas* spp. from reclaimed water and shellfish samples. (En preparación).**

#### **Resumen**

En este estudio se compara y se determina cual es la mejor metodología de cultivo (directo y/o enriquecimiento) y medio de cultivo (Agar Dextrina Ampicilia, ADA; Agar Almidón Ampicilina, SAA y Bilis Irgasán Verde Brillante modificado, BIBG-m) para la recuperación de *Aeromonas* spp. a partir de muestras de agua regenerada y de marisco. Utilizando todos los medios de cultivo se detectó la presencia de *Aeromonas* en el 75% (15/20) de las muestras de agua regenerada y en el 90,1% (10/11) de las de marisco. El análisis estadístico determinó que el ADA es el medio de cultivo más específico ( $P < 0,05$ ) para la detección de *Aeromonas* a partir de agua regenerada. Sin embargo, no hubo diferencia significativa en el caso de los marisco ( $P > 0,05$ ). Tampoco se observaron diferencias estadísticamente significativas cuando se analizó si la metodología de cultivo afectaba la recuperación de especies de *Aeromonas* a partir de aguas regenerada y marisco. Dado que la siembra directa no requiere un paso previo de incubación de 24h para el enriquecimiento, esta metodología es la más óptima para el análisis de este tipo de muestras, recomendándose el ADA como medio de cultivo más óptimo para el análisis de agua regenerada y cualquiera de los tres medios ensayados para el análisis de marisco.





**Evaluation of different conditions and culture media for the recovery of  
*Aeromonasspp.* from reclaimed water and shellfish samples.**

**F. Latif-Eugenín, R. Beaz-Hidalgo, M.J. Figueras\*.**

Unidad de Microbiología, Facultad de Medicina y Ciencias de la Salud, IISPV,  
Universidad Rovira i Virgili, Sant Llorenç 21, 43201 Reus, Spain.

\*Corresponding author: Unidad de Microbiología, Facultad de Medicina y Ciencias de  
la Salud, IISPV, Universidad Rovira i Virgili, Sant Llorenç 21, 43201 Reus, Spain. Tel:  
+34-977759321; Fax: +34-977759322; E-mail: mariajose.figueras@urv.cat



## **Abstract**

A comparative study to determine what is the best culture approach (direct plating and/or enrichment) and culture medium (Ampicillin Dextrin Agar, ADA; Starch Ampicillin Agar, SAA and Bile Irgasan Brilliant Green-modified, BIBG-m) for the recovery of *Aeromonas* spp. from reclaimed water and shellfish samples was performed. *Aeromonas* were found in 75% (15/20) reclaimed water and 90.9% (10/11) shellfish samples using all media. The analysis determined that ADA was the most specific ( $P < 0.05$ ) culture media for detecting *Aeromonas* in reclaimed water samples. However, no statistical significant differences were found in the case of seafood ( $P > 0.05$ ). Moreover, when analyzing if the culture approach and culture media, affected the recovery of the different *Aeromonas* species from reclaimed water and seafood, no statistically significant differences were found ( $P > 0.05$ ).

Key words: *Aeromonas*, direct plating, enrichment, ADA, SAA, BIBG-m, reclaimed water, shellfish.



## 1. Introduction

The genus *Aeromonas* was described by Stainer in 1943 (Martin-Carnahan and Joseph, 2005) and to date is formed by 30 species (Beaz-Hidalgo *et al.*, 2015). These species are considered autochthonous of the aquatic environment, because most of them have been isolated from fresh water, sea water, drink water and sewage and they can be isolated too from healthy and diseased fish, chironomid eggs masses and from intestinal and extraintestinal human samples (Borrell *et al.*, 1998; Castro-Escarpulli *et al.*, 2002; Figueras, 2005; Janda & Abbott, 2010; Figueras *et al.*, 2011; Beaz-Hidalgo *et al.*, 2012; Figueras & Beaz-Hidalgo, 2015). The species of this genus are considered emerging pathogens in humans and can affect both immunocompetent and immunocompromised individuals that can be infected by consumption of contaminated water and food or by direct contact of wounds with environmental waters (Figueras, 2005; Janda & Abbott, 2010; Figueras & Beaz-Hidalgo, 2015).

Correct identification of *Aeromonas* spp. is complex and laborious, but so is the detection and isolation of this bacteria (Jeppesen, 1995; Perales, 2003). A variety of selective and differential media have been proposed for the isolation of *Aeromonas* but no single medium has received a general acceptance (Jeppesen, 1995; Perales, 2003).

The culture media first used for the recovery of *Aeromonas* from environmental samples include glutamate starch penicillin agar (GSP, Kielwein, 1969), *Aeromonas* medium (Am, Rippey & Cabelli, 1979), ampicillin dextrin agar (ADA, Havelaar *et al.*, 1987), mix agar (Cunliffe & Adcoch, 1989) and starch glutamate ampicillin penicillin C-glucose agar (SGAP-10C, Huguet & Ribas, 1991). For the isolation of *Aeromonas* from food, other culture media has been described, such as starch ampicillin agar (SAA, Palumbo *et al.*, 1985), MacConkey xilose agar (MXA, Okrend *et al.*, 1987), MacConkey mannitol agar (MMA, Okrend *et al.*, 1987) and bile salts irgasan brilliant green modified (BIBG-m, Neyts *et al.*, 2000). Moreover, other culture media as rimler shotts (RS, Shott & Rimler, 1973), peptone beef extract glycogen agar (PBG, McCoy & Pilcher, 1974), bile salt brilliant green starch agar (BBGS, Nishikawa & Kishi, 1987), ryan medium (anonymous, 1990) have been described to be used both in food and environmental samples.

In this study will be evaluated specifically three culture media, as ADA, originally described for the analysis of different type water (sewage, lake, river, sea and drinking

water); SAA, that was developed for tested food as fish and shellfish and BIBG-m that corresponded to a improvement of the BIBG medium (initially designed for the isolation of *Aeromonas* spp. from faeces) for be used for the *Aeromonas* detection from food as shrimp, minced meat and vegetables. Currently, the ADA medium is the most used for the detection of *Aeromonas* from water samples and is the reference medium that we used in our laboratory. Moreover, after a review of the literature related with this topic, we choose another two culture media, as SAA and BIBG-m based on the good results for sensitivity and specificity that were reported in previous studies and we decided to compare these three culture medium for the *Aeromonas* detection from complex matrix as reclaimed water and seafood samples.

When it is suspected that the number of *Aeromonas* is low in a samples or when the cells are stressed it is recommended to introduce an enrichment step of the samples. The enrichment medium most commonly used are alkaline peptone water (APW) and trypticase soy broth (TSB), supplemented with antibiotics, being the most used the ampicillin and cephalotin (Gobat & Jemmi, 1995; Sachan & Agarwal, 2000).

The main problem for the recovery of *Aeromonas* is the presence of competing microbes and the high or low levels of the bacteria counts present in the food and environmental samples. Therefore, when choosing a culture media for the isolation of *Aeromonas*, we should know the sensibility and selectivity of the culture media used as well as the facility to differentiate the colonial morphology of *Aeromonas* from that of back ground microorganisms. The objective of this work was to determine the efficacy of introducing an enrichment step for the recovery of *Aeromonas* and the evaluation of the selectivity and sensitivity of three culture media (ADA, SAA and BIBG-m) for the recovery of these bacteria from food and reclaimed water samples.

## **2. Materials and methods**

### *Bacterial reference strains*

The 27 *Aeromonas* type strains and four not *Aeromonas* strains (competitive microorganisms) were used in this study as shown in the table 1.

### *Culture media*

The three culture media compared were Dextrin Ampicillin Agar (ADA, HIMEDIA®, India, described by Havelaar *et al.*, 1987) used as reference medium in our laboratory,

Starch Ampicillin Agar (SAA, Palumbo *et al.*, 1985) and Bile salts Irgasan Brilliant Green-modified (BIBG-m, Neyts *et al.*, 2000). The commercialized ADA medium, SAA and BIBG-m were prepared in our laboratory according to the provided instructions. The characteristics of these medium are listed in the table S1. The Trypticase Soy Agar (TSA, Difco, France) was used as control. All medium were incubated in aerobic condition at 30°C for 24 hours, except were testing *Aeromonas salmonicida* (CECT 894<sup>T</sup>) that was incubated at room temperature for 24-48 hours. All tests were performed in triplicate.

#### *Selectivity and sensitivity of the culture media using artificially inoculated distilled water sample*

All bacterial strains listed in table 1 were directly inoculated in the three culture media and on TSA for verify their growth, colony characteristics and selectivity.

To evaluate the bacterial growth the Petri dish (90 mm diameter) was streaked in three different directions and covering the entire surface of the plate. Therefore, when growth was observed in the three directions, the bacterial growth was considered abundant (+++), if the bacteria grew only in two directions, was considered regular (++) and when only grew in one direction was considered scarce (+).

To determine the sensibility of the culture media tested, sterile distilled water samples were artificially contaminated with pure culture of *Aeromonas hydrophila* CECT 389<sup>T</sup>, *Aeromonas caviae* CECT 838<sup>T</sup>, *Aeromonas salmonicida* CECT 894<sup>T</sup> and *Aeromonas trota* CECT 4255<sup>T</sup>. These *Aeromonas* strains were chosen randomly, except the strain *Aeromonas trota* CECT 4255<sup>T</sup> described as susceptible to ampicillin (Carnahan *et al.*, 1991) which is the antimicrobial used as selective agent both in ADA and SAA, because except this species, the rest are resistant to this antibiotic. For this, all strains were inoculated in 10 ml of Trypticase Soy Broth (TSB) and incubated at 30°C for 18 hours and after were adjusted to a optical density of 0.8 (measured at 450 nm) which corresponded to a concentration of approximately 10<sup>8</sup> cfu/ml. For each strain serial 10-fold dilutions were performed using sterile distilled water samples and 100 µl of each dilutions were inoculated on TSA, ADA, SAA and BIBG-m to perform the bacterial counts, that were estimated as the average obtained from a triplicate inoculation.

#### *Reclaimed water and shellfish sampling*



A total of 31 samples, that corresponded 11 to shellfish and 20 to reclaimed water samples used for irrigation of vegetables, were investigated in parallel using ADA, SAA and BIBG-m.

### ***Isolation and detection of Aeromonas sp.***

All samples analyzed were cultured directly. For this ten-fold serial dilutions using Buffered Peptone Water (BPW) were performed and 100 µl were inoculated on the different culture media and incubated at 30°C for 24 hours. In parallel, an enrichment step with Alkaline Peptone Water (APW) supplemented with Ampicillin (10 mg/l, APW-A) was done for all samples. For this, 1 ml of water samples were homogenized with 9 ml of APW-A (1:10 vol/vol). In the case of shellfish, 10 gr of these were homogenized with 90 ml of APW-A (1:10 wt/vol). This mix was incubated at 30°C for 24 hours, and after ten-fold serial dilutions were performed using BPW and then 100 µl were inoculated on the three media (ADA, SAA and BIBG-m) and incubated under the same conditions. After the incubation period the plates were observed for the recognition of *Aeromonas* sp. from direct and enrichment culture and from each culture media, 8 colonies suspected to belong to the genus were transferred to TSA to obtain a pure culture and start with the genotyping and molecular identification.

In parallel to the direct plate count of *Aeromonas*, an enumeration using the Most Probable Number (MPN) method was performed. For this, serial dilutions of the samples with BPW were done and after inoculated in APW-A and incubated at 30°C for 24 hours and directly inoculated in ADA and incubated at 30°C for 24 hours for determine the presence or absence of *Aeromonas*.

### ***Genotyping and molecular identification***

A total of 48 typical colonies of *Aeromonas* (24 from direct culture and 24 from enrichment culture) were transferred to TSA and the DNA extraction of one colony was performed using InstaGene Matrix (BioRad) according to manufacturer's instructions.

All isolates were identified to genus level using the PCR detection of Glycerophospholipid Cholesterol Acyltransferase (GCAT) characteristic of the *Aeromonas* genus (Chacón *et al.*, 2002). To avoid working with clonally related isolates, DNA typing was carried out with the Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus PCR (ERIC-PCR) technique using the primers and conditions described by Versalovic

*et al.* (1991). The molecular identification to species level was performed using the *rpoD* gene sequencing using primers and conditions described by Soler *et al.* (2004).

#### *Statistical analyzes*

The data were analyzed by two-way ANOVA model with respect to the type of culture (direct and enrichment culture) and three culture media (ADA, SAA and BIBG-m) tested, using the Bonferroni correction for multiples comparison. The significance level was fixed at  $P < 0.05$ . All the analyses were performed using SigmaPlot 11.0 (SSI, California, USA).

### **3. Results**

#### *Selectivity and sensitivity of the culture media using artificially inoculated distilled water sample*

As shown in the table 1, of the 27 *Aeromonas* type strains directly inoculated in the 3 culture media tested, all (26/27, 96.3%), except *A. trota* CECT 4255<sup>T</sup>, grew in ADA and presented a abundant growth. In the case of SAA, all (25/27, 95.3%), except *A. media* CECT 4232<sup>T</sup> and *A. trota* CECT 4255<sup>T</sup>, grew in this medium. Only 22 strains showed abundant growth on SAA, because *A. schubertii* CECT 4240<sup>T</sup> showed a regular growth and *A. salmonicida* CECT 894<sup>T</sup> and *A. sobria* CECT 4245<sup>T</sup> presented scarce growth. With BIBG-m, the 100% of *Aeromonas* type strains were recovered, but only 25 strains grew abundantly in this medium, while that *A. schubertii* CECT 4240<sup>T</sup> and *A. salmonicida* CECT 894<sup>T</sup> grow only poorly.

In relation with the growth of *Pseudomonas aeruginosa* CECT 110<sup>T</sup>, *Plesiomonas shigelloides* CECT 597, *Vibrio parahaemolyticus* CECT 588 and *Escherichia coli* CECT 744 in the 3 culture media tested, the BIBG-m medium was the most selective (100%), while that ADA was not selective, allowing growth of this four organisms (table 1). In ADA this four bacteria grow showing colorless to whitish colour colonies of 1-2 mm of diameter.

The table 2 show that both ADA and SAA presented the same sensitivity for the recovery of *A. hydrophila* CECT 839<sup>T</sup>, *A. caviae* CECT 838<sup>T</sup> and *A. salmonicida* CECT 894<sup>T</sup> from artificially contaminated distilled water samples and both ADA and SAA showed a better sensibility with statistical differences in comparison with BIBG-m

(ADA= SAA  $P < 0.05$  BIBG-m). In relation with *A. trota* CECT 4255<sup>T</sup>, this strain only grow in BIBG-m.

#### *Recovery of Aeromonas from reclaimed water and shellfish samples*

Of the 20 reclaimed water samples analyzed, 15 (75%) were positive for the presence of *Aeromonas* sp. after enrichment and MPN and 13 (65%) samples by direct culture (footnote in the table3). The four seawater samples and one irrigation water samples were negative for the presence of this bacteria with all methods used. In the case of the shellfish, in 10/11 (90,9%) samples were detected *Aeromonas* sp. using enrichment and MPN and only 6 (54,5%) shellfish samples were positive by direct culture (footnote in the table3).

The results obtained of the direct plate counts (ADA, SAA and BIBG-m) and MPN (ADA) method are shown in the table 3. Not significant differences ( $P > 0.05$ ) in the recovery of *Aeromonas* using different culture media both in reclaimed water and seafood samples were observed.

As shown in table 4, the more specific media for the reclaimed water and shellfish samples, were ADA (98.4%) and BIBG-m (90.5%) respectively. The statistical analysis revealed that in the case of the reclaimed water samples the specificity of the ADA was significantly superior ( $P < 0.05$ ) to that of SAA and BIBG-m. No statistically significant difference between the culture media were found for the seafood samples.

The table 5 shows that of total of 705 *Aeromonas* isolates recovered from reclaimed water samples 658 (93.3%) of them were positive for the GCAT and belonged to 436 different *Aeromonas* genotypes or strains (66.3% of genetic diversity). Similar percentage of recovery were observed to compare both the approach of culture and culture media used. In relation to the shellfish, a total of 335 isolates were obtained and 289 (86.3%) were identified as *Aeromonas* sp. after of the GCAT-PCR and corresponded to 156 (54.3% of genetic diversity) ERIC patterns (strains). The majority (63.5%) of them were recovered by enrichment culture and similar percentage of recovery were obtained when the culture media were compared.

As shown in the table 6, these 436 *Aeromonas* strains recovered from reclaimed water samples corresponded to a total of 12 species of *Aeromonas*, but only five species, *Aeromonas media*, *Aeromonas caviae*, *Aeromonas salmonicida*, *Aeromonas allosaccharophila* and *Aeromonas veronii*, represent the 94.4% of the total. The other

seven species of *Aeromonas* correspond to a total of 25 (5.7%) strains, which are detailed in the table 6, but that were treated as a whole to make appropriate statistical analyzes.

The table 7 showed a diversity of 10 species of *Aeromonas* recovered from shellfish samples. The most prevalent were *A. salmonicida*, *A. media*, and *A. caviaetha* that correspond to the 82.7% of the total. The remaining seven species correspond to 27 (17.3%) *Aeromonas* strains that were analyzed together for statistical comparisons.

The data showed in the tables 6 and 7, corresponding to reclaimed water and shellfish samples respectively, revealed that the variables approach of culture and media culture not influencing ( $P > 0.05$ ) the recovery of *Aeromonas* spp. The same results were obtained when the two variables (approach of culture and culture media) were analyzed separately and together. However, the use of enrichment allowed the recovery of species of *Aeromonas* rarely isolated in these types of matrix, as *Aeromonas bivalvium*, *Aeromonas sanarellii* and *Aeromonas eucrenophila* from reclaimed water samples and four isolates recovered from seafood, identified as *Aeromonas* sp. corresponding to a putative *Aeromonas* sp. nov. In the case of the direct culture, this made possible the recovery of species of *Aeromonas* with low frequency of isolation, as *Aeromonas popoffii* and *Aeromonas bestiarum* and of *Aeromonas fluvialis*, that correspond to the first report since its description by Alperi et al. (2010).

#### 4. Discussion

In relation with the results showed in the table 1 between 95.3% and 100% of the 27 type strain of *Aeromonas* grew on SAA, ADA and BIBG-m and all presented the typical size and colour described for each culture medium. However, five species of *Aeromonas*, *A. schubertii* CECT 4240<sup>T</sup>, *A. salmonicida* CECT 894<sup>T</sup>, *A. sobria* CECT 4245<sup>T</sup>, *A. media* CECT 4232<sup>T</sup> and *A. trota* CECT 4255<sup>T</sup> presented a poor growth or not growth on ADA, SAA or BIBG-m. To corroborate these results, we decided to evaluate other four additional strains of *A. sobria* and *A. media* on SAA medium and four different strains of *A. salmonicida* and *A. schubertii* in SAA and BIBG-m. In all cases, the new strains tested showed abundant growth in SAA and/or BIBG-m and the colonial characteristics (colour and size) were the typical for *Aeromonas*. Therefore, this results indicate that recovery of each species of *Aeromonas* is strain independent. Similar results

have been reported by Gavriel & Lamb (1995), who compared 3 culture media, ADA, glutamate starch penicillin agar (GSP) and starch glutamate ampicillin penicillin agar (SGAP-10C), and found that *A. sobria* grew in ADA only, while *A. schubertii* did not grow in any of the culture media tested. The results obtained with *A. trota* CECT 4255<sup>T</sup> in our study (growth in BIBG-m only and not growth on ADA and SAA) are in agreement with what could be expected because this species was described as ampicillin susceptible (Carnahan *et al.*, 1991; Abbott *et al.*, 2003). This antibiotic is the selective agent both of ADA and SAA medium, but not of the BIBG-m medium. Moreover, the genus *Aeromonas*, is considered to be generally resistant to this antibiotic with the exception commented.

In relation with the selectivity of the culture media tested (Table 1), the BIBG-m was the most selective medium, allowing the growth of only *Aeromonas* strains, but not the growth of another bacteria (Table 1). This result is in agreement with the reported by Neyts *et al.* (2000) that used 27 *Aeromonas* strains, 10 species of Enterobacteriaceae, four *Pseudomonas* strains and one strain of *Shewanella putrefaciens* for comparing the selectivity of the BIBG and BIBG-m medium by direct inoculation and determined that while on BIBG medium grew all bacterial strain tested, in BIBG-m grew only one Enterobacteriaceae (*Citrobacter freundii*) and the four *Pseudomonas* strains. Moreover, this results were confirmed by the authors when artificially contaminated food samples (shrimp, minced meat pre-cut leek and shredded carrot) were tested with the media. Similar results to the our were presented by Villari *et al.* (1999) that compared the selectivity of six culture media using 12 artificially contaminated water samples with fecal material but free of *Aeromonas* sp. and demonstrated that the lower selective were ADA and SAA medium.

The present study demonstrated that both ADA and SAA have the same sensitivity and that these is superior to that of BIBG-m (table 2) when artificially inoculated distilled water samples were analyzed. Similar results were found in 1999, when Villari *et al.* tested the sensibility of the six culture medium using 18 sterile tap samples water artificially contaminated with nine *Aeromonas* strains, at concentration ranged between 1-10 cfu/ml and determined that SAA and ADA were the most sensitive medium.

When reclaimed water samples were analyzed, the ADA medium showed a superior specificity (98.4%) than SAA y BIBG-m ( $P < 0.005$ ). This result is in agreement with

the reported by Holmes & Sartory (1993) when analyzed 146 drinking water samples and 153 of water samples from different sources and obtained a specificity of 90% and 95% in each case, showing to the ADA medium as one of the most specific medium for water samples.

Moreover, our results showed that the culture media used not influenced the recovery of *Aeromonas* spp. from reclaimed water and shellfish samples. The same results were obtained by Holmes & Sartory (1993) when reported that the diversity of *Aeromonas* recovered from water samples were the same in all culture media tested.

The present study revealed that the approach of culture (with or without enrichment culture) neither influenced the recovery of *Aeromonas* spp. when reclaimed water and shellfish were analyzed, but in the case of shellfish samples, the enrichment step increased the detection of *Aeromonas* (63.5%). Similar results were reported by Gobat & Jemmi (1995) that obtained a 24.1% (200/829) of food samples positive for the presence of *Aeromonas* and only a 7.4% of the samples were positive by direct culture, while the 20.5% were positive after enrichment step.

## 5. Conclusion

In conclusion, is important to remark that the ADA and SAA were de most sensitivity medium when the artificially water samples were analyzed. Moreover, the BIGB-m was the most selective medium. On the other hand, the usefulness of ADA is ratified for the *Aeromonas* detection from water samples, showing as the most specificity medium. Finally, although it was demonstrated that the variables analyzed in this studies, as approach of culture (direct and enrichment culture) and the culture media (ADA, SAA and BIBG-m) tested do not influence the recovery of *Aeromonas* spp. from reclaimed water and shellfish samples, is important remark that the use of enrichment step allowed the recovery of species of *Aeromonas* rarely isolated.

## 6. Acknowledgements

This study was supported by the project with reference AGL2011-30461-C02-02 of the Ministerio de Ciencia e Innovación (Spain).

**Table 1. Growth and colonial characteristics of the 27 *Aeromonas* type strains and 4 competitive microorganisms in the 3 culture media tested in comparison with TSA.**

Organisms	Growth on			
	TSA	ADA	SAA	BIBG-m
<i>A. hydrophila</i> CECT 839 <sup>T</sup>	+++	+++ <sup>a</sup>	+++ <sup>a</sup>	+++ <sup>a</sup>
<i>A. salmonicida</i> CECT 894 <sup>T</sup>	+++	+++ <sup>a</sup>	+ <sup>a</sup>	+ <sup>a</sup>
<i>A. sobria</i> CECT 4245 <sup>T</sup>	+++	+++ <sup>a</sup>	+ <sup>a</sup>	+++ <sup>a</sup>
<i>A. media</i> CECT 4232 <sup>T</sup>	+++	+++ <sup>a</sup>	-	+++ <sup>a</sup>
<i>A. veronii</i> CECT 4257 <sup>T</sup>	+++	+++ <sup>a</sup>	+++ <sup>a</sup>	+++ <sup>a</sup>
<i>A. caviae</i> CECT 838 <sup>T</sup>	+++	+++ <sup>a</sup>	+++ <sup>a</sup>	+++ <sup>a</sup>
<i>A. eucrenophila</i> CECT 4224 <sup>T</sup>	+++	+++ <sup>a</sup>	+++ <sup>a</sup>	+++ <sup>a</sup>
<i>A. schubertii</i> CECT 4240 <sup>T</sup>	+++	+++ <sup>a</sup>	++ <sup>b</sup>	++ <sup>a</sup>
<i>A. jandaei</i> CECT 4228 <sup>T</sup>	+++	+++ <sup>a</sup>	+++ <sup>a</sup>	+++ <sup>a</sup>
<i>A. trota</i> CECT 4255 <sup>T</sup>	+++	-	-	+++ <sup>a</sup>
<i>A. allossacharophila</i> CECT 4199 <sup>T</sup>	+++	+++ <sup>a</sup>	+++ <sup>b</sup>	+++ <sup>a</sup>
<i>A. encheleia</i> CECT 4342 <sup>T</sup>	+++	+++ <sup>a</sup>	+++ <sup>b</sup>	+++ <sup>a</sup>
<i>A. bestiarum</i> CECT 4227 <sup>T</sup>	+++	+++ <sup>b</sup>	+++ <sup>a</sup>	+++ <sup>a</sup>
<i>A. popoffii</i> CECT 5176 <sup>T</sup>	+++	+++ <sup>b</sup>	+++ <sup>b</sup>	+++ <sup>c</sup>
<i>A. simiae</i> IBS S6874 <sup>T</sup>	+++	+++ <sup>a</sup>	+++ <sup>a</sup>	+++ <sup>a</sup>
<i>A. molluscorum</i> CECT 5864 <sup>T</sup>	+++	+++ <sup>b</sup>	+++ <sup>b</sup>	+++ <sup>c</sup>
<i>A. bivalvium</i> CECT 7113 <sup>T</sup>	+++	+++ <sup>a</sup>	+++ <sup>a</sup>	+++ <sup>a</sup>
<i>A. tecta</i> CECT 7082 <sup>T</sup>	+++	+++ <sup>a</sup>	+++ <sup>a</sup>	+++ <sup>a</sup>
<i>A. piscicola</i> CECT 7443 <sup>T</sup>	+++	+++ <sup>b</sup>	+++ <sup>a</sup>	+++ <sup>a</sup>
<i>A. fluvialis</i> CECT 7401 <sup>T</sup>	+++	+++ <sup>a</sup>	+++ <sup>a</sup>	+++ <sup>a</sup>
<i>A. taiwanensis</i> CECT 7403 <sup>T</sup>	+++	+++ <sup>a</sup>	+++ <sup>a</sup>	+++ <sup>a</sup>
<i>A. sanarellii</i> CECT 7402 <sup>T</sup>	+++	+++ <sup>a</sup>	+++ <sup>a</sup>	+++ <sup>a</sup>
<i>A. diversa</i> CECT 4254 <sup>T</sup>	+++	+++ <sup>b</sup>	+++ <sup>b</sup>	+++ <sup>a</sup>
<i>A. rivuli</i> CECT 7518 <sup>T</sup>	+++	+++ <sup>a</sup>	+++ <sup>a</sup>	+++ <sup>a</sup>
<i>A. cavernicola</i> CECT 7862 <sup>T</sup>	+++	+++ <sup>b</sup>	+++ <sup>b</sup>	+++ <sup>c</sup>
<i>A. australiensis</i> CECT 8023 <sup>T</sup>	+++	+++ <sup>a</sup>	+++ <sup>a</sup>	+++ <sup>a</sup>
<i>A. dhakensis</i> CECT 5744 <sup>T</sup>	+++	+++ <sup>b</sup>	+++ <sup>b</sup>	+++ <sup>c</sup>
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> CECT 110 <sup>T</sup>	+++	+++ <sup>d</sup>	+++ <sup>d</sup>	+++ <sup>d</sup>
<i>Plesiomonas shigelloides</i> CECT 597	+++	+++ <sup>d</sup>	-	-
<i>Vibrio parahaemolyticus</i> CECT 588	+++	+++ <sup>e</sup>	+ <sup>d</sup>	-
<i>Escherichia coli</i> CECT 744	+++	+++ <sup>e</sup>	-	-

TSA: Trypticase Soy Agar; ADA: Ampicillin Dextrin Agar; SAA: Starch Ampicillin Agar; BIBG-m: Bile Irgan Brilliant Green- modified Agar; +++: abundant; ++: regular; +: scarce; -: not growth; <sup>a</sup>colonial characteristics (colour and size) are in agree with the description of each culture media; <sup>b</sup>light yellow to whitish colonies and normal size, <sup>c</sup>light purple to whitey purple colonies and normal size, <sup>d</sup>colorless colony, 1-2 mm of diameter; <sup>e</sup>whitish colony, 1-2 mm of diameter.

**Table 2. Sensibility of the three culture media compared in this study and percentage of recovery of *Aeromonas* isolated from artificially contaminated distilled water samples.**

<i>Aeromonas</i> sp. (initial inoculum in TSA, cfu/ml)	Culture media	<i>Aeromonas</i> count in cfu/ml by dilution (% recovery)		
		10 <sup>-6</sup>	10 <sup>-7</sup>	10 <sup>-8</sup>
<i>A. hydrophila</i> CECT 839 <sup>T</sup> (2.5x10 <sup>8</sup> )	ADA <sup>a</sup>	223 (99.1)	24 (96)	3 (100)
	SAA <sup>a</sup>	225 (100)	26 (100)	2 (80)
	BIBG-m	190 (76)	11 (44)	0 (0)
<i>A. caviae</i> CECT 838 <sup>T</sup> (2.9x10 <sup>8</sup> )	ADA <sup>a</sup>	267 (92.1)	29 (100)	2 (69)
	SAA <sup>a</sup>	263 (90.7)	26 (89.7)	2 (69)
	BIBG-m	220 (75.9)	19 (65.5)	1 (34.5)
<i>A. salmonicida</i> CECT 894 <sup>T</sup> (2.4x10 <sup>8</sup> )	ADA <sup>a</sup>	203 (85.6)	24 (100)	2 (83.3)
	SAA <sup>a</sup>	205 (85.4)	32 (100)	1 (41.7)
	BIBG-m	161 (67.1)	9 (37.5)	0 (0)
<i>A. trota</i> CECT 4255 <sup>T</sup> (3.3x10 <sup>8</sup> )	ADA	ND	ND	ND
	SAA	ND	ND	ND
	BIBG-m	281 (84.8)	19 (57.6)	1 (30.3)

ADA: Ampicillin Dextrin Agar; SAA: Starch Ampicillin Agar; BIBG-m: Bile Irgasan Brilliant Green- modified Agar;  
 ND: no detected; <sup>a</sup>ADA= SAA P < 0,05 BIBG-m.



**Table 3. Average of the *Aeromonas* count recovered from reclaimed water and shellfish samples by direct count plate and MPN methods.**

Reference samples (total number of positive samples)	Direct platecount (cfu/100ml)			MPN/100ml <sup>a</sup>
	ADA	SAA	BIBG-m	
<i>Reclaimed water (15)</i>				
Average <sup>b</sup>	8.03E+04	6.28E+04	5.01E+04	2.89E+05
<i>Shellfish (10)</i>				
Average <sup>c</sup>	1.11E+03	1.14E+03	1.17E+03	1.15E+04

ADA: Ampicillin Dextrin Agar; SAA: Starch Ampicillin Agar; BIBG-m: Bile Irgasan Brilliant Green- modified Agar; <sup>a</sup>This method was performed using ADA only; <sup>b</sup>The average corresponding to the direct count plate was calculate based in the 13 reclaimed water samples that were positive for the presence of *Aeromonas*. However, the average corresponding to the MPN is based in the 15 reclaimed water samples that were positive for the presence of *Aeromonas*. These same 15 reclaimed water samples were positive after enrichment step using APW-A. The four seawater and one irrigation water samples were negative for the presence of *Aeromonas* using the three detection methods; <sup>c</sup>The average corresponding to the direct count plate was calculate based in the six shellfish samples that were positive for the presence of *Aeromonas*. However, the average corresponding to the MPN is based in the 10 shellfish samples that were positive for the presence of *Aeromonas*. These same 10 shellfish samples were positive after enrichment step using APW-A. One shellfish sample was negative for the presence of *Aeromonas* by all detection methods used in this study ADA = SAA = BIBG-m (P > 0.05).

**Table 4. Specificity of the 3 culture media used in this study for the detection of *Aeromonas* from reclaimed water and food samples.**

<b>Matrix (total number of isolates)</b>	<b>Culture media</b>	<b>Total number of isolates</b>	<b>Number of isolates GCAT (+)</b>	<b>Specificity (%)</b>
Reclaimed water (705)	ADA*	254	250	98.4
	SAA	255	229	89.8
	BIBG-m	196	179	91.3
Shellfish (335)	ADA	119	97	81.5
	SAA	121	106	87.6
	BIBG-m	95	86	90.5

ADA: Ampicillin Dextrin Agar; SAA: Starch Ampicillin Agar; BIBG-m: Bile Irgan Brilliant Green-modified Agar; \*ADA was significantly more specific ( $P < 0.05$ ) than SAA and BIBG-m.

**Table 5. Number and percentage of *Aeromonas* isolates recovered from reclaimed water and shellfish samples by type culture and culture media used.**

Matrix	Total number of isolates	Number (%) of isolates GCAT-PCR (+)	Number of genotypes (% of diversity)	Number (%) of isolates by type of culture		Number (%) of isolates by culture media		
				Direct	Enrichment	ADA	SAA	BIBG-m
Reclaimed water	705	658 (93.3)	436 (66.3)	202 (46.3)	234 (53.7)	177 (40.6)	149 (34.2)	110 (25.2)
Shellfish	335	289 (86.3)	156 (54)	57 (36.5)	99 (63.5)	50 (32.1)	59 (37.8)	47 (30.1)

ADA: Ampicillin Dextrin Agar; SAA: Starch Ampicillin Agar; BIBG-m: Bile Irgan Brilliant Green- modified Agar.

**Table 6. Prevalence (number of strains) of the different *Aeromonas* spp. recovered from reclaimed water samples depending upon the type of culture approach (direct and enrichment) and culture media (ADA, SAA and BIBG-m) used.**

Total number (%) of <i>Aeromonas</i> spp.	Direct culture				Enrichment culture			
	total n (%) of strains	n (%) strains by culture media			total n (%) of strains	n (%) strains by culture media		
		ADA	SAA	BIBG-m		ADA	SAA	BIBG-m
176 (40.4) <i>A. media</i>	93 (52.8)	42 (45.2)	25 (26.9)	26 (28)	83 (47.2)	42 (50.6)	28 (33.7)	13 (15.7)
101 (23.2) <i>A. caviae</i>	40 (39.6)	16 (40)	13 (32.5)	11 (27.5)	61 (60.4)	24 (39.3)	14 (23)	23 (37.7)
75 (17.2) <i>A. salmonicida</i>	32 (42.7)	9 (28.1)	16 (50)	7 (21.9)	43 (57.3)	10 (23.3)	22 (51.2)	11(25.6)
30 (6.9) <i>A. allosaccharophila</i>	9 (30)	5 (55.6)	3 (33.3)	1(11.1)	21 (70)	13 (61.9)	6 (28.6)	2 (9.5)
29 (6.7) <i>A. veronii</i>	13 (44.8)	3(23.1)	5 (38.5)	5 (38.5)	16 (55.2)	3 (18.8)	7 (43.8)	6 (37.5)
9 (2.1) <i>A. popoffii</i>	9 (100)	7 (77.8)	1(11.1)	1 (11.1)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
7 (1.6) <i>A. hydrophila</i>	1 (14.3)	0 (0)	1 (100)	0 (0)	6 (85.7)	0 (0)	4 (66.7)	2 (33.3)
3 (0.7) <i>A. bestiarum</i>	3 (100)	1 (33.3)	1 (33.3)	1(33.3)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
2 (0.5) <i>A. sobria</i>	2 (100)	0 (0)	2 (100)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
2 (0.5) <i>A. bivalvium</i>	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	2 (100)	1(50)	1(50)	0 (0)
1 (0.2) <i>A. sanarellii</i>	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (100)	0 (0)	0 (0)	1 (100)
1 (0.2) <i>A. eucrenophila</i>	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (100)	1 (100)	0 (0)	0 (0)
<b>TOTAL (n= 436)</b>	<b>202 (46.3)</b>	<b>83 (41.1)</b>	<b>67 (33.2)</b>	<b>52 (25.7)</b>	<b>234 (53.7)</b>	<b>94 (40.2)</b>	<b>82 (35)</b>	<b>58 (24.8)</b>

ADA: Ampicillin Dextrin Agar; SAA: Starch Ampicillin Agar; BIBG-m: Bile Irganon Brilliant Green-modified.

**Table 7. Prevalence of *Aeromonas* spp. isolated from shellfish samples depending upon the type of culture approach (direct and enrichment) and culture media (ADA, SAA and BIBG-m) used.**

Total number (%) of <i>Aeromonas</i> spp.	Direct culture				Enrichment culture			
	total n (%) of strains	n (%) strains by culture media			total n (%) of strains	n (%) strains by culture media		
		ADA	SAA	BIBG-m		ADA	SAA	BIBG-m
59 (37.8) <i>A.salmonicida</i>	18 (30.5)	4 (22.2)	9 (50)	5 (27.8)	41 (69.5)	8 (19.5)	18 (43.9)	15 (36.6)
41 (26.3) <i>A.media</i>	22 (53.7)	9 (40.9)	6 (27.3)	7 (31.8)	19 (46.3)	7 (36.8)	5 (26.3)	7 (36.8)
29 (18.6) <i>A.caviae</i>	7 (24.1)	3 (42.9)	4 (57.1)	0 (0)	22 (75.9)	7 (31.8)	8 (36.4)	7 (31.8)
10( 6.4) <i>A.allosaccharophila</i>	3 (30)	1 (33.3)	1 (33.3)	1 (33.3)	7 (70)	3 (42.9)	3 (42.9)	1 (14.3)
5 (3.2) <i>A.veronii</i>	2 (40)	1 (50)	0 (0)	1 (50)	3 (60)	1 (33.3)	1 (33.3)	1 (33.3)
4 (2.6) <i>Aeromonas sp. .</i>	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	4 (100)	3 (75)	1 (25)	0 (0)
3 (1.9) <i>A.hydrophila</i>	1 (33.3)	0 (0)	0 (0)	1(100)	2 (66.7)	0 (0)	1 (50)	1 (50)
3 (1.9) <i>A.popoffii</i>	2 (66.7)	2 (100)	0 (0)	0 (0)	1 (33.3)	0 (0)	1 (100)	0 (0)
1 (0.6) <i>A.fluvialis</i>	1 (100)	1 (100)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
1 (0.6) <i>A.bestiarum</i>	1 (100)	0 (0)	1 (100)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
<b>TOTAL (n= 156)</b>	<b>57 (36.5)</b>	<b>21 (36.8)</b>	<b>21 (36.8)</b>	<b>15 (26.3)</b>	<b>99 (63.5)</b>	<b>29 (29.3)</b>	<b>38 (38.4)</b>	<b>32 (32.3)</b>

ADA: Ampicillin Dextrin Agar; SAA: Starch Ampicillin Agar; BIBG-m: Bile Irganan Brilliant Green-modified.

**Table S1. Characteristics of the culture media compared in this study.**

<b>Medium</b>	<b>Original purpose</b>	<b>Selective agents</b>	<b>Differential agents</b>	<b>Interpretation - growth of <i>Aeromonas</i></b>	<b>Reference</b>
ADA	Water	Ampicillin, Sodium deoxycholate	Dextrin, Bromothymol blue	Yellow colonies, 1-2 mm of diameter	Havelaar <i>et al.</i> , 1987
SAA	Food	Ampicillin	Starch, Phenol red	Yellow to honey colonies, 3-5 mm of diameter, with clear zone surrounding the colony*	Palumbo <i>et al.</i> , 1985
BIBG-m	Food	Bile salts, irgasan, brilliant green, pH= 8,7 ± 0,2	Starch, Neutral red	Purple colonies, 1-1,5 mm of diameter	Neyts <i>et al.</i> , 2000

\*After incubation at 28° C for 24 hours it is necessary to flood the plate with 5 ml of lugol iodine solution to detect amylase activity.

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI  
AEROMONAS, UN MICROORGANISMO AMBIENTAL DE IMPORTANCIA EN SALUD HUMANA Y ANIMAL.  
Fadua Leila Latif Eugenín  
Dipòsit Legal: T 73-2016

## **4.2. Diversidad de especies de *Aeromonas* en aguas regeneradas, mariscos y vegetales**

### **4.2.1. Chlorinated and UV-treated reclaimed irrigation water is the source of *Aeromonas* found in vegetables used for human consumption. Latif-Eugenín F, Beaz-Hidalgo R, Figueras MJ. (Water Research, Sometido).**

#### **Resumen**

En la actualidad, el agua residual se utiliza como una fuente de agua ya que después de su tratamiento genera el agua regenerada que se utiliza para el riego de campos de cultivo y vegetales o verduras destinados al consumo humano. Algunas bacterias potencialmente patógenas como el género *Aeromonas* han sido aisladas a partir de aguas residuales tratadas que se utilizan para el riego agrícola, qué podría ser una fuente de transmisión de posibles patógenos y repercutir en la salud pública. Hasta ahora, no hay ningún estudio que haya investigado la relación clonal de bacterias del género *Aeromonas* presentes en el agua de riego y en los vegetales o cultivos regados con este tipo de agua. El objetivo de este estudio es determinar la diversidad y prevalencia de *Aeromonas* en agua regenerada y en tres variedades de vegetales regados con esta agua. El 63,6% (7/11) de las muestras de agua regenerada y el 100% de los vegetales (n=3/3) fueron positivas para la presencia de *Aeromonas*. Un total de 132 cepas de *Aeromonas* fueron identificadas mediante secuenciación del gen *rpoD* y se observó que pertenecían a 10 especies diferentes. Las prevalencias de las diferentes especies dependieron del tipo de muestra. En el agua residual el 91% de las cepas pertenecían a las especies *A. caviae* y *A. media*, mientras que el 74 % de las cepas aisladas del agua de riego pertenecían a las especies *A. salmonicida*, *A. media*, *A. allosaccharophila* y *A. popoffii*. En los vegetales, *A. caviae* (75%) fue la especie más prevalente y una cepas aislada a partir de lechuga tuvo el mismo genotipo (patrón ERIC) que una cepa recuperada a partir del agua de riego. Además se obtuvo el mismo genotipo de la especie *A. sanarellii*, una especie asociada a patología en humanos a



partir de dos variedades de vegetales, perejil y tomate, demostrando que el agua fue probablemente la fuente de contaminación de ambos tipos de vegetales, confirmando así el potencial riesgo para la salud pública.

**Chlorinated and UV-treated reclaimed irrigation water is the source of *Aeromonas* found in vegetables used for human consumption.**

**Fadua Latif-Eugenín, Roxana Beaz-Hidalgo, María J. Figueras\***

Unidad de Microbiología, Facultad de Medicina y Ciencias de la Salud, IISPV,  
Universidad Rovira i Virgili, Sant Llorenç 21, 43201 Reus, Spain.

\*Corresponding author: Unidad de Microbiología, Facultad de Medicina y Ciencias de  
la Salud, IISPV, Universidad Rovira i Virgili, Sant Llorenç 21, 43201 Reus, Spain. Tel:  
+34-977759321; Fax: +34-977759322; E-mail: mariajose.figueras@urv.cat



## Abstract

Waste water is increasingly being recognized as a key water resource, and reclaimed water (or treated waste water) is used for irrigating vegetables destined for human consumption. Some potentially pathogenic bacteria like *Aeromonas* have been recovered from both untreated and treated waste water that has been used for irrigation and this is a risk for public health. No study has so far investigated the genotypes of *Aeromonas* present in irrigation water and the irrigated vegetables at the same time. The aim of the present study was to determine the diversity and prevalence of *Aeromonas* both in reclaimed water used for irrigation and in the three types of vegetables irrigated with that water. Seven of the 11 (63.6%) samples of reclaimed water and all samples of vegetable were positive for the presence of *Aeromonas*. A total of 132 *Aeromonas* strains investigated by sequencing the *rpoD* gene belonged to one of 10 different species. Prevalence varied for each species, i.e. in the treated reclaimed water *A. caviae* and *A. media* dominated (91.4%) while *A. salmonicida*, *A. media*, *A. allosaccharophila* and *A. popoffii* corresponded to 74% of the strains in the irrigation water. In vegetables, *A. caviae* (75%) was the most common species, among which a strain isolated from lettuce had the same genotype (ERIC pattern) as a strain recovered from the irrigation water. Furthermore, the same genotype of the species *A. saranellii* was recovered from parsley and tomatoes demonstrating that the irrigation water was the source of contamination and confirming the risk for public health.

*Key words:* Reclaimed water, vegetables, irrigation water, *Aeromonas*, ERIC-PCR, *rpoD* gene



## 1. Introduction

The genus *Aeromonas* consists of Gram negative, oxidase positive bacilli that are considered autochthonous of aquatic environments and are commonly isolated from clinical and environmental samples (Janda and Abbott, 2010; Beaz-Hidalgo and Figueras, 2013; Figueras and Beaz-Hidalgo, 2014, 2015). Many studies have shown that *Aeromonas* species are foodborne and waterborne pathogens of increasing importance (Altwegg et al., 1991; Demarta et al., 2000; Figueras and Borrego, 2010; Pablos et al., 2011; Khajanchi et al., 2010). *Aeromonas* can be readily isolated from treated sewage, reclaimed water, sea water, fresh water and from drinking water distribution systems, where they appear to survive well, to proliferate at low temperatures and to be linked to pipe biofilms where populations may survive at high chlorine levels (Emekdas et al., 2006; Figueras and Borrego, 2010; Jjemba et al., 2010; Khajanchi et al., 2010; Martone-Rocha et al., 2010; Figueira et al., 2011; Igbinosa and Okoh, 2013; Robertson et al., 2014; Al-Jassim et al., 2015). *Aeromonas* is recognized as an opportunistic pathogen to humans that can affect both immunocompromised and immunocompetent individuals, the most frequent clinical presentations being gastroenteritis, wound or soft tissue infection and bacteremia (Janda and Abbott, 2010; Figueras and Beaz-Hidalgo, 2015).

Waste water is increasingly being recognized as a key resource, especially in Mediterranean Europe where treated waste water, i.e. reclaimed water, is used for irrigating fruit and vegetables that are destined for human consumption (Pianetti et al., 2004; Carvalho et al., 2012). The safety of reclaimed water and food products (shellfish, lettuces, meat etc.) is evaluated by the results obtained for faecal indicators (coliforms, *Escherichia coli*, etc.) during the stipulated controls fixed by legislation to determine their sanitary quality and potential risk (Figueras and Borrego, 2010). However, related illness outbreaks still occur worldwide both in the presence and the absence of indicator organisms, mainly due to the failure of the indicator organisms to correlate with pathogens (Figueras and Borrego, 2010). Among the food and water borne pathogens considered to be emerging, some of them, such as *Aeromonas*, are of special interest because their significance to public health is still clearly understood (Figueras and Beaz-Hidalgo, 2015). It was proved recently that *Aeromonas* sp. was the cause of two waterborne infections. In those studies, strains showing the same genotypes were

isolated from drinking water (Khajanchi et al., 2010) and from the faeces of patients with diarrhoea (Pablos et al., 2011). Some studies have found *Aeromonas*, among other opportunistic human pathogens in reclaimed water used for agricultural irrigation, which is a risk for consumers when considering that it can be the source of entry of the bacteria into the human food chain (Pianetti et al., 2004; Al-Jassim et al., 2015). So far, however, no studies have evaluated the water used for irrigation and the irrigated vegetables at the same time. The aim of this study, therefore, was to determine, using molecular tools (genotyping and sequencing the *rpoD* gene), the prevalence, diversity and epidemiological relationship of *Aeromonas* isolates that were recovered from reclaimed water used for irrigation and from the irrigated vegetables produced within it .

## 2. Materials and Methods

### 2.1. Water and vegetables sampling

Eleven reclaimed water samples were collected from a wastewater treatment plant, located in Catalonia North-East of Spain. Three water samples were collected after the secondary treatment, three after tertiary treatment that involved chlorination and ultraviolet radiation and five corresponded to irrigation water. The latter came from a plastic tube that extracted water from a well, where the tertiary treated water was accumulated before being use for irrigation. In addition 3 irrigated vegetables samples i.e. lettuces, tomatoes and parsley were analyzed. The tomatoes were irrigated by drip irrigation, while the lettuce and parsley by spray irrigation. The frequency of the irrigation depend on weather conditions but it was normally every two days.

### 2.2. Detection of faecal indicator bacteria

The determination of *E. coli* (EC) and intestinal enterococci (IE) was carried out using the 96-well microplate (BioRad, France) most probable number (MPN) ISO 9308-2 and ISO 7899-1 methods respectively. The detection of *E. coli* in the 96-well microplate is based on the expression  $\beta$ -D-glucuronidase enzyme, while the  $\beta$ -glucosidase is the target for IE.

### 2.3. Isolation and detection of *Aeromonas* sp.

All samples were submitted to an enrichment step with Alkaline Peptone Water supplemented with Ampicillin (APW-A) at a concentration of 10 mg/l. For this, 10 ml of water samples were mixed with 90 ml of APW-A (1:10 vol/vol). For the vegetables,

10 g were homogenized in 90 ml of APW-A (1:10 wt/vol). The enrichment culture was incubated at 30°C for 24 hours, 10-fold serial dilutions were performed and then 100 µl were plated on 3 different culture media: Dextrin Ampicillin Agar (ADA= M-*Aeromonas* Agar, Biolife, Italy), Starch Ampicillin Agar (SAA, Palumbo *et al.*, 1985) and Bile Irgasan Brilliant Green- modified (BIBG-m, Neyts *et al.*, 2000) and incubated at 30°C for 24 hours. Typical *Aeromonas* colonies were transferred to Trypticase Soy Agar (TSA, BD, France) to obtain a pure culture from which to perform the DNA extraction for the molecular genotyping and molecular identification. *Aeromonas* counts were performed on ADA culture media by direct count being this also the culture media for the verification of the positive tube obtained in the MPN method.

#### 2.4. Genotyping and molecular identification

DNA was extracted using InstaGene Matrix (BioRad, France) according to manufacturer's instructions. All isolates were identified to genus level using the PCR detection of Glicerophospholipid Cholesterol Acyltransferase (GCAT) characteristic of the genus *Aeromonas* (Soler *et al.*, 2002). All isolated were genotyped with the Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus PCR (ERIC-PCR) technique using the primers and conditions described by Versalovic *et al.* (1991) and used for *Aeromonas* in several other studies (Beaz-Hidalgo *et al.*, 2012). Molecular identification to species level was performed by sequencing the *rpoD* gene using the primers and conditions described by Soler *et al.* (2004). Sequence corrections and analysis were performed with the DNASTar Seqman program (Lasergene, USA) and the alignment and phylogenetic tree using the Neighborn Joining algorithm were performed using the MEGA program version 5.0 (Tamura *et al.*, 2011).

### 3. Results

#### 3.1. Water and vegetables sampling

A total of 63.6% (7/11) water samples and all vegetables (3/3) were positive for the presence of *Aeromonas* (Table 1). The four negative water samples were the three that were submitted to a tertiary treatment (with chlorination and ultraviolet radiation) and one irrigation water sample. Enumeration of *Aeromonas* was one to two logs higher with the MPN enumeration method than with the direct plate count. The percentage of *Aeromonas* reduction in the tertiary treatment was 100% and represented four to five



logs. However, four of the five irrigation water samples were positive for *Aeromonas* with levels that ranged from  $7.0 \times 10^2$  cfu/100 ml with plate count to  $2.45 \times 10^4$  MPN/100ml with the MPN method (Table 1).

### 3.2. *Detection of faecal indicator bacteria*

For the fecal indicator (*E. coli* (EC) and intestinal enterococci (IE)) the 45.5% of the reclaimed water were positive for EC and IE and included all three secondary treated water. One samples each from tertiary treated wastewater, irrigation water and vegetables samples were positive only for EC (Table 1). The concentration of the fecal indicator bacteria EC and EI present in the secondary treated wastewater were reduced by the tertiary treatment in 99.9% and 100% respectively (Table 1).

### 3.4. *Genotyping and molecular identification*

From the seven reclaimed water samples where *Aeromonas* was detected, 216 isolates were recovered which corresponded to 124 different genotypes (after the analysis by ERIC-PCR) representing a 57.4% genetic diversity (Table 2). The 39 isolates recovered from vegetables belonged to eight different strains showing a genetic diversity of 20.5%. The 132 genotypes (strains) recovered from reclaimed water and vegetables samples belonged to 10 *Aeromonas* species, nine of which were present in irrigation water and five in the secondary treated water (Table 3). However, the eight strains detected in vegetables belonged all to *A. caviae* (75%), except two strains that belonged to *A. hydrophila* and *A. sanarellii* (Table 3).

The distribution and prevalence of the species varied depending on the type of samples analyzed. For instance 91.4% of the total strains recovered from secondary treated reclaimed water corresponded to *A. caviae* (71.4%) and *A. media* (20%) with no detection of *A. salmonicida* and *A. popoffii*. However, *A. salmonicida* (22.2%), *A. media* (18.5%), *A. allosaccharophila* (18.5%) and *A. popoffii* (14.8%) were the most prevalent species in irrigation water. One *A. caviae* isolate (AAR-15B) recovered from irrigation water showed the same ERIC pattern than an isolate (Sle-15D) recovered from lettuce and the same *A. sanarellii* strain (Bpe-16B ) was identified both in parsley and tomato (Table 3 and Figure 1).

#### 4. Discussion

In agreement with other studies (Pianetti et al., 2004; Jjemba et al., 2010; Martone-Rocha et al., 2010; Al-Jassim et al., 2015), the fecal indicators (EC and EI) and bacteria belonging to the genus *Aeromonas* were present in high concentrations in all the secondary treated wastewater samples. However, after the tertiary treatment with chlorine and ultraviolet radiation, these microorganisms were not detected, with exception of one sample where EC grew in a very low concentration (147 MPN/100ml). These results show that the use of chlorine and ultraviolet radiation were highly effective for the reduction of the bacterial load, showing a percentage reduction of *Aeromonas* and IE of 100% and of 99.9% for EC. However, 80% of the irrigation water samples showed to be positive for *Aeromonas* and 20% for EC indicating that this bacteria were not totally eliminated by the tertiary treatment and that had the capacity to re-grow when the tertiary treated water was stored in a well (Table 1). However, EI were not detected in any sample after the tertiary treatment. Our results are in agreement with a previous study that found *Aeromonas* in 84.6% (11/13) of the water samples used for irrigation of agricultural products (Pianetti et al., 2004) and with a recent publication by Al-Jassim et al. (2015) that in the 4 samples from a chlorinated effluent used for agricultural irrigation, where 4/72 (5.6%) isolates recovered were identified as *Aeromonas* (). However, *Aeromonas* was not recovered after chlorination treatment in the four water samples that Figueira et al. (2011) analyzed.

In relation to the ability of the bacteria to regrow, Jjemba et al. (2010) found that despite fecal indicator bacteria and *Aeromonas* were effectively removed from wastewater using different disinfection mechanisms (chlorine, ozone and ultraviolet radiation) the bacteria were again detected in the distribution system as a result of their ability to regrow. Al-Jassim et al. (2015) also found regrowth of *Aeromonas* and other microbes and to minimize their risk they discourage the use of treated wastewater for irrigation. It has been suggested that the regrowth of the bacteria could be due to: i) the decrease of the chlorine concentration that occurs during storage of the water and in the irrigation distribution systems, ii) the capacity of *Aeromonas* to produce biofilm and iii) the amounts of organic matter present in the reclaimed water (Jjemba et al., 2010 and Figueras and Beaz-Hidalgo, 2014). Also using metagenomics (454 pyrosequencing) targeting the V4 or the V6 region of the 16S rRNA gene several authors showed that

wastewater samples contained *Aeromonas* (McLellan et al., 2010; Yeand Zhang et al., 2011; Al-Jassim et al., 2015).

A total of 10 *Aeromonas* species were recovered from reclaimed, irrigation water and vegetables. However, nine of this species came from the irrigation water, which seems to indicate that cleaner water favors a higher diversity of species, than the more contaminated secondary treated water, where only five species were detected and the 90% corresponded to *A. caviae* (71.4%) and *A. media* (20%) that were followed by for *A. hydrophila* (5.7%), *A. allosaccharophila* and *A. veronii* (1.4% each). This dominance of species is in agreement with those reported by Figueira et al. (2011), that molecularly identified 19 *Aeromonas* isolates from treated wastewater and found that the 68.4% of them belonged to *A. media* (7/19, 36.8%) and *A. caviae* (6/19, 31.6%) followed by *A. dhakensis* (3/19, 15.8%) and *A. sanarellii* (3/19, 15.8%).

Prevalent species recovered from irrigation water were *A. salmonicida* (22.2%), *A. media* (18.5%), *A. allosaccharophila* (18.5%), *A. popoffii* (14.8%), *A. caviae* (13%), followed with a 3.7% each by *A. hydrophila*, *A. veronii*, and *A. bestiarum* (and finally by *A. eucrenophila* (1.9%). These results are in agreement with the results found from water samples by other authors using molecular method (Soler et al., 2002; Figueira et al., 2011). However, they were discordant with those obtained by Pianetti et al. (2004), that identified, using API 20E system, only three species i.e. *A. caviae* (48.64%), *A. sobria* (35.13%) and *A. hydrophila* (16.22%) among 111 *Aeromonas* isolates recovered from 11 irrigation water samples. This fact is not strange, considering that the phenotypic identification mask the diversity of *Aeromonas* species as demonstrated in previous studies (Soler et al., 2003; Beaz-Hidalgo et al., 2010; Lamy et al., 2010).

As indicated, all strains recovered from vegetables corresponded to *A. caviae* in addition to one strain each of *A. hydrophila* and *A. sanarellii*. These results are in agreement with the ones obtained by Nishikawa and Kishi (1988) that analyzed several types of vegetables (cabbage, carrot, cucumber, eggplant, lettuce, onion, tomato, potato and spinach) and identified *A. caviae* (63%) as the most prevalent species, followed by *A. hydrophila* (37%). Identical results were reported by Nagar et al. (2011), that identified *Aeromonas* in 2/80 (2.5%) sprouts samples analyzed by sequencing of 16S rRNA gene and found only three *Aeromonas* isolates, two (66.6%) of them were identified as *A. caviae* and the remaining isolate (33.3%) as *A. hydrophila*. Other authors have found

other prevalent species associated with vegetables, like McMahon and Wilson (2001), who using biochemical identification found that 29/86 (33.7%) samples were positive for the presence of *Aeromonas*, being the most frequently isolated species *A. schubertii* (54.5%), *A. hydrophila* (15.2%), *A. trota* (15.2%), *A. caviae* (9.1%) and *A. popoffii* (6%) from vegetables such as lettuce, potato, carrot, onion, celery samples. However, these authors did not investigate the irrigation water in parallel with the vegetables as we did in our study neither they performed a genotyping study to investigate the relationship epidemiological.

An important finding in this study was the recognition of one *A. caviae* isolate (AAR-15B) recovered from irrigation water that showed the same genotype as another isolate (Sle-15D) recovered from lettuce, showing an epidemiological relation, and demonstrating that water acts as a vehicle of dissemination of these pathogens. The epidemiological relationships among *Aeromonas* strains have only been reported in few studies. Altwegg et al. (1991) demonstrated that the *A. hydrophila* strain recovered from human stool of a patient with diarrhea was identical to the one isolated from the left over shrimp cocktail that he consumed. Demarta et al. (2000) reported that four *A. caviae* strains isolated from feces of children with diarrhea presented the same ribotype that the isolates found from household environment (tap water and wet surfaces, mainly kitchen and bathroom). More recently, the epidemiological relationship was established between same *Aeromonas* clone from human stool and drinking water (Khajanchi et al., 2010; Pablos et al., 2011). In the study by Khajanchi et al. (2010), two *A. caviae/A. media* strains isolated from water showed indistinguishable PFGE patterns than those isolated from the faeces of two patients with diarrhea. The same genetic relationship was established by Pablos et al. (2011) that found one *A. caviae* clinical isolate and 2 water isolates with identical PFGE patterns. These discoveries reinforce the believe that the route of infection of *Aeromonas* would be the drinking water or the contaminated food (Janda and Abbott, 2010; Figueras and Beaz-Hidalgo, 2014).

Also in the present study the same *A. sanarellii* strain, was recovered from parsley and tomato, being this the first time that this species, originally found in association with human wound infection (Alperi et al., 2010) is recovered from vegetables. Previously, it has also been recovered from other environmental sources like treated wastewater (Figueira et al., 2011) and chironomids egg masses associated to waste stabilization

pond systems (Beaz-Hidalgo et al., 2012). All these findings suggest that reclaimed waters can act as a dispersion and contamination source of pathogens like *Aeromonas* to the food chain from where they can contaminate food products that may infect human.

## 5. Conclusion

Despite the use of reclaimed water is a good way to compensate scarcity of water, it is necessary to consider the potential risk for human health derived from the presence of opportunistic pathogens like *Aeromonas*. The results showed that the tertiary treatment by chlorination and ultraviolet radiation was effective in reducing the *Aeromonas* load. However, this microorganism were able to regrow during storage in the irrigation distribution system. Irrigation water acted as a vehicle of transmission of *Aeromonas* to the vegetables used for human consumption. Due to the failure of *E. coli* to measure the regrowth of potential pathogenic microorganisms such as *Aeromonas*, the latter bacteria should be considered as new potential indicators in order to increase the protection of public health.

## Acknowledgements

This study was supported by the projects with references AGL2011-30461-C02-02 and JPIW2013-095-C03-03 of the Ministerio de Ciencia e Innovación (Spain).

**Conflicts of interest statement:** None declared.

## References

- Al-Jassim, N., Ansari, M.I., Harb, M., Hong, P.Y., 2015. Removal of bacterial contaminants and antibiotic resistance genes by conventional wastewater treatment processes in Saudi Arabia: Is the treated wastewater safe to reuse for agricultural irrigation? *Water Res.* 15 (73), 277-290.
- Alperi, A., Martínez-Murcia, A.J., Ko, W.C., Monera, A., Saavedra, M.J., Figueras, M.J., 2010. *Aeromonas taiwanensis* sp. nov. and *Aeromonas sanarellii* sp. nov., clinical species from Taiwan. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 60 (9), 2048-2055.

- Altwegg, M., Martinetti-Lucchini, G., Lüthy-Hottenstein, J., Rohrbach, M., 1991. *Aeromonas*-associated gastroenteritis after consumption of contaminated shrimp. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 10 (1), 44-45.
- Beaz-Hidalgo, R., Alperi, A., Buján, N., Romalde, J.L., Figueras, M.J., 2010. Comparison of phenotypical and genetic identification of *Aeromonas* strains isolated from diseased fish. *Syst. Appl. Microbiol.* 33 (3):149-153.
- Beaz-Hidalgo, R., Shakèd, T., Laviad, S., Halpern, M., Figueras, M.J., 2012. Chironomid egg masses harbour the clinical species *Aeromonas taiwanensis* and *Aeromonas sanarellii*. *FEMS Microbiol. Lett.* 337 (1), 48-54.
- Beaz-Hidalgo, R., Figueras, M.J., 2013. *Aeromonas* spp. whole genomes and virulence factors implicated in fish disease. *J. Fish Dis.* 36 (4), 371-388.
- Carvalho, M.J., Martínez-Murcia, A., Esteves, A.C., Correia, A., Saavedra, M.J., 2012. Phylogenetic diversity, antibiotic resistance and virulence traits of *Aeromonas* spp. from untreated waters for human consumption. *Int. J. Food Microbiol.* 59 (3), 230-239.
- Demarta, A., Tonolla, M., Caminada, A., Beretta, M., Peduzzi, R., 2000. Epidemiological relationships between *Aeromonas* strains isolated from symptomatic children and household environments as determined by ribotyping. *Eur. J. Epidemiol.* 16 (5), 447-453.
- Emekdas, G., Aslan, G., Tezcan, S., Serin, M.S., Yildiz, C., Ozturhan, H., Durmaz, R., 2006. Detection of the frequency, antimicrobial susceptibility, and genotypic discrimination of *Aeromonas* strains isolated from municipally treated tap water samples by cultivation and AP-PCR. *Int. J. Food Microbiol.* 107 (3), 310-314.
- Figueira, V., Vaz-Moreira, I., Silva, M., Manaia, C.M., 2011. Diversity and antibiotic resistance of *Aeromonas* spp. in drinking and waste water treatment plants. *Water Res.* 45 (17), 5599-5611.
- Figueras, M.J., Beaz-Hidalgo, R., 2014. *Encyclopedia of food microbiology*. In: Batt C, Tortorello ML (eds). p.p. 25-30, Elsevier Ltd, Oxford, UK.
- Figueras, M.J., Beaz-Hidalgo, R., 2015. *Aeromonas*. In: Graf J (ed). p.p. 65-108, Caister Academic Press, Connecticut, USA.
- Figueras, M.J., Borrego, J.J., 2010. New perspectives in monitoring drinking water microbial quality. *Int. J. Environ. Res. Public Health.* 7 (12), 4179-4202.

- Igbinosa, I.H., Okoh, A.I., 2013. Detection and distribution of putative virulence associated genes in *Aeromonas* species from freshwater and wastewater treatment plant. *J. Basic Microbiol.* 53 (11), 895-901.
- Janda, J.M., Abbott, S.L., 2010. The genus *Aeromonas*: taxonomy, pathogenicity, and infection. *Clin. Microbiol. Rev.* 23 (1), 35-73.
- Jjemba, P.K., Weinrich, L.A., Cheng, W., Giraldo, E., Lechevallier, M.W., 2010. Regrowth of potential opportunistic pathogens and algae in reclaimed-water distribution systems. *Appl. Environ. Microbiol.* 76 (13), 4169-4178.
- Khajanchi, B.K., Fadl, A.A., Borchardt, M.A., Berg, R.L., Horneman, A.J., Stemper, M.E., Joseph, S.W., Moyer, N.P., Sha, J., Chopra, A.K., 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 (7), 2313-2325.
- Lamy, B., Laurent, F., Verdier, I., Decousser, J.W., Lecaillon, E., Marchandin, H., Roger, F., Tigaud, S., de Montclos, H., colBVH Study Group., Kodjo A., 2010. Accuracy of 6 commercial systems for identifying clinical *Aeromonas* isolates. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 67 (1), 9-14.
- Martone-Rocha, S., Piveli, R.P., Matté, G.R., Dória, M.C., Dropa, M., Morita, M., Peternella, F.A., Matté, M.H., 2010. Dynamics of *Aeromonas* species isolated from wastewater treatment system. *J. Water Health* 8 (4), 703-711.
- McLellan, S.L., Huse, S.M., Mueller-Spitz, S.R., Andreishcheva, E.N., Sogin, M.L., 2010. Diversity and population structure of sewage-derived microorganisms in wastewater treatment plant influent. *Environ. Microbiol.* 12 (2), 378-392.
- McMahon, M.A., Wilson, I.G., 2001. The occurrence of enteric pathogens and *Aeromonas* species in organic vegetables. *Int. J. Food Microbiol.* 70 (1-2), 155-162.
- Nagar, V., Shashidhar, R., Bandekar, J.R., 2011. Prevalence, characterization, and antimicrobial resistance of *Aeromonas* strains from various retail food products in Mumbai, India. *J. Food Sci.* 76 (7), M486-M492.
- Neyts, K., Notebaert, E., Uyttendaele, M., Debevere, J., 2000. Modification of the bile salts-Irgasan-brilliant green agar for enumeration of *Aeromonas* species from food. *Int. J. Food Microbiol.* 57 (3), 211-218.

- Nishikawa, Y., Kishi, T., 1988. Isolation and characterization of motile *Aeromonas* from human, food and environmental specimens. *Epidemiol. Infect.* 101 (2), 213-223.
- Pablos, M., Huys, G., Cnockaert, M., Rodríguez-Calleja, J.M., Otero, A., Santos, J.A., García-López, M.L., 2011. Identification and epidemiological relationships of *Aeromonas* isolates from patients with diarrhea, drinking water and foods. *Int. J. Food Microbiol.* 147 (83), 203-210.
- Palumbo, S.A., Maxino, F., Williams, A.C., Buchanan, R.L., Thayer, D.W., 1985. Starch-Ampicillin Agar for the Quantitative Detection of *Aeromonas hydrophila*. *Appl. Environ. Microbiol.* 50 (4), 1027-1030.
- Pianetti, A., Sabatini, L., Bruscolini, F., Chiaverini, F., Cecchetti, G., 2004. Faecal contamination indicators, *Salmonella*, *Vibrio* and *Aeromonas* in water used for irrigation of agricultural products. *Epidemiol. Infect.* 132, 231-238.
- Robertson, B.K., Harden, C., Selvaraju, S.B., Pradhan, S., Yadav, J.S., 2014. Molecular detection, quantification and toxigenicity profiling of *Aeromonas* spp. in source and drinking water. *Open Microbiol. J.* 8, 32-39.
- Soler, L., Figueras, M.J., Chacón, M.R., Vila, J., Marco, F., Martínez-Murcia, A.J., Guarro, J., 2002. Potential virulence and antimicrobial susceptibility of *Aeromonas popoffii* recovered from freshwater and seawater. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 32 (3), 243-247.
- Soler, L., Marco, F., Vila, J., Chacón, M.R., Guarro, J., Figueras, M.J., 2003. Evaluation of two miniaturized systems, MicroScan W/A and BBL Crystal E/NF, for identification of clinical isolates of *Aeromonas* spp. *J. Clin. Microbiol.* 41 (12), 5732-5734.
- 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(Pt 5), 1511-1519.
- 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 (10), 2731-2739.
- Versalovic, J., Koeuth, T., Lupski, J.R., 1991. Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes. *Nucleic Acids Res.* 19 (24), 6823-6831.



Ye, L., Zhang, T., 2011. Pathogenic bacteria in sewage treatment plants as revealed by 454 pyrosequencing. *Environ. Sci. Technol.* 45 (17), 7173-7179.

**Table 1. Detection of *Aeromonas* sp. and faecal indicators in samples from reclaimed water and irrigated vegetables.**

Type of sample analysed	n	Number (%) of positive samples for <i>Aeromonas</i> and counts			Number (%) of positive samples for faecal indicators and counts (MPN/100ml) <sup>a</sup>		
			Plate count (cfu/100 ml) <sup>a</sup>	MPN/100 ml <sup>a</sup>	<i>Escherichia coli</i> <sup>b</sup>	Intestinal enterococci <sup>b</sup>	
<b>Reclaimed water</b>	<b>11</b>						
Secondary treated	3	3 (100)	4.15x10 <sup>4</sup>	4.60x10 <sup>5</sup>	3 (100)	1.89x10 <sup>5b1</sup>	2.20x10 <sup>4b1</sup>
Tertiary treated <sup>3</sup>		0 (0)	ND	ND	1 (33.3)	1.47x10 <sup>2b2</sup>	ND <sup>b2</sup>
Irrigation water <sup>5</sup>		4 (80)	7.00x10 <sup>2</sup>	2.45x10 <sup>4</sup>	1 (20)	3.0x10 <sup>0b3</sup>	ND <sup>b3</sup>
	<b>Total</b>	<b>7 (63.6)</b>	<b>2.11x10<sup>4</sup></b>	<b>2.42x10<sup>5</sup></b>	<b>5 (45.5)</b>	<b>6.3x10<sup>4</sup></b>	<b>2.2x10<sup>4</sup></b>
<b>Vegetables<sup>c3</sup></b>		3 (100)	NP	NP	1 (33.3)	3.10x10 <sup>1b3</sup>	ND <sup>b3</sup>

<sup>a</sup>Corresponds to the mean from all the positive values; <sup>b</sup>The detection limits (95% of confidence interval) depend on the dilutions used and correspond to: <sup>b1</sup>56 (8-46) MPN/100ml, <sup>b2</sup>38 (5-271) MPN/100ml, <sup>b3</sup>15 (2-106) MPN/100ml; <sup>c</sup>Corresponds to one lettuce, one tomato and one parsley sample; ND: not detected; NP: not performed.

**Table 2. Number of *Aeromonas* isolates and genotypes recovered from positive samples from reclaimed water and irrigated vegetables.**

Type samples	Total of isolates GCAT-PCR (+)	Total number of genotypes	% Genetic diversity
<b>Reclaimed water</b>			
Secondary treated	108	70	64.8
Irrigation water	108	54	50
<b>Total</b>	<b>216</b>	<b>124</b>	<b>57.4</b>
<b>Vegetables</b>			
Lettuce	13	6	46.2
Tomato	13	1	7.7
Parsley	13	1	7.7
<b>Total</b>	<b>39</b>	<b>8</b>	<b>20.5</b>

**Table 3. Prevalence and diversity of *Aeromonas* spp. among 132 strains recovered from samples from reclaimed water and irrigated vegetables.**

N° (%) of <i>Aeromonas</i> spp.	Type of samples N° (%)		
	Secondary treated water	Irrigation water	Vegetables
63 (47.7) <i>A. caviae</i>	50 (71.4)	7(13) <sup>a</sup>	6 (75)
24 (18.2) <i>A. media</i>	14 (20)	10 (18.5)	0 (0)
12 (9.1) <i>A. salmonicida</i>	0 (0)	12 (22.2)	0 (0)
11 (8.3) <i>A. allosaccharophila</i>	1 (1.4)	10 (18.5)	0 (0)
8 (6.1) <i>A. popoffii</i>	0 (0)	8 (14.8)	0 (0)
7 (5.3) <i>A. hydrophila</i>	4 (5.7)	2 (3.7)	1 (12.5)
3 (2.3) <i>A. veronii</i>	1 (1.4)	2 (3.7)	0 (0)
2 (1.5) <i>A. bestiarum</i>	0 (0)	2 (3.7)	0 (0)
1 (0.8) <i>A. sanarellii</i>	0 (0)	0 (0)	1(12.5) <sup>b</sup>
1 (0.8) <i>A. eucrenophila</i>	0 (0)	1 (1.9)	0 (0)
<b>Total</b>	<b>70 (53)</b>	<b>54 (40.9)</b>	<b>8 (6.1)</b>

<sup>a</sup>One *A. caviae* strain isolated from irrigation water showed the same ERIC-genotype as one isolated from lettuce, <sup>b</sup>The same *A. sanarellii* ERIC-genotype was isolated from both parsley and tomato.

#### 4.2.2. Diversidad de *Aeromonas* spp. en aguas regeneradas tras un proceso de lagunaje.

El 100% de las muestras (10 de EL y 10 de SL) fueron positiva para la presencia de *Aeromonas*. El promedio global de *Aeromonas* en la EL fue de  $1,08 \times 10^6$  NMP/100ml y de  $1,94 \times 10^5$  NMP/100ml en la SL, lo que representa una reducción global de un 82%. Sin embargo, al analizar el porcentaje de reducción mensual, este fue del 98,9% en los meses de primavera (marzo, abril y mayo) y del 26,7% durante los meses de verano (junio, julio y agosto), observándose una menor reducción de *Aeromonas* cuando la temperatura del agua fue cercana a los 30°C ( $P < 0,05$ ), como se muestra en la Tabla 1.

**Tabla 1. Relación entre la cantidad de *Aeromonas* (NMP/100ml) y la temperatura del agua regenerada.**

Período	NMP/100ml		Porcentaje de reducción	Temperatura (°C)		
	Entrada lagunaje	Salida lagunaje		Entrada lagunaje	Salida lagunaje	Promedio
Marzo-2013	$1,4 \times 10^6$	$4,3 \times 10^3$	99,7	18	13,3	15,7 <sup>a</sup>
Abril-2013	$2,6 \times 10^5$	$6,5 \times 10^3$	97,5	17	18	17,5 <sup>b</sup>
Mayo-2013	$3,3 \times 10^6$	$4,2 \times 10^4$	98,7	21	20	20,5 <sup>c</sup>
Junio-2013	$9,1 \times 10^5$	$3,4 \times 10^5$	62,3	26	28	27,0 <sup>d</sup>
Julio-2013	$4,3 \times 10^5$	$3,4 \times 10^5$	20,9	27	28	27,5 <sup>e</sup>
Agosto-2013	$1,6 \times 10^5$	$4,3 \times 10^5$	0,0	26	27	26,5 <sup>f</sup>

(a=b=c  $P < 0,05$  d,e,f; d  $P < e$ , f; e  $P < 0,05$  d, f; f  $P < 0,05$  d, e).

Se obtuvo un total de 979 aislados que después del genotipado correspondieron a 522 cepas, lo que representa una diversidad genética del 53,3% tal como se muestra en la Tabla 2.

Se identificaron 10 especies de *Aeromonas* (Tabla 3), siendo las más prevalentes *A. caviae* (34,5%), *A. media* (30,4%), *A. veronii* (13,6%) y *A. salmonicida* (10,9%) que correspondieron al 89,4% del total. Sin embargo, la prevalencia de estas especies varió significativamente ( $P < 0,05$ ) entre la entrada y salida del lagunaje. Mientras que *A. caviae* (49,8%) y *A. media* (35,9%) representaron el 85,7% del total de cepas recuperadas en la entrada del lagunaje, *A. veronii* (27,7%) fue la más prevalente en la

salida del lagunaje, seguida por *A. media* (23,3%), *A. salmonicida* (21,6%) y *A. caviae* (14,5%) correspondiendo al 87,1% del total de cepas aisladas en estas muestras.

**Tabla 2. Número de aislados y genotipos obtenidos a partir de 20 muestras de agua regenerada.**

Tipo de agua	Nº de aislados	Nº de genotipos	Diversidad genética (%)
Entrada de lagunaje	510	295	57,8
Salida de lagunaje	469	227	48,4
<b>Total</b>	<b>979</b>	<b>522</b>	<b>53,3</b>

Se identificaron 10 especies de *Aeromonas* (Tabla 3), siendo las más prevalentes *A. caviae* (34,5%), *A. media* (30,4%), *A. veronii* (13,6%) y *A. salmonicida* (10,9%) que correspondieron al 89,4% del total. Sin embargo, la prevalencia de estas especies varió significativamente ( $P < 0,05$ ) entre la entrada y salida del lagunaje.

**Tabla 3. Diversidad y prevalencia de especies de *Aeromonas* en las 522 cepas recuperadas de aguas regeneradas.**

<i>Aeromonas</i> spp.	Nº (%) de cepas de <i>Aeromonas</i>		
	Total	Entrada lagunaje (n= 295)	Salida lagunaje (n= 227)
<i>A. caviae</i>	180 (34,5)	147 (49,8) <sup>a1</sup>	33 (14,5) <sup>a2</sup>
<i>A. media</i>	159 (30,4)	106 (35,9) <sup>b1</sup>	53 (23,3) <sup>b2</sup>
<i>A. veronii</i>	71 (13,6)	8 (2,7) <sup>c1</sup>	63 (27,7) <sup>c2</sup>
<i>A. salmonicida</i>	57 (10,9)	8 (2,7) <sup>d1</sup>	49 (21,6) <sup>d2</sup>
<i>A. allosaccharophila</i>	29 (5,6)	18 (6,1) <sup>e1</sup>	11 (4,8) <sup>e2</sup>
<i>A. hydrophila</i>	11 (2,1)	3 (1,0) <sup>f1</sup>	8 (3,5) <sup>f2</sup>
<i>A. dhakensis</i>	10 (1,9)	4 (1,4) <sup>g1</sup>	6 (2,6) <sup>g2</sup>
<i>A. sobria</i>	3 (0,6)	0 (0)	3 (1,3)
<i>A. sanarellii</i>	1 (0,2)	1 (0,3)	0 (0)
<i>A. popoffii</i>	1 (0,2)	0 (0)	1 (0,4)

a1  $P < 0,05$  a2; b1  $P < 0,05$  b2; c2  $P < 0,05$  c1; d2  $P < 0,05$  d1; e1  $P > 0,05$  e2; f1  $P > 0,05$  f2; g1  $P > 0,05$  g2.

Mientras que *A. caviae* (49,8%) y *A. media* (35,9%) representaron el 85,7% del total de cepas recuperadas en la entrada del lagunaje, *A. veronii* (27,7%) fue la más prevalente en la salida del lagunaje, seguida por *A. media* (23,3%), *A. salmonicida* (21,6%) y *A. caviae* (14,5%) correspondiendo al 87,1% del total de cepas aisladas en estas muestras.

Como se observa en la Figura 1, algunas especies de *Aeromonas* presentan una estacionalidad, como es el caso de *A. salmonicida*, que fue detectada entre diciembre y abril y *A. media* mayoritariamente detectada entre enero y marzo. Además, a pesar de que *A. caviae* fue recuperada durante todo el período de muestreo, esta especie fue principalmente identificada durante los meses de junio y diciembre.

Como hemos observado, el tratamiento de lagunaje no es completamente efectivo en remover las *Aeromonas* presentes en aguas residuales. Para entender esta situación, nosotros realizamos un experimento para poder determinar la capacidad de sobrevivencia y/o recrecimiento de este microorganismo tal como fue explicado en el apartado 3.1.3. Los resultados mostraron que para todas las muestras de agua la reducción fue mayor a 37°C que a 20°C, cuando *A. caviae* SELE10-16B (Figura 2) y *A. veronii* SSL7-15A (Figura 3) fueron investigadas.

En el caso de *A. caviae* SELE10-16B, el recuento bacteriano permaneció constante en agua mineral a 20°C. Sin embargo, a la misma temperatura, *A. veronii* SSL7-15 disminuyó ligeramente su recuento hasta el día 10, en que su recuento cae 10 veces y se mantiene constante hasta el final del experimento. En agua mineral, pero a 37°C, el recuento para ambas cepas disminuyó 10 veces las primeras 24 horas de incubación, para luego permanecer constante en el tiempo.

En el caso de la muestra de agua regenerada correspondiente a la entrada del lagunaje, la cepa *A. caviae* SELE10-16B mostró un comportamiento similar a ambas temperaturas en las primeras 24 horas de incubación. Luego su recuento comienza a descender para alcanzar concentraciones cercanas a las 100 ufc/100ml el día 28 de incubación. Sin embargo, *A. veronii* SSL7-15 mostró un recuento similar, a ambas temperaturas, desde el día 3 hasta el final del experimento.

Respecto del agua regenerada de la salida del lagunaje, la cepa *A. caviae* SELE10-16B fue más constante que la cepa *A. veronii* SSL7-15A a 20°C. Ya que *A. caviae* SELE10-16B disminuyó 10 veces su recuento, después del día 14 y se mantuvo

constante a lo largo del experimento, mientras que *A. veronii* SSL7-15A mostró una disminución gradual con recuentos cercanos a las 300 ufc/100ml después de los 35 días de incubación. En contraste, a 37°C, *A. caviae* SELE10-16B disminuyó bruscamente su recuento, siendo no detectada el día 6 del experimento, presentando un leve recrecimiento entre los días 10 y 14 (promedio de 25 ufc/100ml) y siendo nuevamente no detectada desde el día 21 hasta el final de la investigación, mientras que *A. veronii* SSL7-15A dejó de ser detectada el día 21 de incubación.

Cuando cada variable fue analizada separadamente, el análisis estadístico de las temperaturas mostró diferencias significativas ( $P < 0,05$ ) en la recuperación de ambas cepas a 20°C y 37°C. En relación al tipo de agua analizada, el análisis estadístico evidenció diferencias estadísticamente significativa ( $P < 0,05$ ) entre el agua mineral y el agua regenerada de la entrada del lagunaje para la cepa *A. caviae* SELE10-16B. Sin embargo, cuando ambas variables, temperatura y tipo de agua, fueron analizadas conjuntamente, sólo se encontraron diferencias significativas ( $P < 0,05$ ) en los recuentos de la cepa *A. caviae* SELE10-16B obtenidos entre en el agua mineral a 20°C y el agua mineral a 37°C, entre el agua mineral a 20°C y el agua de la entrada del lagunaje a 20°C y a 37°C y entre el agua mineral a 20°C y el agua de la salida del lagunaje tanto a 20°C como a 37°C.

En el caso del factor tiempo de incubación, diferencias significativas ( $P < 0,05$ ) también fueron observadas. Para la cepa *A. caviae* SELE10-16B, las diferencias en el recuento de *Aeromonas*, en relación al tiempo cero, fueron significativos desde el día 10 de incubación, mientras que para la cepa *A. veronii* SSL7-15A, diferencias significativas fueron observadas desde el día 3 de incubación.

## Discusión

*Aeromonas* estuvo presente en todas las muestras de agua analizadas, con recuentos que variaron entre  $1,8 \times 10^6$  NMP/100ml en la entrada del lagunaje y  $1,94 \times 10^5$  NMP/100ml en la salida. La efectividad del lagunaje como método para reducir la carga de bacterias potencialmente patógenas, como *Aeromonas* fue de un 82%. Mejores resultados fueron obtenidos por Boussaid y cols. (1991) y por Hassani y cols. (1992) en estudios realizados en Marruecos y por Martone-Rocha y cols. (2010) en Brazil. Así Boussain y cols. (1991) encontraron que el lagunaje era capaz de disminuir en un 93%

Figura 1. Distribución mensual de *Aeromonas* spp. en las muestras de agua de la entrada (EL) y salida del lagunaje (SL).

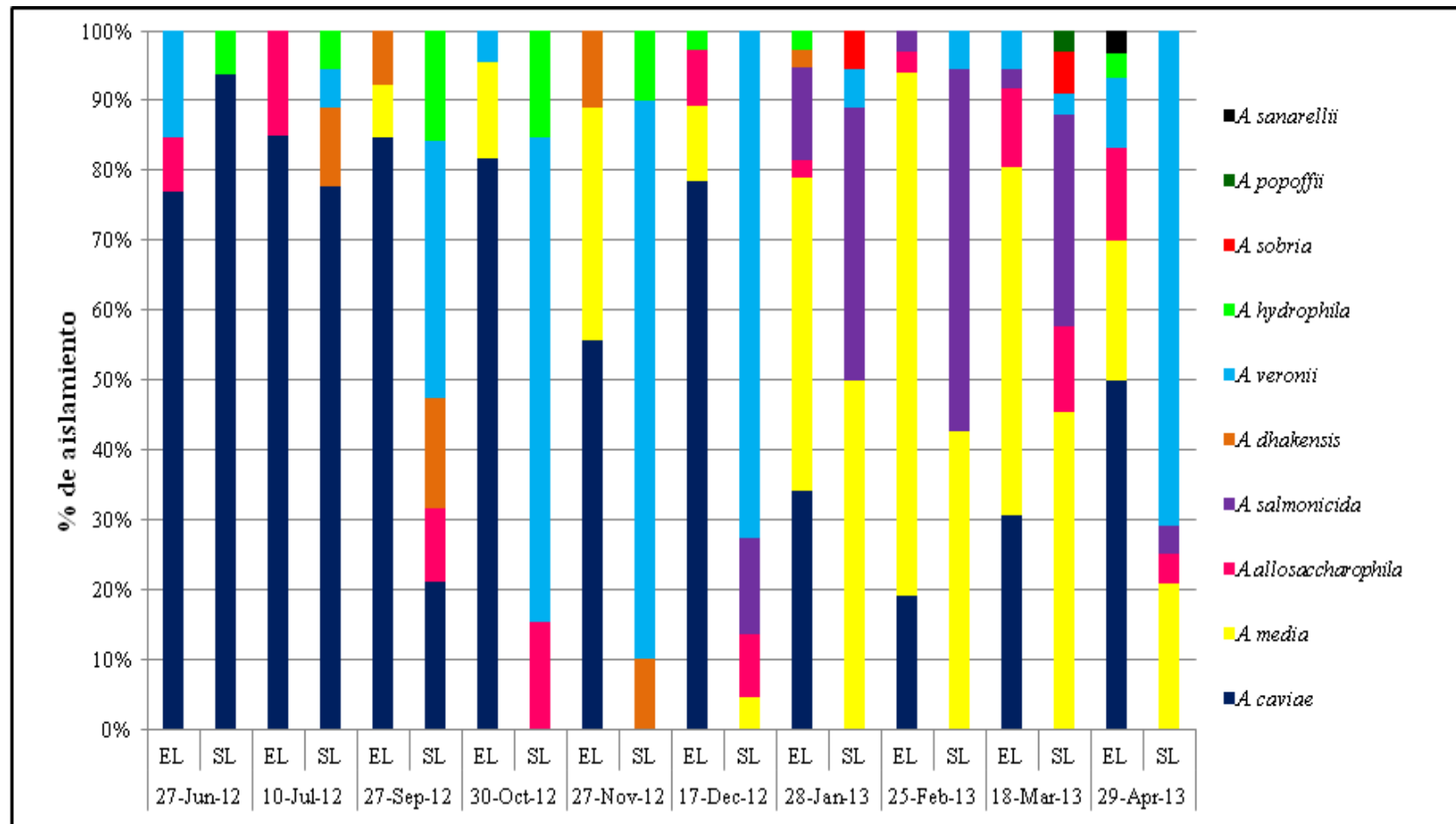




Figura 2. Comportamiento de la cepa *A. caviae* SELE10-16B, inoculada en diferentes tipos de agua, mineral, entrada de lagunaje (EL) y salida de lagunaje (SL), en dos temperaturas (20°C y 37°C) diferentes.

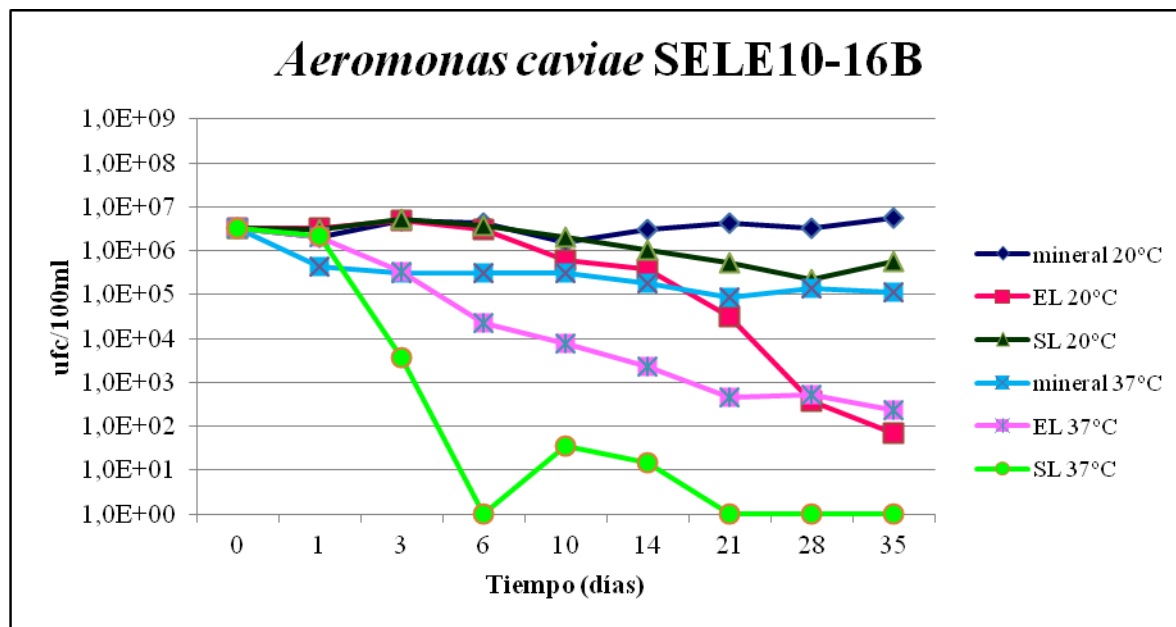
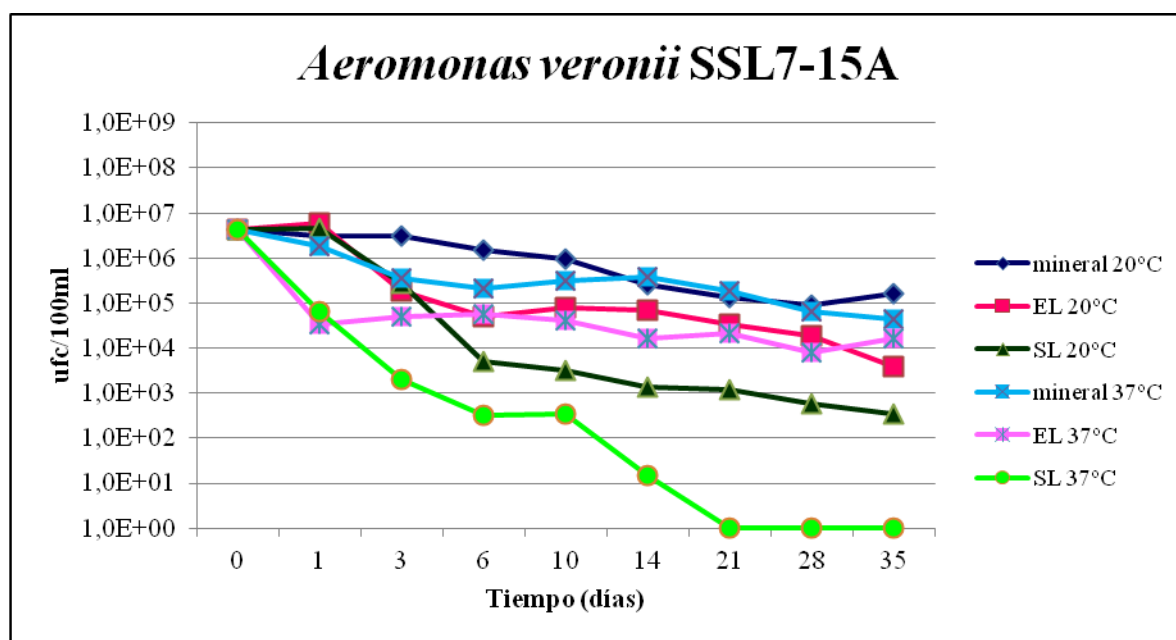


Figura 3. Comportamiento de la cepa *A. veronii* SL7-15A, inoculada en diferentes tipos de agua, mineral, entrada de lagunaje (EL) y salida de lagunaje (SL), en dos temperaturas (20°C y 37°C) diferentes.



la carga de *Aeromonas*, con recuentos que variaron entre  $3,3 \times 10^6$  ufc/100ml y  $2,4 \times 10^5$  ufc/100ml para la entrada y salida del lagunaje respectivamente. En el estudio realizado por Hassani y cols. (1992), los recuentos entre la entrada y salida del lagunaje disminuyeron de  $5,63 \times 10^6$  ufc/100ml a  $1,04 \times 10^5$  ufc/100 ml, lo que significó el 98,2% de reducción de la carga de *Aeromonas*. En un estudio realizado en Brazil, el porcentaje de reducción obtenido fue de 96,8% y los recuentos de *Aeromonas* fluctuaron entre  $5,2 \times 10^6$  NMP/100ml en la entrada del lagunaje y  $1,67 \times 10^5$  NMP/100ml en la salida del lagunaje (Martone-Rocha, 2010).

El hecho de haber encontrado un menor porcentaje de reducción en los meses de verano (26,7%) que en primavera (98,9%), puede estar asociado a la mayor temperatura, lo que se traduce en una mayor demanda de agua, por lo tanto, en la disminución del tiempo de retención de esta en las balsas del lagunaje, disminuyendo la efectividad de este tratamiento. Debido a que estas aguas regeneradas son utilizadas para el riego de vegetales, la presencia de *Aeromonas* en concentraciones elevadas puede tener un impacto negativo en la salud humana, debido principalmente a que es en esta estación cuando aumenta el consumo, principalmente crudo, de este tipo de alimentos.

Coincidentemente esta es también la época del año en la que aumentan los casos de diarrea asociados a *Aeromonas* (Janda y Abbott, 2010; Figueras y Beaz-Hidalgo, 2014, 2015).

Como se observa en la Tabla 1, *Aeromonas* presentó una mayor densidad en los meses con temperaturas inferiores a los 20°C (Tabla 1). Idénticos resultados fueron encontrados en los estudios realizados en Marruecos por Bossain y cols. (1991) y por Hassani y cols. (1992) en los cuales *Aeromonas* fue más abundante en los meses fríos (octubre a abril), en donde las temperaturas fueron inferiores a 21°C, que en los meses cálidos (junio a noviembre) en los cuales la temperatura fue superior a los 21°C (en todo este período la temperatura fue cercana a los 30°C).

A pesar de que se identificaron 10 especies sólo cuatro, *A. caviae*, *A. media*, *A. veronii* y *A. salmonicida*, representaron a más del 85% del total de cepas recuperadas. Desde el punto de vista de la diversidad de especies, similares a nuestros resultados son los obtenidos por Martone-Rocha y cols. (2010) quienes identificaron con métodos fenotípicos, 13 especies de *Aeromonas* en aguas regeneradas siendo las más prevalentes *A. caviae*

(25.1%), *A. allosaccharophila* (24.4%), *A. salmonicida* (8.5%) y *A. media* (8.1%) fueron las más prevalentes en este tipo de agua. Una menor diversidad de especies fue encontrada por Boussaid y cols. (1991), Hassani y cols. (1992) y por Imzilin y cols. (1996) quienes identificaron, mediante métodos bioquímicos, sólo tres especies, *A. caviae*, *A. hydrophila* y *A. sobria*.

En nuestro estudio la prevalencia de especies varió entre la entrada y salida del lagunaje. En la entrada del lagunaje, el 85,7% de las cepas correspondió a *A. caviae* (49,8%) y *A. media* (35,9%) pero estos porcentajes disminuyeron drásticamente en la salida del lagunaje en donde las especie más frecuentemente aisladas fueron *A. veronii* (27,7%), *A. media* (23,3%), *A. salmonicida* (21,6%) y *A. caviae* (14,5%). En otros estudios y en concordancia con nuestros resultados, *A. caviae* fue la especie predominante (> 50%) en la entrada del lagunaje. Sin embargo, a diferencia de nosotros, *A. sobria* (93%) lo fue en la salida del lagunaje (Boussaid y cols., 1991; Hassani y cols., 1992; Imzilin y cols., 1996). En el estudio realizado por Martone-Rocha y cols. (2010) *A. caviae* (33,1%) y *A. allosaccharophila* (17,5%) fueron las especies más prevalentes en la entrada del lagunaje, mientras que en la salida del lagunaje lo fueron *A. allosaccharophila* (46,7%), *A. popoffii* (9,3%) y *A. media* (5,3%).

Es importante destacar, que la especie *A. dhakensis*, recientemente descrita y de gran importancia en clínica (Beaz-Hidalgo y cols., 2013; Figueras y Beaz-Hidalgo, 2015), aunque en bajo porcentaje, fue recuperada tanto en la entrada (1,4%) como en la salida (2,6%) del lagunaje. Además, la especie *A. sanarellii*, raramente aislada, fue identificada en la entrada del lagunaje (0,3%). Esta especie fue previamente detectada en aguas residuales tratadas en Portugal (Figueira y cols., 2011) y también en vegetales irrigados con aguas regeneradas en esta tesis (estudio 4.2.1).

En relación a la estacionalidad presentada por algunas especies, como es el caso de *A. salmonicida* (detectada entre diciembre y abril), *A. media* (detectada principalmente entre enero y marzo) y *A. caviae* (detectada principalmente entre junio y diciembre), esta última especie fue más prevalente entre los meses de febrero y octubre, según lo encontrado por Bossain y cols. (1991).

Sobre el estudio de sobrevivencia y/o recrecimiento de las dos cepas de *Aeromonas* (*A. caviae* SELE 10-16B y *A. veronii* SSL7-15A), se puede concluir que estas son capaces

de sobrevivir largos períodos en estado de inanición en diferentes tipos de agua y a diferentes temperaturas, con excepción del agua regenerada de la salida del lagunaje a 37°C. El mejor tipo de agua, en el cual *Aeromonas* fue capaz de sobrevivir los 35 días del experimento y a ambas temperaturas, fue el agua mineral.

En conclusión, el bajo porcentaje global de reducción alcanzado (82%) y la alta incidencia de especies como *A. veronii*, *A. caviae*, *A. hydrophila* y *A. dhakensis*, que en conjunto representan al 96.5% de las especies asociadas con infección en humanos (Figueras y Beaz-Hidalgo, 2015), puede tener impacto en la salud pública, si estas aguas regeneradas se usan para el riego de vegetales que se consuman preferentemente crudos. Por otra parte, este tipo de aguas pueden ser vertidas en áreas costeras destinadas al cultivo de mariscos, lo que no sólo implica riesgo para el ser humano, sino que también para los animales, especialmente considerando la alta prevalencia de *A. salmonicida*, que es una especie patógena par los peces.



### 4.2.3. Diversidad de *Aeromonas* spp. en moluscos bivalvos.

El 90,1% (10/11) de las muestras de moluscos fueron positiva para la presencia de *Aeromonas* (Tabla 1). El relación al recuento de *Aeromonas*, este presentó diferencia estadísticamente significativa ( $P < 0,05$ ) entre cada tipo de marisco siendo el promedio obtenido de  $1,1 \times 10^3$  ufc/100gr cuando se realizó un recuento directo y utilizan la técnica de recuento del NMP de  $1,17 \times 10^4$  NMP/100gr.

**Tabla 1. Número de muestras positivas y recuento de *Aeromonas* en mariscos.**

Tipo de marisco (n)	Nº (%) de muestras positivas	Recuento de <i>Aeromonas</i>	
		Directo (ufc/100gr)	NMP/100gr
Almeja (1)	1 (100)	$3,9 \times 10^{2a}$	$2,5 \times 10^3$
Mejillón (5)	4 (80)	$1,93 \times 10^{3b}$	$1,61 \times 10^4$
Ostrón (5)	5 (100)	$1,01 \times 10^{3c}$	$1,64 \times 10^4$
<b>Total (11)</b>	<b>10 (90,1)</b>	<b><math>1,1 \times 10^3</math></b>	<b><math>1,17 \times 10^4</math></b>

b  $P < 0,05$  a y c; c  $P < 0,05$  a

De las 10 muestras positivas, se obtuvo un total de 289 aislados de *Aeromonas* que presentaron 156 patrones ERIC diferentes (cepas), lo que equivale a un 54,3% de diversidad genética (Tabla 2).

**Tabla 2. Número de aislados y genotipos obtenidos a partir de 10 muestras de moluscos.**

Tipo de marisco	Nº de aislados	Nº de genotipos	Porcentaje de diversidad genética
Almeja	23	15	65,2
Mejillón	128	76	59,4
Ostrón	138	65	47,8
Total	289	156	54,3

Como se observa en la Tabla 3, de las 156 cepas sólo 152 fueron identificadas a nivel de especies, mientras que cuatro cepas fueron identificadas como *Aeromonas* sp. debido a que en el árbol filogenético basado en las secuencias del gen *rpoD*, estas cepas se

agrupaban todas juntas pero no se agruparon con ninguna de las cepas tipo de las 27 especies conocidas que conforman el género. Esto nos hizo pensar que estas cuatro cepas podían corresponder a una nueva especie de *Aeromonas* tal y como se demuestra en el estudio polifásico que se muestra en el apartado 4.4.2.

Las 152 cepas correspondieron a un total de nueve especies y cuatro de ellas, *A. salmonicida* (37,8%), *A. media* (26,3%), *A. caviae* (18,6%) y *A. allosaccharophila* (6,4%), representaron un 89,1% del total. (Tabla 3).

**Tabla 3. Diversidad y prevalencia de especies de *Aeromonas* en las 156 cepas recuperadas de moluscos.**

<i>Aeromonas</i> spp.	Nº (%) de cepas de <i>Aeromonas</i>			
	Total	Almeja (n= 15)	Mejillón (n= 76)	Ostrón (n= 65)
<i>A. salmonicida</i>	59 (37,8)	9 (60) <sup>a1</sup>	21 (27,6) <sup>a2</sup>	29 (44,6) <sup>a3</sup>
<i>A. media</i>	41 (26,3)	3 (20) <sup>b1</sup>	25 (32,9) <sup>b2</sup>	13 (20) <sup>b3</sup>
<i>A. caviae</i>	29 (18,6)	0 (0) <sup>c1</sup>	13 (17,1) <sup>c2</sup>	16 (24,6) <sup>c3</sup>
<i>A. allosaccharophila</i>	10 (6,4)	0 (0) <sup>d1</sup>	9 (11,8) <sup>d2</sup>	1 (1,5) <sup>d3</sup>
<i>A. veronii</i>	5 (3,2)	0 (0)	4 (5,3)	1 (1,5)
<i>Aeromonas</i> sp.	4 (2,6)	1 (6,7)	1 (1,3)	2 (3,1)
<i>A. hydrophila</i>	3 (1,9)	0 (0)	1 (1,3)	2 (3,1)
<i>A. popoffii</i>	3 (1,9)	2 (13,3)	0 (0)	1 (1,5)
<i>A. fluvialis</i>	1 (0,6)	0 (0)	1 (1,3)	0 (0)
<i>A. bestiarum</i>	1 (0,6)	0 (0)	1 (1,3)	0 (0)

a2 P < 0,05 a1 y a3 P < 0,05 a1, a2; b2 P < 0,05 b1, b3 y b3 P < 0,05 b1; c2 P < 0,05 c1 y c3 P < 0,05 c1, c2; d2 P < 0,05 d1, d3.

El análisis estadístico indica que existe una mayor probabilidad (P < 0.05) de recuperar *A. salmonicida* y *A. caviae* de ostrones que de mejillones y almejas (Tabla 3). Mientras que *A. media* y *A. allosaccharophila* mostraron una prevalencia significativamente mayor en mejillones que en ostrones y almejas.

## Discusión

*Aeromonas* fue recuperada en el 90,1% de las muestras de mariscos analizadas. El recuento de *Aeromonas* de  $1,1 \times 10^3$  ufc/100gr se encuentra dentro del rango descrito por Borrell y cols. (1998) quienes encontraron que la concentración de *Aeromonas* fluctuó entre  $10^2 - 2,0 \times 10^3$  ufc/100gr en las 26 muestras positivas de las 83 (31,3%) muestras de mariscos que analizaron. Sin embargo, un recuento superior ( $< 10^4 - 4,0 \times 10^6$  ufc/100gr) fue

obtenido a partir de las muestras de ostrones positivas para la presencia de *Aeromonas* 20/30 (67%) por Evangelista-Barreto y cols. (2006).

En relación a la diversidad encontrada, en los pocos estudios existentes, esta es menor. Sin embargo, es necesario aclarar que en todos ellos, sólo se utilizaron métodos fenotípicos de identificación. A diferencia de nuestros resultados, en donde las especies más prevalentes, entre las nueve especies identificadas fueron *A. salmonicida* (37,8%), *A. media* (26,3%), *A. caviae* (18,6%) y *A. allosaccharophila* (6,4%). En el estudio de Borrell y cols. (1998), identificaron *A. caviae/A. media* (46,9%), *A. salmonicida* (17,3%), *A. veronii* (14,8%) fueron las especies más frecuentemente aisladas desde mariscos representando el 79% del total de los aislados.

Si analizamos los resultados por tipo de mariscos, también se observan diferencias. En este estudio, las especies más prevalentes en ostrones fueron *A. salmonicida* (44,6%), *A. caviae* (24,6%) y *A. media* (20,0%), que representaron el 89,2% del total de las cepas. Sin embargo, en un estudio realizado en Brasil, mostró que de entre 59 aislados, *A. veronii* (30,5%) fue la especie más prevalente, seguida por *A. media* (28,8%), *A. caviae* (18,6%), *A. trota* y *Aeromonas* sp. (8,5% cada una), *A. sobria* (3,4%) y *A. eucrenophila* (1,7%) (Evangelista-Barreto y cols., 2006). Mientras que en un estudio realizado en Tailandia por Woodring y cols. (2012), las especies recuperadas fueron *A. veronii* (50%), *A. caviae* (31,3%) y *A. hydrophila* (18,7%).

En el caso específico de los mejillones, el 89,4% de las cepas correspondió a *A. media* (32,9%), *A. salmonicida* (27,6%), *A. caviae* (17,1%) y *A. allosaccharophila* (11,8%). Sin embargo, en el estudio realizado por Ottaviani y cols. (2006) de 32 aislados recuperados de mejillones, 22 (68,7%) de estos fueron identificados como *A. hydrophila*, 8 (25,0%) como *A. bestiarum* y 2 (6,3%) como *A. caviae*.

Es importante destacar, que este corresponde al primer estudio en donde se analiza si existe una mayor probabilidad de aislar una especie de *Aeromonas* desde un tipo marisco en concreto, demostrándose de forma estadísticamente significativa que *A. salmonicida* y *A. caviae* se recuperan más en ostrones que de mejillones y almejas. De igual forma, la mayor prevalencia de *A. media* y *A. allosaccharophila* en mejillones presentó diferencias estadísticamente significativas en relación a la prevalencia de estas especies en ostrones y almejas.



Por otra parte, la recuperación de *A. fluviialis* es importante, ya que este corresponde al primer aislamiento desde su descripción a partir de muestras de agua procedentes de un río en España (Alperi y cols., 2010b).

Finalmente, el hecho de haber identificado cuatro cepas (una aislada desde almeja, una desde mejillón y dos desde ostrones) que corresponden a una potencial nueva línea filogenética, nos hace sospechar de la importancia de los mariscos como nicho de nuevas especies de *Aeromonas*. Esta nueva especie, correspondería a la tercera de este género recuperada desde moluscos bivalvos, después de *A. molluscorum* y *A. bivalvium* (Miñana-Galbis y cols., 2004, 2007).

Como conclusión, el consumo de estos alimentos, principalmente crudos, puede tener un impacto en la salud humana, al ser portadores de concentraciones relativamente elevadas de *Aeromonas* y de especies potencialmente patógenas para el hombre. Además, se demuestra que los moluscos bivalvos, corresponden a una fuente de nuevas especies dentro del género *Aeromonas*.

### **4.3. Identidad y caracterización de las cepas de *Aeromonas* aisladas desde peces, cetáceo y muestras clínicas**

**4.3.1. Re-identification of *Aeromonas* isolates from rainbow trout and incidence of class 1 integron and  $\beta$ -lactamase genes.** Vega-Sánchez V, Latif-Eugenín F, Soriano-Vargas E, Beaz-Hidalgo R, Figueras MJ, Aguilera-Arreola MG, Castro-Escarpulli G. *Vet. Microbiol.* (2014) 172:528-533.

#### **Resumen**

Cuarenta y ocho aislados de bacterias del género *Aeromonas* recuperados a partir de truchas y que habían sido previamente identificados mediante la técnica 16S DNAr-RFLP fueron re-identificados mediante la secuenciación de dos genes “housekeeping” (*gyrB* y *rpoD*). Después de la re-identificación la prevalencia de especies fue: *A. veronii* (29,2%), *A. bestiarum* (20,8%), *A. hydrophila* (16,7%), *A. sobria* (10,4%), *A. media* (8,3%), *A. popoffii* (6,2%), *A. allosaccharophila* (2,1%), *A. caviae* (2,1%), *A. salmonicida* (2,1%) y un aislado (2,1%) identificado como una candidata a una nueva especie, "*A. lusitana*". En el 68,8% de los aislados se obtuvieron los mismos resultados mediante ambas metodologías de identificación. La genotipificación mediante la técnica ERIC-PCR demostró que los 48 aislados correspondían a 33 genotipos diferentes. Varios genotipos se aislaron a partir de diferentes piscifactorías y de diferentes órganos en un mismo pez, indicando una diseminación sistémica de la bacteria. Se analizó la presencia de genes (*bla*<sub>TEM</sub>, *bla*<sub>CphA/IMIS</sub>, *bla*<sub>TEM</sub>, *bla*<sub>SHV</sub> y *intI1*) que codifican  $\beta$ -lactamasas de amplio espectro (ESBLs), metalo- $\beta$ -lactamasas (MBLs) e integrones de clase 1 mediante PCR. Se observó que el 39,6% (19/48) de las cepas poseían uno o más de los genes de resistencia estudiados. El gen *bla*<sub>CphA/IMIS</sub> se detectó en el 29,2% de los aislados estudiados, el gen *intI1* en el 6,2% y el gen *bla*<sub>SHV</sub> en el 4,2%. Se secuenció la región variable del integrón de clase 1 de tres aislados positivos revelando la presencia del cassette de genes *aadA1* (aminoglicósido transferasa) que juega un rol en la resistencia a la estreptomicina/espectinomicina.





Contents lists available at ScienceDirect

Veterinary Microbiology

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/vetmic](http://www.elsevier.com/locate/vetmic)



## Re-identification of *Aeromonas* isolates from rainbow trout and incidence of class 1 integron and $\beta$ -lactamase genes



Vicente Vega-Sánchez<sup>a</sup>, Fadua Latif-Eugenín<sup>b</sup>, Edgardo Soriano-Vargas<sup>a</sup>,  
Roxana Beaz-Hidalgo<sup>b</sup>, María José Figueras<sup>b,\*\*</sup>, Ma. Guadalupe Aguilera-Arreola<sup>c</sup>,  
Graciela Castro-Escarpulli<sup>c,\*</sup>

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

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

<sup>c</sup> Laboratorio de Bacteriología Médica, Escuela Nacional de Ciencias Biológicas (ENCB), Instituto Politécnico Nacional (IPN), Mexico

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 27 April 2014

Received in revised form 7 June 2014

Accepted 14 June 2014

#### Keywords:

*Aeromonas*

*gyrB*

*rpoD*

ESBLs

Integrans

Rainbow trout

### ABSTRACT

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

© 2014 Elsevier B.V. All rights reserved.

### 1. Introduction

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

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

\* Corresponding author. Tel.: +52 55 57296300x62374; fax: +52 55 57296207.

\*\* Corresponding author. Tel.: +34 977759321; fax: +34 977759322.  
E-mail addresses: [mariajose.figueras@urv.cat](mailto:mariajose.figueras@urv.cat) (M.J. Figueras), [chelacastro@hotmail.com](mailto:chelacastro@hotmail.com), [gcastro@encb.ipn.mx](mailto:gcastro@encb.ipn.mx) (G. Castro-Escarpulli).

*A. hydrophila*, *A. media*, *A. piscicola*, *A. salmonicida*, *A. sobria* and *A. tecta*) are isolated from healthy or diseased fish (Beaz-Hidalgo et al., 2010). Nowadays the use of housekeeping genes is the gold standard technique for the correct identification of *Aeromonas* species (Figueras et al., 2011).

An increased resistance to  $\beta$ -lactam antibiotics in the genus *Aeromonas* has been detected due to the presence of  $\beta$ -lactamases genes (Ndi and Barton, 2011; Carvalho et al., 2012; Chen et al., 2012). Extended-spectrum beta-lactamases (ESBLs), metallo-beta-lactamases (MBLs) and class 1 integrons include genes that encode antimicrobial resistance in the genus *Aeromonas* and have been identified in isolates recovered from aquaculture systems (Jacobs and Chenia, 2007; Kadlec et al., 2011). Integrons are able to capture several resistance gene cassettes from the environment and to incorporate them by using site-specific recombination and play a major role in the dissemination of antibiotic resistance genes (L'Abée-Lund and Sørum, 2001; Fluit and Schmitz, 2004). The class 1 integrons are the most commonly found in the genus *Aeromonas* (Pérez-Valdespino et al., 2009; Ndi and Barton, 2011; Sarria-Guzmán et al., 2014).

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

## 2. Materials and methods

### 2.1. Bacterial strains

A total of 48 isolates from rainbow trout previously identified (Vega-Sánchez et al., 2014) using the 16S rDNA-RFLP technique (Borrell et al., 1997; Figueras et al., 2000) were included in the study. The sources and origins of isolates are shown in supplemental table S1.

Supplementary Table S1 related to this article can be found, in the online version, at <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetmic.2014.06.012>.

### 2.2. *Aeromonas* re-identification and typing

The DNA of the strains was extracted with the InstaGene<sup>TM</sup> Matrix (Bio-Rad Laboratories, Ltd., Mississauga, Ontario, Canada) according to the manufacturer's protocols. Re-identification of all isolates was performed by sequencing the *gyrB* and *rpoD* genes determining their similarity with the type strains and on the basis of their position in the phylogenetic tree constructed with the concatenated sequences of both genes as in previous studies (Soler et al., 2004; Martínez-Murcia et al., 2011). The nucleotide sequences were aligned by Clustal W software with the published reference sequences of all type strains described by Martínez-Murcia et al. (2011) including the recently described species *A. australiensis* and *A. dhakensis* (GenBank accession numbers for *gyrB*: FN691773; HQ442711 and *rpoD*: FN773335; HQ442800, respectively). Genetic distances were obtained by Kimura's two parameter model and phylogenetic trees were constructed using the Neighbor-Joining method implemented in MEGA 5.2 software (Tamura et al., 2011) as in previous studies (Martínez-Murcia et al., 2011). The

enterobacterial repetitive intergenic consensus polymerase chain reaction (ERIC-PCR) technique was used to genotype the isolates as described by Soler et al. (2003). Fingerprints with identical patterns were considered to be the same genotype or strain.

### 2.3. Detection of $\beta$ -lactamase and class 1 integron genes

The  $\beta$ -lactamase genes *bla*<sub>TEM</sub>, *bla*<sub>SHV</sub>, *bla*<sub>IMP</sub>, *bla*<sub>C<sub>phA</sub>/IMIS</sub> and class 1 integron gene (*int1*) were amplified using primers and PCR conditions described elsewhere (Nüesch-Inderbinen et al., 1996; Navarro et al., 2001; Migliavacca et al., 2002; Henriques et al., 2006). Positive isolates for the *int1* gene were tested for the presence of inserted gene cassettes into the variable region of this integron as described earlier (Henriques et al., 2006). Briefly, the band obtained was extracted from the agarose gel and purified using Wizard<sup>®</sup> SV gel and PCR clean-up system (Promega, USA), according to the manufacturer's protocols and was submitted for sequencing.

### 2.4. Statistical analysis

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

## 3. Results and discussion

### 3.1. Molecular identification

A total of 68.8% (33/48) of the strains showed coincident identification with those obtained in the previous study using the 16S rDNA-RFLP (Vega-Sánchez et al., 2014) and belonged to the species *A. bestiarum*, *A. hydrophila*, *A. media*, *A. popoffii*, *A. sobria* and *A. veronii* (Table 1). The 16S rDNA-RFLP identification method described by Borrell et al. (1997) and Figueras et al. (2000) generated species-specific profiles that enabled the identification of the 14 species that composed the genus in the year 2000. The addition of new species in the genus since 2000 limits the usefulness of this method, because the same RFLP pattern is obtained for the species *A. salmonicida*, *A. bestiarum* and *A. piscicola* as described by Beaz-Hidalgo et al. (2010). In the current study this occurred for 12.5% (6/48) of the strains that showed with the 16S rDNA-RFLP the common pattern for the species *A. salmonicida*, *A. bestiarum* and *A. piscicola*, and also 4.2% (2/48) of the isolates that showed the typical 16 rDNA-RFLP pattern described for the species *A. salmonicida*, although after sequencing they were identified as *A. bestiarum* ( $n = 7$ ) and *A. salmonicida* ( $n = 1$ ) (Table 1). Furthermore 8.3% (4/48) of the isolates showed atypical RFLP patterns and after sequencing they were shown to correspond to *A. allosaccharophila* ( $n = 1$ ), *A. caviae* ( $n = 1$ ) and *A. media* ( $n = 2$ ) (Table 1 and supplemental Fig. S1) and 2.1% (1/48) showed the typical RFLP pattern described for the species *A. encheleia*, nevertheless after sequencing this isolate was identified as "*Aeromonas lusitana*" (Table 1 and Fig. 1). The remaining

**Table 1**

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

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

<sup>a</sup> Identification by comparison with the described 16S rDNA-RFLP patterns for the different *Aeromonas* spp. (Borrell et al., 1997; Figueras et al., 2000).

<sup>b</sup> The isolates showed the 16S rDNA-RFLP pattern of *A. sobria* but were wrongly interpreted in the previous study (Vega-Sánchez et al., 2014).

<sup>c</sup> Isolates showed atypical 16S rDNA-RFLP patterns.

isolates 4.2% (2/48) showed the typical RFLP pattern described for the species *A. sobria* (Table 1) but were wrongly interpreted in the previous study (Vega-Sánchez et al., 2014). Atypical 16S rDNA RFLP patterns are due to the presence of microheterogeneities (i.e. sequence variation in the operon copies of the 16S rRNA gene) and have previously been detected for the species *A. caviae*, *A. media* and *A. veronii* and reported in 8.1% of the strains analyzed by Alperi et al. (2008). However, this is the first time that they are described for *A. allosaccharophila* (Fig. S1).

Supplementary Figure S1 related to this article can be found, in the online version, at <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetmic.2014.06.012>.

The phylogenetic tree constructed with concatenated sequences of the *gyrB* and *rpoD* genes of the 48 isolates and representative strains of all *Aeromonas* species showed that the rainbow trout sequences clustered with 9 known species (Fig. 1): *A. veronii* 14 (29.2%), *A. bestiarum* 10 (20.8%), *A. hydrophila* 8 (16.7%), *A. sobria* 5 (10.4%), *A. media* 4 (8.3%), *A. popoffii* 3 (6.2%), *A. allosaccharophila* 1 (2.1%), *A. caviae* 1 (2.1%), *A. salmonicida* 1 (2.1%) and "*Aeromonas lusitana*" 1 (2.1%). The latter has been recognized as a new species by Martínez-Murcia et al. (2011) but its formal description has not yet been published. The partial *gyrB* and *rpoD* gene sequences obtained from the rainbow trout isolates have been deposited in the GenBank under the accession numbers (*gyrB*; KJ743507–KJ743554 and *rpoD*; KJ743555–KJ743602).

In a previous study performed in Spain by Beaz-Hidalgo et al. (2010) the prevalent species isolated from diseased rainbow trout (identified by *rpoD* sequencing) were *A. sobria* 45.7% (16/35), *A. hydrophila* 22.9% (8/35), *A. media* 11.4% (4/35), *A. piscicola* 8.6% (3/35), *A. bestiarum* 5.7% (2/35) and *A. salmonicida* 5.7% (2/35). All these species with the exception of *A. piscicola* were found in the present study. However, in addition we found *A. veronii* as the most prevalent species. Interestingly, this species has been found to be responsible of important catfish outbreaks in the USA (Nawaz et al., 2010). Other species found like

*A. allosaccharophila* and *A. caviae* have so far been recognized after sequencing, for instance the species *A. caviae* was identified in diseased fish by Beaz-Hidalgo et al. (2010). To our knowledge, this is the first time that the species *A. popoffii* is recovered from rainbow trout, as so far it has only been recognized once from eels and most reports are from water and occasionally from human disease (Soler et al., 2002; Hua et al., 2004; Alcaide et al., 2010). Interestingly, the potential new species "*A. lusitana*" has been only described from a drinking water-fountain, thermal water and vegetables (Martínez-Murcia et al., 2011). The present results confirms once more that sequencing the *rpoD* and *gyrB* genes is a straight forward identification approach for the precise identification of *Aeromonas* spp. (Soler et al., 2004).

### 3.2. ERIC-PCR genotyping

Several isolates showed identical *gyrB* and *rpoD* sequences and therefore all isolates were genotyped with the ERIC-PCR to confirm if they were epidemiologically related. The 48 fish isolates showed to belong to 33 (68.8%) different ERIC patterns indicating a high genetic diversity that depended upon the species (Table S1). The ERIC patterns E1, E11, E25 and E28 (Table S1) which belong to the species *A. veronii*, *A. bestiarum*, *A. media* and *A. popoffii* respectively were isolated from different organs in the same fish, indicating a systemic dissemination of the bacteria. Other studies using experimental infection assays have confirmed the ability of *A. salmonicida* to produce a systemic dissemination and this has been attributed to the presence of the type III secretion system (Burr et al., 2005). Sreedharan et al. (2013) isolated the species *A. veronii* from ornamental fish and showed a clonal relationship among isolates obtained from different internal organs (kidney, liver and spleen) within the same batch of fish. However, other authors indicate that the presence of *Aeromonas* in different organs is not necessarily related with a disease (Koziońska and Pękala, 2012). Four ERIC genotypes



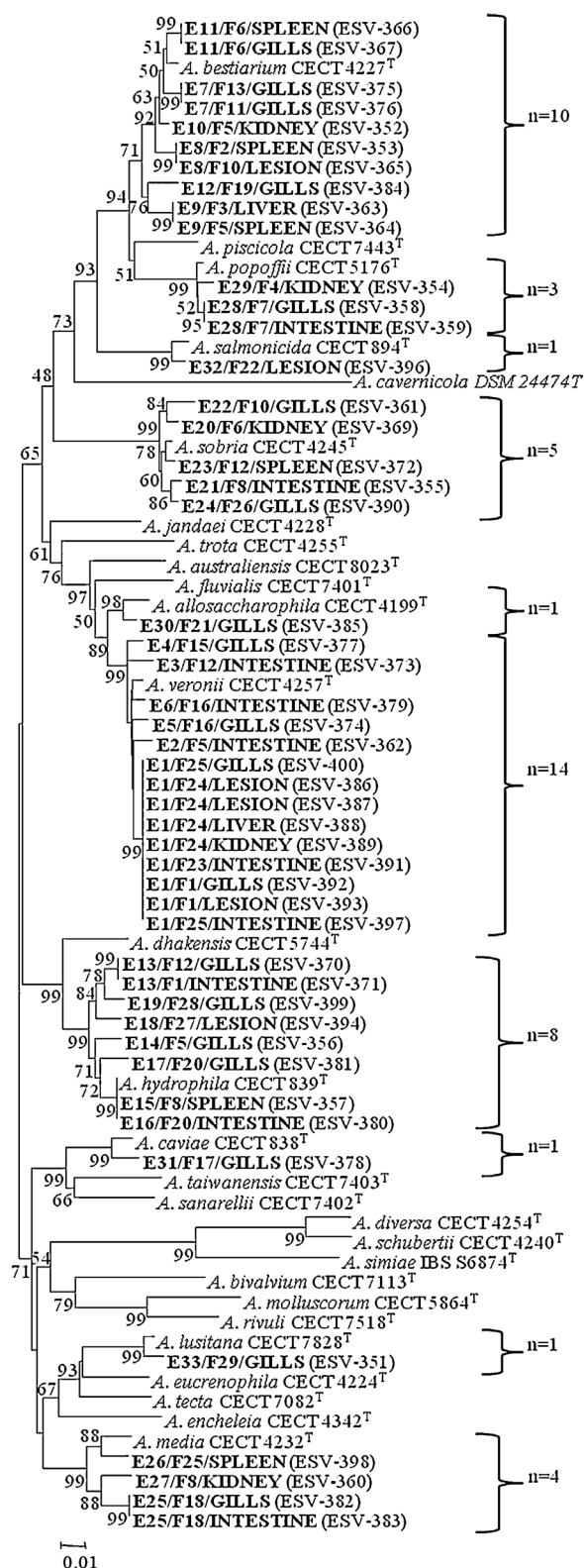


Fig. 1. Unrooted neighbor-joining phylogenetic tree derived from the concatenated sequences of the *gyrB-rpoD* genes (1004 bp) showing the relationship between rainbow isolates and other known *Aeromonas* species. Number shown next to each node indicates bootstrap values (percentage of 1000 replicates).

(E1, E7, E8 and E9) were found simultaneously in fish farms located in two states (México and Hidalgo, México and Veracruz, México and Michoacán, México and Hidalgo) but the epidemiological connection is unknown. Ndi and Barton (2011) showed that the same clonal strain, recognized by pulsed-field gel electrophoresis, was present in various rainbow trout farms in Victoria (Australia) as found in our study. Furthermore, it has recently been demonstrated a highly clonal relationship between *A. hydrophila* epidemic channel catfish isolates from the USA (Hossain et al., 2013).

Results also showed (Table S1) the presence of two or three different *Aeromonas* species in the same fish (fishes F5, F6, F8, F10, F12 and F25). This indicated the presence of mixed infections, further analysis on the virulence factors and activity of these isolates would provide more insight on their pathological mechanisms.

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

### 3.3. $\beta$ -Lactamase genes and class 1 integron

Only 39.6% (19/48) of the strains showed the presence of one or more resistance genes. The concurrent presence of *bla*<sub>Cpha/IMIS</sub> and *bla*<sub>SHV</sub> genes that encode for a carbapenem-hydrolyzing MBLs and ESBLs was observed in only 1 *A. hydrophila* isolate while *bla*<sub>Cpha/IMIS</sub> gene and class 1 integrons were present in 3 isolates belonging to the species *A. allosaccharophila*, *A. hydrophila* and *A. sobria* (Table S1). However, the *bla*<sub>IMP</sub> and *bla*<sub>TEM</sub> genes that encode for a MBLs and ESBLs were not detected in any of the isolates as has previously occurred in other studies that report a low prevalence or not detection (Ndi and Barton, 2011; Carvalho et al., 2012). The *bla*<sub>Cpha/IMIS</sub> gene that encode for a carbapenem-hydrolyzing MBLs was the most prevalent one being found in 14 isolates (29.2%) of the species *A. hydrophila* (7/48), *A. bestiarum* (2/48), *A. veronii* (2/48), *A. allosaccharophila* (1/48), *A. salmonicida* (1/48) and *A. sobria* (1/48). These results are similar to those previously reported by Carvalho et al. (2012) who detected a high presence of this gene in *A. hydrophila* (15/20) but lower in other species including *A. allosaccharophila* (1/20), *A. bestiarum* (1/20), *A. eucrenophila* (2/20) and *A. salmonicida* (1/20). Also Chen et al. (2012) reported that the *bla*<sub>Cpha/IMIS</sub> resistance gene was the most prevalent in the genus *Aeromonas*. Nevertheless the fact that the primers were designed for *A. hydrophila* together with the high molecular diversity observed in sequences of this gene by Carvalho et al. (2012) may justify the low detection of this gene in other species. The gene *bla*<sub>SHV</sub> that encode for ESBLs was found in 2 isolates (4.2%) which belong to the species *A. hydrophila* and *A. sobria* (Table 1). There are few reports of the presence of this gene and so far it has been described in strains of *A. allosaccharophila* 10.5% (2/19), *A. media* 5.3% (1/19) and *A. veronii* 5.3% (1/19) isolated from river water in Paris and these species were genetically identified on the basis of sequencing of 16S rRNA and *rpoB* genes respectively (Girlich et al., 2011). Maravić et al. (2013) reported *bla*<sub>SHV</sub> in 45.5% (10/22) of

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

The occurrence of class 1 integrons have previously been reported in *Aeromonas* isolated from clinical, environmental and fish culture samples (Jacobs and Chenia, 2007; Pérez-Valdespino et al., 2009; Carvalho et al., 2012; Lukkana et al., 2012; Sarria-Guzmán et al., 2014). In the present study, the gene *intl1* associated with class 1 integrons was found in 3 isolates (6.2%) that belonged to species *A. allosaccharophila*, *A. hydrophila* and *A. sobria* (Table S1). These positive strains bared only the gene cassette of the aminoglycoside transferase (*aadA1*) that confers resistance to streptomycin/spectinomycin. Different prevalences for the presence of the class 1 integrons have previously been reported. Carvalho et al. (2012) found a prevalence of 8.8% (7/80) in strains obtained from untreated water samples; although, Jacobs and Chenia (2007) found that 51.4% (19/37) of the *Aeromonas* isolates from common carp, koi, rainbow trout and tilapia harbored this gene. Other studies have found different resistance gene cassettes within the class 1 integrons in *Aeromonas* isolates associated to aquaculture (Jacobs and Chenia, 2007) but the gene cassette *aadA1* is commonly reported in environmental, clinical and fish strains (Jacobs and Chenia, 2007; Pérez-Valdespino et al., 2009; Carvalho et al., 2012).

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

## Conflict of interest

The authors declare that they have no competing interests.

## Acknowledgements

This study was financially supported by Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), project CB-2008-01-103142 (UAEM1900/2010C) and grants 20120652, 20130601 and 20140854 from SIP-IPN, México City. Ma. Guadalupe Aguilera-Arreola and Graciela Castro-Escarpulli received COFAA, EDI and SNI support, Vicente Vega-Sánchez held a scholarship from CONACYT. This work was also supported in part by the project with reference AGL2011-30461-C02-02 by the Ministerio de Ciencia e Innovación (Spain).

## References

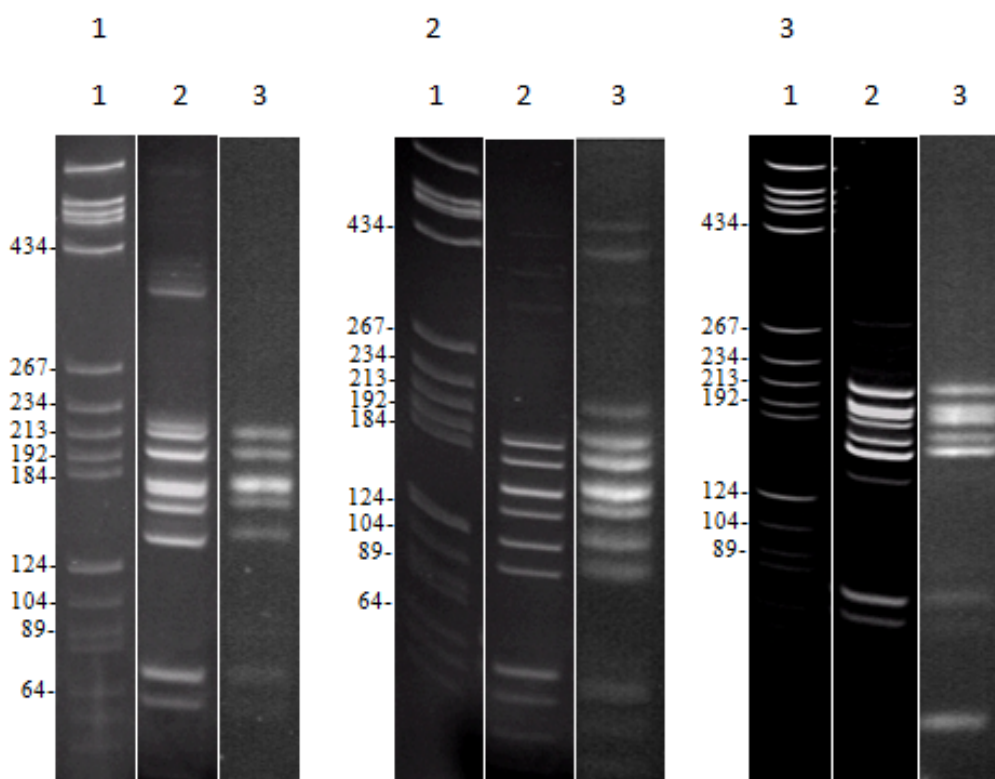
Alcaide, E., Blasco, M.D., Esteve, C., 2010. Mechanisms of quinolone resistance in *Aeromonas* species isolated from humans water and eels. *Res. Microbiol.* 161, 40–45.

- Alperi, A., Figueras, M.J., Inza, I., Martínez-Murcia, A.J., 2008. Analysis of 16S rRNA gene mutations in a subset of *Aeromonas* strains and their impact in species delineation. *Int. Microbiol.* 11, 185–194.
- Beaz-Hidalgo, R., Alperi, A., Buján, N., Romalde, J.L., Figueras, M.J., 2010. Comparison of phenotypical and genetic identification of *Aeromonas* strains isolated from diseased fish. *Syst. Appl. Microbiol.* 33, 149–153.
- Beaz-Hidalgo, R., Figueras, M.J., 2013. *Aeromonas* spp. whole genomes and virulence factors implicated in fish disease. *J. Fish Dis.* 36, 371–388.
- Borrell, N., Acinas, S.G., Figueras, M.J., Martínez-Murcia, A.J., 1997. Identification of *Aeromonas* clinical isolates by restriction fragment polymorphism of PCR-amplified 16S rRNA genes. *J. Clin. Microbiol.* 35, 1671–1674.
- Burr, S.E., Puqovkin, D., Wahli, T., Seqner, H., Frey, J., 2005. Attenuated virulence of *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida* type III secretion mutant in a rainbow trout model. *Microbiology* 151, 2111–2118.
- Carvalho, M.J., Martínez-Murcia, A., Esteves, A.C., Correia, A., 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.
- Chen, P.L., Ko, W.C., Wu, C.J., 2012. Complexity of  $\beta$ -lactamases among clinical *Aeromonas* isolates and its clinical implications. *J. Microbiol. Immunol. Infect.* 45, 398–403.
- Dallaire-Dufresne, S., Tanaka, K.H., Trudel, M.V., Lafaille, A., Charette, S.J., 2014. Virulence, genomic features, and plasticity of *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida*, the causative agent of fish furunculosis. *Vet. Microbiol.* 169, 1–7.
- Figueras, M.J., Beaz-Hidalgo, R., 2014. *Aeromonas*: introduction. In: Batt, C.A., Tortorello, M.L. (Eds.), *Encyclopedia of Food Microbiology*, vol. 1. Elsevier Ltd, Academic Press, Netherlands, pp. 24–30.
- Figueras, M.J., Beaz-Hidalgo, R., Collado, L., Martínez-Murcia, A.J., 2011. Point of view on the recommendations for new bacterial species description and their impact on the genus *Aeromonas* and *Arcobacter*. *Bull. BISMIS 2* (Pt 1) 1–16.
- 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. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 50, 2069–2073.
- Fluit, A.C., Schmitz, F.J., 2004. Resistance integrons and super-integrons. *Clin. Microbiol. Infect.* 10, 272–288.
- Girlich, D., Poirel, L., Nordmann, P., 2011. Diversity of clavulanic acid-inhibited extended-spectrum  $\beta$ -lactamases in *Aeromonas* spp. from the Seine River, Paris, France. *Antimicrob. Agents Chemother.* 55, 1256–1261.
- Henriques, I.S., Fonseca, F., Alves, A., Saavedra, M.J., Correia, A., 2006. Occurrence and diversity of integrons and beta-lactamase genes among ampicillin-resistant isolates from estuarine waters. *Res. Microbiol.* 157, 938–947.
- Hossain, M.J., Waldbieser, G.C., Sun, D., Capps, N.K., Hemstreet, W.B., Carlisle, K., Griffin, M.J., Khoo, L., Goodwin, A.E., Sonstegard, T.S., Schroeder, S., Hayden, K., Newton, J.C., Terhune, J.S., Liles, M.R., 2013. Implication of lateral genetic transfer in the emergence of *Aeromonas hydrophila* isolates of epidemic outbreaks in channel catfish. *PLoS ONE* 8, e80943.
- Hua, H.T., Bollet, C., Tercian, S., Drancourt, M., Raoult, D., 2004. *Aeromonas popoffii* urinary tract infection. *J. Clin. Microbiol.* 42, 5427–5428.
- Jacobs, L., Chenia, H.Y., 2007. Characterization of integrons and tetracycline resistance determinants in *Aeromonas* spp. isolated from South African aquaculture systems. *Int. J. Food Microbiol.* 114, 295–306.
- Janda, J.M., Abbott, S.L., 2010. The genus *Aeromonas*: taxonomy pathogenicity, and infection. *Clin. Microbiol. Rev.* 23, 35–73.
- Kadlec, K., von Czapiewski, E., Kaspar, H., Wallmann, J., Michael, G.B., Steinacker, U., Schwarz, S., 2011. Molecular basis of sulfonamide and trimethoprim resistance in fish-pathogenic *Aeromonas* isolates. *Appl. Environ. Microbiol.* 77, 7147–7150.
- Kozińska, A., Pękala, A., 2012. Characteristics of disease spectrum in relation to species, serogroups, and adhesion ability of motile aeromonads in fish. *Sci. World J.* 2012, 949358.
- L'Abée-Lund, T.M., Sorum, H., 2001. Class 1 integrons mediate antibiotic resistance in the fish pathogen *Aeromonas salmonicida* worldwide. *Microb. Drug Resist.* 7 (Fall) 263–272.
- Lukkana, M., Wongtavatchai, J., Chuanchuen, R., 2012. Class 1 integrons in *Aeromonas hydrophila* isolates from farmed Nile tilapia (*Oreochromis nilotica*). *J. Vet. Med. Sci.* 74, 435–440.
- Maravić, A., Skočibušić, M., Samanić, I., Fredotović, Z., Cvjetan, S., Jutronić, M., Puizina, J., 2013. *Aeromonas* spp. simultaneously harbouring bla(CTX-M-15), bla(SHV-12), bla(PER-1) and bla(FOX-2), in wild-growing Mediterranean mussel (*Mytilus galloprovincialis*) from Adriatic Sea, Croatia. *Int. J. Food Microbiol.* 166, 301–308.



- 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*. *Syst. Appl. Microbiol.* 34, 189–199.
- Migliavacca, R., Docquier, J.D., Mugnaioli, C., Amicosante, G., Daturi, R., Lee, K., Rossolini, G.M., Pagani, L., 2002. Simple microdilution test for detection of metallo- $\beta$ -lactamase production in *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Clin. Microbiol.* 40, 4388–4390.
- Navarro, F., Perez-Trallero, E., Marimon, J.M., Aliaga, R., Gomariz, M., Mirelis, B., 2001. CMY-2-producing *Salmonella enterica*, *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella oxytoca*, *Proteus mirabilis* and *Escherichia coli* strains isolated in Spain (October 1999–December 2000). *J. Antimicrob. Chemother.* 48, 383–389.
- Nawaz, M., Khan, S.A., Khan, A.A., Sung, K., Tran, Q., Kerdahi, K., Steele, R., 2010. Detection and characterization of virulence genes and integrons in *Aeromonas veronii* isolated from catfish. *Food Microbiol.* 27, 327–331.
- Ndi, O.L., Barton, M.D., 2011. Incidence of class 1 integron and other antibiotic resistance determinants in *Aeromonas* spp. from rainbow trout farms in Australia. *J. Fish Dis.* 34, 589–599.
- Nüesch-Inderbinen, M.T., Hächler, H., Kayser, F.H., 1996. Detection of genes coding for extended-spectrum SHV beta-lactamases in clinical isolates by a molecular genetic method, and comparison with the E test. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 15, 398–402.
- Pérez-Valdespino, A., Fernández-Redón, E., Curiel-Quesada, E., 2009. Detection and characterization of class 1 integrons in *Aeromonas* spp. isolated from human diarrheic stool in México. *J. Basic Microbiol.* 49, 572–578.
- Sarria-Guzmán, Y., López-Ramírez, M.P., Chávez-Romero, Y., Ruiz-Romero, E., Dendooven, L., Bello-López, J.M., 2014. Identification of antibiotic resistance cassettes in class 1 integrons in *Aeromonas* spp. strains isolated from fresh fish (*Cyprinus carpio* L.). *Curr. Microbiol.* 68, 581–586.
- Soler, L., Figueras, M.J., Chacón, M.R., Guarro, J., Martínez-Murcia, A.J., 2003. Comparison of three molecular methods for typing *Aeromonas popoffii* isolates. *Antonie Van Leeuwenhoek* 83, 341–349.
- Soler, L., Figueras, M.J., Chacón, M.R., Vila, J., Marco, F., Martínez-Murcia, A.J., 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., Chacon, 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.
- Sreedharan, K., Philip, R., Singh, I., 2013. Characterization and virulence potential of phenotypically diverse *Aeromonas veronii* isolates recovered from moribund freshwater ornamental fishes of Kerala, India. *Antonie van Leeuwenhoek* 103, 53–67.
- 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.
- Vega-Sánchez, V., Acosta-Dibarrat, J., Vega-Castillo, F., Castro-Escarpulli, G., Aguilera-Arreola, M.G., Soriano-Vargas, E., 2014. Phenotypical characteristics, genetic identification, and antimicrobial sensitivity of *Aeromonas* species isolated from farmed rainbow trout (*Onchorynchus mykiss*) in México. *Acta Trop.* 130, 76–79.

Fig. S1 Polyacrylamide (17%) gels showing atypical 16S rDNA-RFLP patterns observed for rainbow trout strains and comparison with typical patterns of *A. media*, *A. allosaccharophila* and *A. caviae*. (1) *A. media*: Line 1, DNA molecular size marker (marker V Roche Applied Science); lane 2, strain E25/F18 showing an atypical restriction pattern; lane 3, strain CECT 4232<sup>T</sup> showing the typical restriction pattern. (2) *A. allosaccharophila*: Lane 1, DNA molecular size marker (marker V Roche Applied Science); lane 2, strain E30/F21 showing an atypical restriction pattern; lane 3, strain CECT 4199<sup>T</sup> showing the typical restriction pattern. (3) *A. caviae*: Lane 1, DNA molecular size marker (marker V Roche Applied Science); lane 2, strain E31/F17 showing an atypical restriction pattern; lane 3, strain CECT 838<sup>T</sup> showing the typical restriction patterns.



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

Genetic diversity among the different species and distribution of the genotypes by origin														
Species n° isolates (%)	n° genotypes / n° isolates (%)	Genotype	n° isolates	Fish	Gills	Intestine	Spleen	Liver	Kidney	Lesion	State			
<i>A. veronii</i> 14 (29.2)	6/14 (42.8)	E1	4	F24				1	1	2 <sup>a,b</sup>	Hidalgo			
		E1	2	F1	1					1 <sup>c</sup>	México			
		E1	2	F25	1		1					Hidalgo		
		E1	1	F23			1					Hidalgo		
		E2	1	F5			1					Hidalgo		
		E3	1	F12			1 <sup>g</sup>					Veracruz		
		E4	1	F15	1							Veracruz		
		E5	1	F16	1							Veracruz		
		E6	1	F16			1 <sup>g</sup>					Veracruz		
		<i>A. bestiarum</i> 10 (20.8)	6/10 (60)	E7	1	F11	1						México	
				E7	1	F13	1						Veracruz	
				E8	1	F2				1 <sup>g</sup>				Michoacán
				E8	1	F10							1 <sup>d</sup>	México
				E9	1	F3					1 <sup>g</sup>			México
E9	1			F5				1				Hidalgo		
E10	1			F5						1		Hidalgo		
<i>A. hydrophila</i> 8 (16.7)	7/8 (87.5)	E11	2	F6	1		1				Hidalgo			
		E12	1	F19	1							México		
		E13	1	F12	1 <sup>g,i</sup>							Veracruz		
		E13	1	F1			1 <sup>g</sup>					Veracruz		
		E14	1	F5	1 <sup>g</sup>							Hidalgo		
		E15	1	F8				1 <sup>g,h</sup>				Hidalgo		
		E16	1	F20			1 <sup>g</sup>					Hidalgo		
		E17	1	F20	1							Hidalgo		
		E18	1	F27							1 <sup>e,g</sup>	Michoacán		
		E19	1	F28	1 <sup>g</sup>							Michoacán		
<i>A. sobria</i> 5 (10.4)	5/5 (100)	E20	1	F6					1 <sup>g,i</sup>		Hidalgo			
		E21	1	F8			1				Hidalgo			
		E22	1	F10	1							México		

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

Genetic diversity among the different species and distribution of the genotypes by origin											
Species n° isolates (%)	n° genotypes / n° isolates (%)	Genotype	n° isolates	Fish	Gills	Intestine	Spleen	Liver	Kidney	Lesion	State
<i>A. media</i> 4 (8.3)	3/4 (75)	E23	1	F12			1 <sup>h</sup>				Veracruz
		E24	1	F26	1						Michoacán
		E25	2	F18	1		1				Veracruz
		E26	1	F25				1			Hidalgo
		E27	1	F8 <sup>f</sup>						1	Hidalgo
<i>A. popoffii</i> 3 (6.3)	2/3 (66.6)	E28	2	F7	1						Hidalgo
		E29	1	F4						1	Hidalgo
<i>A. allosaccharophila</i> 1 (2.1)	1/1 (100)	E30	1	F21	1 <sup>g,i</sup>						Hidalgo
<i>A. caviae</i> 1 (2.1)	1/1 (100)	E31	1	F17	1						Veracruz
<i>A. salmonicida</i> 1 (2.1)	1/1 (100)	E32	1	F22						1 <sup>f, g</sup>	Hidalgo
“ <i>Aeromonas lusitana</i> ” 1 (2.1)	1/1 (100)	E33	1	F29	1						Hidalgo

<sup>a</sup>Erosion in the dorsal fin, <sup>b</sup>Petechiae haemorrhages in the pectoral fins, <sup>c</sup>Erosion of the mouth, <sup>d</sup>Petechiae haemorrhages in the ventral fin, <sup>e</sup>Epidermal ulceration, <sup>f</sup>Ulceration in the base of the pectoral fin.

<sup>g</sup>PCR positive for the *bla*<sub>CphA/IMIS</sub> gen; <sup>h</sup>PCR positive for the *bla*<sub>SHV</sub> gen; <sup>i</sup>PCR positive for the *int1* gen

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI  
AEROMONAS, UN MICROORGANISMO AMBIENTAL DE IMPORTANCIA EN SALUD HUMANA Y ANIMAL.  
Fadua Leila Latif Eugenín  
Dipòsit Legal: T 73-2016

**4.3.2. Molecular characterization of *Shewanella* and *Aeromonas* isolates associated with spoilage of Common carp (*Cyprinus carpio*). Beaz-Hidalgo R, Agüeria D, Latif-Eugenín F, Yeannes MI, Figueras MJ. FEMS Microbiol.Lett. (2015) 362:1-8.**

**Resumen**

La conservación en hielo es una forma frecuente de preservar los peces destinados al consumo humano, pero aún así hay algunos microorganismos que son capaces de participar en la putrefacción del producto, por lo que la identificación de estos microbios potencialmente perjudiciales es importante. En este estudio se aislaron trece colonias bacterianas a partir de especímenes de la carpa común (*Cyprinus carpio*) que habían sido almacenadas en hielo. La identificación fenotípica reveló que las bacterias pertenecían a los géneros *Aeromonas* (n= 5) y *Shewanella* (n= 8). El genotipado mediante la técnica de ERIC-PCR demostró la presencia de clones entre dos de los cinco aislados de *Aeromonas* y en dos grupos (n= 3; n= 2) de los ocho aislados de *Shewanella*. La secuenciación del gen *rpoD* permitió identificar a nivel de especie cuatro aislados como *Aeromonas salmonicida* y uno como *Aeromonas sobria*. Mediante secuenciación del gen ARNr 16S, se observó que de los ocho aislados de *Shewanella*, siete se agruparon con la especie *Shewanella putrefaciens* y uno con *Shewanella profunda*. Sin embargo, la secuenciación del gen *gyrB* indicó que estos ocho aislados podrían representar una nueva especie de *Shewanella* muy cercana a la especie *Shewanella baltica*. Tanto los aislados de *Shewanella* como de *A. salmonicida* generaron un olor putrefactivo y redujeron el óxido de trimetilamina, indicando que podrían contribuir a la putrefacción de los peces.





RESEARCH ARTICLE – Food Microbiology

# Molecular characterization of *Shewanella* and *Aeromonas* isolates associated with spoilage of Common carp (*Cyprinus carpio*)

Roxana Beaz-Hidalgo<sup>1</sup>, Daniela Agüeria<sup>2,3</sup>, Fadua Latif-Eugenín<sup>1</sup>,  
Maria I. Yeannes<sup>4,5</sup> and Maria J. Figueras<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup>Unitat de Microbiologia. Departament de Ciències Mèdiques Bàsiques, Facultat de Medicina i Ciències de la Salut. IISPV. Universitat Rovira i Virgili, Sant Lorenzo 21, 43201, Reus, Spain, <sup>2</sup>Departamento de Tecnología y Calidad de los Alimentos, Facultad Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional del Centro de la Provincia de Buenos Aires B700, Argentina, <sup>3</sup>Instituto Multidisciplinario sobre Ecosistemas y Desarrollo Sustentable, Universidad Nacional del Centro de la Provincia de Buenos Aires B7000 Tandil, Buenos Aires, Argentina, <sup>4</sup>Grupo de Investigación Preservación y Calidad de Alimentos. Departamento de Ingeniería Química. Facultad de Ingeniería, Universidad Nacional de Mar del Plata 7600 Mar del Plata, Buenos Aires, Argentina and <sup>5</sup>Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), 7600 Mar del Plata, Buenos Aires, Argentina

\*Corresponding author: Unitat de Microbiologia. Departament de Ciències Mèdiques Bàsiques, Facultat de Medicina i Ciències de la Salut. IISPV. Universitat Rovira i Virgili, Sant Lorenzo 21, 43201, Reus, Spain. Tel: +34-977759321; Fax: +34-977759322; E-mail: [mariajose.figueras@urv.cat](mailto:mariajose.figueras@urv.cat)

One Sentence Summary: *Shewanella* and *Aeromonas* associated with spoilage of fish.

Editor: Craig A. Shoemaker

## ABSTRACT

Storage in ice is a common way of preserving commercial fish species but some microorganisms can still contaminate and participate in the spoilage of the product; therefore, identification of potential harmful microbes is important. Thirteen colonies were isolated from common carp (*Cyprinus carpio*) that had been stored in ice, whose phenotypic identification revealed that they belonged to the genera *Aeromonas* ( $n = 5$ ) and *Shewanella* ( $n = 8$ ). Molecular genotyping with ERIC-PCR showed clonality only among two of the five *Aeromonas* isolates and for two groups ( $n = 3$ ;  $n = 2$ ) of the eight *Shewanella* isolates. Sequencing the *rpoD* gene showed that four *Aeromonas* isolates belonged to the species *Aeromonas salmonicida* and one to *A. sobria*. Of the eight *Shewanella*, seven isolates cluster with *Shewanella putrefaciens* and one with *Shewanella profunda* in the 16S rRNA phylogenetic tree. However, analysis of the *gyrB* gene showed that these eight isolates could constitute a new species closely related to *S. baltica*. The *Shewanella* and *A. salmonicida* isolates produce off-odours and reduce trimethylamine oxide, indicating that they might contribute to the spoilage of the fish.

**Key words:** fish spoilage; *Aeromonas*; *Shewanella*; *rpoD*; *gyrB*

## INTRODUCTION

Bacteria present in skin, guts and gills of newly caught fish can change through the stages of food processing and storage

and may contribute to the spoilage of fish before consumption. Iced fresh fish is most commonly spoiled by Gram-negative psychrotrophic rods such as members of the genera *Shewanella*,

Received: 15 August 2014; Accepted: 5 November 2014

© FEMS 2014. All rights reserved. For permissions, please e-mail: [journals.permissions@oup.com](mailto:journals.permissions@oup.com)



*Pseudomonas* and *Aeromonas* (Gram and Dalgaard 2002; Vogel et al., 2005; Parlapani et al., 2013; Janda and Abbott 2014).

*Aeromonas* species are autochthonous inhabitants of aquatic environments and can be isolated from clinical and environmental samples, including water, healthy or diseased fish, food products or from infections of humans and animals (Beaz-Hidalgo et al., 2010; Janda and Abbott 2010; Beaz-Hidalgo and Figueras 2013; Figueras and Beaz-Hidalgo 2014). The psychrotrophic species *Aeromonas salmonicida* is responsible for producing furunculosis, an important fish infection (Beaz-Hidalgo and Figueras 2013) and has also been identified as part of spoilage microbiota in ice-stored fish (Parlapani et al., 2013).

The genus *Shewanella* is an ubiquitous group of bacteria that embraces psychrophilic and mesophilic species that are commonly isolated from a wide range of habitats, terrestrial sites and marine environments including seawater, marine sediments, invertebrates and fish (Bowman 2005; Vogel et al., 2005; Sung, Yoon and Ghim 2012; Janda and Abbott 2014). *Shewanella* species are commonly linked to the spoilage of proteinaceous chilled foods and are opportunistic pathogens of humans and aquatic animals (Bowman 2005; Sung et al., 2012; Janda and Abbott 2014). The species *Shewanella putrefaciens* is a bacteria that is well known for spoiling iced fish such as cod or mackerel that produce off-odours (described as 'sulphur', 'dish rag' or 'wet dog' odours), off-flavour and slime (Parlapani et al., 2013; Janda and Abbott 2014). This species was first isolated from common carp by Kozińska and Pekala (2004) and was described as pathogenic to fish. *Shewanella baltica* was found to be the dominant species producing spoilage in ice-stored fish caught in the Danish Baltic Sea, despite other psychrotolerant H<sub>2</sub>S-producing species have also been isolated like *S. algae*, *S. glacialipiscicola* and *S. algidipiscicola* (Vogel et al. 2005; Satomi et al., 2007).

Commercial phenotypic systems and conventional biochemical assays are able to identify *Aeromonas* and *Shewanella* strains to genus level but confusing and incorrect identifications to species level are common because of their variable response to many phenotypic tests (Figueras et al., 2011). Nowadays, molecular methods like sequencing housekeeping genes allow more reliable identification to species level (Castro-Escarpulli et al., 2003; Satomi et al., 2007; Beaz-Hidalgo et al., 2010; Figueras et al., 2011; Beaz-Hidalgo and Figueras 2013; Figueras and Beaz-Hidalgo 2014; Janda and Abbott 2014), but these methods are not commonly used in food control laboratories.

Common carp (*Cyprinus carpio*) is an important commercial food product in Argentina. However, there is scarce information on the microbiological spoilage of this freshwater fish in Argentina and there are few studies that have investigated the incidence of spoilage microorganisms in iced fish using molecular methods (Castro-Escarpulli et al., 2003; Parlapani et al., 2013). Therefore, the aims of the present study were to phenotypically and genetically characterize and identify bacteria that have the potential to spoil common carp stored in ice and to determine their spoilage potential.

## MATERIALS AND METHODS

### Sources of the isolates

Sampling was performed for the development of a quality index method for common carp mainly based on changes in sensory properties (skin, texture, appearance of eyes and gills). At the time of sampling, the approximate temperature of the water was 17°C. The catching, handling and preservation of the carp was performed according to current practices undertaken by fisher-

men and adjusted according to the guidelines established for good manufacturing practices.

Isolates were obtained from six carp specimens captured from a lagoon located in Buenos Aires, Argentina. The fish were slaughtered, eviscerated and stored in ice in a chilled chamber at 2 ± 1°C. The sensory rejection point based on the evaluation of sensory attributes of the raw fish (based on 'gill smell' and 'odour' of cooked carp) occurred at day 18 of storage in ice. At this time, 10 g of dorsal muscle were aseptically removed, diluted in sterile peptone water (90 mL) and homogenized in a stomacher blender (Stomacher 400-Labsystem) for 2 min. Then, 10-fold serial dilutions were made up to 10<sup>-6</sup> and were inoculated on iron agar (Gram, Trolle and Huss 1987) and incubated at 25°C for 3 days to recover bacteria that produce hydrogen sulphide (H<sub>2</sub>S), as previously described (Hozbor et al., 2006).

### Phenotypic characterization

For the phenotypic characterization and identification, a total of 27 phenotypic tests (Table S1, Supporting Information) were carried out as described by the International Commission on Microbiological Specifications for Foods (1983), Cowan and Steel's Manual (Barrow and Feltham 1999) and in Bergey's Manual of Systematic Bacteriology (Bowman 2005; Martin-Carnahan and Joseph 2005). In parallel, the commercial identification system API 20NE (bioMérieux, Marcy l'Étoile, France) was used.

### Molecular typing and identification

DNA was extracted from single colonies after growth in trypticase soya agar at 30°C for 24 h using the InstaGene Matrix (Bio-Rad). In order to determine the presence of clones, isolates were genotyped by enterobacterial repetitive intergenic consensus (ERIC)-PCR using the primers and conditions described by Versalovic, Koeuth and Lupski (1991).

Sequences of the *rpoD* gene were obtained to genetically identify the isolates presumed to be *Aeromonas* based on phenotypic tests as previously described (Soler et al., 2004). The phenotypically identified *Shewanella* isolates were genetically identified by sequencing the 16S rRNA and the *gyrB* genes as previously described (Martínez-Murcia, Benlloch and Collins 1992; Yamamoto and Harayama 1995).

The *rpoD* sequences obtained were aligned with sequences of type strains of members of the genus *Aeromonas* taken from our in-house database (Martínez-Murcia et al., 2011), and the 16S rDNA and *gyrB* sequences were aligned with those of the type strains of members of the genus *Shewanella* that were available at the GenBank. Genetic distances and clustering were obtained using Kimura's two-parameter model, phylogenetic trees were constructed using the neighbour-joining method and pairwise similarities of the 16S rRNA and *gyrB* genes were calculated with the MEGA5 program (Tamura et al., 2011).

### Spoilage evaluation

The fish isolates were inoculated in sterile carp broth (Gram et al., 1987) and incubated at chill temperature (5°C) for 3–4 weeks in order to determine spoilage. Six panellists experienced in sensory assessment evaluated the developing odours by ranking them as 'fishy', 'sulphidic', 'sour', 'sweet', 'wet dog', etc. (Gram, Wedell-Neergaard and Huss 1990) and categorizing the strength of odour into three scores: I (strains producing no off-odours), II (strains producing light off-odours) and III (strains producing strong off-odours). The production of an off-odour

was considered positive with scores greater than II (Dalgaard 1995).

Trimethylamine oxide (TMAO) medium was also used for testing the ability of the strains to reduce TMAO to trimethylamine (TMA), which is usually responsible for the odours associated with bacterial food spoilage (Gram et al., 1987). The test was carried out under anaerobic conditions at 25°C for 3 days.

## RESULTS

### Phenotypic identification

Thirteen black H<sub>2</sub>S-producing colonies were isolated from iron agar. All the isolates were Gram-negative rods, aerobic/anaerobic facultative, motile and oxidase positive. Other phenotypic tests are outlined in Table S1 (Supporting Information). Eight of the 13 isolates were not able to ferment glucose and were presumptively identified as *Shewanella* sp. The remaining five isolates were able to ferment glucose and were identified as members of the genus *Aeromonas*, of which four isolates (A3, A11, A12, A13) were identified as *A. hydrophila*/*A. caviae* with the API 20NE. The other *Aeromonas* (A8) and all *Shewanella* isolates could not be assigned to a known species in the API 20NE database.

### Molecular and genotypic identification

Identical ERIC-PCR profiles were observed for two (A11 and A12) of the five presumptive *Aeromonas* isolates and for two (A1 and A7) and three (A6, A9 and A10) of the eight presumptive *Shewanella* isolates (data not shown).

The *rpoD* phylogenetic tree showed that isolates A3, A11, A12 and A13 belong to the species *A. salmonicida* as they clustered with its type strain with a 100% bootstrap value. Isolates A11 and A12 showed an identical *rpoD* sequence and this confirmed the clonal relationship obtained with the ERIC-PCR. Strain A8 clustered with the species *A. sobria* and also with a 100% bootstrap value (Fig. 1).

The other eight isolates presumptively identified as belonging to the genus *Shewanella* were confirmed as such from their 16S rRNA and *gyrB* genes sequences. As expected, clonal isolates showed identical sequences of both genes. Of the eight *Shewanella* isolates, seven cluster with *S. putrefaciens* (56% bootstrap) and one with *S. profunda* (49% bootstrap) in the 16S rRNA phylogenetic tree (Fig. 2). In the *gyrB* phylogenetic analysis, all the eight isolates grouped together in a separate cluster supported with a 98% bootstrap having as the closest neighbour the species *S. baltica* (Fig. 3). Pairwise sequence similarities of both genes among the fish strains and with the closely related species are shown in Tables S2 and S3 (Supporting Information).

### Spoilage potential

All the *Shewanella* isolates were able to produce very strong off-odours (III) in carp broth and were described as 'wet dog' odours, and all except strain A2 reduced TMAO after 48 h. The four *A. salmonicida* isolates produced weak odours (II) and were characterized as 'cheese' and 'sour' and all also showed the ability to reduce TMAO. However, the strain of the species *A. sobria* was unable to either produce off-odours or reduce TMAO.

## DISCUSSION

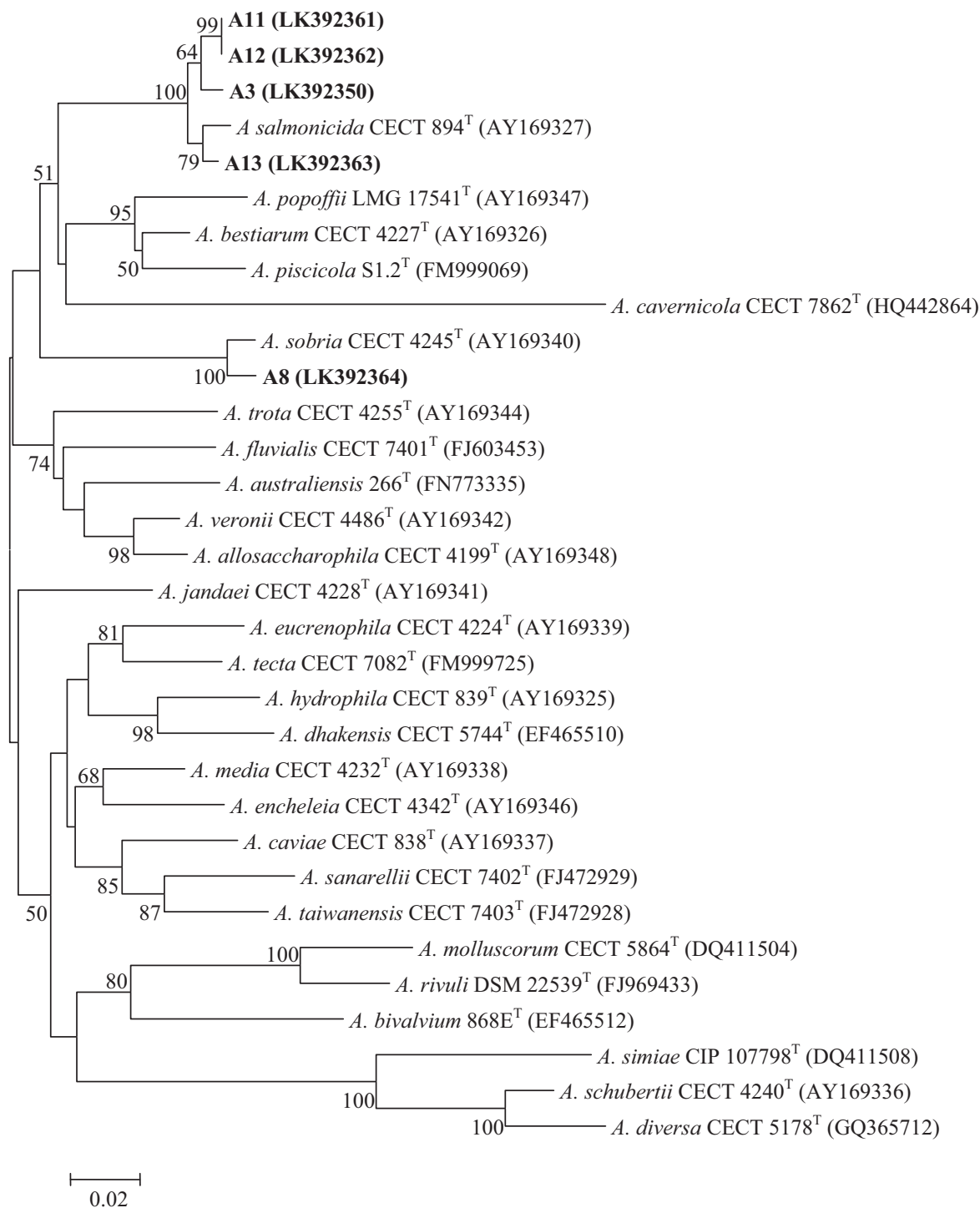
The classic phenotypic tests carried out for identifying the isolates were only able to identify all *Shewanella* and *Aeromonas* isolates up to the genus level and the API 20NE system

erroneously identified two strains as *A. hydrophila*/*A. caviae*. Results for some phenotypic tests obtained with *A. sobria* and *A. salmonicida* isolates differed from previously published data (Table S1, Supporting Information; indicated in brackets) (Abbott, Cheung and Janda 2003; Martin-Carnahan and Joseph 2005; Beaz-Hidalgo et al., 2010). According to Austin and Austin (2007), the only subspecies of *A. salmonicida* that are H<sub>2</sub>S producers are *salmonicida*, *pectinolytica* and *smithia*; in addition, both species produce a diffusible pigment and are non-motile. The *A. salmonicida* isolates obtained in this study produced H<sub>2</sub>S, but did not produce pigment and were motile so they could not be assigned to any subspecies and therefore were considered as 'atypical' *A. salmonicida*. The inability to discriminate the subspecies of *A. salmonicida* due to the number of variable and atypical reactions has been previously described (Martínez-Murcia et al., 2005).

For the *Shewanella* isolates, the negative response to the ornithine decarboxylase was a differential character from the closely related species *S. putrefaciens*, *S. baltica* and *S. profunda* (Toffin et al., 2004; Bowman 2005). Furthermore, the isolates (except isolate A2) could be differentiated from *S. profunda* by their inability to grow at 6% NaCl (Toffin et al., 2004).

Phenotypic identification systems can give misleading results because of the great variability of the responses and the discordant results using different methodologies; reliable molecular methods are required for a correct identification to species level (Beaz-Hidalgo et al., 2010; Figueras et al., 2011; Figueras and Beaz-Hidalgo 2014). For certain genera, the 16S rRNA gene sometimes lacks sufficient specificity for differentiating closely related species, as in *Aeromonas* and *Shewanella* (Figueras et al., 2011; Janda and Abbott 2014). The interspecies similarity range of the 16S rRNA gene sequences for the genus *Shewanella* is from 93 to 99.9% (Janda and Abbott 2014) and for the genus *Aeromonas* is from 96.8 to 100% (Figueras et al., 2011). Closely related species, such as *A. salmonicida*, *A. bestiarum* and *A. piscicola*, share 99.8–100% 16S rRNA gene similarity and therefore less conserved and more rapidly evolving housekeeping genes (like *rpoD* or *gyrB*) are required for the correct identification of them (Beaz-Hidalgo et al., 2010; Figueras et al., 2011; Figueras and Beaz-Hidalgo 2014). In the present study, *rpoD* sequencing enabled one *A. sobria* and four *A. salmonicida* isolates to be identified from ice-stored carp (Fig. 1). These species have been found previously in association with fish disease (Beaz-Hidalgo et al., 2010; Vega-Sánchez et al., 2014) and in frozen tilapia (*Oreochromis niloticus*) intended for human consumption (Castro-Escarpulli et al., 2003). Most *A. salmonicida* environmental strains are psychrotrophic, increasing the probability of contaminating refrigerated food, including freshwater fish (Gram et al., 1990; Castro-Escarpulli et al., 2003). In fact, the *A. salmonicida* strains recovered in this study showed the atypical motile, mesophilic behaviour as other atypical *A. salmonicida* strains confusingly referred to as '*A. hydrophila*' and classically represented by the reference strain Popoff 316 (Martínez-Murcia et al., 2005; Beaz-Hidalgo et al., 2010).

In a recent work, Parlapani et al. (2013) reported *Aeromonas* as part of the dominant microbiota at the end of the shelf life of farmed sea bream (*Sparus aurata*) stored in ice when detected by sequencing the 16S rRNA gene from DNA extracted directly from the fish flesh (culture-independent technique). These authors identified *A. salmonicida* as a co-dominating microorganism with *Pseudomonas fluorescens* and *S. putrefaciens*. However, the phylotypes of *A. salmonicida* identified by Parlapani et al. (2013) could in fact also belong to *A. bestiarum* or *A. piscicola* as these three species share an almost identical 16S rRNA gene



**Figure 1.** Unrooted neighbour-joining phylogenetic tree derived from *rpoD* gene (510 bp) sequences showing the relationships of *Aeromonas* fish isolates to the type strains of all other currently known species of *Aeromonas*. Numbers at nodes indicate bootstrap values (percentages of 1000 replicates, >50%). Bar, 0.02 substitutions per nucleotide position.

sequences. These authors also reported that *Aeromonas* could not be detected when cultivation-based techniques were used; however, they did not perform an enrichment step which could have increased the sensitivity of the culturing method. They also highlighted the importance of using molecular methods for detecting fish spoilage microbiota. However, one must also bear in mind that DNA detection by PCR does not imply that the

bacteria is alive, so culturing techniques are useful for demonstrating the bacteria's viability. Other authors have also found that *Aeromonas* spp. represent a significant part of the spoilage microbiota in the Nile perch (*Lates niloticus*) stored at ambient temperature (Gram et al., 1990), sea salmon (*Pseudoperca semifasciata*) stored in ice (Hozbor et al., 2006) and in cold-smoked salmon (*Salmo salar*) (Stohr et al., 2001).

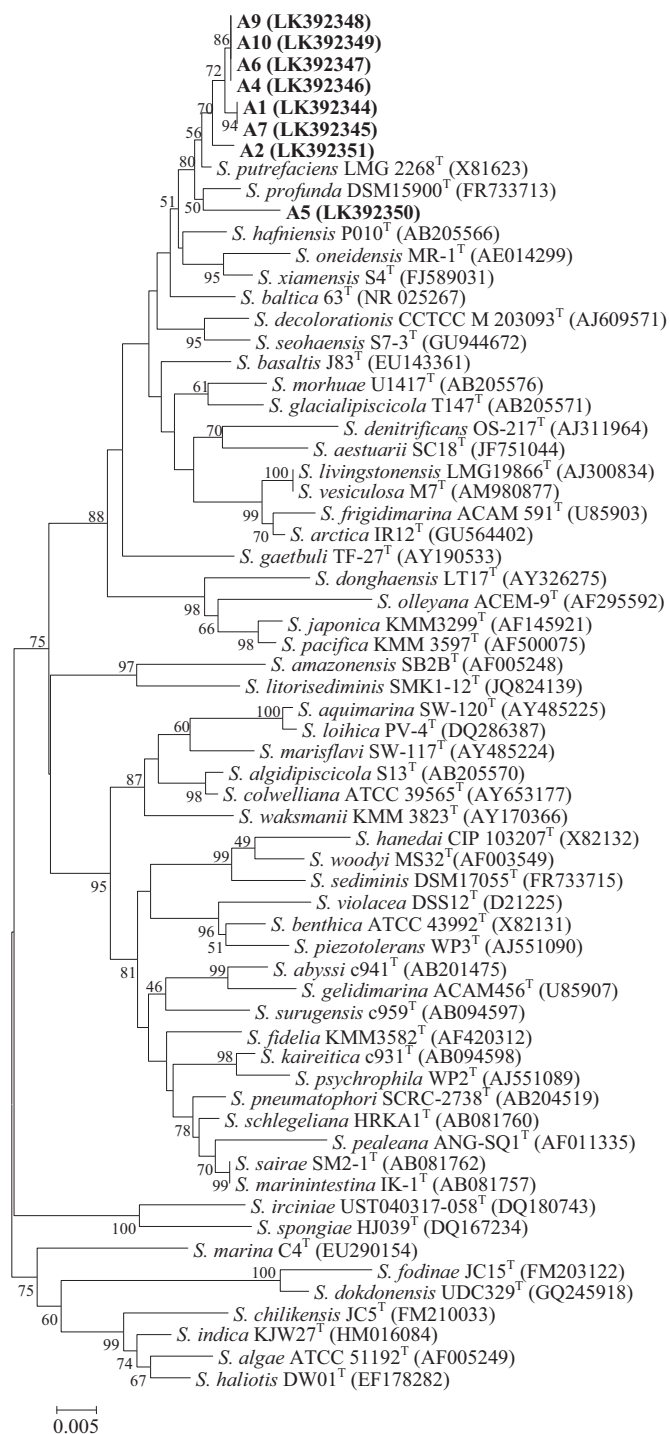
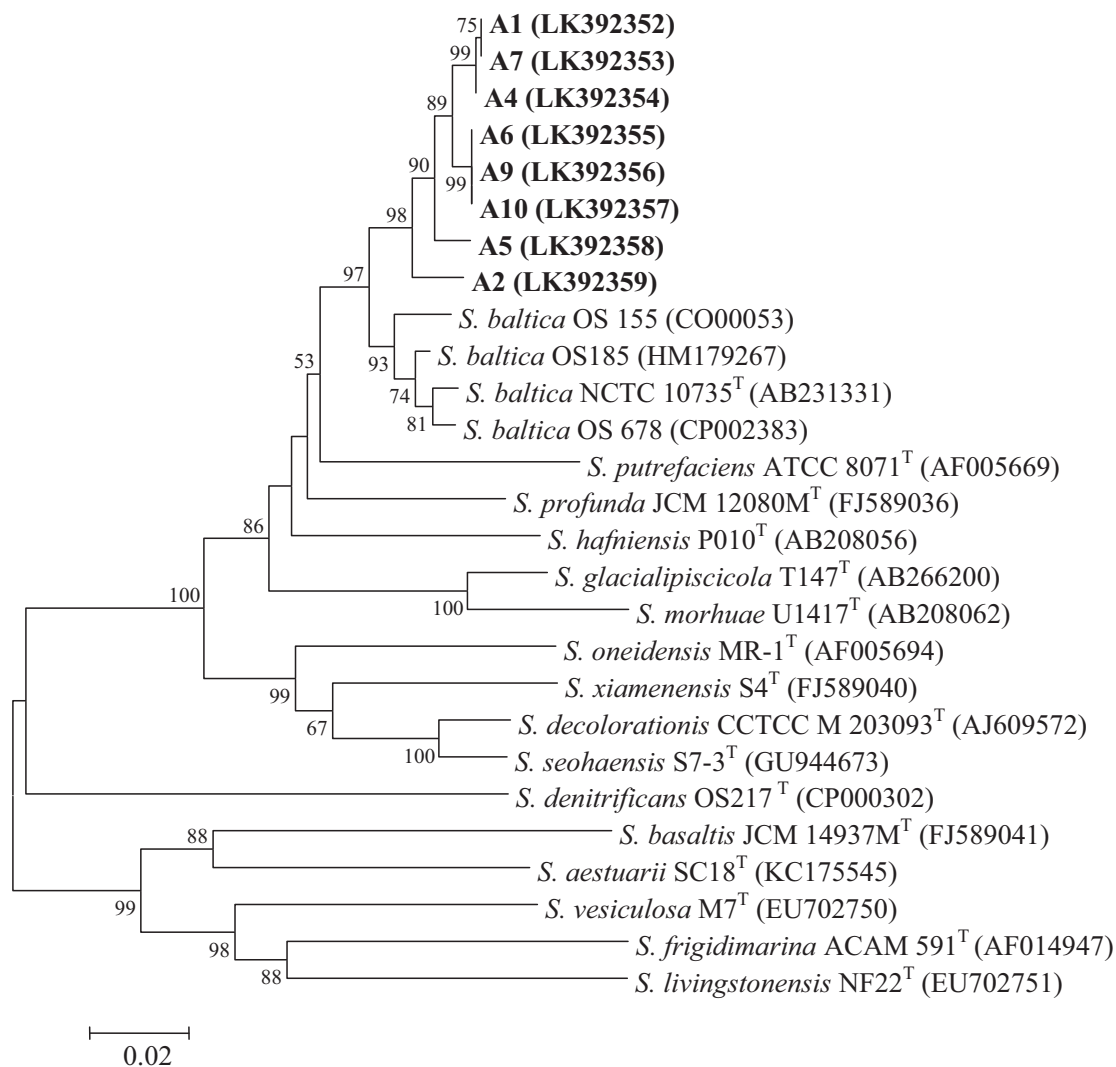


Figure 2. Unrooted neighbour-joining phylogenetic tree derived from the 16S rRNA gene sequences (1344 bp) showing the relationship between the carp isolates and members of the genus *Shewanella*. Numbers at the nodes indicate bootstrap values (percentage of 1000 replicates, >50%). Bar, 0.005 substitutions per nucleotide position.

The analysis of the 16S rRNA gene sequences showed that all *Shewanella* isolates except A5 shared the highest sequence similarity (99.4–99.8%) with the type strain of *S. putrefaciens* and in the phylogenetic tree clustered with the latter species with a low bootstrap of 56% (Table S2, Supporting Information; Fig. 2). However, we found that two sequences of the type strain of *S. putrefaciens* available in the GenBank from two different cul-

ture collections (accession numbers U91550 from strain ATCC 8071<sup>T</sup> and X81623 from strain LMG 2268<sup>T</sup>) differed by four nucleotides. The sequence from strain LMG 2268<sup>T</sup> (X81623) was selected for analysis because the other sequence had an indetermination. This is a problem that to our knowledge has not been reported so far despite authors are using one or the other sequence indistinctly (Satomi et al., 2007; Lee and Yoon 2012;





**Figure 3.** Unrooted neighbour-joining phylogenetic tree derived from the *gyrB* gene sequences (940 bp) showing the relationship between the fish strains and the most closely related members of the genus *Shewanella*. Numbers at the nodes indicate bootstrap values (percentage of 1000 replicates, >50%). Bar, 0.02 substitutions per nucleotide position.

Sung et al., 2012; Yoon et al., 2012; Park and Jean 2013), which could lead to different interpretations. Strain A5 formed in the 16S rRNA tree a long-independent branch that clusters with *S. profunda*, even though it shared practically the same similarity (98.6–98.7%) with *S. putrefaciens* and *S. profunda* (Table S2, Supporting Information).

Considering that previous studies have reported that the resolution of the 16S rRNA gene is not always enough to determine the precise phylogenetic positions for some *Shewanella* species (Satomi, Oikawa and Yano 2003; Satomi et al., 2007; Janda and Abbott 2014), the *gyrB* gene was also sequenced to confirm the results. The type strains of the closest species based on the 16S rRNA gene phylogeny were included in the *gyrB* analysis except the species *S. artica* because its sequence could not be found. In contrast to the 16S rRNA results, all the isolates shared the highest *gyrB* similarity (96.3–96.8%) with *S. baltica* (Table S3, Supporting Information). Therefore, three additional *gyrB* sequences from strains of the latter species, used in a study performed by Deng et al. (2014), were added to the phylogenetic tree to balance the cluster formation (Fig. 3). Interestingly, the eight *Shewanella* isolates formed an independent cluster supported by

a bootstrap of 98% indicating that they represent a different and unknown phylogenetic line close to *S. baltica*. Deng et al. (2014) also observed phenotypic and genetic heterogeneity among the 46 *S. baltica* strains analysed in their study and concluded that they might represent unnamed species. Based on the evidence presented, the eight fish isolates represent an unknown species within the genus *Shewanella* closely related to the halotolerant, psychrotolerant and non-halophilic species *S. baltica*, although further studies are required to confirm this. The species *S. baltica* together with *S. putrefaciens* are among the most common bacteria that spoil refrigerated food and are frequently isolated from dairy products, poultry, beef and seafood (Bowman 2005; Vogel et al., 2005; Parlapani et al., 2013). In fact, Vogel et al. (2005) found that the main H<sub>2</sub>S-producing organism in ice-stored marine fish caught in the Danish Baltic Sea was *S. baltica* as they recognized that 76% (394/518) of the recovered strains belonged to this species. So far, *S. putrefaciens* has been considered the predominating microorganism that spoils marine species stored in ice (Gram and Huss 1996; Gram and Dalgaard 2002; Hozbor et al., 2006; Parlapani et al., 2013) and has also been found in common carp (Koziańska and Pękala 2004) and in other

freshwater fish, such as Nile perch (Gram et al., 1990), trout (Chytiri et al., 2004; Kozińska and Pékala 2004) and tilapia (Lu and Levin 2010). *Shewanella* spp. are opportunistic fish pathogens that can kill stressed and/or immunocompromised fish (Kozińska and Pékala 2004; Bowman 2005). Human infections such as bacteremia, soft tissue and eye infections, pneumonia, arthritis, peritonitis and epyema have been attributed to *S. putrefaciens* (Bowman 2005; Janda and Abbott 2014), highlighting the importance of its detection and identification in food, especially in goods that are sometimes consumed raw or poorly cooked, like fish.

Off-odours and -flavours developed in aerobically stored fish depend on the climatic and storage conditions, the type of fish and even its origin (Hozbor et al., 2006). The TMAO (a naturally occurring substance found in many fish species) is a terminal electron acceptor present among *Shewanella* species and its reduction to TMA under anaerobic or microaerophilic conditions is responsible for the odours and 'ammonia-like' and 'fishy' off-flavours associated with fish spoilage (Gram and Dalgaard 2002; Hozbor et al., 2006). Identifying specific spoilage bacteria relies on detecting sensory odours and chemical compounds of spoiled products, like TMA and H<sub>2</sub>S (Gram and Dalgaard 2002). In the present study, the ability of all *Shewanella* strains to produce H<sub>2</sub>S and to reduce TMAO indicates that they are active spoilers in the deterioration of eviscerated and chilled carp. The *A. salmonicida* isolates recovered from fish in this study were positive for the TMAO reduction test, indicating their contribution in the deterioration of the fish. It has been reported that *Aeromonas* is able to grow and spoil freshwater fish stored in ice or at room temperature (Gram et al., 1990; Castro-Escarpulli et al., 2003). Furthermore, Stohr et al. (2001) have linked bacteria of this genus to the production of off-odours in cold smoked salmon, using other specific sensory descriptors such as 'cheese-like', 'sour' and 'neutral'. However, Gram et al. (1990) described the odours produced by 15 *Aeromonas* isolates present in the Nile perch as 'fishy', 'rotten' and 'sulphidy'.

In conclusion, the use of molecular tools in this study enabled to recognize the presence of *A. salmonicida*, *A. sobria* and of *Shewanella* strains belonging to an unknown phylogenetic lineage that is closely related to *S. baltica* in common carp stored in ice at the time of sensory rejection. The spoilage ability of the species *A. salmonicida* and of the potential new *Shewanella* sp. in chilled stored carp has also been proven.

## SUPPLEMENTARY DATA

Supplementary data is available at FEMSLE online.

## FUNDING

This study was supported in part by funding from the Food Program from the Universidad Nacional del Centro de la Provincia de Buenos Aires, Argentina and by the project with reference AGL2011-30461-C02-02 of the Ministerio de Ciencia e Innovación (Spain).

**Conflict of interest statement.** None declared.

## REFERENCES

Abbott SL, Cheung WK, Janda JM. The genus *Aeromonas*: biochemical characteristics, atypical reactions, and phenotypic identification schemes. *J Clin Microbiol* 2003;41:2348-57.

- Austin B, Austin DA. *Bacterial Fish Pathogens: Disease of Farmed and Wild Fish*, 4th edn. Chichester: Springer-Praxis, 2007.
- Barrow GI, Feltham RKA. *Cowan and Steel's Manual for the Identification of Medical Bacteria*, 3rd edn. Cambridge: Cambridge University Press, 1999.
- Beaz-Hidalgo R, Alperi A, Buján N, et al. Comparison of phenotypic and genetic identification of *Aeromonas* strains isolated from diseased fish. *Syst Appl Microbiol* 2010;33:149-53.
- Beaz-Hidalgo R, Figueras MJ. *Aeromonas* spp. whole genomes and virulence factors implicated in fish disease. *J Fish Dis* 2013;36:371-88.
- Bowman JP. Genus XIII. In: Brennan DJ, Krieg NR, Staley JT, et al. (eds). *Shewanella*. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Vol. 2, 2nd edn. New York: Springer-Verlag, 2005, 480-91.
- Castro-Escarpulli G, Figueras MJ, Aguilera-Arreola G, et al. Characterization of *Aeromonas* spp. isolated from frozen fish intended for human consumption in Mexico. *Int J Food Microbiol* 2003;84:41-9.
- Chytiri S, Chouliara I, Savvaidis IN, et al. Microbiological, chemical and sensory assessment of iced whole and filleted aquacultures rainbow trout. *Food Microbiol* 2004;21:157-65.
- Dalgaard P. Qualitative and quantitative characterization of spoilage bacteria from packed fish. *Int J Food Microbiol* 1995;26:319-33.
- Deng J, Bretta I, Luo C, et al. Stability, genotypic and phenotypic diversity of *Shewanella baltica* in the redox transition zone of the Baltic Sea. *Environ Microbiol* 2014;16:1854-66.
- Figueras MJ, Beaz-Hidalgo R. *Aeromonas*: introduction. In: Batt CA, Tortorello ML (eds). *Encyclopedia of Food Microbiology*, Vol. 1, 2nd edn. Oxford: Elsevier, Ltd, Academic Press, 2014, 24-30.
- Figueras MJ, Beaz-Hidalgo R, Collado L, et al. Recommendations for a new bacterial species description based on analysis of the unrelated genera *Aeromonas* and *Arcobacter*. *BISMIS* 2011;2: 1-16.
- Gram L, Dalgaard P. Fish spoilage bacteria- problems and solutions. *Curr Opin Biotechnol* 2002;13:262-6.
- Gram L, Huss H. Microbiological spoilage of fish and fish products. *Int J Food Microbiol* 1996;33:121-37.
- Gram L, Trolle G, Huss HH. Detection of specific spoilage bacteria from fish stored at low (0°C) and high (20°C) temperatures. *Int J Food Microbiol* 1987;4:65-72.
- Gram L, Wedell-Neergaard C, Huss HH. The bacteriology of fresh and spoiling Lake Victorian Nile perch (*Lates niloticus*). *Int J Food Microbiol* 1990;10:303-16.
- Hozbor MC, Saiz I, Yeannes MI, et al. Microbiological changes and its correlation with quality physicochemical indexes during aerobic iced storage of sea salmon (*Pseudoperca semifasciata*). *Food Sci Technol* 2006;39:99-104.
- International Commission on Microbiological Specifications for Foods (ICMSF) Métodos recomendados para el análisis microbiológico de alimentos. In *Microorganismos de los Alimentos I. Técnicas de Análisis Microbiológicos*, 2nd edn. Zaragoza: Acribia, 1983, 105-280.
- Janda JM, Abbott SL. The genus *Aeromonas*, taxonomy, pathogenicity, and infection. *Clin Microbiol Rev* 2010;23:35-73.
- Janda JM, Abbott SL. The genus *Shewanella*: from the briny depths below to human pathogen. *Clin Microbiol Rev* 2014;40:293-312.
- Kozińska A, Pékala A. First isolation of *Shewanella putrefaciens* from freshwater fish—a potential new pathogen of fish. *Bull Eur Assn Fish P* 2004;24:189-93.
- Lee MH, Yoon HJ. *Shewanella litorisediminis* sp. nov., a gammaproteobacterium isolated from a tidal flat sediment. *Anton Van Leeuw* 2012;102:591-9.

- Lu S, Levin RE. *Shewanella* in a tilapia fish farm. *J Fish Sci* 2010;**4**:159–70.
- Martin-Carnahan A, Joseph SW. Family I. *Aeromonadaceae* Colwell, MacDonell and DeLey 1986. In: Brennan DJ, Krieg NR, Staley JT, et al. (eds). *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Vol. 2, 2nd edn. New York: Springer-Verlag, 2005, 556–578.
- Martínez-Murcia AJ, Benlloch S, Collins MD. 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* 1992;**42**:412–21.
- Martínez-Murcia A, Morena A, Saavedra MJ, et al. Multilocus phylogenetic analysis of the genus *Aeromonas*. *Syst Appl Microbiol* 2011;**34**:189–99.
- Martínez-Murcia AJ, Soler L, Saavedra MJ, et al. Phenotypic, genotypic, and phylogenetic discrepancies to differentiate *Aeromonas salmonicida* from *Aeromonas bestiarum*. *Int Microbiol* 2005;**8**:259–69.
- Park HY, Jean CO. *Shewanella aestuarii* sp. nov., a marine bacterium isolated from tidal flat. *Int J Syst Evol Microbiol* 2013;**63**:4683–90.
- Parlapani FF, Meziti A, Kormas KA, et al. Indigenous and spoilage microbiota of farmed sea bream stored in ice identified by phenotypic and 16S rRNA analysis. *Food Microbiol* 2013;**33**:85–9.
- Satomi M, Oikawa H, Yano Y. *Shewanella marinintestina* sp. nov., *Shewanella schlegeliana* sp. nov. and *Shewanella sairae* sp. nov., novel eicosapentaenoic-acid-producing marine bacteria isolated from sea-animal intestines. *Int J Syst Evol Microbiol* 2003;**53**:491–9.
- Satomi M, Vogel BF, Venkateswaran K, et al. Description of *Shewanella glacialipiscicola* sp. nov. and *Shewanella algidipiscicola* sp. nov., isolated from marine fish of the Danish Baltic Sea, and proposal that *Shewanella affinis* is a later heterotypic synonym of *Shewanella colwelliana*. *Int J Syst Evol Microbiol* 2007;**57**:347–52.
- Soler L, Yañez MA, Chacón MR, et al. Phylogenetic analysis of the genus *Aeromonas* based on two housekeeping genes. *Int J Syst Evol Microbiol* 2004;**54**:1511–9.
- Stohr V, Joffraud JJ, Cardinal M, et al. Spoilage potential and sensory profile associated with bacteria isolated from cold-smoked salmon. *Food Res Int* 2001;**34**:797–806.
- Sung HR, Yoon JH, Ghim SY. *Shewanella dokdonensis* sp. nov., isolated from seawater. *Int J Syst Evol Microbiol* 2012;**62**:1636–43.
- Tamura K, Peterson D, Peterson N, et al. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance and maximum parsimony methods. *Mol Biol Evol* 2011;**28**:2731–9.
- Toffin L, Bidault A, Pignet P, et al. *Shewanella profunda* sp. nov., isolated from deep marine sediment of the Nankai Trough. *Int J Syst Evol Microbiol* 2004;**54**:1943–9.
- Vega-Sánchez V, Latif-Eugenin F, Soriano-Vargas E, et al. Re-identification of *Aeromonas* isolates from rainbow trout and incidence of class 1 integron and  $\beta$ -lactamase genes. *Vet Microbiol* 2014;**172**:528–33.
- Versalovic J, Koeuth T, Lupski JR. Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes. *Nucleic Acid Res* 1991;**19**:6823–31.
- Vogel BF, Venkateswaran K, Satomi M, et al. Identification of *Shewanella baltica* as the most important H<sub>2</sub>S-producing species during iced storage of Danish marine fish. *Appl Environ Microb* 2005;**71**:6689–97.
- Yamamoto S, Harayama S. PCR amplification and direct sequencing of *gyrB* genes with universal primers and their application to the detection and taxonomic analysis of *Pseudomonas putida* strains. *Appl Environ Microb* 1995;**61**:1104–9.
- Yoon JH, Park S, Jung YT, et al. *Shewanella seohaensis* sp. nov., isolated from a tidal flat sediment. *Anton Van Leeuw* 2012;**102**:149–56.

**4.3.3. *Aeromonas dhakensis* pneumonia and sepsis in a neonatal Risso's dolphin (*Grampus griseus*) from the Mediterranean Sea. Pérez L, Abarca M, Latif-Eugenín F, Beaz-Hidalgo R, Figueras MJ, Domingo M. Dis. Aquat. Or. (En prensa, doi: 10.3354/dao02899).**

**Resumen**

En una playa de Cataluña se encontró un neonato de delfín moribundo (*Grampus griseus*) varado. A pesar de los intentos por salvar al animal murió dos días después con signos de neumonía y sepsis. Se obtuvieron cultivos bacterianos puros de un microorganismo a partir de todos los tejidos y sangre. El microorganismo fue identificado como *Aeromonas hydrophila* mediante el sistema fenotípico API 20NE. Sin embargo, mediante la secuenciación del gen *rpoD*, la cepa fue re-identificada como *Aeromonas dhakensis*, siendo este el primer caso fatal de neumonía hemorrágica-necrotizante y sépsis causada por esta especie en un mamífero marino. La cepa *A. dhakensis* GMV 740 es  $\beta$ -hemolítica, portadora de varios genes de virulencia y sensible a varios antibióticos. Este estudio proporciona un nuevo huésped de *A. dhakensis*, una especie potencialmente virulenta en delfines y su presencia en el medio marino indica que puede considerarse como una potencial amenaza en otros mamíferos marinos.





# *Aeromonas dhakensis* pneumonia and sepsis in a neonate Risso's dolphin *Grampus griseus* from the Mediterranean Sea

Lola Pérez<sup>1</sup>, M. Lourdes Abarca<sup>1,2</sup>, Fadua Latif-Eugenín<sup>3</sup>, Roxana Beaz-Hidalgo<sup>3</sup>, M. José Figueras<sup>3,\*</sup>, Mariano Domingo<sup>1,4,5</sup>

<sup>1</sup>Departament de Sanitat i Anatomia Animals, <sup>2</sup>Veterinary Mycology Group, and <sup>4</sup>Servei de Diagnòstic de Patologia Veterinària, Facultat de Veterinària, Universitat Autònoma de Barcelona, 08193 Bellaterra, Barcelona, Spain

<sup>3</sup>Unitat de Microbiologia, Departament de Ciències Mèdiques Bàsiques, Facultat de Medicina i Ciències de la Salut, IISPV, Universitat Rovira i Virgili, Reus, Spain

<sup>5</sup>Centre de Recerca en Sanitat Animal (CReSA), IRTA, Campus de la Universitat Autònoma de Barcelona, 08193 Bellaterra, Barcelona, Spain

**ABSTRACT:** A neonate Risso's dolphin *Grampus griseus* was found stranded alive on a beach in Catalonia, Spain. Rehabilitation attempts were unsuccessful and it died 2 d later, showing pneumonia and sepsis. A pure bacterial culture was obtained from all tissues and blood and identified as *Aeromonas hydrophila* using the API 20NE. However, sequencing the *rpoD* gene showed that the strain in fact belongs to *A. dhakensis*, making this the first report of fatal haemorrhagic-necrotizing pneumonia and sepsis due to this species in a marine mammal. The *A. dhakensis* strain GMV-704 produced  $\beta$ -haemolysis, possessed several virulence genes and showed sensitivity to several antimicrobials. This study provides a new potential host for *A. dhakensis*, and its potential virulence in dolphins and its presence in the marine environment may warrant considering this species a potential threat to marine mammals.

**KEY WORDS:** *Aeromonas dhakensis* · *rpoD* · Virulence · Pneumonia · Sepsis · Dolphin · *Grampus griseus*

Resale or republication not permitted without written consent of the publisher

## INTRODUCTION

*Aeromonas* are Gram-negative bacteria that are autochthonous in aquatic environments and are the causative agents of human and fish infections (Figueras et al. 2005, Beaz-Hidalgo et al. 2010, 2013, Janda & Abbott 2010, Parker & Shaw 2011, Figueras & Beaz-Hidalgo 2015). However, in contraposition to the extensive literature implicating *Aeromonas* in fish diseases, few cases of *Aeromonas* infections have been reported in marine mammals (Cusick & Bullock 1973, Krovacek et al. 1998, Thornton et al. 1998, Nielsen et al. 2013). Moreover, it has been shown that routine phenotypic identification of *Aeromonas* spp. tends to erroneously classify 70 to 80% of the

isolates as belonging to *A. hydrophila*, as demonstrated using reliable molecular identification methods, such as the sequences of housekeeping genes (Figueras et al. 2005, 2011, Beaz-Hidalgo et al. 2010, Figueras & Beaz-Hidalgo 2015). In this study, we present a case of pneumonia and sepsis in a neonatal Risso's dolphin *Grampus griseus* caused by *Aeromonas*. The fatal infection was first attributed to *A. hydrophila* on the basis of the API 20NE identification, but sequencing of the *rpoD* gene classified the isolate as *A. dhakensis*. This relatively unknown species has recently been discovered to be the second-most prevalent *Aeromonas* species in human infections in Asia and Australia (Figueras & Beaz-Hidalgo 2015), but it has never been described in cetacean

\*Corresponding author: mariajose.figueras@urv.cat

species. The clinicopathological presentation as well as the virulence characteristics of the isolated *A. dhakensis* strain (i.e. antimicrobial susceptibility and presence of virulence genes) is provided.

## MATERIALS AND METHODS

### Case history and pathological studies

A neonatal Risso's dolphin was found stranded alive on the beach of Canet de Mar, Catalonia, Spain (41° 35' 13" N, 2° 35' 03" E) on 18 July 2013, the day after a heavy storm. The specimen was a male, 143 cm in length, and still showed skin foetal folds. The calf was detected swimming close to the beach (about 10–15 m away from the coast), and finally stranded about 5 h after first sighting. Despite the very low probability of successful re-introduction of such a young calf, euthanasia was not applied, and after 2 h, the dolphin was transported to a marine water swimming pool at a rescue centre for rehabilitation. The animal died 2 d and 6 h after rescue, in spite of rehabilitation efforts.

A complete necropsy was performed 8 h after the calf died. A large set of organs and tissues were collected and fixed in 10% buffered formalin and processed for routine histopathology as previously described (Soto et al. 2011). Routine detection techniques (immunohistochemistry and reverse transcription PCR, RT-PCR) for cetacean morbillivirus (CeMV) were performed in lung, liver, spleen, kidney and blood as previously described (Soto et al. 2011). Detection of antibodies against *Brucella* spp. was performed in serum with the routine Bengal Rose test, following established procedures (OIE 2013).

### Bacterial isolation and identification

Samples from lung, liver, spleen, kidney and blood were taken aseptically and submitted for bacteriological culture. Homogenates of tissue samples were inoculated onto Columbia agar with 5% sheep blood (Difco) and MacConkey agar (Oxoid) and incubated overnight at 37°C in 5% CO<sub>2</sub>. A blood sample was enriched in thioglycolate broth at 37°C for 24 h before subculturing onto the above-mentioned culture media.

Isolates were phenotypically identified using the API 20NE identification system (bioMérieux). Molecular identification methods, i.e. DNA extraction, amplification, sequencing and analysis of the *rpoD*

gene, were performed as previously described (Soler et al. 2004).

### Virulence gene and antimicrobial susceptibility analysis

Screening for the presence of several virulence genes by PCR was performed in parallel for the recovered *Aeromonas dhakensis* strain GMV-704 and for the type strain of this species, CECT 5744<sup>T</sup>. The investigated genes using primers and conditions described previously (Beaz-Hidalgo et al. 2012) were those encoding toxins (*act*, *alt* and *ast*), enzymes (*aer*, *lip* and *ser*), effector and structural proteins of the type-III secretion system (*aexT*, *aopP*, *asc-V* and *asc-FG*) and a flagellar structural protein (*lafA*).

Antimicrobial susceptibility testing for several antibiotics was performed using the disk-diffusion method following the criteria of the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI 2013).

## RESULTS

### Necropsy findings

At necropsy, the calf showed foetal folds and a small skin excoriation in the anterior maxillary and mandibular extremes, due to traumatism of stranding. The main lesions were observed in the lung, with a single, unilateral, not well-demarcated area of consolidation affecting the caudal zone of the left lung. The size of this lesion was approximately 6 × 8 × 6 cm, with a dark red colour and a harder consistency than the surrounding lung tissue (Fig. 1). The pleural surface over this area showed a thin filamentous fibrin layer, and pleural lymphatic vessels were distended and reddened. The lesion was classified as an acute, severe, focal, unilateral fibrinous-necrotizing pleuropneumonia. Affected lung portions sank completely in fixative, indicating obliteration of aerial spaces by exudate. The left diaphragmatic lymph node was slightly enlarged and had an increased consistency. The ductus arteriosus was still patent. The first (muscular) stomach was empty, and there was a small amount of milky fluid in the second and third gastric chambers. The intestinal lumen was almost empty. Meconium was not present. The liver was pale and of friable consistency. No external or internal parasites were found, and no other macroscopic lesions were recorded.



Fig. 1. Left lung lobe of a neonate Risso's dolphin *Grampus griseus*, showing haemorrhagic necrotizing pneumonia in the caudal portion

Microscopically, the grossly affected lung zones showed an acute inflammatory reaction, with exudation of fibrin, neutrophils and macrophages into the alveolar spaces, and into the bronchial and bronchiolar lumen. Lesions were acinar and confluent in distribution. Alveolar walls and cells in the exudate showed necrosis, with karyorrhectic debris in neutrophils and macrophages (Fig. 2A). Abundant small bacillary bacteria were evident in haematoxylin-eosin stained sections as well as in Grocott's silver methenamine impregnation, located in the bronchiolar lumen and also attached to the epithelial cells, as well as in alveolar spaces, especially evident in the necrotic areas (Fig. 2B). Numerous medium-size venules and lymphatic vessels showed thrombosis. Widespread haemorrhages and congestion in the affected lung parenchyma were observed. The pleural serosa was also infiltrated with neutrophils and macrophages, and lymphatic vessels were massively distended with fibrin and neutrophils. The left diaphragmatic lymph node showed lymphoid depletion in follicular and parafollicular zones and had distended subcapsular sinus filled with neutrophils, macrophages and numerous bacillary bacteria. The thymus showed lymphoid depletion, both in cortex and in medullary zones. In general, secondary lymphoid tissues, like mesenteric and prescapular lymph nodes, and spleen showed signs of immaturity, with a sparse development and lack of germinal centres. Additionally, the laryngeal tonsil (a lymphoglandular organ located at the basis of the larynx) had multiple necrotic foci arranged around cryptal structures and affecting surrounding lymphoid tissue, with abundant bacillary bacterial colonies. The liver showed a severe

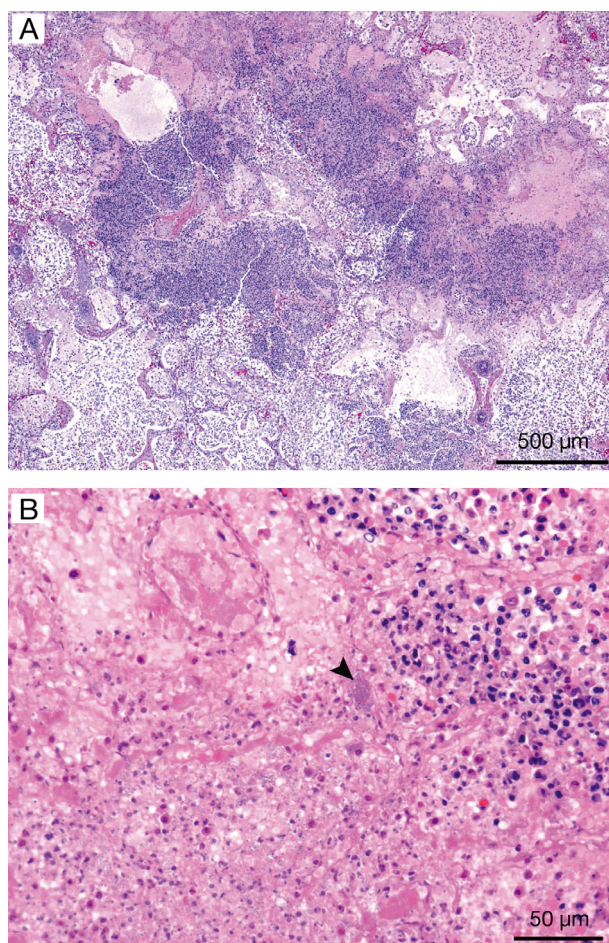


Fig. 2. Histologic lung section of a neonate Risso's dolphin *Grampus griseus* (haematoxylin and eosin stain). (A) Acute inflammatory reaction, with fibrin, neutrophils and macrophages extending into alveolar spaces and bronchiolar spaces, surrounding wide areas of necrosis of lung tissue. (B) Necrosis and inflammatory infiltration by neutrophils and macrophages. Groups of small bacillary bacteria (arrow-head) are evident in the necrotic zones

lipidosis and moderate congestion, and the kidney was congested, with vacuolization of proximal tubules. The central nervous system showed congestion and multifocal perivascular haemorrhages, especially numerous in thalamus and in cerebellar white substance. Routine tests for *Brucella* spp. and CeMV were negative.

#### Culture identification, virulence and antimicrobial susceptibility analysis

Pure cultures of Gram-negative rods in moderate to heavy growth were recovered from all tissues and



from a whole blood sample. Colonies were  $\beta$ -haemolytic on Columbia agar with 5% sheep blood, and non-lactose fermenter on MacConkey agar. The API 20NE identification profile obtained was 7576755 with 83.8% identity to *Aeromonas hydrophila*. One isolate recovered from the lung (GMV-704) was identified by sequencing the *rpoD* gene, and the highest similarity (98.9%) was found with the type strain of *A. dhakensis* (CECT 5744<sup>T</sup>). The identity of the strain was also confirmed when constructing a phylogenetic tree as shown in Fig. 3.

Strain GMV-704 carried the *aer*, *alt*, *lip* and *ser* genes and did not possess the *act*, *ast*, *aexT*, *aopP*, *asc-V*, *asc-FG* and *lafA* genes. The strain showed resistance to the cephalosporins of the first and second generation, to most penicillins and to tetracycline. However, the strain was susceptible to the cephalosporins of the third and fourth generation, carbapenems, aminoglycosides, fluoroquinolones, aztreonam, trimethoprim-sulphamethoxazole, polymyxin B and chloramphenicol.

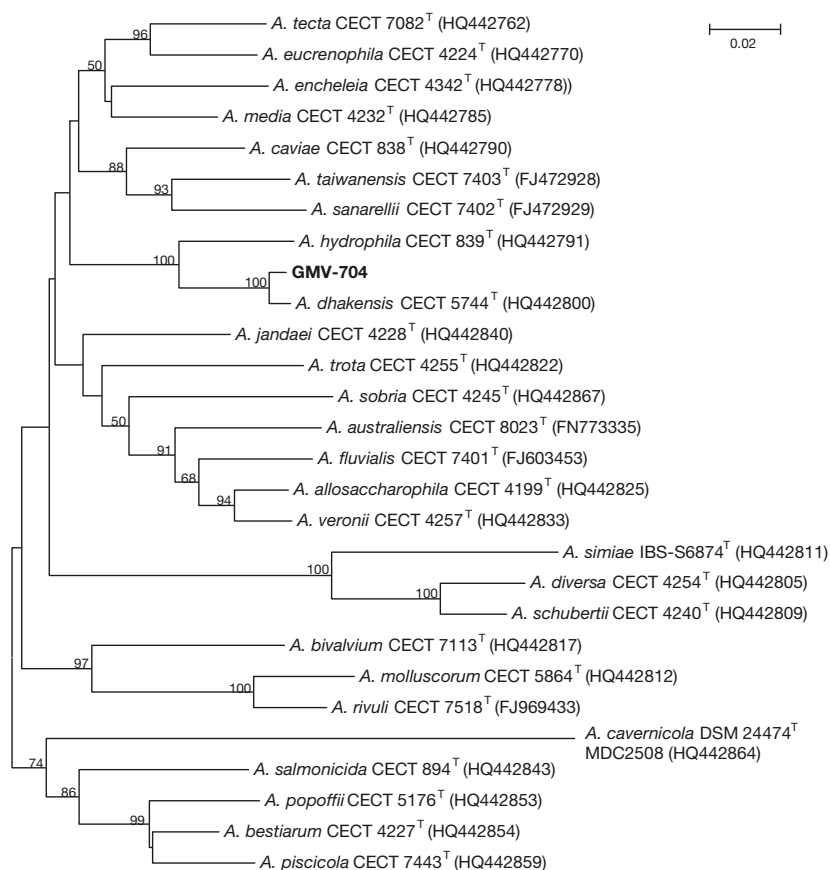


Fig. 3. Unrooted neighbour-joining phylogenetic tree derived from *rpoD* gene sequences (667 bp) showing the relationships of the *Aeromonas* GMV-704 strain (in **bold**) and all currently known *Aeromonas* species. Numbers at the nodes indicate bootstrap values (>50%)

## DISCUSSION

This is the first report of fatal haemorrhagic-necrotizing pneumonia and sepsis due to *Aeromonas dhakensis* in a marine mammal. In cetaceans, *Aeromonas* spp. have been frequently recovered from blowhole and faecal swabs, from wild bottlenose dolphins *Tursiops truncatus* (Morris et al. 2011) and from several cetacean species in Brazilian coastal waters (Pereira et al. 2008), but their role as pathogenic organisms in these species remained unclear. *Aeromonas* spp. were the predominant Gram-negative bacteria found in post-mortem studies in dugongs *Dugong dugon*, contributing to pyogranulomatous pneumonia in this species, frequently as mixed infections (Nielsen et al. 2013). The only report relating *A. hydrophila* with disease in cetaceans was a case of multifocal necrotizing dermatitis and supportive bronchopneumonia described in a captive bottlenose dolphin in 1973 (Cusick & Bullock 1973). In pinnipeds, *A. hydrophila* was cultured from lung and spleen in a stranded grey seal *Halichoerus grypus* with pneumonia and septicaemia (Krovacek et al. 1998). This bacterium was also occasionally isolated from stranded elephant seals, California sea lions and harbour seals (Thornton et al. 1998). It is possible that the *A. hydrophila* identified phenotypically in those studies could belong, after a genetic identification, to *A. dhakensis* (synonym of *A. aquariorum*), as occurred in previous studies (Figueras et al. 2009, 2011, Aravena-Román et al. 2011, Morinaga et al. 2013). In our case, pathologic and bacteriologic examination revealed an acute haemorrhagic-necrotizing pneumonia and sepsis associated with *A. dhakensis*, which was recovered in pure culture from lung, liver, spleen, kidney and blood. Virulence genes detected in our strain (GMV-704), like the *alt*, *aer*, *lip* and *ser* genes, have been previously recorded with variable prevalence (27–100%) in *A. dhakensis* isolates (Figueras et al. 2009, 2011, Puthuchery et al. 2012, Chen et al. 2013, Morinaga et al. 2013). The fact that the *A. dhakensis* GMV-704 strain showed  $\beta$ -haemolysis on sheep blood agar and possessed the *aer* and *lip* genes implicated in the production of

haemolysis, as well as many other known virulence genes, means that these factors may play an important role in the development of the disease. The haemorrhagic-necrotizing character of the pneumonic lesions and the possession of well-known virulence genes by the isolated *A. dhakensis* strain highlight the primary pathogenic role of the bacteria in this case. However, the immaturity of the lymphoid system in a new-born calf and a possible lack or insufficient transfer of maternal immunity by colostrum to the calf could also have increased susceptibility to infection by this bacterium. Routine investigation of CeMV, a well-known immunosuppressive cetacean pathogen, was negative in this animal.

Differentiation of *Aeromonas* species based on phenotypic methods alone is difficult, and frequently, *A. hydrophila* strains have been reclassified into different species by the use of molecular methods (Soler et al. 2004, Figueras et al. 2005, 2011, Beaz-Hidalgo et al. 2010, Aravena-Roman et al. 2011, Figueras & Beaz-Hidalgo 2015). In line with this observation, the API 20NE identification profile of our strain provided 83.8% identity with *A. hydrophila*, because L-arabino assimilation was negative. This and the production of urocanic acid are typical phenotypic characteristics for *A. dhakensis*, useful to differentiate it from *A. hydrophila* (Beaz-Hidalgo et al. 2013). The present study corroborates once more that API 20NE, as other phenotypic identification methods, is unreliable for the identification of *Aeromonas* spp. because it tends to identify the isolates as belonging to the species *A. hydrophila* (Figueras et al. 2005, 2011, Beaz-Hidalgo et al. 2010). Studies in marine mammals that use these phenotypic identification methods to characterize *Aeromonas* isolates will probably uncover the prevalence of *A. dhakensis* under *A. hydrophila*. However, *A. dhakensis* can be easily recognised using molecular identification with the sequences of housekeeping genes as shown in different studies (Figueras et al. 2009, 2011, Beaz-Hidalgo et al. 2010, 2013, Aravena-Román et al. 2011, Esteve et al. 2012, Puthuchery et al. 2012, Sedláček et al. 2012, Wu et al. 2012, Chen et al. 2013, Morinaga et al. 2013, Soto-Rodriguez et al. 2013). The housekeeping genes *rpoD* and *gyrB* were shown to be very useful (Beaz-Hidalgo et al. 2013). Sedláček et al. (2012) identified 1 *A. dhakensis* among the 21 phenotypically identified *A. hydrophila* isolates, using the sequences of the *cpn60* gene and also found that ribotyping with the *EcoRI* restriction enzyme was a suitable and efficient method for the identification of *A. dhakensis*. Other identification methods used in the recent literature for the identification of *A. dhakensis* include MALDI-TOF, which was able to cor-

rectly identify 29 of the 30 strains assayed (Chen et al. 2014). The expected genus-characteristic resistance against ampicillin was observed for our *A. dhakensis* strain. Also the results obtained for the susceptibility analysis of the rest of the antimicrobials tested agreed with those reported by other authors, showing that the cephalosporins (third and fourth generation), monobactams, carbapenems, aminoglycosides, fluoroquinolones, sulphonamides, polypeptides and amphenicols tested were highly effective against this microorganism (Figueras et al. 2009, Esteve et al. 2012, Wu et al. 2012, Chen et al. 2013, Morinaga et al. 2013).

So far, *A. dhakensis* has only been reported in freshwater habitats (fish, river water, pond, egg masses of the non-biting midge *Chironomus* sp.) in many parts of the world such as Israel, Spain, Australia, Portugal and Mexico (Beaz-Hidalgo et al. 2013, Soto-Rodriguez et al. 2013), and it has been associated with disease in freshwater fish, i.e. rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*, European eel *Anguilla anguilla*, Nile tilapia *Oreochromis niloticus* and Mozambican tilapia *O. mossambicus* (Orozova et al. 2009, Esteve et al. 2012, Soto-Rodriguez et al. 2013).

Furthermore, *A. dhakensis* is considered a new emerging human pathogen, and it has been recognised as a prevalent species among *Aeromonas* spp. in human clinical and environmental isolates in Australia, Taiwan and Malaysia (Aravena-Roman et al. 2011, Puthuchery et al. 2012, Chen et al. 2013, Figueras & Beaz-Hidalgo 2015). This study indicates another potential host for *A. dhakensis*, now considered the second-most prevalent *Aeromonas* pathogenic species in humans after *A. caviae* and before *A. veronii* (Figueras & Beaz-Hidalgo 2015), and an emerging pathogen in freshwater fish (Orozova et al. 2009, Esteve et al. 2012, Soto-Rodriguez et al. 2013).

The virulence of *A. dhakensis* for cetaceans is a novel observation, and since this bacterium has been reported to be distributed worldwide, it should be considered a potential threat to marine mammals in fresh water or estuarine environments, particularly river dolphins, but also to marine mammals kept, even shortly, outside of their natural milieu.

*Acknowledgements.* We thank Blanca Pérez and Aida Neira from the Servei de Diagnòstic de Patologia Veterinària, Universitat Autònoma de Barcelona, and Carolina Gómez from the Veterinary Mycology Group of the Universitat Autònoma de Barcelona for their valuable technical assistance. Financial support came from Direcció General de Medi Natural i Biodiversitat, Generalitat de Catalunya, and Servei de Diagnòstic de Patologia Veterinària and Servei Veterinari de Bacteriologia i Micologia (Universitat Autònoma de Barcelona).

LITERATURE CITED

Author copy

- Aravena-Román M, Harnett GB, Riley TV, Inglis TJJ, Chang BJ (2011) *Aeromonas aquariorum* is widely distributed in clinical and environmental specimens and can be misidentified as *Aeromonas hydrophila*. *J Clin Microbiol* 49: 3006–3008
- Beaz-Hidalgo R, Alperi A, Buján N, Romalde JL, Figueras MJ (2010) Comparison of phenotypical and genetic identification of *Aeromonas* strains isolated from diseased fish. *Syst Appl Microbiol* 33:149–153
  - Beaz-Hidalgo R, Shakèd T, Laviad S, Halpern M, Figueras MJ (2012) Chironomid egg masses harbour the clinical species *Aeromonas taiwanensis* and *Aeromonas sanarellii*. *FEMS Microbiol Lett* 337:48–54
  - Beaz-Hidalgo R, Martínez-Murcia A, Figueras MJ (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
  - Chen PL, Wu CJ, Chen CS, Tsai PJ, Tang HJ, Ko WC (2013) A comparative study of clinical *Aeromonas dhakensis* and *Aeromonas hydrophila* isolates in southern Taiwan: *A. dhakensis* is more predominant and virulent. *Clin Microbiol Infect* 20:O428–O434
  - Chen PL, Lee TF, Wu CJ, Teng SH, Teng LJ, Ko WC, Hsueh PR (2014) Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry can accurately differentiate *Aeromonas dhakensis* from *A. hydrophila*, *A. caviae*, and *A. veronii*. *J Clin Microbiol* 52:2625–2628
  - CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) (2013) Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: twenty-third informational supplement M100–S23. CLSI, Wayne, PA
  - Cusick PK, Bullock BC (1973) Ulcerative dermatitis and pneumonia associated with *Aeromonas hydrophila* infection in the bottle-nosed dolphin. *J Am Vet Med Assoc* 163:578–579
  - Esteve C, Alcaide E, Blasco MIAD (2012) *Aeromonas hydrophila* subsp. *dhakensis* isolated from feces, water and fish in Mediterranean Spain. *Microbes Environ* 27:367–373
  - Figueras MJ, Beaz-Hidalgo R (2015) *Aeromonas* infections in humans. In: Graf J (ed) *Aeromonas*. Caister Academic Press, Linton, p 24–30
  - Figueras MJ, Suarez-Franquet A, Chacon MR, Soler L and others (2005) First record of the rare species *Aeromonas culicicola* from a drinking water supply. *Appl Environ Microbiol* 71:538–541
  - Figueras MJ, Alperi A, Saavedra MJ, Ko WC, Gonzalo N, Navarro M, Martínez-Murcia AJ (2009) Clinical relevance of the recently described species *Aeromonas aquariorum*. *J Clin Microbiol* 47:3742–3746
  - Figueras MJ, Beaz-Hidalgo R, Senderovich Y, Laviad S, Halpern M (2011) Re-identification of *Aeromonas* isolates from chironomid egg masses as the potential pathogenic bacteria *Aeromonas aquariorum*. *Environ Microbiol Rep* 3:239–244
  - Janda JM, Abbott SL (2010) The Genus *Aeromonas*: taxonomy, pathogenicity, and infection. *Clin Microbiol Rev* 23:35–73
  - Krovacek K, Huang K, Sternberg S, Svenson SB (1998) *Aeromonas hydrophila* septicemia in a grey seal (*Halichoerus grypus*) from the Baltic Sea: a case study. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* 21:43–49
  - Morinaga Y, Yanagihara K, Eugenin FLL, Beaz-Hidalgo R, Kohno S, Figueras Salvat MJ (2013) Identification error of a causative agent of septicemia. *Diagn Microbiol Infect Dis* 76:106–109
  - Morris PJ, Johnson WR, Pisani J, Bossart GD, Adams J, Reif JS, Fair PA (2011) Isolation of culturable microorganisms from free-ranging bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus*) from the southeastern United States. *Vet Microbiol* 148:440–447
  - Nielsen KA, Owen HC, Mills PC, Flint M, Gibson JS (2013) Bacteria isolated from dugongs (*Dugong dugon*) submitted for postmortem examination in Queensland, Australia, 2000–2011. *J Zoo Wildl Med* 44:35–41
  - OIE (World Organisation for Animal Health) (2013) Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals 2013. OIE, Paris
  - Orozova P, Barker M, Austin DA, Austin B (2009) Identification and pathogenicity to rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), of some aeromonads. *J Fish Dis* 32: 865–871
  - Parker JL, Shaw JG (2011) *Aeromonas* spp. clinical microbiology and disease. *J Infect* 62:109–118
  - Pereira CS, Amorim SD, Santos AFD, Siciliano S, Moreno IB, Ott PH, Rodrigues DDP (2008) *Plesiomonas shigelloides* and *Aeromonadaceae* family pathogens isolated from marine mammals of Southern and Southeastern Brazilian coast. *Braz J Microbiol* 39:749–755
  - Puthuchery SD, Pua SM, Chua KH (2012) Molecular characterization of clinical isolates of *Aeromonas* species from Malaysia. *PLoS ONE* 7:e30205
  - Sedlá ek I, Krej í E, Andlová A, Sedlá ková M, Porazilová I, Holochová P (2012) *Aeromonas hydrophila* subsp. *dhakensis* a causative agent of gastroenteritis imported into the Czech Republic. *Ann Agric Environ Med* 19:409–413
  - Soler L, Yañez MA, Chacón MR, Aguilera-Areola MG, Catalán V, Figueras MJ, Martínez-Murcia AJ (2004) Phylogenetic analysis of the genus *Aeromonas* based on two housekeeping genes. *Int J Syst Evol Microbiol* 54: 1511–1519
  - Soto S, González R, Alegre F, González B and others (2011) Epizootic of dolphin morbillivirus on the Catalanian Mediterranean coast in 2007. *Vet Rec* 169:102
  - Soto-Rodríguez SA, Cabanillas-Ramos J, Alcaraz U, Gomez-Gil B, Romalde JL (2013) Identification and virulence of *Aeromonas dhakensis*, *Pseudomonas mosselii* and *Microbacterium paraoxydans* isolated from Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*, cultivated in Mexico. *J Appl Microbiol* 115:654–662
  - Thornton SM, Nolan S, Gulland FM (1998) Bacterial isolates from California sea lions (*Zalophus californianus*), harbor seals (*Phoca vitulina*), and northern elephant seals (*Mirounga angustirostris*) admitted to a rehabilitation center along the central California coast, 1994–1995. *J Zoo Wildl Med* 29:171–176
  - Wu CJ, Tsai PJ, Chen PL, Wu IC and others (2012) *Aeromonas aquariorum* septicemia and enterocolitis in a cirrhotic patient. *Diagn Microbiol Infect Dis* 74:406–408

Editorial responsibility: Michael Moore,  
Woods Hole, Massachusetts, USA

Submitted: April 13, 2015; Accepted: June 23, 2015  
Proofs received from author(s): August 17, 2015

#### **4.3.4. First record of the rare species *Aeromonas schubertii* from mussels. Phenotypic and genetic reevaluation of the species and a review of the literature. Latif-Eugenín F, Beaz-Hidalgo R, Figueras MJ. Current Microbiology (Sometido)**

##### **Resumen**

En un estudio donde se analizó la prevalencia de *Aeromonas* en moluscos bivalvos, tres aislados fueron identificados como *Aeromonas schubertii* siendo el primer aislamiento de esta especie a partir de mejillones. La descripción de esta especie fue en el año 1988 a partir de cepas clínicas aisladas de infecciones extra-intestinales y desde entonces sólo ha sido citada en 18 ocasiones. Durante muchos años, *A. schubertii* fue la única especie del género incapaz de producir ácido a partir del manitol. Sin embargo, recientemente se han descrito tres nuevas especies manitol negativo (*Aeromonas simiae*, *Aeromonas diversa* y *Aeromonas australiensis*). Esto, además de que *A. schubertii* es una especie patógena en humanos rara, ha motivado el presente estudio para realizar una caracterización de su comportamiento bioquímico y lograr diferenciarla de las otras especies manitol negativo. Se determinó el porcentaje de similitud en diferentes genes (16S rRNA, *rpoD* y *gyrB*), presencia de genes de virulencia y resistencia antimicrobiana entre las diferentes cepas de *A. schubertii* estudiadas. Todas las cepas de *A. schubertii* mostraron el mismo comportamiento fenotípico: reacciones positivas para el citrato, la lisina descarboxilasa y el DL-lactato, pero negativa para la producción de ácido a partir del manitol y sacarosa y para la producción de indol a partir de triptófano, pudiendo ser fácilmente diferenciadas de otras especies manitol negativo. Se demostró que todas las cepas poseen los genes de virulencia *aerA* y *lafA* y son sensibles a todos los antibióticos analizados. Los moluscos bivalvos, podrían ser una ruta de transmisión de esta bacteria al ser humano.





**First record of the rare species *Aeromonas schubertii* from mussels. Phenotypic and genetic reevaluation of the species and a review of the literature.**

**Fadua Latif-Eugenín, Roxana Beaz-Hidalgo, María J. Figueras\***

Unidad de Microbiología, Facultad de Medicina y Ciencias de la Salud, IISPV, Universidad Rovira i Virgili, Sant Llorenç 21, 43201 Reus, Spain. fadua\_latif@yahoo.com, roxana.beaz@urv.cat, mariajose.figueras@urv.cat

\*Corresponding author: Unidad de Microbiología, Facultad de Medicina y Ciencias de la Salud, IISPV, Universidad Rovira i Virgili, Sant Llorenç 21, 43201 Reus, Spain. Tel: +34-977759321; Fax: +34-977759322; E-mail: mariajose.figueras@urv.cat

Key words: *Aeromonas schubertii*, molecular and phenotypic identification, mussels, virulence genes, antimicrobials.



## Abstract

In a study where the prevalence of *Aeromonas* in shellfish was analysed, three isolates of *Aeromonas schubertii* were identified, representing this the first report of this species from mussels. This species was originally described in 1988 from strains isolated from extra-intestinal human infections and since then has been cited on only 18 occasions. For many years, *A. schubertii* was the only mannitol-negative species of the genus. However, three additional mannitol-negative species (*Aeromonas simiae*, *Aeromonas diversa* and *Aeromonas australiensis*) have been described. This, together with the fact that *A. schubertii* is a rare human pathogenic species, motivated the present study to characterize its biochemical behaviour and differentiation from the other mannitol-negative species. The molecular similarity (16S rRNA, *rpoD* and *gyrB* genes) of the strains, presence of virulence genes and antimicrobial resistance were determined. All *A. schubertii* strains showed the same phenotypic behaviour i.e. they use citrate, are positive for lysine decarboxylase and DL-lactate, but negative for production of mannitol, indole and acid from sucrose and could be easily differentiated from other mannitol-negative species. All strains carried the *aerA* and *lafA* virulence genes and showed susceptibility to all antibiotics tested. Seafood could be a transmission route of this bacterium to humans.



## Introduction

*Aeromonas* species are considered common inhabitants of aquatic ecosystems and are widely distributed in the environment, being isolated from water, chironomid egg masses, healthy and diseased fish, food, human and animal stools, as well as from other clinical samples [6, 10, 13, 19, 20, 21, 24]. Currently, *Aeromonas* are considered opportunistic and emerging pathogens in humans and may affect both immunocompetent and immunocompromised individuals [13, 19, 21, 24]. The most prevalent species in clinical samples, accounting for ca 96% of the clinical isolates, are *Aeromonas caviae* (29.9%), the recently reclassified species *Aeromonas dhakensis* (25.5%), *Aeromonas veronii* (22%) and *Aeromonas hydrophila* (18%) [21]. Among other, less frequently, isolated clinical species is *A. schubertii*. This species was described in 1988 [23], as the only species of the genus not able to ferment mannitol, using seven strains isolated mainly from soft tissue infections and blood. Since then, three other mannitol-negative species have been described, *Aeromonas simiae* [22], *Aeromonas diversa* [36] and *Aeromonas australiensis* [4].

*Aeromonas schubertii* has so far been isolated from clinical samples of blood, wounds, skin, abscess, pleural fluid and faeces [1, 11, 15, 23, 25, 26, 39]. This species has also been isolated from a variety of environmental samples, including frog skin [38], vegetables [35], rabbit meat [42], chicken meat [5, 40], drinking water [41], freshwater where snakehead fish are cultured [16, 30], ornamental fish aquarium water [43] and shrimps [48]. Biochemical methods used for the identification of *Aeromonas* to species level are laborious and produce misidentifications [6, 28, 44]. To solve this problem, molecular identification methods are used, i.e. 16S rDNA-RFLP and sequencing of housekeeping genes, that are reliable in differentiating the current 30 species that compose the genus *Aeromonas* [9, 27, 34].

Regarding the virulence of *Aeromonas*, these bacteria have pili, flagella, outer-membrane proteins, lipopolysaccharide and capsules, and are able to produce extracellular toxins that can have cytotoxic, cytolytic, haemolytic, enterotoxic, lipolytic and proteolytic activities [8]. They generally show antimicrobial resistance to ampicillin (a characteristic of genus), penicillin, carbenicillin and ticarcillin, although they are generally susceptible to a wide

range of cephalosporins, and to aminoglycosides, carbapenems, chloramphenicol, tetracycline, trimethoprim-sulphamethoxazole and quinolones [3, 12, 24, 29].

Within a separate study aimed at determining the prevalence of *Aeromonas* in shellfish, three isolates of *A. schubertii* were recognized, and considering the rarity of this finding, the aim of this study is to update the information of the species *A. schubertii* in relation to its phenotypic differentiation from other described mannitol-negative species and to determine the presence of virulence genes and the antimicrobial pattern. Furthermore, the habitats from where the species has previously been recorded will be reviewed.

## Materials and methods

### *Sample collection and Aeromonas strains*

A total of 19 shellfish specimens (16 mussels and 3 oysters) were obtained from the Ebro delta in Spain. Homogenates of 10 g of shellfish in 90 ml of alkaline peptone water supplemented with ampicillin (10 mg/l) were incubated at 30°C for 24 h. After this enrichment step, ten-fold serial dilutions were carried out and 0.1 ml of each dilution tube was spread on ampicillin dextrin agar (ADA) and incubated at 30°C for 24 h. Yellow colonies were considered to be presumptive *Aeromonas* and were cultured on Tryptic Soy Agar (TSA) for further analysis.

Type and reference *Aeromonas* strains evaluated were obtained from our culture collection (Table S1) which include one *A. schubertii* strain recovered from shellfish in the present study, six reference *A. schubertii* strains and additional strains belonging to other mannitol-negative species, i.e. *A. simiae* (n=2), *A. diversa* (n= 2) and *A. australiensis* (n=1).

### *Genetic identification to genus level*

From pure cultures, DNA was extracted using InstaGene™ DNA purification Matrix (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA) following the manufacturer's instructions. The presence of the glycerophospholipid-cholesterol acetyltransferase (GCAT) gene, considered specific for the genus *Aeromonas* was determined by PCR using previously described primers and conditions [14].

### *Molecular typing and genetic identification to species level*

The *Aeromonas* isolates were genotyped using the Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus (ERIC) PCR using the primers ERIC-1R and ERIC2 [47]. Molecular

identification was performed by 16S rDNA-RFLP and by sequencing the 16S rRNA, *rpoD*, *gyrB* genes, using the procedures described in previous studies [18, 32, 45]. Sequence correction, alignment and phylogenetic analysis were performed using the programs DNASTar Seqman (Lasergene) and Mega version 5.0 [46].

Accession numbers for 16S rRNA, *rpoD* and *gyrB* genes are LN849803 to LN849808, LN849791 to LN849796 and LN849797 to LN849802 respectively.

#### *Biochemical identification to species level*

Key differential phenotypic tests for *A. schubertii* (Table 1) i.e. production of  $\beta$ -haemolysis using TSA with 5% sheep blood, production of indole from tryptophan, LDC, acid production from sucrose and mannitol and utilization of citrate and DL-lactate were selected based on previously published data [2, 23, 31]. These tests were assayed in parallel for the shellfish isolates, six *A. schubertii* reference strains from our culture collection and three other phenotypically closely-related *Aeromonas* species: *A. simiae* (n=2), *A. diversa* (n= 2) and *A. australiensis* (n=1). The tests were carried out in triplicate using appropriate positive and negative controls. All tests were incubated at 30°C for 24-48 h, except for the utilization of the DL-lactate that was incubated for seven days. Additionally  $\beta$  -haemolysis was also tested at 37°C for 24/48 h.

#### *Detection of virulence genes and antimicrobial susceptibility*

The seven *A. schubertii* strains analysed in the present study were screened for the presence of several virulence genes encoding toxins (*act*, *alt*, *ast*, *stx1* and *stx2*), enzymes (*aer* and *ser*), effector and structural proteins of the type three secretion system (TTSS; *aexT*, *aopP*, *asc-V* and *ascF-G*) and a flagella structural protein (*lafA*) by PCR using previously described primers and conditions [7].

Antimicrobial susceptibility was determined using the disk-diffusion method following the criteria of the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI 2010, M45-A2) [17]. The antimicrobials tested were: piperacillin (100  $\mu$ g), ceftiofloxacin (30  $\mu$ g), ceftriaxone (30  $\mu$ g), cefepime (30  $\mu$ g), aztreonam (30  $\mu$ g), imipenem (10  $\mu$ g), gentamicin (10  $\mu$ g), amikacin (30  $\mu$ g), ciprofloxacin (5  $\mu$ g), trimethoprim-sulphamethoxazole (1.25  $\mu$ g + 3.75  $\mu$ g) and tetracycline (30)  $\mu$ g.



## Results

### *Molecular identification and characterization of A. schubertii*

Among the 19 shellfish samples analysed, four (21.1%, three mussels and one oyster) were positive for the presence of *Aeromonas* and the 10 isolates obtained were confirmed to belong to the genus on the basis of the presence of the 230 bp genus-specific PCR band of the GCAT gene. The ERIC-PCR showed that the 10 isolates belonged to six genotypes or strains. Only one isolate representative of each genotype was identified by sequencing the *rpoD* gene and revealed that four of the six strains correspond to *Aeromonas media* (66.7%), one to *Aeromonas allosaccharophila* (16.7%) and one to *A. schubertii* (16.7%). The 3 isolates of *A. schubertii* (367A, 367C and 367D) showed identical ERIC-PCR profiles and were all recovered from the same mussel sample. The *rpoD* gene of strain 367A also showed 99.5% identity with the type strain of *A. schubertii*. The isolate *A. schubertii* 367A was re-identified using the 16S rDNA-RFLP method and sequencing the 16S rRNA and *gyrB* genes. This isolate in parallel to the other six *A. schubertii* strains analysed shared an identical 16S rDNA-RFLP pattern (with bands at 228, 207, 195, 180, 172, 157, 78, 69, 66, 47 and 40 bp). The sequences of the 16S rRNA gene obtained clustered with the sequence of the type strain of *A. schubertii* in the phylogenetic tree (Fig. S1), as occurred in the tree constructed using the concatenated *gyrB* and *rpoD* gene sequences (Fig. 1).

### *Evaluation of diagnostic phenotypic tests*

All *A. schubertii* strains showed an identical behaviour in the phenotypic tests assayed being positive for  $\beta$ -haemolysis at both temperatures tested (30°C and 37°C), LDC, utilization of citrate and DL-lactate but negative for the production of indole and acid from sucrose and mannitol (Table 1).

### *Virulence genes and antimicrobial susceptibility*

The seven *A. schubertii* strains studied carried both the *aer* and *lafA* genes that encode for aerolysin and lateral flagellum respectively, but none of the other 10 virulence genes (*act*, *alt*, *ast*, *stx1*, *stx2*, *ser*, *aexT*, *aopP*, *asc-V* and *ascF-G*) could be detected.

Strain 367A and the other six *A. schubertii* strains used in this study, were susceptible to all antibiotics tested: piperacillin, cefoxitin, ceftriaxone, cefepime, aztreonam, imipenem, gentamicin, amikacin, ciprofloxacin, trimethoprim-sulphametoxazole, and tetracycline.

## Discussion

As commented, the 16S rRNA-RFLP patterns obtained for the strain 367A and the other six *A. schubertii* strains were identical to the one described as species-specific for *A. schubertii* [18]. These results together with those obtained with the sequenced genes confirmed the identity of strain 367A as *A. schubertii*. From our review of the literature (Table 2), this is the first report of *A. schubertii* from shellfish. So far, reports of this species in environmental samples appear in only 10 studies. In a study performed in the year 2000, was isolated 1 (2.3%) strain among 43 *Aeromonas* isolates from frog skin (*Rana tigerina* and *Rana rugulosa*) [38]. In the same year, *A. schubertii* was the most commonly isolated *Aeromonas* species in vegetables, mainly carrot, cucumber and pepper, being present in 18/86 (21%) samples analysed [35]. In another study, were examined rabbit meat as a potential source of food borne pathogens and found that 18/54 (33.3%) isolates were identified as *Aeromonas* sp. and 1/18 (5.6%) as *A. schubertii* [42]. One *A. schubertii* isolate was identified in 30 samples analysed from chicken meat (3.3%) [5]. In another study, the authors analysed drinking water for the presence of *Aeromonas* sp. and reported an incidence of this genus of 6% (12/200 water samples) identifying one (1%) *A. schubertii* strain among the 96 *Aeromonas* isolates recovered [41]. More recently, another study reported that 8/57 (14.03%) of the chicken meat samples analysed were positive for *Aeromonas* and identified one (12.5%) of the eight isolates recovered as *A. schubertii* [40]. It is important to highlight that all the above cited studies (Table 2) used phenotypic methods for the identification to species level. The stability of the phenotypic characteristics of the species *A. schubertii* observed in this study may indicate that identification was correctly performed in previous studies that used these tests.

Other authors have used molecular techniques to identify *Aeromonas* to species level. In the year 2012, was reported the first case of *A. schubertii* infection in snakehead fish (*Ophiocephalus argus*) in China, causing about 45% mortality. In the latter study 8 isolates were recovered from liver (n=2), kidney (n=2), blood (n=2) and spleen (n=2) in pure culture and were identified as *A. schubertii* by phenotypic tests and by sequencing the 16S rRNA and three housekeeping genes (*gyrB*, *rpoD* and *dnaJ*) [30]. The analysis of some of these sequences in our study seem to indicate that they were all clonally related because the *rpoD* and *gyrB* sequences were identical (Fig. 1).

High mortality was also reported in a fish farm of another snakehead fish species (*Channa maculata*) where three isolates were recovered in pure culture and were identified as *A. schubertii* using phenotypic tests and 16S rRNA gene sequencing [16]. In both studies [16, 30] mentioned above, the only bacteria isolated from diseased fish was *A. schubertii*. Using a combination of traditional molecular approaches and pyrosequencing, *A. schubertii* was found within microbial communities in ornamental fish aquarium water [43]. *Aeromonas* sp. were present in seven of the 14 tanks analysed and *A. schubertii* was recovered from two of them (28.6%) [43]. More recently, in a study conducted in Thailand, *Aeromonas* was found in 14/18 (78%) samples of marine shrimps (*Litopenaeus vannamei* and *Penaeus monodon*) cultured in low salinity inland ponds, and two (2.3%) of the 87 *Aeromonas* isolates recovered were identified as *A. schubertii* by sequencing the *gyrB* and *cpn60* genes [48].

So far, *A. schubertii* has rarely been isolated from human samples (Table 2). Those isolates recovered have mainly been from extra-intestinal origins such as blood, pleural fluid, skin and soft tissue infections [1, 11, 15, 23, 26]. Only two studies have reported isolation of this species from stool samples [25, 39]. The first, 602 samples from patients who were suffering acute diarrhoea in Kolkata (India) were analyzed. Among the *Aeromonas* strains recovered from 64 (10.6%) samples, *A. schubertii* accounted for 4% (3/64) of them [25]. The other study, performed in Brazil, reported one isolate (1.8%) of *A. schubertii* among the 56 *Aeromonas* strains recovered from stool samples of hospitalized newborn babies [39].

The 16S rRNA-RFLP patterns obtained for the seven *A. schubertii* strains analysed in the present study were identical to the previously described specific pattern for the species [18] showing that this technique is still useful for the identification of this species. This is important because since the method was first described the genus has enlarged by 16 new species [9]. Identity was further confirmed by sequencing the 16S rRNA, *rpoD* and *gyrB* genes, again demonstrating the effectiveness of using housekeeping genes to differentiate and identify correctly all species of *Aeromonas* [32, 45]. Despite the geographical diversity of the studied isolates (Table S1) and using the sequences available from other studies to determine the genetic diversity (Figures S1 and 1), this species shows a high degree of genetic homogeneity in the genes analysed.

In relation to the phenotypic tests carried out, our results agree with the original description [23] apart from the ability of the type strain ATCC 43700<sup>T</sup> to produce  $\beta$ -haemolysis, being negative in the original description but positive in the present study. However, it is well known that haemolytic activity depends on the incubation temperature and type of blood (Table 1). Production of  $\beta$ -haemolysis was also observed on horse and bovine blood agar plates at 37°C for 18-24 h in one *A. schubertii* strain recovered from raw chicken [5]. Table 1 shows that the reported biochemical behaviour of *A. schubertii* is highly stable (except for discordant results of LDC and citrate [16]) and based on the tests assayed the species phenotype can be recognized and differentiated easily from other mannitol-negative species (*A. simiae*, *A. diversa* and *A. australiensis*). However, considering the variability reported across studies that use different media and incubation temperatures, haemolysis may not be a useful character for species identification. Regarding the detection of virulence genes, the seven *A. schubertii* strains carried the *aer* and *lafA* genes but the *act*, *alt*, *ser*, *ast*, *stx1*, *stx2* and TTSS genes could not be detected. Table 2 gives a summary of other virulence genes studied by other authors and among those most commonly detected by PCR were *aer*, *lafA/fla*, *ela*, *hlyA* and *ast* [16, 25, 42, 48]. However, we must emphasize that detecting virulence genes by PCR has some limitations. Testing may generate false negatives depending on the sequence being complementary to the primers used. Therefore a negative result by PCR does not necessarily determine the real absence of virulence genes within a bacterium's genome nor does its presence indicate that the gene is expressed. In order to avoid this problem, primers used in the present study were aligned with sequences deposited by different authors in the NCBI database. The aligned sequences were then compared with the draft genome of *A. schubertii* CECT 4240<sup>T</sup> (PRJEB7038) to observe their percentage similarity (Table 3). It was found that both *aer* and *lafA* virulence genes detected by PCR are present in the draft genome of *A. schubertii* CECT 4240<sup>T</sup>, with a percentage similarity ranging between 81% - 91% for *aer* gene and 76% - 85% for *lafA* gene (Table 3). However, the *ast* gene, which was not detected by PCR, was in fact present in the draft genome of *A. schubertii* CECT 4240<sup>T</sup>. This disagreement might be due to the low complementary sequence of the primers with the targeted sequence. Since the draft genome of *A. schubertii* CECT 4240<sup>T</sup> makes up 25% of the complete genome, the real absence of other virulence genes cannot be guaranteed.

In another study that evaluated the pathogenicity of *A. schubertii* using cell cultures, it was shown that one isolate of *A. schubertii* recovered from fresh chicken meat presented cytotoxic but not cytotoxic activity in Vero cells [5]. However, one *A. schubertii* isolate recovered from drinking water that produced a cytotoxic activity in Y-1 mouse adrenal cells [41]. The authors determined that this toxin was detected after exposure of the extracts at 56°C for 15 minutes. Furthermore, both one *A. schubertii* strain isolated from frog skin and the type strain (CECT 4240<sup>T</sup>) of the species showed a low haemolytic activity when they were exposed to frog red blood cells [38]. It is clear that variation in relation to the presence of virulence genes or activity indicate that these tend to be strain specific within a species.

The seven *A. schubertii* strains used in this study were susceptible to all 11 antibiotics tested (Table 2). Similar results were obtained for other authors, who reported that the eight *A. schubertii* strains isolated from snakehead fish (*Ophiocephalus argus*) were susceptible to ciprofloxacin, gentamicin, kanamycin and sulfamethoxazole-trimethoprim; however, contrary to our results their fish strains were resistant to piperacillin [30]. In another study was reported that three *A. schubertii* isolates recovered from other types of snakehead fish (*Channa maculata*) showed susceptibility to all antimicrobials tested, with the exception of aztreonam [16]. During this year was reported that two *A. schubertii* isolates, recovered from shrimps, were susceptible to cefotaxime, imipenem, aztreonam, gentamicin, tetracycline and trimethoprim-sulphamethoxazole. However, there were contradictory results on the resistance of clindamycin [48].

Susceptibility to a wide spectrum of antibiotics has also been observed in clinical isolates of *A. schubertii* (Table 2). Three *A. schubertii* strains (2 recovered from leg wounds and the type strain ATCC 43700<sup>T</sup>) were susceptible to all antibiotics tested [11]. However, in 1999, were determined the susceptibility patterns for 12 *A. schubertii* clinical strains. While 100% of the strains were susceptible to ceftriaxone, aztreonam, imipenem, ciprofloxacin and sulfamethoxazole-trimethoprim, 92% were susceptible to piperacillin, gentamicin and amikacin and there was a variable response for cefoxitin (83% were susceptible) and tobramycin (58% were susceptible) [37]. In another study, one *A. schubertii* strain was isolated from a patient who presented a fatal case of necrotizing fasciitis. The strain was susceptible to broad-spectrum cephalosporins, aminoglycosides and tetracycline but was

resistant to piperacillin [26], being the latter result in disagreement with the result obtained for our strain. In a more recent study, was studied one *A. schubertii* strain associated with skin and soft tissue infections that was susceptible to a spread-spectrum of cephalosporins, aminoglycosides and imipenem, but was resistant to cephazolin [15].

In conclusion, key phenotypic tests for *A. schubertii* have shown to be stable and useful for differentiating it from other mannitol-negative *Aeromonas* species. All *A. schubertii* strains were susceptible to all antimicrobials tested, in agreement with previous studies, showing that there is a wide diversity of antimicrobials that might be useful for treating an *A. schubertii* infection. To our knowledge, this is the first time that *A. schubertii* has been isolated from shellfish, and considering this species is potentially pathogenic to humans and the fact that the mussels can be consumed raw or poorly cooked, its presence in shellfish is of public health concern.

Acknowledgements: This study was supported by the project with reference AGL2011-30461-C02-02 of the Ministerio de Ciencia e Innovación (Spain).

*Conflicts of interest statement*: None declared.

## 5. References

1. Abbott SL, Seli LS, Catino M Jr, Hartley MA, Janda JM (1998) Misidentification of unusual *Aeromonas* species as members of the genus *Vibrio*: a continuing problem. *J Clin Microbiol* 36:1103-1104.
2. Abbott SL, Cheung WK, Janda JM (2003) The genus *Aeromonas*: biochemical characteristics, atypical reactions, and phenotypic identification schemes. *J Clin Microbiol* 4:2348-2357.
3. Aravena-Román M, Inglis TJ, Henderson B, Riley TV, Chang BJ (2012) Antimicrobial susceptibilities of *Aeromonas* strains isolated from clinical and environmental sources to 26 antimicrobial agents. *Antimicrob Agents Chemother* 56:110-1112.
4. Aravena-Román M, Beaz-Hidalgo R, Inglis TJ, Martínez-Murcia AJ, Shang BJ, Figueras MJ (2013) *Aeromonas australiensis* sp. nov., isolated from irrigation water in Western Australia. *Int J Syst Evol Microbiol* 63:2270-2276.

5. Bashir Awan MB, Ahmed MM, Bari A, Krovacek K (2006) Putative virulence factors of the *Aeromonas* spp. isolated from food and environment in Abu Dhabi, United Arab Emirates. *J Food Prot* 69:1713-1716.
6. Beaz-Hidalgo R, Alperi A, Buján N, Romalde JL, Figueras MJ (2010) Comparison of phenotypical and genetic identification of *Aeromonas* strains isolated from diseased fish. *Syst Appl Microbiol* 33:149–153.
7. Beaz-Hidalgo R, Shakèd T, Laviad S, Halpern M, Figueras MJ (2012) Chironomid egg masses harbour the clinical species *Aeromonas taiwanensis* and *Aeromonas sanarellii*. *FEMS Microbiol Lett* 337: 48-54.
8. Beaz-Hidalgo R, Figueras MJ (2013) *Aeromonas* spp. whole genomes and virulence factors implicated in fish disease. *J Fish Dis* 36:371-388.
9. Beaz-Hidalgo R, Latif-Eugenín F, Hossain MJ, Berg K, Niemi RM, Rapala J et al (2015) *Aeromonas aquatica* sp. nov., *Aeromonas finlandiensis* sp. nov. and *Aeromonas lacus* sp. nov. isolated from finnish waters associated with cyanobacterial blooms. *Syst Appl Microbiol* 38:161-168.
10. Borrell N, Figueras MJ, Guarro J (1998) Phenotypic identification of *Aeromonas* genomospecies from clinical and environmental sources. *Can J Microbiol* 44:103-108.
11. Carnahan AM, Marii MA, Fanning GR, Pass MA, Joseph SW (1989) Characterization of *Aeromonas schubertii* strains recently isolated from traumatic wound infections. *J Clin Microbiol* 27:1826-1830.
12. Carvalho MJ, Martínez-Murcia AJ, Esteves AC, Correia A, Saavedra MJ (2012) Phylogenetic diversity, antibiotic resistance and virulence traits of *Aeromonas* spp. from untreated waters for human consumption. *Int J Food Microbiol* 159:230-239.
13. Castro-Escarpulli G, Figueras MJ, Aguilera-Arreola G, Soler L, Fernández-Rendón E, Aparicio GO et al (2003) Characterisation of *Aeromonas* spp. isolated from frozen fish intended for human consumption in Mexico. *Int J Food Microbiol* 84:41-49.
14. Chacón MR, Castro-Escarpulli G, Soler L, Guarro J, Figueras MJ (2002) A DNA probe specific for *Aeromonas* colonies. *Diagn Microbiol Infect Dis* 44:221–225.
15. Chao CM, Lai CC, Tang HJ, Ko WC (2013) Skin and soft-tissue infections caused by *Aeromonas* species. *Eur. J Clin Microbiol Infect Dis* 32:543-547.

16. Chen YF, Liang RS, Zhuo XL, Wu XT, Zou JX (2012) Isolation and characterization of *Aeromonas schubertii* from diseased snakehead, *Channa maculata* (Lacepède). *J Fish Dis* 35:421-430.
17. Clinical Institute and Laboratory Standards (2010) Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: 21st informational supplement. CLSI M45-A2. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA.
18. Figueras MJ, Soler L, Chacón MR, Guarro J, Martínez-Murcia AJ (2000) Extended method for discrimination of *Aeromonas* spp. by 16S rDNA RFLP analysis. *Int J Syst Evol Microbiol* 50:2069-2073.
19. Figueras MJ (2005) Clinical relevance of *Aeromonas*. *Rev Med Microbiol* 16:145-153.
20. Figueras MJ, Beaz-Hidalgo R, Senderovich Y, Laviad S, Halpern M (2011) Re-identification of *Aeromonas* isolates from chironomid egg masses as the potential pathogenic bacteria *Aeromonas aquariorum*. *Environ Microbiol Rep* 3:239-244.
21. Figueras MJ, Beaz-Hidalgo R (2015) Chapter 4. *Aeromonas* infections in humans. In: Graf J (ed). *Aeromonas*. USA: Caister Academic Press, p.p. 65-108.
22. Harf-Monteil C, Le Flèche, A, Riegel, P, Prévost G, Bermond D, Grimond PAD et al (2004) *Aeromonas simiae* sp. nov., isolated from monkey faeces. *Int J Syst Evol Microbiol* 54:481-485.
23. Hickman-Brenner FW, Fanning GR, Arduino MJ, Brenner DJ, Farmer III JJ (1988) *Aeromonas schubertii*, a new mannitol-negative species found in human clinical specimens. *J Clin Microbiol* 26:1561-1564.
24. Janda JM, Abbott SL (2010) The genus *Aeromonas*: taxonomy, pathogenicity, and infection. *Clin Microbiol Rev* 23:35-73.
25. Kannan S, Chattopadhyay UK, Pal D, Shimada T, Takeda Y, Batthacharya SK et al (2001) Isolation and identification of *Aeromonas* from patients with acute diarrhoea in Kolkata, India. *Indian J Med Microbiol* 19:190-192.
26. Kao TL, Kao ML (2012) A fatal case of necrotizing *Aeromonas schubertii* fasciitis after penetrating injury. *Am J Emerg Med* 30:258.e3-258.e5.



27. Lamy B, Laurent F, Kodjo A (2010a) 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.
28. Lamy B, Laurent F, Verdier I, Decousser JW, Lecaillon E, Marchandin H et al (2010b) Accuracy of 6 commercial systems for identifying clinical *Aeromonas* isolates. *Diagn Microbiol Infect Dis* 67:9-14.
29. Lamy B, Laurent F, Kodjo A, Roger F, Jumas-Bilak E, the col BVH study group et al (2012) Which antibiotics and breakpoints should be used for *Aeromonas* susceptibility testing? Considerations from a comparison of agar dilution and disk diffusion methods using Enterobacteriaceae breakpoints. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 31:2369-2377.
30. Liu JY, Li AH (2012) First case of *Aeromonas schubertii* infection in the freshwater cultured snakehead fish, *Ophiocephalus argus* (Cantor), in China. *J Fish Dis* 35:335-342.
31. Martin-Carnahan A, Joseph SW (2005) Family I. Aeromonadaceae Colwell, MacDonell and DeLey 1986. In: Brennan DJ, Krieg NR, Staley JT, et al. (eds). *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Vol. 2, 2nd edn. New York: Springer-Verlag, p.p. 556-578.
32. Martínez-Murcia AJ, Benlloch S, Collins MD (1992) Phylogenetic interrelationships of members of the genera *Aeromonas* and *Plesiomonas* determined by 16S ribosomal DNA sequencing: lack of congruence with results of DNA-DNA hybridizations. *Intl J Syst Bacteriol* 42:412-421.
33. Martínez-Murcia AJ, Monera A, Alperi A, Figueras MJ, Saavedra MJ (2009) Phylogenetic evidence suggests that strains of *Aeromonas hydrophila* subsp. *dhakensis* belong to the species *Aeromonas aquariorum* sp. nov. *Curr Microbiol* 58:76-80.
34. Martínez-Murcia AJ, Morena A, Saavedra MJ, Oncina R, López-Álvarez M, Lara E et al (2011) Multilocus Phylogenetic Analysis of the Genus *Aeromonas*. *Syst Appl Microbiol* 34:189-199.
35. McMahon MA, Wilson IG (2001) The occurrence of enteric pathogens and *Aeromonas* species in organic vegetables. *Int J Food Microbiol* 70:155-162.
36. Miñana-Galbis D, Farfan M, Loren JG, Fusté MC (2010) Proposal to assign *Aeromonas diversa* sp. nov., as a novel species designation for *Aeromonas* group 501. *Syst Appl Microbiol* 33:15-19.

37. Overman TL, Janda JM(1999) Antimicrobial susceptibility patterns of *Aeromonas jandaei*, *A. schubertii*, *A. trota*, and *A. veronii* biotype *veronii*.J Clin Microbiol 37:706-708.
38. Pearson MD, Hirono I, Aoki T, Miranda R, Inglis V (2000) Virulence properties of motile aeromonads isolated from farmed frogs *Rana tigerina* and *R. rugulosa*.Dis Aquat Organ 40:185-193.
39. Pereira CS, Amorim SD, Santos AF, Reis CM, Theophilo CM, Rodrigues D (2008)Characterization of *Aeromonas* spp isolates from newborns hospitalized.Rev Soc Bras Med Trop 41:179-182.
40. Rather MA, Willayat MM, Wani SA, Munshi ZH, Hussain SA (2014) A multiplex PCR for detection of enterotoxin genes in *Aeromonas* species isolated from foods of animal origin and human diarrhoeal samples.J Appl Microbiol 117:1721-1729.
41. Razzolini MT, Di Bari M, Sanchez PS,Zanolli MA (2008) *Aeromonas* detection and their toxins from drinking water from reservoirs and drinking fountains.J Water Health 6:117-123.
42. Rodríguez-Calleja JM, García-López I, García-López ML, Santos JA, Otero A (2006) Rabbit meat as a source of bacterial foodborne pathogens.J Food Prot 69:1106-1112.
43. Smith KF, Schmidt V, Rosen GE, Amaral-Zettler L (2012) Microbial diversity and potential pathogens in ornamental fish aquarium water.PLoS One 7:e39971.
44. Soler L, Marco F, Vila J, Chacón MR, Guarro J, Figueras MJ (2003) Evaluation of two miniaturized systems, MicroScan W/A and BBL Crystal E/NF, for identification of clinical isolates of *Aeromonas* spp. J Clin Microbiol 41: 732-5734.
45. Soler L, Yañez MA, Chacón MR,Aguilera-Arreola MG, Catalán V, Figueras MJ et al (2004) Phylogenetic analysis of the genus *Aeromonas* based on two housekeeping genes. Int J Syst Evol Microbiol 54:1511-1519.
46. Tamura K, Dudley J, Nei M,Kumar S (2007) MEGA4: molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0. Mol Biol Evol 24:1596-1599.
47. Versalovic J, Koeuth T, Lupski JR (1991) Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes.Nucleic Acids Res 19:6823-6831.

Yano Y, Hamano K, Tsutsui I, Aue-Umneoy D, Ban M, Satomi M (2015) Occurrence, molecular characterization, and antimicrobial susceptibility of *Aeromonas* spp. in marine species of shrimps cultured at inland low salinity ponds. *Food Microbiol* **47**:21-27.

**Table 1. Key phenotypic tests for the differentiation of *A. schubertii* from other D-mannitol non-fermentative *Aeromonas* species.**

Test	Results (% positivity) obtained from different studies								
	<i>A. schubertii</i>						<i>A. simiae</i>	<i>A. diversa</i>	<i>A. australiensis</i>
	This study (n= 7) <sup>a</sup>	Hickman-Brenner et al. (1988) (n= 7)	Carnahan et al. (1989) (n= 3)	Abbott et al. (2003) (n= 12)	Lu and Li, (2012) (n= 8)	Chen et al. (2012) (n= 3)	Harf-Monteil et al. ( 2004) (n=2)	Miñana-Galbis et al. ( 2010) (n= 2)	Aravena-Román et al. (2013) (n= 1)
β-haemolysis	+ <b>(100)</b> <sup>b</sup>	V (71) <sup>c</sup>	+ (100) <sup>d</sup>	V (75) <sup>e</sup>	NA	NA	- (0)	+ (100)	+ (100)
Indole production	- <b>(0)</b>	- (0)	- (0)	- (8)	- (0)	- (0)	- (0)	+ (100)	+ (100)
LDC	+ <b>(100)</b>	+ (100)	+ (100)	+ (85)	+ (100)	- (0)	+ (100)	- (0)	+ (100)
<i>Acid from</i>									
Sucrose	- <b>(0)</b>	- (0)	- (0)	- (0)	- (0)	- (0)	+ (100)	- (0)	+ (100)
<i>Utilization of</i>									
Citrate	+ <b>(100)</b>	+ (86)	+ (100)	V (58)	NA	- (0)	- (0) <sup>f</sup>	- (0)	- (0)
DL-lactate	+ <b>(100)</b>	NA	NA	V (58)	NA	NA	+ (100) <sup>f</sup>	- (0)	+ (100)

<sup>a</sup>*A. schubertii* strains used in this study are: 367A (which showed identical phenotypic response to 367C and 367D strains), CECT 4240<sup>T</sup>, ATCC 43701, CECT 4243, LMG 12655, LMG 12668 and 186, our results are in bold; <sup>b</sup>All strains, including the type strain ATCC 43700<sup>T</sup>, were positive using TSA with 5% sheep blood both at 30°C and 37°C for 24 h of incubation; <sup>c</sup>The type strain ATCC 43700<sup>T</sup> was negative using TSA with 5% sheep blood at 36°C up to 7 days; <sup>d</sup>All strains, including the type strain ATCC 43700<sup>T</sup>, showed weak haemolytic activity in TSA with 5% sheep blood and strong haemolytic activity in TSA with 5% horse blood, both at 22°C and 37°C; <sup>e</sup>9/12 *A. schubertii* strains presented haemolytic activity when they were cultured on TSA with 5% sheep blood at 35°C for 7 days; <sup>f</sup>These tests were not carried out in the original description, therefore the results correspond to those obtained in our laboratory; NA: not data available; +, 85-100% of strains positive; -, 0-14% of strains positive; V, 15-84% of strains positive.

**Table 2. Identification methods, antimicrobial susceptibility and virulence genes analyzed in *A. schubertii* strains from different origins.**

Authors	Type of samples analyzed (n)	Identification methods	Antimicrobial susceptibility	Virulence genes studied by PCR <sup>a</sup>
Hickman-Brenner et al. 1988 <sup>b</sup>	Blood (2), forehead abscess (1= ATCC 43700 <sup>f</sup> ), wound (1), skin (1), pleural fluid (1), arm drainage (1)	Phenotypic and DNA-DNA hybridization	S: CEP, CHL, COL, GEN, NAL, TCY R: AMP, PEN, KAN, TCY	ND
Carnahan et al. 1989 <sup>c</sup>	Wound (2) and forehead abscess (1) <sup>f</sup>	Phenotypic (API 20E and MicroScan Gram Negative Combo Panel 7)	S: PIP, CEP, FOX, CRO, IPM, GEN, CIP, SXT, TCY, but AMK, TOB and TIC (66,6% of the strains) R: AMP (66,6% of the strains)	ND
Kokka et al. 1992	Wound (4) <sup>f</sup> , blood (3), arm (1) pleural fluid (1) <sup>f</sup> , skin (1) <sup>f</sup> , forehead abscess (1) <sup>f</sup>	Phenotypic (classical method)	ND	ND
Abbott et al. 1998	Blood (1)	Phenotypic (classical method)	ND	ND
Overman and Janda 1999 <sup>c</sup>	Human infection (12)	NA	S: CRO, ATM, IPM, CIP,SXT and PIP, GEN, AMK (92% of the strains), FOX, TIC (83% ), SAM (75%) and TOB (58%) R: AMP	ND
Pearson et al. 2000	Frog skin (1),forehead abscess (1) <sup>f</sup>	Phenotypic (API20E and AeroKey II)	ND	ND
Kannan et al. 2001 <sup>b</sup>	Faeces (3)	Phenotypic (AeroKey II)	R: CHL, ERI, NOV, TCY, SXT, VAN, GEN (89% of the strains), NEO, COL, PLB (95% of the strains)	<i>ast, aer, hlyA</i>
McMahon and Wilson 2001	Carrot (6), cucumber and pepper (3 each), broccoli, cauliflower, celery, cherry tomatoes, courgette, lettuce, mushroom (1 each)	Phenotypic (AeroKey II)	ND	ND
Bashir Awan et al. 2006	Fresh chicken (1)	Phenotypic (API20E and AeroKey II)	ND	ND

**Table 2 (continuación 1). Identification methods, antimicrobial susceptibility and virulence genes analyzed in *A. schubertii* strains from different origins.**

Authors	Type of samples analyzed (n)	Identification methods	Antimicrobial susceptibility	Virulence genes studied by PCR <sup>a</sup>
Rodriguez-Calleja et al. 2006	Rabbit meat (1)	Phenotypic (classical method)	ND	<i>aerA</i> , <i>hlyA</i>
Razzolini et al. 2008	Drinking water (1)	Phenotypic (classical method)	ND	ND
Pereira et al. 2008 <sup>b</sup>	Faeces(1)	Phenotypic (classical method)	S: CHL, CRO, NAL, NIT, CIP, GEN, IMP, SXT, TCY R: CEP, FOX	ND
Liu and Li 2012 <sup>b</sup>	Blood, kidney, spleen and liver (2 each) of snakehead fish ( <i>Ophiocephalus argus</i> )	Phenotypic (classical method) and molecular (16S rRNA, <i>gyrB</i> , <i>rpoD</i> and <i>dnaJ</i> genes)	S: CEP, CHL, CIP, FOS, GEN, KAN, NEO, NOR, OFX, OXI, SXT, TOB I: ERI, CLR R: AMP, PIP, CLI, VAN, RIF	ND
Smith et al. 2012	Ornamental fish aquarium water(2)	Molecular (pyrosequencing)	ND	ND
Kao and Kao 2012 <sup>b</sup>	Necrotizing fasciitis (1)	Phenotypic (classical method)	S: GEN, TCY, SXT, CHL R: CEP, AMP, CAR	ND
Chen et al. 2012 <sup>b</sup>	Snakehead fish ( <i>Channa maculata</i> , 3)	Phenotypic and molecular (16S rRNA gene)	S: AMK, KAN, PIP, SXT, GEN, CEP,TCY, ERI, LVX, FOX, FEP, CFP, NIT, TOB, CRO, OFX, CHL, NOR, CIP I: PLB, VAN R: CLR, PEN, CLI, OXA,ATM	<i>hlyA</i> , <i>ela</i> , <i>lip</i> <sup>d</sup>

**Table 2 (continuación 2). Identification methods, antimicrobial susceptibility and virulence genes analyzed in *A. schubertii* strains from different origins.**

Authors	Type of samples analyzed (n)	Identification methods	Antimicrobial susceptibility	Virulence genes studied by PCR <sup>a</sup>
Chao et al. 2013 <sup>b</sup>	Skin (1)	Phenotypic (classical method)	S: AMK, GEN, CRO, FEP, IPM R: AMP	ND
Rather et al. 2014	Chicken meat (1)	Phenotypic (classical method)	ND	<i>act, alt, ast</i>
Yano et al. 2015 <sup>b</sup>	Shrimps (2)	Molecular (16S rRNA, <i>gyrB</i> and <i>cpn60</i> genes)	S: CEP, CTX, IPM, ATM, GEN, TCY, CHL, NAL, NOR, SXT R: AMP, SAM, ERI, CLI	<i>act, alt, ast, aer, asc-V, aexT, <b>fla, ela</b>, lip<sup>e</sup></i>
This study <sup>b</sup>	Mussel (1), wound (4) <sup>f</sup> , skin (1) <sup>f</sup> , forehead abscess (1) <sup>f</sup>	Phenotypic and molecular (16S rDNA-RFLP and 16S rRNA, <i>rpoD</i> and <i>gyrB</i> genes)	S: PIP, FOX, CRO, FEP, ATM, IPM, GEN, AMK, CIP, SXT, TCY	<i>act, alt, ast, stx1, stx2, <b>aer, ser, aexT, aopP, asc-V, ascF-G, lafA</b></i>

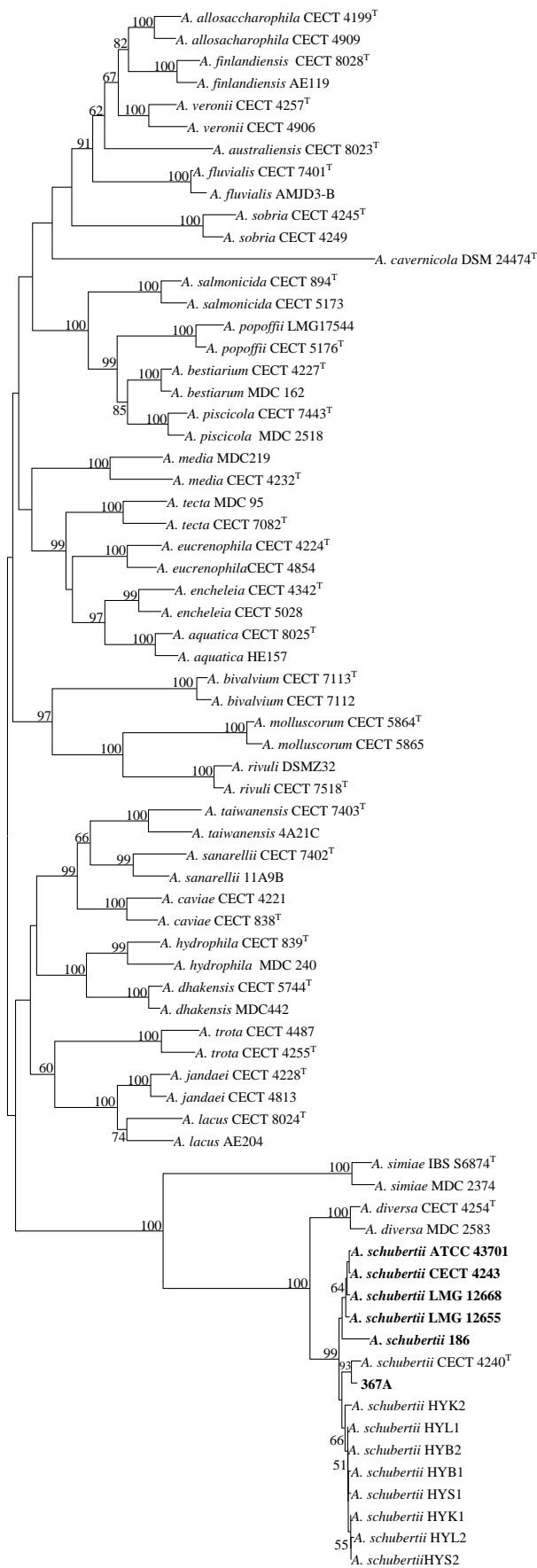
S: susceptible, I: intermediate susceptibility, R: resistant; AMK: amikacin, AMP: ampicillin, SAM: ampicillin-sulbactam, ATM: aztreonam, CAR: carbenicillin, FEP: cefepime, CFP: cefoperazona, FOX: cefoxitin, CTX: cefotaxime, CRO: ceftriaxone, CEP: cephalotin, CIP: ciprofloxacin, CLR: clarithromycin, CHL: chloramphenicol, CLI: clindamycin, COL: colistin, ERI: erythromycin, FOS: fosfomicin, GEN: gentamicin, IPM: imipenem, KAN: kanamycin, LVX: levofloxacin, NAL: nalidixic acid, NEO: neomycin, NIT: nitrofurantoin, NOR: norfloxacin, NOV: novobiocin, OFX: ofloxacin, OXA: oxacillin, OXI: oxytetracycline, PEN: penicillin, PIP: piperacillin, PLB: polymyxin B, RIF: rifampicin, TCY: tetracycline, TIC: ticarcilina, TOB: tobramycin, SXT: trimethoprim-sulphamethoxazole, VAN: vancomycin. <sup>a</sup>The genes that were detected by PCR are shown in bold. <sup>b</sup>The authors used the disk-diffusion method for the antimicrobial susceptibility study, <sup>c</sup>The authors used the micro dilution method (MicroScan) for the antimicrobial susceptibility study. <sup>d</sup>In this study, the 3 *A. schubertii* strains were phenotypically tested for haemolysis, elastase (66.7 % of the strain were positive in both cases) and lipase (100% of the strains were positive) production. <sup>e</sup>In this study, the 2 *A. schubertii* strains were phenotypically tested for haemolytic, DNase, protease and gelatinase activity, with positive results in all cases, <sup>f</sup>These strains were used in the original description (Hickman-Brenner et al., 1988), ND: not done, NA: not data available (the strains were previously identified).

**Table 3. Blast results obtained between sequences of *A. schubertii* virulence genes and the genome of *A. schubertii* CECT 4240<sup>T</sup> (PRJEB7038).**

Genes	Sequences downloaded from NCBI database				Presence (+) or absence (-) of genes in the genome of <i>A. schubertii</i> CECT 4240 <sup>T</sup> and percentage similarity
	Size (bp)	Reference strains	Authors	Accession number	
<i>Ast</i> <sup>a</sup>	4623	<i>A. hydrophila</i> SSU	Sha et al., 2002	AF419157	(+) 89% similarity
<i>Alt</i> <sup>a</sup>	1371	<i>A. hydrophila</i>	Chopra et al., 1996	L77573	(-)
<i>stx1</i> <sup>b</sup>	350	<i>A. caviae</i> 885C	Alperi & Figueras, 2010	GU130285	(-)
<i>stx2</i> <sup>b</sup>	406	<i>A. caviae</i> 819C	Alperi & Figueras, 2010	GU130286	(-)
Haemolysin <sup>b</sup>	354	<i>A. schubertii</i> ZS20100725	Chen et al., 2012	JF298812	(-)
	626	<i>A. schubertii</i> WL-2	Lui C <sup>c</sup>	JX996182	(+) 81% similarity
Hole-forming Preprotoxin aerolysin gene <sup>a</sup>	2346	<i>A. hydrophila</i> AEOHFPA	Howard et al., 1987	M16495	(+) 89% similarity
Aerolysin <sup>a</sup>	4343	<i>A. veronii</i> MTCC 3249	Dayananda et al., <sup>c</sup>	EF034117	(+) 91% similarity
Serine protease and Chaperone protein gene <sup>a</sup>	2358	<i>A. trota</i> 701	Takahashi et al., 2014	KF914659	(-)
<i>serA</i> <sup>a</sup>	1875	<i>A. hydrophila</i> AH-1	Yu et al., 2005	AY841795	(-)
<i>Laf</i> <sup>a</sup>	35945	<i>A. hydrophila</i>	Merino et al., 2003	DQ124694	(+) 76% similarity
	9117	<i>A. salmonicida</i>	Merino et al., 2003	AY129557	(+) 85% similarity
TTSS locus <sup>a</sup>	26855	<i>A. hydrophila</i> SSU	Sha et al., 2005	AY763611	(-)
	26160	<i>A. hydrophila</i> AH-1	Yu et al., 2004	AY394563sd	(-)
<i>aexT</i> <sup>a</sup>	2742	<i>A. salmonicida</i> A449	Decanay et al., 2006	DQ386860	(-)
	2151	<i>A. salmonicida</i> FJ2267	Fehr & Frey <sup>c</sup>	AJ578475	(-)

*ast*: heat-stable cytotoxic enterotoxin, *alt*: heat labile cytotoxic enterotoxin, *stx1*: shiga toxin 1, *stx2*: shiga toxin 2, *serA*: serine protease, *lafA*: lateral flagellin, TTSS: type three secretion system, *aexT*: TTSS effector protein; <sup>a</sup>Complete gene sequence, <sup>b</sup>Partial gene sequence, <sup>c</sup>Unpublished data.



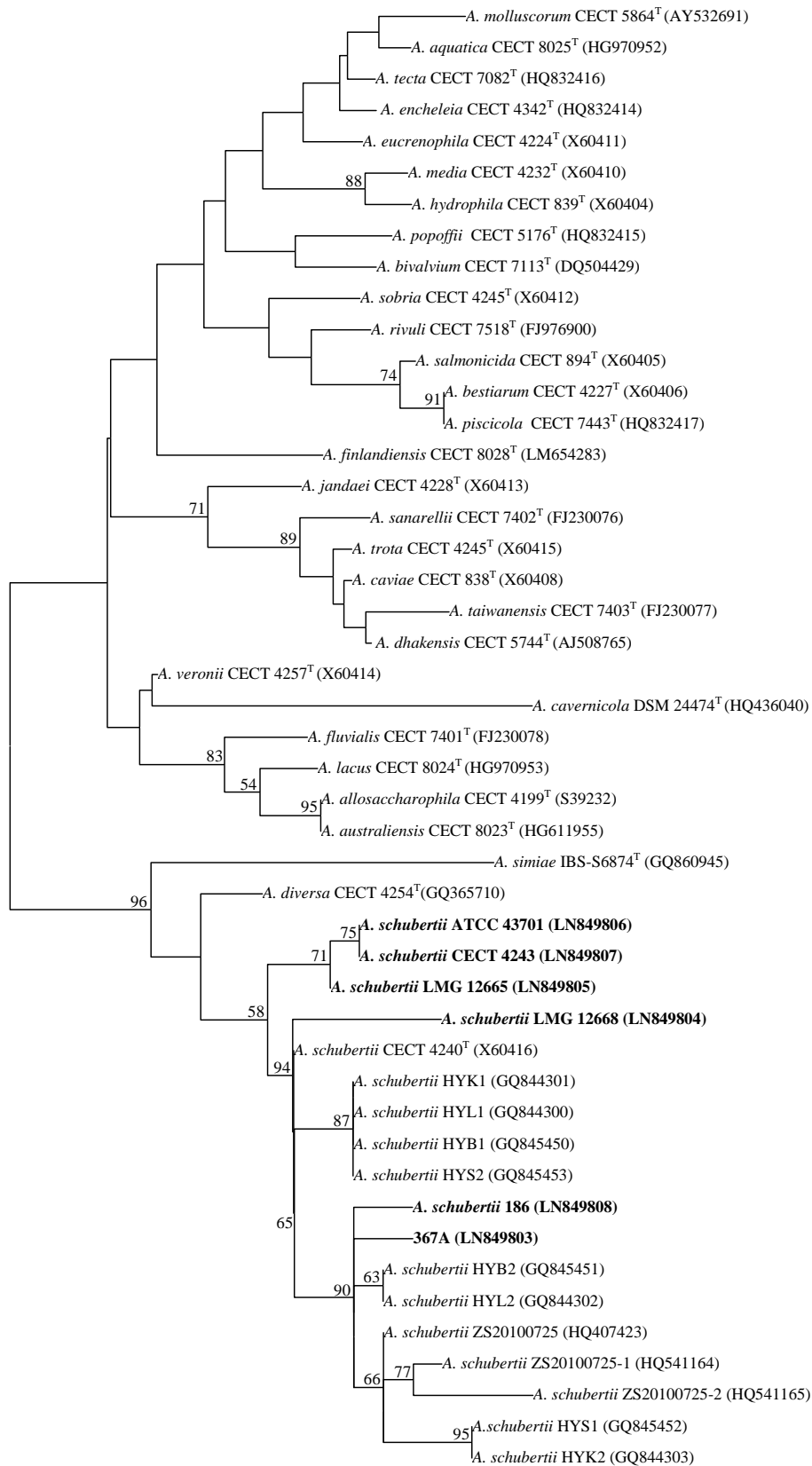


**Origins of *A. schubertii* strains**

- USA Skin - human
- USA Wound - human
- Sweden Wound - human
- Sweden Wound - human
- Australia Wound - human
- USA Abscess - human
- Spain Mussel
- China Kidney - fish<sup>a</sup>
- China Liver - fish<sup>a</sup>
- China Blood - fish<sup>a</sup>
- China Blood - fish<sup>a</sup>
- China Spleen - fish<sup>a</sup>
- China Kidney - fish<sup>a</sup>
- China Liver - fish<sup>a</sup>
- China Spleen - fish<sup>a</sup>

0.01

Figure1. Unrooted phylogenetic tree derived from *rpoD* and *gyrB* genes (1399 bp) concatenated sequences showing the relationships between strain 367A with all other described species in the genus *Aeromonas*. The tree was constructed using the neighbour-joining method. Numbers at nodes indicate bootstrap values (percentage of 1000 replicates). Bar, 0,01 substitutions per nucleotide positions. The sequences deposited in the NCBI database by <sup>a</sup>Liu and Li (2012) were used. Country and source of isolation is indicated at the side of each *A. schubertii* strain.



**Origins of *A. schubertii* strains**

- USA Skin - human
- USA Wound - human
- Sweden Wound - human
- Sweden Wound - human
- USA Abscess - human
- China Kidney - fish<sup>a</sup>
- China Liver - fish<sup>a</sup>
- China Blood - fish<sup>a</sup>
- China Spleen - fish<sup>a</sup>
- Australia Wound - human
- Spain Mussel
- China Blood - fish<sup>a</sup>
- China Liver - fish<sup>a</sup>
- China fish<sup>b</sup>
- China fish<sup>b</sup>
- China fish<sup>b</sup>
- China Spleen - fish<sup>a</sup>
- China Spleen - fish<sup>a</sup>

0.002

Figure S1. Unrooted phylogenetic tree derived from 16S rRNA gene (1298 bp) sequences showing relationships of strain 367A with all other described species in the genus *Aeromonas*. The tree was constructed using the neighbour-joining method. Numbers at nodes indicate bootstrap values (percentage of 1000 replicates). Bar, 0,002 substitutions per nucleotide positions. The sequences deposited in the NCBI database by <sup>a</sup>Lui and Li (2012) and by <sup>b</sup>Chen *et al.* (2012) were used. Country and source of isolation is indicated at the side of each *A. schubertii* strain.

**Table S1. *Aeromonas* strains used in the present study.**

<b>Species</b>	<b>Strains</b>	<b>Other designations</b>	<b>Source of isolation (Data patient)</b>	<b>Country (City)</b>
<i>A. schubertii</i>	367A <sup>a</sup>	----	Mussels	Spain (Tarragona)
<i>A. schubertii</i>	CECT 4240 <sup>Tb</sup>	ATCC 43700 <sup>T</sup> , LMG 9074 <sup>T</sup>	Forehead abscess (injury from diving accident)	USA (Texas)
<i>A. schubertii</i>	ATCC 43701 <sup>b</sup>	CDC 9180-81, LMG 13473	Skin (NA)	USA (Florida)
<i>A. schubertii</i>	CECT 4243 <sup>b</sup>	ATCC 43945, CDC 2508-86	Wound (infection around the folds of the fingernails)	USA (Louisiana)
<i>A. schubertii</i>	LMG 12655	CECT 4933, AMC 1108	Leg wound (35 year old man with enteritis)	Sweden (Göteborg)
<i>A. schubertii</i>	LMG 12668	CECT 4934, AMC 4396	Leg wound (36 year old woman)	Sweden (Göteborg)
<i>A. schubertii</i>	186	----	Wound (NA)	Australia (NA)
<i>A. simiae</i>	IBS S-6874 <sup>T</sup>	LMG 22269 <sup>T</sup> , DSM 16559 <sup>T</sup>	Monkey faeces	France (Strasbourg)
<i>A. simiae</i>	MDC 2374	----	Swine faeces	Portugal (Vila Real)
<i>A. diversa</i>	CECT 4254 <sup>T</sup>	ATCC 43946 <sup>T</sup> , CDC 2478-85 <sup>T</sup>	Leg wound (right tibia)	USA (Louisiana)
<i>A. diversa</i>	CECT 5178	ATCC 700064, CDC 2555-87	Fracture wound (NA)	USA (Louisiana)
<i>A. australiensis</i>	CECT 8023 <sup>T</sup>	LMG 26707 <sup>T</sup> , CCM 8484 <sup>T</sup>	Irrigation water system	Australia (NA)

<sup>a</sup>The isolates 367A, 367C and 367D recovered in this study presented the same genotypic pattern, <sup>b</sup>These strains correspond to 3 of the 7 *A. schubertii* strains used in the original description (Hickman-Brenner et al., 1988), NA: not data available.

**4.3.5. Identification error of *Aeromonas aquariorum*: a causative agent of septicemia.**  
**Morinaga Y, Yanagihara K, Latif-Eugenin F, Beaz-Hidalgo R, Kohno S, Figueras MJ. Diagn. Microbiol. Infect. Dis. (2013) 76:106-109.**

**Resumen**

La re-identificación genética de siete aislados de *Aeromonas* recuperados a partir de sangre reveló que los sistemas fenotípicos de identificación identificaron erróneamente cinco (71,4%) de ellos. Entre las cepas de *Aeromonas*, *A. aquariorum* fue la especie más frecuentemente mal identificada y además se observó que mostraba una mayor actividad citotóxica en líneas celulares sanguíneas humanas, lo que sugiere la importancia de una identificación correcta de *A. aquariorum*.





Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

## Diagnostic Microbiology and Infectious Disease

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/diagmicrobio](http://www.elsevier.com/locate/diagmicrobio)



### Notes

## Identification error of *Aeromonas aquariorum*: A causative agent of septicemia<sup>☆,☆☆</sup>

Yoshitomo Morinaga<sup>a</sup>, Katsunori Yanagihara<sup>a,\*</sup>, Fadua Leila Latif Eugenin<sup>b</sup>, Roxana Beaz-Hidalgo<sup>b</sup>, Shigeru Kohno<sup>c,d</sup>, Maria Josefa Figueras Salvat<sup>b</sup>

<sup>a</sup> Department of Laboratory Medicine, Nagasaki University Graduate School of Biomedical Sciences, Nagasaki, Japan

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

<sup>c</sup> Second Department of Internal Medicine, Nagasaki University Graduate School of Biomedical Sciences, Nagasaki, Japan

<sup>d</sup> Global COE Program, Nagasaki University, Nagasaki, Japan

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 24 October 2012

Accepted 19 January 2013

Available online 23 February 2013

#### Keywords:

*Aeromonas aquariorum*

*Aeromonas* species

Automatic identification systems

Misidentification

*rpoD*

### ABSTRACT

A genetic reidentification of 7 *Aeromonas* blood isolates revealed that phenotype-based identification systems misidentified 5 (71.4%) isolates. In *Aeromonas* strains, *A. aquariorum* was the most common misidentified organism and showed the most potent cytotoxic activities against human blood cell lines, suggesting that the correct identification of *A. aquariorum* is important.

© 2013 Elsevier Inc. All rights reserved.

The genus *Aeromonas* is composed of oxidase-positive, glucose-fermenting, Gram-negative rods that are widely distributed in freshwater, estuarine, and marine environments, and causes a variety of human illnesses such as enterocolitis and septicemia (Figueras, 2005; Janda and Abbott, 2010; Morinaga et al., 2011). We previously reported that *Aeromonas* septicemia occurred frequently in hospitalized patients with underlying diseases including malignancy in Japan (Morinaga et al., 2011). Phenotypical differentiation of the genus *Aeromonas* or its species has been recognized to be difficult because of the nonuniform biochemical reactions and can lead to misidentification (Abbott et al., 2003; Aravena-Roman et al., 2011; Figueras, 2005; Figueras et al., 2011b). The acid production from arabinose and the production of urocanic acid and sodium dodecyl sulfate have been proposed for discriminating *A. aquariorum* from other species (Esteve et al., 2012), but the molecular identification has been emphasized as an alternative method for the correct identification (Figueras et al., 2011a; Puthuchery et al., 2012). To examine the clinical importance of the correct identification, we molecularly reidentified the isolates

included in our previous report and evaluated the virulence genes and cytotoxicity on human cell lines.

Seven *Aeromonas* strains recovered from 7 cases with septicemia (1 strain did not regrow) (Morinaga et al., 2011) were reidentified by sequencing the *rpoD* gene using primers and conditions previously described (Soler et al., 2004). The sequences obtained were independently aligned using the MEGA5 program with the sequences of the type and reference strains of all members of the genus *Aeromonas* taken from our in-house database (Martinez-Murcia et al., 2011). Percentage similarity was calculated using the EzTaxon pairwise alignment tool (Chun et al., 2007). Genetic distances and clustering were determined using Kimura's (1980) 2-parameter model, and the evolutionary tree was constructed by the neighbour-joining method (Saitou and Nei, 1987) using the MEGA5 program (Tamura et al., 2011). Stability of the relationship was assessed by the bootstrap method (1000 replications).

Sequence-based analysis identified 4 of the 7 isolates as *A. aquariorum* and the rest as *A. hydrophila*, *A. caviae*, and *A. veronii* (Fig. 1 and Table 1). Only 2 (28.6%) of 7 strains were correctly identified by phenotypic identifications (Vitek 2 [bioMérieux, Hazelwood, MO, USA] and Phoenix 100 systems [BD, Franklin Lakes, NJ, USA]). The species *A. aquariorum* was phenotypically misidentified as *A. hydrophila* in agreement with a previous study (Aravena-Roman et al., 2011), but also as *A. veronii* bv *sobria*, despite misidentification with *A. caviae* (Figueras et al., 2009).

*A. aquariorum* is a novel species of the genus *Aeromonas* (Esteve et al., 2012; Martinez-Murcia et al., 2008, 2009) and has been

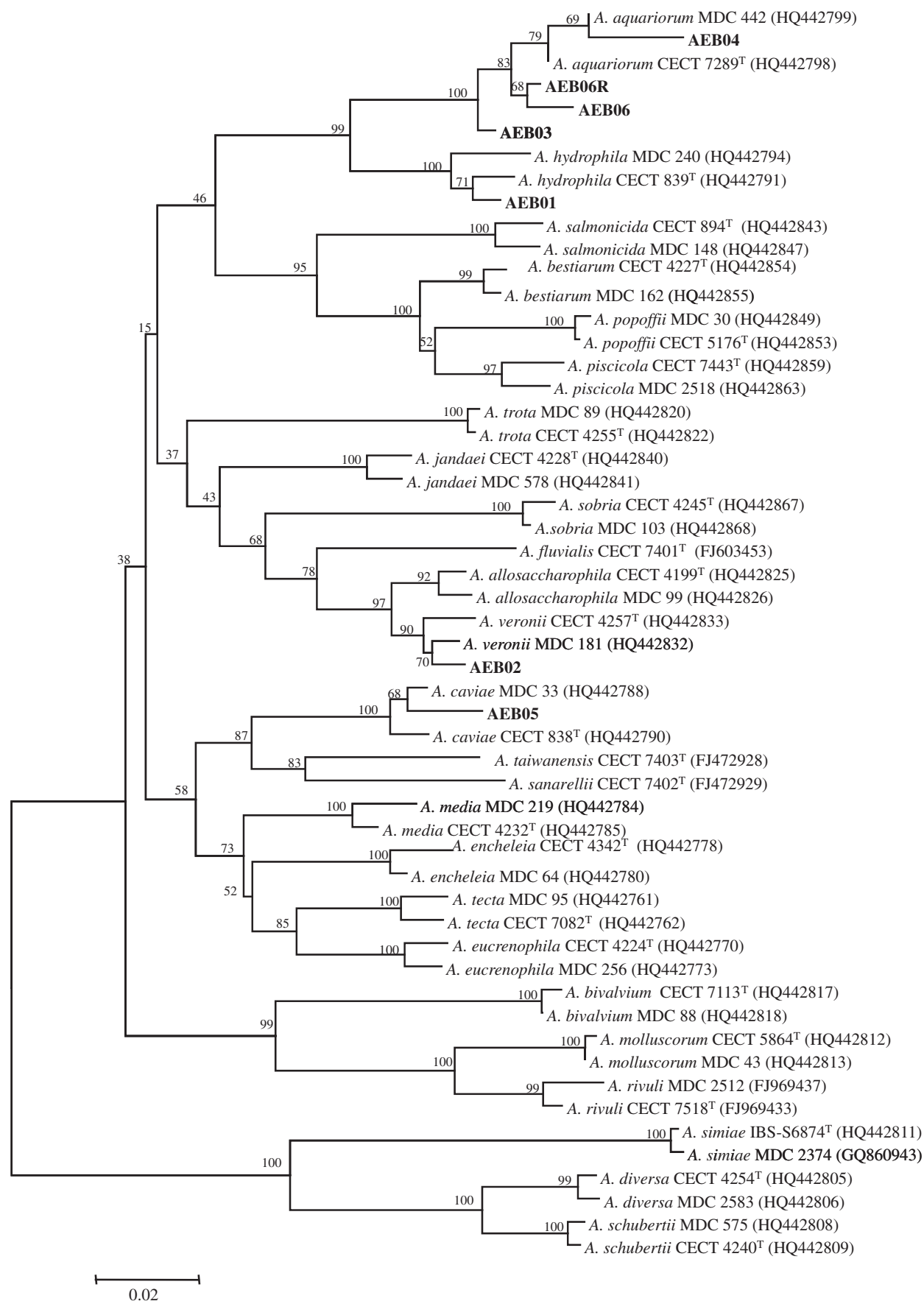
<sup>☆</sup> This research was partially supported by a Grant-in-Aid for Scientific Research (no. 21591294 to K. Y.) from the Japanese Ministry of Education, Culture, Sports, Science and Technology; a Grant-in-Aid for Young Scientists (B) (no. 23791137 to Y.M.) from Japan Society for the Promotion of Science, and a grant from the Global Centers of Excellence Program, Nagasaki University. This work was also supported in part by the project with reference no. AGL2011-30461-C02-02 by the Ministerio de Ciencia e Innovación (Spain).

<sup>☆☆</sup> Conflict of interests: The authors declare that they have no conflict of interests.

\* Corresponding author. Tel.: +81-95-819-7418; fax: +81-95-819-7257.

E-mail address: [k-yanagi@nagasaki-u.ac.jp](mailto:k-yanagi@nagasaki-u.ac.jp) (K. Yanagihara).





**Fig. 1.** Unrooted neighbor-joining phylogenetic tree based on the combined stretch of *rpoD* (790 bp) gene sequences showing the relationship within the genus *Aeromonas* of 7 clinical strains. Type strains are in bold font. Numbers at nodes indicate bootstrap values (1000 replicates). The scale bar represents 1 nucleotide substitution per 50 nucleotides.

**Table 1**  
 Phenotypic and molecular identification and pattern of virulence genes of the clinical isolates of *Aeromonas* strains recovered from septicemia cases (Morinaga et al., 2011) in Japan.

Strains	Identification		PCR detection of virulence genes				LD <sub>50</sub> (%) after stimulation with bacterial culture media <sup>a</sup>		Severity scoring	
	Phenotypic	<i>rpoD</i> gene	<i>aerolysin/hemolysin</i>	<i>act</i>	<i>alt</i>	<i>ast</i>	THP-1 cells	HL-60 cells	SOFA	SAPS II
AEB01	<i>A. hydrophila</i>	<i>A. hydrophila</i>	+	+	+	+	0.30 ± 0.07	0.53 ± 0.19	1	18
AEB02	<i>A. hydrophila</i>	<i>A. veronii</i>	+	+	–	–	>1.0	>1.0	12	62
AEB03	<i>A. hydrophila</i>	<i>A. aquariorum</i>	–	–	+	–	0.25 ± 0.01	0.58 ± 0.06	8	51
AEB04	<i>A. hydrophila</i>	<i>A. aquariorum</i>	+	+	–	–	0.09 ± 0.01	0.25 ± 0.02	3	35
AEB05	<i>A. caviae</i>	<i>A. caviae</i>	–	–	–	–	>1.0	>1.0	10	58
AEB06 <sup>b</sup>	<i>A. veronii</i> bv. <i>sobria</i>	<i>A. aquariorum</i>	+	+	+	+	0.08 ± 0.01	0.21 ± 0.04	13 <sup>c</sup>	73 <sup>c</sup>
AEB06R <sup>b</sup>	<i>A. veronii</i> bv. <i>sobria</i>	<i>A. aquariorum</i>	+	+	+	+	0.04 ± 0.00	0.11 ± 0.02		

PCR = Polymerase chain reaction.

<sup>a</sup> Values are expressed as mean ± SEM (*n* = 3).

<sup>b</sup> Strains AEB06 and AEB06R were isolated from the same patient on different days.

<sup>c</sup> Scores at the first onset of the patient.

indicated as a pathogenic bacterium in humans (Aravena-Roman et al., 2011; Figueras et al., 2009). While *A. hydrophila*, *A. caviae*, and *A. veronii* bv. *sobria* have been recognized as the most common *Aeromonas* species associated with septicemia (Janda et al., 1994), we identified *A. aquariorum* strains with a higher frequency (57.1% including a case with 2 strains) compared to previous reports in Australia (30.4%) and Malaysia (50.0%) (Aravena-Roman et al., 2011; Puthucherry et al., 2012). These indicate that *A. aquariorum* should be noticed globally as a causative agent of septicemia. *A. aquariorum* can lead to invasive infectious diseases (Figueras et al., 2011b); however, there are still no reports on the toxicity against human cells despite the virulence genes having been explored already.

For the cytotoxicity experiments, bacteria were cultured in 3 mL of Luria-Bertani broth (37 °C, at 250 rpm for 10 h) and each bacterial culture broth was filtered through 0.22 µm to remove bacteria. The human monocytic cell line THP-1 and the human neutrophilic cell line HL-60 were plated into 96-well plates at a density of 5 × 10<sup>4</sup> cells/well and stimulated by filtered bacterial culture broth (≤1% v/v) or 1% Triton X-100 as a control for 100% cell death. After stimulation for 12 h, the cell viability was measured using an XTT assay kit (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) according to the manufacturer's instructions. *A. hydrophila* ATCC 7966<sup>T</sup>, *A. caviae* ATCC 15468<sup>T</sup>, and *Pseudomonas aeruginosa* PAO-1 and NUS10 strains were used as the reference strains.

The cytotoxicity was expressed as the median lethal dose (LD<sub>50</sub>) of triplicate experiments (Table 1). Whereas *A. hydrophila* ATCC 7966<sup>T</sup>, *A. caviae* ATCC 15468<sup>T</sup>, and *P. aeruginosa* strains were not cytotoxic (LD<sub>50</sub> >1%, data not shown), *A. aquariorum* strains (AEB03, AEB04, AEB06, AEB06R) showed strong cytotoxicity (LD<sub>50</sub> in THP-1, 0.04 ± 0.01% [means ± SEM, *n* = 3] to 0.25 ± 0.01%; in HL-60, 0.11 ± 0.02% to 0.58 ± 0.06%). *A. hydrophila* (AEB01) showed mild cytotoxicity (0.30 ± 0.07% in THP-1, 0.53 ± 0.19% in HL-60) compared to *A. aquariorum*. In contrast, LD<sub>50</sub> values of *A. veronii* (AEB02) and *A. caviae* (AEB05) were over 1%. The potent cytotoxicity of *A. aquariorum* can justify the importance of differentiation of *A. aquariorum* from other prevalent *Aeromonas* clinical species (Figueras, 2005).

Furthermore, the pore-forming toxin gene *aerolysin/hemolysin* and the cytotoxic enterotoxins genes *ast*, *alt*, and *act* were evaluated (Table 1) by polymerase chain reaction (Figueras et al., 2009; Nawaz et al., 2010). The *alt* gene was present in all of the cytotoxic strains (AEB01, AEB03, AEB04, AEB06, AEB06R). The *aerolysin/hemolysin* and *act* genes were observed in the cytotoxic strains except AEB03. The *ast* gene was detected only in *A. hydrophila* AEB01, and no genes were detected in *A. caviae* AEB05. The presence of *alt*, *aerolysin/hemolysin*, or *act* genes seemed parallel to the cytotoxicity, although we cannot exclude the involvement of other virulence genes not investigated (Chopra et al., 2009). The prevalence of *alt*, *act*, *aerolysin/haemolysin*, and *ast* in *A. aquariorum* strains in this study was 100%, 75%, 75%, and 50%, respectively, while that in another study of 25 clinical strains was 28%, 44%, 100%, and 84%, respectively (Figueras et al., 2009).

The severity of septicemia in the studied patients was evaluated using the SAPS II (15 scores for the type of admission, chronic diseases, consciousness, age, blood pressure, heart rate, temperature, oxygenation, urine output, serum urea, white blood cells, potassium, sodium, bicarbonate, and bilirubin) and the SOFA (consists of 6 scores for the respiratory, cardiovascular, hepatic, coagulation, renal, and neurologic systems) scoring systems (Le Gall et al., 1993; Vincent et al., 1996) (Table 1). The high scores were observed in 2 dead patients (AEB02, AEB06, and AEB06R were isolated from these patients), but the scores varied between the patients. We believe that the differences are partly because of the patients' various medical conditions as previously reported (Morinaga et al., 2011). To clarify the clinical characteristics of *A. aquariorum* septicemia, further studies with a large number of cases will be required.

This study provides the first evidence of severe cytotoxicity of *A. aquariorum* strains to human cell lines and corroborates the high prevalence of virulence genes. Because *A. aquariorum* is uncovered by clinical automated identification systems and has a potential pathogenicity, *A. aquariorum* should be differentiated from other *Aeromonas* species.

## References

- Abbott SL, Cheung WK, Janda JM. The genus *Aeromonas*: biochemical characteristics, atypical reactions, and phenotypic identification schemes. *J Clin Microbiol* 2003;41: 2348–57.
- Aravena-Roman M, Harnett GB, Riley TV, Inglis TJ, Chang BJ. *Aeromonas aquariorum* is widely distributed in clinical and environmental specimens and can be mis-identified as *Aeromonas hydrophila*. *J Clin Microbiol* 2011;49:3006–8.
- Chopra AK, Graf J, Horneman AJ, Johnson JA. Virulence factor-activity relationships (VFAR) with specific emphasis on *Aeromonas* species (spp.). *J Water Health* 2009;7(Suppl 1):S29–54.
- Chun J, Lee JH, Jung Y, Kim M, Kim BK, et al. EzTaxon: a web-based tool for the identification of prokaryotes based on 16S ribosomal RNA gene sequences. *Int J Syst Evol Microbiol* 2007;57:2259–61.
- Esteve C, Alcaide E, Blasco MD. *Aeromonas hydrophila* subsp. *dhakensis* isolated from feces, water and fish in Mediterranean Spain. *Microbes Environ* 2012.
- Figueras MJ. Clinical relevance of *Aeromonas*. *Rev Med Microbiol* 2005;16:145–53.
- Figueras MJ, Alperi A, Saavedra MJ, Ko WC, Gonzalo N, Navarro M, et al. Clinical relevance of the recently described species *Aeromonas aquariorum*. *J Clin Microbiol* 2009;47:3742–6.
- Figueras MJ, Beaz-Hidalgo R, Collado L, Martínez-Murcia AJ. Recommendations for a new bacterial species description based on analysis of the unrelated genera *Aeromonas* and *Arcobacter*. *Bull BISMIS* 2011a;2:1–16.
- Figueras MJ, Beaz-Hidalgo R, Senderovich Y, Laviad S, Halpern M. Re-identification of *Aeromonas* isolates from chironomid egg masses as the potential pathogenic bacteria *Aeromonas aquariorum*. *Environ Microbiol Rep* 2011b;3:239–44.
- Janda JM, Abbott SL. The genus *Aeromonas*: taxonomy, pathogenicity, and infection. *Clin Microbiol Rev* 2010;23:35–73.
- Janda JM, Guthertz LS, Kokka RP, Shimada T. *Aeromonas* species in septicemia: laboratory characteristics and clinical observations. *Clin Infect Dis* 1994;19:77–83.
- Kimura M. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *J Mol Evol* 1980;16:111–20.
- Le Gall JR, Lemeshow S, Saulnier F. A new Simplified Acute Physiology Score (SAPS II) based on a European/North American multicenter study. *JAMA* 1993;270:2957–63.
- Martínez-Murcia A, Monera A, Alperi A, Figueras MJ, Saavedra MJ. Phylogenetic evidence suggests that strains of *Aeromonas hydrophila* subsp. *dhakensis* belong to the species *Aeromonas aquariorum* sp. nov. *Curr Microbiol* 2009;58:76–80.

- Martinez-Murcia AJ, Monera A, Saavedra MJ, Oncina R, Lopez-Alvarez M, Lara E, et al. Multilocus phylogenetic analysis of the genus *Aeromonas*. *Syst Appl Microbiol* 2011;34:189-99.
- Martinez-Murcia AJ, Saavedra MJ, Mota VR, Maier T, Stackebrandt E, Cousin S. *Aeromonas aquariorum* sp. nov., isolated from aquaria of ornamental fish. *Int J Syst Evol Microbiol* 2008;58:1169-75.
- Morinaga Y, Yanagihara K, Araki N, Harada Y, Yamada K, Akamatsu N, et al. Clinical characteristics of seven patients with *Aeromonas* septicemia in a Japanese hospital. *Tohoku J Exp Med* 2011;225:81-4.
- Nawaz M, Khan SA, Khan AA, Sung K, Tran Q, Kerdahi K, et al. Detection and characterization of virulence genes and integrons in *Aeromonas veronii* isolated from catfish. *Food Microbiol* 2010;27:327-31.
- Puthuchery SD, Puah SM, Chua KH. Molecular characterization of clinical isolates of *Aeromonas* species from malaysia. *PLoS One* 2012;7:e30205.
- Saitou N, Nei M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol* 1987;4:406-25.
- Soler L, Yanez MA, Chacon MR, Aguilera-Arreola MG, Catalan V, Figueras MJ, et al. Phylogenetic analysis of the genus *Aeromonas* based on two housekeeping genes. *Int J Syst Evol Microbiol* 2004;54:1511-9.
- Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S. MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol Biol Evol* 2011;28:2731-9.
- Vincent JL, Moreno R, Takala J, Willatts S, De Mendonca A, Bruining H, et al. The SOFA (Sepsis-related Organ Failure Assessment) score to describe organ dysfunction/-failure. On behalf of the Working Group on Sepsis-Related Problems of the European Society of Intensive Care Medicine. *Intensive Care Med* 1996;22:707-10.

#### 4.3.6. Diversidad de las *Aeromonas* aisladas en diversos hospitales y características de los pacientes

La re-identificación de las 422 cepas mediante secuenciación del gen *rpoD* puso de manifiesto que sólo 176 (41,6%) fueron correctamente identificadas en los hospitales como se muestra en la Tabla 1. Si analizamos los resultados según el método de identificación empleado en cada hospital, la identificación correcta a nivel de género varió entre un 94,9% y un 100% para los sistemas MicroScan W/A y MALDI-TOF (Biotyper 3.0) respectivamente. Sin embargo, a nivel de especie el MALDI-TOF fue capaz de identificar correctamente más del 91,1% (163/179) de las cepas analizadas. Un análisis más detallado de los resultados obtenidos mediante el sistema MALDI-TOF se presenta en el estudio 4.3.7. El MicroScan W/A y VitekII identificaron correctamente a nivel de especie el 6,8% y 1,5% de las cepas analizadas respectivamente.

Mediante secuenciación del gen *rpoD* se determinó que de las 422 cepas investigadas, 260 (61,6%) correspondieron a *A. caviae*, 91 (21,5%) a *A. veronii*, 27 (6,4%) a *A. hydrophila*, 19 (4,5%) a *A. media*, 5 (1,2%) a *A. dhakensis*, 2 (0,5%) a *A. allosaccharophila*, 2 (0,5%) a *A. salmonicida*, 1 (0,2%) a *A. bestiarum*, 2 (0,5%) a *Aeromonas* sp. y 13 (3,1%) fueron identificadas como no *Aeromonas*. Al realizar un BlastN con estas 13 secuencias, se determinó que todas presentaban una alta similitud (>98%) con otros bacilos gram-negativos correspondientes a enterobacterias, principalmente del género *Enterobacter*. Las 2 cepas identificadas como *Aeromonas* sp. correspondieron a nuevas líneas filogenéticas, que serán abordadas nuevamente en el apartado 4.4.2.

De las 409 cepas identificadas como *Aeromonas* (Tabla 2), 355 (86,8%) fueron aisladas de heces, 18 (4,4%) de sangre, 7 (1,7%) de heridas, 6 (1,5%) de esputos, 5 (1,2%) de abscesos, 4 (1,0%) de líquidos ascíticos, 3 (0,7%) de bilis, 3 (0,7%) de orinas, 2 (0,5%) desde secreciones faríngeas y de 6 (1,5%) se desconoce el origen.

Como se observa en la Tabla 3, de 409 cepas de *Aeromonas*, el 41,8% y 42,1% de estas afectaron a pacientes de sexo masculino y femenino respectivamente. En el 16,1% de los casos, este dato no estuvo disponible.

**Tabla 1. Porcentaje de concordancia en la identificación de 422 cepas de *Aeromonas* según el método de identificación utilizado en cada hospital y la secuenciación del gen *rpoD*.**

Procedencia (Nº total de cepas)	Identificación realizada en el hospital		Identificación mediante secuenciación del gen <i>rpoD</i> (n)	Porcentaje de concordancia por especie	Porcentaje de concordancia global	
	Método	<i>Aeromonas</i> spp. (n)				
Hospital Universitario Miguel Servet (117)	MALDI-TOF (Biotyper 3.0)	<i>A. caviae</i> (89)	<b><i>A. caviae</i> (84)</b> <i>A. veronii</i> (2) No <i>Aeromonas</i> (3)	94,4	97,4% (114/117) a nivel de género	
		<i>A. veronii</i> (19)	<b><i>A. veronii</i> (18)</b> <i>A. media</i> (1)	94,7		
		<i>A. hydrophila</i> (7)	<b><i>A. hydrophila</i> (5)</b> <i>A. dhakensis</i> (1) <i>A. caviae</i> (1)	71,4		
		<i>A. caviae/hydrophila</i> (1)	<i>A. caviae</i> (1)	0		
		<i>Aeromonas</i> sp. (1)	<i>A. media</i> (1)	0		
		<i>A. caviae</i> (29)	<b><i>A. caviae</i> (29)</b>	100		
		<i>A. veronii</i> (14)	<b><i>A. veronii</i> (12)</b> <i>A. allosaccharophila</i> (2)	85,7		
Hospital Universitario de Guagalajara (62)	MALDI-TOF Biotyper (3.1)	<i>A. hydrophila</i> (12)	<b><i>A. hydrophila</i> (10)</b> <i>A. caviae</i> (2)	83,3	100% a nivel de género	
		<i>A. media</i> (3)	<b><i>A. media</i> (3)</b>	100	90,3% (56/62) a nivel de especie	
		<i>A. bestiarum</i> (2)	<b><i>A. bestiarum</i> (1)</b> <i>A. salmonicida</i> (1)	50		
		<i>A. salmonicida</i> (1)	<b><i>A. salmonicida</i> (1)</b>	100		
		<i>A. eucrenophila</i> (1)	<i>A. media</i> (1)	0		
		<i>A. hydrophila/caviae</i> (53)	<i>A. caviae</i> (44)			
			<i>A. veronii</i> (5)			
<i>A. dhakensis</i> (1)						
Hospital Universitario de Guagalajara (66)	Vitek II	<i>A. hydrophila/caviae</i> (53)	<i>A. hydrophila</i> (1) <i>A. media</i> (1) No <i>Aeromonas</i> (1)	0	98.5% (65/66) a nivel de género	
		<i>A. caviae</i> (1)	<b><i>A. caviae</i> (1)</b> <i>A. veronii</i> (9) <i>A. caviae</i> (1)	100	1.5% (1/66) a nivel de especie	
		<i>A. sobria</i> (12)	<i>A. media</i> (1)			0
			<i>Aeromonas</i> sp. <sup>a</sup>			

**Tabla 1 (continuación). Porcentaje de concordancia en la identificación de 422 cepas de Aeromonas según el método de identificación utilizado en cada hospital y la secuenciación del gen rpoD.**

Procedencia (Nº total de cepas)	Identificación realizada en el hospital		Identificación mediante secuenciación del gen <i>rpoD</i> (n)	Porcentaje de concordancia por especie	Porcentaje de concordancia global
	Método	<i>Aeromonas</i> spp. (n)			
Hospital Universitario Joan XXIII (102) y Hospital Universitario Sant Joan (75)	MicroScan W/A	<i>A. hydrophila</i> (142)	<b><i>A. hydrophila</i> (11)</b> <i>A. caviae</i> (76) <i>A. veronii</i> (35) <i>A. media</i> (10) <i>A. dhakensis</i> (2) <i>Aeromonas</i> sp. <sup>b</sup> No <i>Aeromonas</i> (7)	7,7	94,9% (168/177) a nivel de género
		<i>A. caviae</i> (1)	<b><i>A. caviae</i> (1)</b> <i>A. caviae</i> (20) <i>A. veronii</i> (10) <i>A. dhakensis</i> (1) <i>A. media</i> (1) No <i>Aeromonas</i> (2)	100	6,8% (12/177) a nivel de especie
		<i>Aeromonas</i> sp. (34)		0	

En negrita aparecen las cepas en las que hubo concordancia (176) en la identificación obtenida mediante método fenotípico y método molecular. <sup>a</sup>Corresponde a una nueva línea filogenética, identificada como *Aeromonas* sp. nov. 2 (= 113634); <sup>b</sup>Corresponde a una nueva línea filogenética identificada como *Aeromonas* sp. nov. 1 (= 1178C)

**Tabla 2. Distribución de 409 cepas de *Aeromonas* spp. según origen de aislamiento.**

<i>Aeromonas</i> spp.	Nº (%) de las cepas según origen de aislamiento										Total
	Heces	Sangre	Herida	Espujo	Absceso	Líquido ascítico	Bilis	Orina	Secreción faríngea	ND	
<i>A. caviae</i>	234 (65,9)	12 (66,7)	1 (14,3)	2 (33,3)	2 (40) <sup>a</sup>	1 (25)	1 (33,3)	2 (66,7)	2 (100)	3 (50,0)	260
<i>A. veronii</i>	79 (22,3)	4 (22,2)	1 (14,3) <sup>b</sup>	3 (50,0) <sup>c</sup>		2 (50)				2 (33,3)	91
<i>A. hydrophila</i>	14 (3,9)	2 (11,1)	4 (57,1) <sup>d</sup>	1 (16,7) <sup>c</sup>	2 (40) <sup>e</sup>	1 (25)	2 (66,7)	1 (33,3)			27
<i>A. media</i>	19 (5,4)										19
<i>A. dhakensis</i>	4 (1,1)				1 (20) <sup>e</sup>						5
<i>A. allosaccharophila</i>	1 (0,3)									1 (16,7)	2
<i>A. salmonicida</i>	1 (0,3)		1 (14,3)								2
<i>A. bestiarum</i>	1 (0,3)										1
<i>Aeromonas</i> sp.	2 (0,6)										2
<b>Total</b>	<b>355 (86,8)</b>	<b>18 (4,4)</b>	<b>7 (1,7)</b>	<b>6 (1,5)</b>	<b>5 (1,2)</b>	<b>4 (1,0)</b>	<b>3 (0,7)</b>	<b>3 (0,7)</b>	<b>2 (0,5)</b>	<b>6 (1,5)</b>	<b>409</b>

<sup>a</sup>De las 2 cepas de *A. caviae* fue aislada de un absceso hepático; <sup>b</sup>Corresponde a una herida quirúrgica; <sup>c</sup>2 de las 3 cepas de *A. veronii* y la cepa de *A. hydrophila* fueron aisladas de aspirado bronquial; <sup>d</sup>De las 4 cepas de *A. hydrophila* fue aislada de exudado de herida quirúrgica; <sup>e</sup>1 de las 2 cepas de *A. hydrophila* y la cepa de *A. dhakensis* fueron aisladas de una úlcera. ND: no disponible.

Como se observa en la Tabla 4, el porcentaje de recuperación de *Aeromonas* en pacientes pediátricos (< 14 años) es muy similar al porcentaje que se presenta en edad adulta, siendo estos de 41,3% y 41,7% respectivamente. Sin embargo, las prevalencias más altas se presentan en las edades extremas, siendo de 34,7% en menores de 4 años y de 24,4% en individuos mayores de 65 años.

**Tabla 3. Distribución de 409 cepas de *Aeromonas* spp. según sexo de los pacientes.**

<i>Aeromonas</i> spp.	Nº (%) de las cepas según sexo de los pacientes			Total
	Masculino	Femenino	ND	
<i>A. caviae</i>	119 (69,6)	108 (62,8)	33 (50,0)	260
<i>A. veronii</i>	39 (22,8)	39 (22,7)	13 (19,7)	91
<i>A. hydrophila</i>	5 (2,9)	11 (6,4)	11 (16,7)	27
<i>A. media</i>	4 (2,3)	11 (6,4)	4 (6,1)	19
<i>A. dhakensis</i>	3 (1,8)	2 (1,2)		5
<i>A. allosaccharophila</i>			2 (3,0)	2
<i>A. salmonicida</i>			2 (3,0)	2
<i>A. bestiarum</i>			1 (1,5)	1
<i>Aeromonas</i> sp.	1 (0,6)	1 (0,6)		2
<b>Total</b>	<b>171 (41,8)</b>	<b>172 (42,1)</b>	<b>66 (16,1)</b>	<b>409</b>

ND: no disponible.

**Tabla 4. Distribución de *Aeromonas* spp. por edad del paciente.**

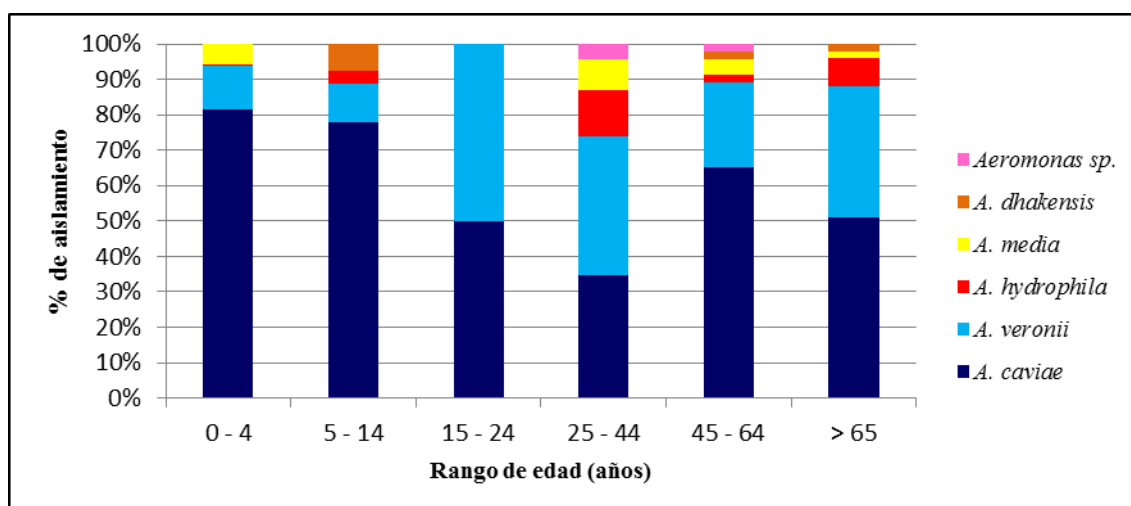
<i>Aeromonas</i> spp.	Nº (%) de <i>Aeromonas</i> por rango de edad (años)						Total	
	0 - 4	5 - 14	15 - 24	25 - 44	45 - 64	> 65		
<i>A. caviae</i>	116 (81,7)	21 (77,8)	1 (50,0)	8 (34,8)	30 (65,2)	51 (51,0)	33 (47,8)	260
<i>A. veronii</i>	17 (12,0)	3 (11,1)	1 (50,0)	9 (39,1)	11 (23,9)	37 (37,0)	13 (18,8)	91
<i>A. hydrophila</i>	1 (0,7)	1 (3,7)		3 (13,0)	1 (2,2)	8 (8,0)	13 (18,8)	27
<i>A. media</i>	8 (5,6)			2 (8,7)	2 (4,3)	2 (2,0)	5 (7,2)	19
<i>A. dhakensis</i>		2 (7,4)			1 (2,2)	2 (2,0)		5
<i>A. allosaccharophila</i>							2 (2,9)	2
<i>A. salmonicida</i>							2 (2,9)	2
<i>A. bestiarum</i>							1 (1,4)	1
<i>Aeromonas</i> sp.				1 (4,3)	1 (2,2)			2
<b>Total</b>	<b>142 (34,7)</b>	<b>27 (6,6)</b>	<b>2 (0,5)</b>	<b>23 (5,6)</b>	<b>46 (11,2)</b>	<b>100 (24,4)</b>	<b>69 (16,9)</b>	<b>409</b>

ND: no disponible.

A partir de la Tabla 4 y de la Figura 1 se deduce que aunque *A. caviae* y *A. veronii* son las especies más dominantes y recuperadas en todos los rangos de edad, *A. caviae* es la más prevalente en menores de 14 años, con valores que alcanzan los 81,1% de los aislamientos, y en mayores de 45 años, con una frecuencia de aislamiento mayor al 50%.



**Figura 1. Distribución de *Aeromonas* spp. según edad del paciente.**



De las 409 cepas de *Aeromonas* que fueron analizadas en este estudio, el 63,6% (260/409) de estas fue recuperada desde un cuadro infeccioso en el cual *Aeromonas* fue reconocida como único agente causal (Tabla 5). Mientras que en el 20,5% (84/409) de los casos *Aeromonas* fue recuperada junto a otros microorganismos. En la Tabla 5 se observa que en el caso de las infecciones polimicrobianas, los microorganismos más frecuentemente aislados junto a *Aeromonas*, corresponden a los géneros *Campylobacter* (48,4% de los casos) y *Salmonella* (16,1% de los casos).

Los signos y/o síntomas clínicos (Tabla 6) más frecuentes que presentaron los pacientes fueron: diarrea (25,2%), gastroenteritis (20,3%) y fiebre (2,9%).

## Discusión

En relación a la efectividad de estos 3 sistemas para la correcta identificación de *Aeromonas*, los valores obtenidos en la identificación a nivel de género fueron muy superiores que la encontrada para la identificación a nivel de especie, cuando los resultados fueron comparados con la secuenciación del gen *rpoD*, utilizado en este estudio como el método de referencia.

Los 3 sistemas utilizados en diferentes hospitales de España, presentaron valores muy similares en relación a la efectividad de estos para la identificación a nivel de género, siendo de 98,5%, 98,3% y 97,4% para el Vitek II, MALDI-TOF y MicroscanW/A respectivamente.

**Tabla 5. Distribución de 409 cepas de *Aeromonas* spp. según tipo de infección.**

<i>Aeromonas</i> spp.	Nº (%) Tipo de infección		Microorganismos asociados a infección polimicrobiana	ND
	Monomicrobiana	Polimicrobiana		
	171 (65,8)	56 (66,7)	29 <i>Campylobacter jejuni</i> 2 <i>C. coli</i> 1 <i>Campylobacter</i> sp. 11 <i>Salmonella enteritidis</i> 3 <i>Escherichia coli</i> 1 <i>Enterobacter aerogenes</i> 1 <i>Clostridium difficile</i> 1 <i>Corynebacterium propionicum</i> 1 <i>Yersinia enterocolitica</i> 1 <i>Hafnia alvei</i> 1 <i>Klebsiella oxytoca</i> 1 <i>Enterococcus faecalis</i> 1 <i>K. oxytoca</i> + <i>E. faecalis</i> 1 <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> + <i>Staphylococcus aureus</i> + <i>Haemophilus parainfluenzae</i> 1 <i>Acinetobacter</i> sp. + <i>K. pneumoniae</i> + <i>S. aureus</i> + <i>S. maltophilia</i>	33 (50,8)
<i>A. caviae</i>				
	65 (25,0)	13 (15,5)	9 <i>C. jejuni</i> 1 <i>C. coli</i> 2 <i>E. coli</i> 1 <i>E. coli</i> + <i>K. pneumoniae</i>	13 (20,0)
<i>A. veronii</i>				
	9 (3,5)	8 (9,5)	1 <i>C. jejuni</i> 1 <i>S. aureus</i> 1 <i>K. oxytoca</i> 1 <i>E. coli</i> 1 Toxina <i>C. difficile</i> (+) 1 <i>S. aureus</i> + <i>Finnegoldia magna</i> 1 <i>Citrobacter freundii</i> + <i>K. pneumoniae</i> 1 <i>Pseudomonas aeruginosa</i> + <i>E. faecalis</i>	10 (15,4)
<i>A. hydrophila</i>				
	10 (3,8)	5 (6,0)	3 <i>S. enteritidis</i> 2 <i>Campylobacter</i> sp.	4 (6,2)
<i>A. media</i>				
	3 (1,2)	2 (2,4)	1 <i>K. oxytoca</i> 1 <i>Salmonella</i> sp.	
<i>A. dhakensis</i>				
<i>A. allosaccharophila</i>				2 (3,1)
<i>A. salmonicida</i>				2 (3,1)
<i>A. bestiarum</i>				1 (1,5)
<i>Aeromonas</i> sp.	2 (0,8)			
<b>Total</b>	<b>260 (63,6)</b>	<b>84 (20,5)</b>	<b>39 <i>C. jejuni</i><sup>a</sup> 3 <i>C. coli</i><sup>a</sup> 3 <i>Campylobacter</i> sp.<sup>a</sup> 14 <i>S. enteritidis</i><sup>b</sup> 1 <i>Salmonella</i> sp.<sup>b</sup> 6 <i>E. coli</i><sup>c</sup> 3 <i>K. oxytoca</i><sup>d</sup> 2 <i>C. difficile</i><sup>e</sup> 1 <i>C. propionicum</i><sup>i</sup> 1 <i>E. aerogenes</i><sup>i</sup> 1 <i>Y. enterocolitica</i><sup>i</sup> 1 <i>H. alvei</i><sup>i</sup> 1 <i>E. faecalis</i><sup>f</sup> 1 <i>S. aureus</i><sup>e</sup> 1 <i>K. oxytoca</i><sup>d</sup> + <i>E. faecalis</i><sup>f</sup> 1 <i>E. coli</i><sup>c</sup> + <i>K. pneumoniae</i><sup>d</sup> 1 <i>S. aureus</i><sup>e</sup> + <i>F. magna</i><sup>i</sup> 1 <i>C. freundii</i><sup>i</sup> + <i>K. pneumoniae</i><sup>d</sup> 1 <i>P. aeruginosa</i><sup>i</sup> + <i>E. faecalis</i><sup>f</sup> 1 <i>S. maltophilia</i><sup>h</sup> + <i>S. aureus</i><sup>e</sup> + <i>H. parainfluenzae</i><sup>i</sup> 1 <i>Acinetobacter</i> sp.<sup>i</sup> + <i>K. pneumoniae</i><sup>d</sup> + <i>S. aureus</i><sup>e</sup> + <i>S. maltophilia</i><sup>h</sup></b>	<b>65 (15,9)</b>

Porcentaje de participación de otros microorganismos en infecciones polimicrobianas junto con *Aeromonas*: <sup>a</sup>*Campylobacter* sp.= 48.4% (45/93), <sup>b</sup>*Salmonella* sp.= 16.1% (15/93), <sup>c</sup>*E. coli*= 7.5% (7/93), <sup>d</sup>*Klebsiella* sp.= 7.5% (7/93), <sup>e</sup>*S. aureus*= 4.3% (4/93), <sup>f</sup>*E. faecalis*= 3.2% (3/93), <sup>g</sup>*C. difficile*= 2.2% (2/93), <sup>h</sup>*S. maltophilia*= 2.2% (2/93), <sup>i</sup>los 8 microorganismos restantes presentan, cada uno, el mismo porcentaje 1.1% (1/93), ND: no disponible.

**Tabla 6. Distribución de 409 cepas de *Aeromonas* spp. y presentación de signos y/o síntomas clínicos.**

<i>Aeromonas</i> spp.	Nº signos y/o síntomas clínicos	ND
<i>A. caviae</i>	72 diarrea <sup>a,b</sup>	92
	65 gastroenteritis	
	7 fiebre <sup>c</sup>	
	5 control de salud	
	3 infección <sup>d1,d2,d3</sup>	
	2 colecistitis	
	2 leucopenia severa	
	2 colitis <sup>e</sup>	
	1 absceso hepático	
	1 anorexia	
	1 astenia	
	1 bacteremia	
	1 dermatitis	
	1 giardiasis	
	1 invaginación intestinal	
1 prurito anal		
1 urticaria		
1 trasplante renal		
<i>A. veronii</i>	25 diarrea	45
	12 gastroenteritis	
	2 dolor abdominal	
	2 fiebre <sup>f</sup>	
	2 peritonitis	
<i>A. hydrophila</i>	1 bacteremia	20
	1 control de salud	
	1 infección <sup>d1</sup>	
	4 diarrea	
<i>A. media</i>	1 gastroenteritis	14
	1 laceración (herida)	
	1 úlcera tobillo derecho	
<i>A. dhakensis</i>	3 gastroenteritis	3
	1 control de salud	
<i>A. allosaccharophila</i>		2
<i>A. salmonicida</i>		2
<i>A. bestiarum</i>		1
<i>Aeromonas</i> sp.	1 gastroenteritis	1
<b>Total (%)</b>	<b>229 (56):</b>	<b>180 (44)</b>
	<b>103 (25,2) diarrea</b>	
	<b>83 (20,3) gastroenteritis</b>	
	<b>9 (3,9) fiebre</b>	
	<b>7 (1,7) control de salud</b>	
	<b>4 (1,0) infecciones</b>	
	<b>2 (0,5) bacteremia</b>	
	<b>2 (0,5) colecistitis</b>	
	<b>2 (0,5) leucopenia severa</b>	
	<b>2 (0,5) colitis</b>	
	<b>2 (0,5) dolor abdominal</b>	
	<b>2 (0,5) peritonitis</b>	
	<b>1 (0,2) absceso hepático</b>	
	<b>1 (0,2) anorexia</b>	
	<b>1 (0,2) astenia</b>	
	<b>1 (0,2) dermatitis</b>	
	<b>1 (0,2) giardiasis</b>	
<b>1 (0,2) invaginación intestinal</b>		
<b>1 (0,2) prurito anal</b>		
<b>1 (0,2) urticaria</b>		
<b>1 (0,2) trasplante renal</b>		
<b>1 (0,2) laceración (herida)</b>		
<b>1 (0,2) úlcera tobillo derecho</b>		

<sup>a</sup>Un paciente era VIH (+); <sup>b</sup>4 pacientes presentaron diarrea sanguinolenta; <sup>c</sup>2 pacientes eran inmunodeprimidos y uno era inmunosuprimido; <sup>d</sup>Tipos de infecciones: <sup>d1</sup>Infección de herida quirúrgica, <sup>d2</sup>Infección vírica, <sup>d3</sup>Infección del tracto urinario y otitis; <sup>e</sup>Un paciente presentó pancolitis ulcerosa, <sup>f</sup>Un paciente sufrió politraumatismo; ND: no disponible.

En relación a los métodos semiautomatizados, las identificaciones correctas obtenidas a nivel de género mediante MicroScan W/A (97,4%) fueron superiores a los encontrados por Soler y cols. (2003) quienes informaron que este sistema identificó correctamente el 84% de los aislados. Similares a nuestros resultados fueron los obtenidos por Lamy y cols. (2010), quienes determinaron que los sistemas Vitek II y MicroScan W/A identificaron correctamente a nivel de género el 98,9% y 93,1% de los aislados respectivamente.

El 98,3% de efectividad en la identificación a nivel de género obtenido por el MALDI-TOF, está en concordancia con los resultados publicados en otros estudios, en donde los porcentajes varían entre un 98,5% y 100% (Lamy y cols., 2011; Benagli y cols., 2012; Chen y cols., 2014a; Shin y cols., 2015).

Como esperábamos, en cuanto a la identificación a nivel de especie, los métodos semiautomatizados mostraron ser muy poco confiables, ya que sólo lograron identificar correctamente el 6,8% (MicroScan W/A) y 1,5% (Vitek II) de las cepas. Valores muy superiores fueron los obtenidos en otros trabajos, los que variaron entre un 19,3% y 80,5% para la identificación específica mediante MicroScan y de un 82,7% para el sistema Vitek II (Soler y cols., 2003; Lamy y cols., 2010). Por el contrario, el MALDI-TOF se presenta como un método prometedor, logrando un 91,1% de correcta identificación de *Aeromonas* a nivel de especie. Este valor se correlaciona con los publicados en otros estudios, donde encuentran valores de fiabilidad iguales a 91,4%, 92,3%, 93,0% y 97,0% (Lamy y cols., 2011; Benagli y cols., 2012; Chen y cols., 2014a; Shin y cols., 2015). Estos resultados demuestran la superioridad del MALDI-TOF por sobre los sistemas de identificación clásicos utilizados en los laboratorios clínicos a la hora de identificar las especies de *Aeromonas*.

De las 422 cepas que fueron re-identificadas mediante secuenciación del gen *rpoD*, sólo 409 de estas fueron identificadas como *Aeromonas* y correspondieron a ocho especies y además dos cepas fueron identificadas como posibles nuevas especies. Las tres especies más frecuentes fueron *A. caviae* (61,6%, 260/422), *A. veronii* (21,6%, 91/422), *A. hydrophila* (6,4%, 27/422). Las otras cinco especies identificadas, *A. media* (4,5%), *A. dhakensis* (1,2%), *A. allosaccharophila* (0,5%), *A. salmonicida* (0,5%), *A. bestiarum* (0,2%) y *Aeromonas* sp. (0,5%) corresponden en conjunto al 7,4% de los aislados. Estos resultados son diferentes a los documentados en la última revisión que trata sobre infecciones en humanos asociadas a *Aeromonas* (Figueras y Beaz-Hidalgo, 2015) y la que a su vez fue actualizada con nuevos datos adquiridos durante la

redacción de esta tesis doctoral. En 10 artículos originarios de diferentes países aunque dominan los asiáticos y tropicales, se encontró que las cuatro especies más prevalentes en clínica, fueron *A. caviae* (29,9%), *A. dhakensis* (26,3%), *A. veronii* (24,8%) y *A. hydrophila* (15,5%) correspondiendo al 96.5% del total de cepas clínicas estudiadas (Figueras y cols., 2009; Aravena-Román y cols., 2011; Puthuchearry y cols., 2012; Roger y cols., 2012b; Senderovich y cols., 2012; Wu y cols., 2012, 2015; Chen y cols., 2013, 2014b; Pérez-Valdespino y cols., 2013). En países como Malasia y Taiwán, *A. dhakensis* fue la especie más frecuentemente aislada con prevalencias que oscilaron entre 36,4% y 50,0% (Puthuchearry y cols., 2012; Wu y cols., 2012; Chen y cols., 2013). Además, en Australia, tanto *A. dhakensis* como *A. caviae* presentaron idénticas prevalencias (23,8%), ambas en segundo lugar después de *A. veronii* (25,2%) (Aravena-Román y cols., 2012). Pareciera ser que la especie *A. dhakensis* presenta una alta prevalencia en países con clima tropical, como por ejemplo Malasia, Taiwán y Australia. Sin embargo, esto necesita ser confirmado (Figueras y Beaz-Hidalgo, 2015).

Por otra parte, en un estudio realizado previamente (datos no publicados), por este mismo grupo de trabajo, se encontró que entre 76 cepas aisladas de heces, *A. caviae* (61,8%) fue la especie predominante, seguida por *A. veronii* (30,3%), *A. hydrophila* (4,0%), *A. dhakensis* (2,6%) y *A. media* (1,3%). Estos resultados, muy similares a los obtenidos en este estudio, nos demuestran que en España, la epidemiología de *Aeromonas* es diferente a la presentada en otros continentes. Sin embargo, es similar a la observada en otros países de Europa como Francia, en donde en el año 2009 de 70 cepas estudiadas, *A. veronii* (40,0%), *A. hydrophila* (35,7%) y *A. caviae* (21,4%) fueron las tres especies dominantes, seguidas por *A. allosaccharophila* (1,4%) y *A. jandaei* (1,4%) (Lamy y cols., 2009). Posteriormente, también en Francia, similares resultados fueron obtenidos por Roger y cols. (2012b) cuando de entre 103 cepas analizadas, *A. veronii* (45,1%), *A. caviae* (23,5%) y *A. hydrophila* (22,5%) fueron las tres especies más prevalentes, seguidas por *A. dhakensis* (5,9%), *A. media* (1,0%), *A. salmonicida* (1,0%), *A. allosaccharophila* (1,0%) y *A. jandaei* (1,0%).

De las 422 cepas re-identificadas mediante secuenciación del gen *rpoD*, hubo 13 que no correspondieron a *Aeromonas*. Las secuencias obtenidas de estas, permitieron su identificación mediante BlastN (> 98% similitud) y se determinó que todas correspondían a enterobacterias, principalmente del género *Enterobacter*. Estos resultados son diferentes a los obtenidos en estudios previos, en los cuales *Aeromonas* era principalmente confundida con el género *Vibrio* (Abbott y cols., 1998; Soler y cols.,

2003; Lamy y cols., 2010). Sin embargo, es preciso aclarar que en todos estos estudios, la identificación de las cepas se realizó mediante sistemas semiautomatizados.

En relación con el origen de aislamiento de las 409 cepas identificadas como *Aeromonas*, estas fueron principalmente recuperadas de heces (86,8%), y en menor proporción de sangre (4,4%), heridas (1,7%), esputos (1,5%), abscesos (1,2%), líquido ascítico (1,0%), bilis (0,7%), orina (0,7%) y secreción faríngea (0,5%). Como era de esperar las heces, la sangre y las heridas fueron las muestras en las que se aislaron más frecuentemente las *Aeromonas* (Janda y Abbott, 2010; Figueras y Beaz-Hidalgo, 2015). Sin embargo, los porcentajes de aislamiento correspondientes a cada uno de estas muestras, basados en los resultados de 24 estudios revisados por Figueras y Beaz-Hidalgo (2015), son muy diferentes a los nuestros, siendo de 35,1%, 33,6% y 24,2% para heces, sangre y heridas respectivamente (Huys y cols., 2002; Hua y cols., 2004; Al Benwan y cols., 2007; Bossi-Küpfer y cols., 2007; Demarta y cols., 2008; Yang y cols., 2008; Figueras y cols., 2009; Tena y cols., 2009; Alperi y Figueras, 2010; Miñana-Galbis y cols., 2010; Aravena-Román y cols., 2011; Esteve y cols., 2012; Puthuchery y cols., 2012; Roger y cols., 2012; Sedláček y cols., 2012; Senderovich y cols., 2012; Wu y cols., 2012, 2015; Morinaga y cols., 2013; Chen y cols., 2013, 2014b; Shin y cols., 2013; Pérez-Valdespino y cols., 2013 y los resultados de 76 aislados fecales no publicados).

En relación a la distribución de *Aeromonas* por sexo del paciente, la proporción de *Aeromonas* aisladas desde hombres (41,8%) fue muy similar a las observada en mujeres (42,1%), lo que equivale a una razón (F/M ratio) hombre/mujer de 0,99. Sólo unos pocos estudios han obtenido ratios similares al nuestro (Campo y cols., 2001; Lamy y cols., 2009). En un estudio realizado en España el año 2001, el ratio fue de 0,7 cuando 12 pacientes fueron examinados (Campos y cols., 2001). Mientras que un ratio de 1,2 fue obtenido cuando 20 pacientes fueron estudiados en Francia (Lamy y cols., 2009). Sin embargo, en la mayoría de los estudios este ratio es mayor, variando entre 1,5 hasta 3,9 (Ko y cols., 2000; Lau y cols., 2000; Llopis y cols., 2004, Figueras, 2005; Tsai y cols., 2006; Lay y cols., 2010, Hochedez y cols., 2010; Chuang y cols., 2011; Kimura y cols., 2013; Tang y cols., 2014; Wu y cols., 2015), lo que implica que los hombres presentan un mayor número de infecciones causadas por *Aeromonas* que las mujeres. Aunque todos los estudios citados anteriormente corresponden a bacteremias, en el caso de pacientes con diarrea la situación es idéntica, pues el ratio M/F encontrado en un estudio en Taiwán fue de 2,7 (Chen y cols., 2014b) y este ratio fue de 3 cuando se

analizaron 12 casos de pacientes con cáncer que presentaron infección de piel y tejidos debido a *Aeromonas* (Chao y cols., 2013).

En nuestro estudio las *Aeromonas* presentaron la misma proporción en pacientes pediátricos (41,3%) que desde pacientes adultos (41,7%). Sin embargo, en los pacientes pediátricos, el 98,8% de las infecciones fueron intestinales y el 1,2% restante correspondieron a bacteremias y la especie más frecuentemente aislada fue *A. caviae* (81,1%). En el caso de los pacientes adultos, el 80,7% de las infecciones causadas por *Aeromonas* fueron de origen intestinal. En las infecciones extraintestinales (19,3%) las bacteremias fueron las más frecuentes (6,4%). Si bien, *A. caviae* (53,2%) sigue siendo la especie más aislada en pacientes adultos, *A. veronii* alcanzó valores de aislamiento de 32,7%. Esta información está en concordancia con lo encontrado en otros estudios (Figueras, 2005; Janda y Abbott, 2010; Figueras y Beaz-Hidalgo, 2015).

El 63,6% de los aislados fueron recuperados de infecciones monomicrobianas y el 20,5% restante, de infecciones polimicrobianas, en donde *Campylobacter* (48,4%) y *Salmonella* (16,1%) fueron los microorganismos más aislados junto a *Aeromonas*, seguidos por *E. coli* (7,5%), *Klebsiella* sp. (7,5%), *S. aureus* (4,3%) entre otros (Tabla 5). En un estudio en donde se analizaron 12 casos de pacientes con cáncer que desarrollaron infección por *Aeromonas* en piel, el 83,3% de los casos desarrolló una infección polimicrobiana (Chao y cols., 2013). En otro estudio, 103/129 (79%) pacientes con infección de heridas por *Aeromonas*, presentaron infección polimicrobiana, en donde *Klebsiella* spp. (25,6%), *Enterococcus* spp. (18,6%), *E. cloacae* (16,3%), *E. coli* (13,2%), *S. aureus* (13,2%), etc. fueron los microorganismos más frecuentemente aislados en concomitancia con *Aeromonas* (Chao y cols., 2013). Recientemente, en un estudio realizado en Taiwán, en donde se analizaron a 11 pacientes con diarrea debida a *Aeromonas*, en 4 (36,4%) de ellos también se aislaron en paralelo *C. difficile* (27,3%) y *V. parahaemolyticus* (9,1%) (Chen y cols., 2014b). Mientras que en un caso de fascitis necrotizante y sepsis asociada a *Aeromonas* en un paciente inmunocomprometido también se aisló *C. albicans* (Spadaro y cols., 2014).

Podemos concluir que *Aeromonas* es cada vez más estudiada en clínica y que es necesaria la utilización de métodos de identificación fiables, que nos permitan conocer la prevalencia real de las especies. En vista, de todos los casos analizados, *Aeromonas* debería ser reconocido como un patógeno verdadero.

#### **4.3.7. Evaluación del MALDI-TOF en la identificación de cepas clínicas de *Aeromonas*.**

Después de la identificación molecular de las 179 cepas a nivel de especie los resultados globales mostraron que el sistema MALDI-TOF fue capaz de identificar correctamente a nivel de género el 98.3% (176/179) de las cepas y el 91.1% (163/179) a nivel de especie como se muestra en la Tabla 1. Pero, al comparar los resultados obtenidos con cada software, Biotyper 3.0 vs Biotyper 3.1, el primero fue un poco menos efectivo en la identificación a nivel de género (97.4% vs 100%), pero mostró más precisión en la identificación a nivel de especie (91.5% vs 90.3%).

En las tres especies más prevalentes en clínica: *A. caviae* (65.4%), *A. veronii* (17.9%) y *A. hydrophila* (8.4%), los porcentaje de concordancia entre ambos métodos de identificación fueron 96.6%, 98.3% y 100% respectivamente (Tabla 1 y 2). Tanto para *A. media* como para *A. salmonicida*, el porcentaje de concordancia fue de 50%, mientras que para *A. bestiarum* fue de 100%.

En el 90.0% de las 179 cepas identificadas mediante MALDI-TOF, la puntuación (*score*) obtenidos variaron entre 2.0 y 3.0, que corresponden a la puntuación más fiables atribuidas a este método (Tabla 2). Sin embargo, dentro de este porcentaje, también están incluidas las cepas erróneamente identificadas. De las cinco (2,8%) cepas que obtuvieron puntuaciones menores de 2 (identificación no fiable), 3 de estas correspondieron a *A. caviae* correctamente identificadas.

### **Discusión**

En relación a los porcentajes de correcta identificación obtenidos tanto a nivel de género como a nivel de especie (98,3% y 91,1%) estos, salvo excepciones como el estudio realizado por Vávrová y cols. (2014), son similares a los obtenidos en otros estudios en los que se ha utilizado MALDI-TOF para identificar cepas de *Aeromonas*, tanto de origen clínico como ambiental, tal como se muestra en la Tabla 3. Estos resultados demuestran la superioridad de este nuevo método, por sobre los sistemas semiautomatizados, como el API 30E, Vitek II, MicroScan W/A, utilizados frecuentemente en laboratorios clínicos (Soler y cols., 2003b; Lamy y cols., 2010).



**Tabla 1. Porcentaje de concordancia en la identificación de 179 cepas de *Aeromonas*, obtenida mediante MALDI-TOF y la secuenciación del gen *rpoD*.**

Procedencia (Nº total de cepas)	Identificación mediante (n)		Porcentaje de concordancia		
	Secuenciación del gen <i>rpoD</i>	MALDI-TOF	Por especie	Global	
Hospital Universitario Miguel Servet (117) <sup>a</sup>	<i>A. caviae</i> (86)	<b><i>A. caviae</i> (84)</b> <i>A. caviae/hydrophila</i> (1) <i>A. hydrophila</i> (1)	97,6	97,4% (114/117) a nivel de género	
	<i>A. veronii</i> (20)	<b><i>A. veronii</i> (18)</b> <i>A. caviae</i> (2)	90		
	<i>A. hydrophila</i> (5)	<b><i>A. hydrophila</i> (5)</b> <i>A. veronii</i> (1)	100	91,5% (107/117) a nivel de especie	
	<i>A. media</i> (2)	<i>Aeromonas</i> sp. (1)	0		
	<i>A. dhakensis</i> (1)	<i>A. hydrophila</i> (1)	0	100% a nivel de género	
	No <i>Aeromonas</i> (3)	<i>A. hydrophila</i> (1) <i>A. caviae</i> (3)	0		
	Hospital Universitario de Guagalajara (62) <sup>b</sup>	<i>A. caviae</i> (31)	<b><i>A. caviae</i> (29)</b> <i>A. hydrophila</i> (2)	93,5	90,3% (56/62) a nivel de especie
		<i>A. veronii</i> (12)	<b><i>A. veronii</i> (12)</b>	100	
		<i>A. hydrophila</i> (10)	<b><i>A. hydrophila</i> (10)</b> <b><i>A. media</i> (3)</b>	100	
		<i>A. media</i> (4)	<i>A. eucrenophila</i> (1)	75	
<i>A. salmonicida</i> (2)		<b><i>A. salmonicida</i> (1)</b> <i>A. bestiarum</i> (1)	50		
<i>A. allosaccharophila</i> (2)		<i>A. veronii</i> (2)	0		
<i>A. bestiarum</i> (1)		<b><i>A. bestiarum</i> (1)</b> <b><i>A. caviae</i> (113)</b>	100		
<i>A. caviae</i> (117)		<i>A. hydrophila</i> (3) <i>A. caviae/hydrophila</i> (1)	96,6		
<i>A. veronii</i> (32)		<b><i>A. veronii</i> (30)</b> <i>A. caviae</i> (2)	93,8		
<i>A. hydrophila</i> (15)		<b><i>A. hydrophila</i> (15)</b> <b><i>A. media</i> (3)</b>	100		
Global (179)	<i>A. media</i> (6)	<i>A. veronii</i> (1) <i>A. eucrenophila</i> (1) <i>Aeromonas</i> sp. (1)	50	98,3% (176/179) a nivel de género	
	<i>A. salmonicida</i> (2)	<b><i>A. salmonicida</i> (1)</b> <i>A. bestiarum</i> (1)	50	91,1% (163/179) a nivel de especie	
	<i>A. allosaccharophila</i> (2)	<i>A. veronii</i> (2)	0		
	<i>A. dhakensis</i> (1)	<i>A. hydrophila</i> (1)	0		
	<i>A. bestiarum</i> (1)	<b><i>A. bestiarum</i> (1)</b>	100		
	<i>Aeromonas</i> sp. (3)	<i>A. caviae</i> (3)	0		

En negrita aparecen las cepas en las que hubo concordancia en la identificación a nivel de especie entre ambos métodos. Software utilizados: <sup>a</sup>Biotyper 3.0, <sup>b</sup>Biotyper 3.1.

**Tabla 2. Relación entre la identificación de 179 cepas de *Aeromonas* obtenida mediante secuenciación del gen *rpoD* y MALDI-TOF y los score obtenidos mediante MALDI-TOF.**

Secuenciación <i>rpoD</i> (n, %)	Especies (n)	MALDI-TOF				
		Nº (%) según score obtenido				
		0,00 - 1,699	1,70 - 1,999	2,00 - 2,299	2,30 - 3,0	ND
	<b><i>A. caviae</i> (113)</b>		<b>3 (2,6)</b>	<b>80 (68,4)</b>	<b>24 (20,5)</b>	<b>6 (5,1)</b>
<i>A. caviae</i> (117, 65.4)	<i>A. hydrophila</i> (3)	1 (0,9)		2 (1,7)		
	<i>A. caviae/hydrophila</i> (1)			1 (0,9)		
<i>A. veronii</i> (32, 17.9)	<b><i>A. veronii</i> (30)</b>			<b>25 (78,1)</b>	<b>1 (3,1)</b>	<b>4 (12,5)</b>
	<i>A. caviae</i> (2)			1 (3,1)		1 (3,1)
<i>A. hydrophila</i> (15, 8.4)	<b><i>A. hydrophila</i> (15)</b>			<b>14 (93,3)</b>		<b>1 (6,7)</b>
	<b><i>A. media</i> (3)</b>			<b>3 (50,0)</b>		
	<i>A. veronii</i> (1)			1 (16,7)		
<i>A. media</i> (6, 3.4)	<i>A. eucrenophila</i> (1)			1 (16,7)		
	<i>Aeromonas</i> sp. (1)					1 (16,7)
	<b><i>A. salmonicida</i> (1)</b>			<b>1 (50,0)</b>		
<i>A. salmonicida</i> (2, 1.1)	<i>A. bestiarum</i> (1)		1 (50,0)			
	<i>A. veronii</i> (2)			2 (100,0)		
<i>A. allosaccharophila</i> (2, 1.1)	<i>A. hydrophila</i> (1)			1 (100,0)		
<i>A. dhakensis</i> (1, 0.6)	<b><i>A. bestiarum</i> (1)</b>			<b>1 (100,0)</b>		
<i>A. bestiarum</i> (1, 0.6)	<i>A. caviae</i> (3)			3 (100,0)		
No <i>Aeromonas</i> (3, 1.7)						
	Total (%)	1 (0,6)	4 (2,2)	136 (76,0)	25 (14,0)	13 (7,3)

En negrita aparecen las cepas en las que hubo concordancia (163) entre ambos métodos de identificación.

En relación a la identificación por especie, tanto *A. hydrophila* como *A. bestiarum* presentaron un 100% de concordancia entre ambos métodos, seguidos por *A. caviae* (96,6%), *A. veronii* (93,8%) y *A. media* y *A. salmonicida*, ambas con un 50%, mientras que *A. allosaccharophila* y *A. dhakensis* tuvieron un 0% de concordancia. Sin embargo nuestros resultados difieren de los publicados por Lamy y cols. (2010) quienes encontraron un 100% de concordancia para *A. allosaccharophila*, *A. salmonicida* y *A. jandaei*. Además estos autores también encontraron porcentajes más bajos que los nuestros para *A. hydrophila* (95,6%) y *A. caviae* (89,3%), mientras que para *A. veronii* y *A. media* encontraron un 94,4% y un 88,9% respectivamente. En un estudio realizado en Taiwán, se construyó una base de datos para el MALDI-TOF con 217 cepas clínicas de *Aeromonas*, la que más tarde permitió identificación correcta del 100% de las cepas de *A. caviae*, el 96,7% de *A. dhakensis* y *A. veronii* y el 90% de *A. hydrophila* (Chen y cols., 2014a). Recientemente, en otro estudio realizado con cepas de origen clínico, el 100% de las de *A. hydrophila* y *A. veronii* fueron correctamente identificadas, mientras que sólo lo fueron el 86% de las de *A. caviae* y ninguna de las *A. dhakensis* (Shin y cols. 2015).

En cuanto a la relación existente entre la correcta identificación y las puntuaciones obtenidas mediante MALDI-TOF, 149 de las 163 (91.4%) de las cepas correctamente identificadas presentaron un score superior a 2. Además tres (1,8%) cepas de *A. caviae* correctamente identificadas tuvieron score entre 1,70 y 1,999. Sin embargo, de las 14 cepas erróneamente identificadas a nivel de especie, 12 presentaron score entre 2,0 y 2,999 y sólo 2 obtuvieron score inferior a 1,999. Resultados similares fueron obtenidos por Lamy y cols. (2010) quienes al estudiar 139 aislados de *Aeromonas* en 126 (90,6%) identificados correctamente a nivel de especie tuvieron una puntuación superior a 2. Sólo en 2 (1,4%) aislados correctamente identificados se obtuvo una puntuación entre 1,7 y 1,999.

La limitación principal de este método, es que las bases de datos no contienen todas las especies descritas en este género y para las especies que si incluye, solo existe un número reducido de cepas representantes de cada una (Tabla 3). Como ejemplo, de esto en la Tabla 4 que muestran las especies y número de cepas que forman la base de datos utilizadas por los software Biotyper 3.0 y Biotyper 3.1 de Bruker. En la mayoría de los casos los espectros de una especie han sido creados con dos cepas (específicamente en el caso de las cepas tipo) y estas corresponden a la misma lo que cambia es la referencia que se le da en cada colección bacteriana. Por lo tanto, esta base de datos no cuenta con 44 cepas, sino que sólo con 34. Otros problemas son el uso de nomenclatura obsoleta e incluso el uso de cepas mal etiquetadas, como es el caso de *A. allosaccharophila* CECT 4199<sup>T</sup>, que aparece bajo el nombre de *A. veronii*. Esto último explicaría por qué las dos cepas de *A. allosaccharophila* analizadas en este estudio, fueron erróneamente identificadas como *A. veronii*. Problemas similares fueron ya detectados en estudios previos (Lamy y cols., 2011).

Como conclusión el MALDI-TOF es una alternativa útil, rápida, económica y fiable para la identificación de *Aeromonas* a nivel de especie, que genera sobre un 90% de resultados correctos. Su velocidad de análisis y su capacidad de manejar un gran número de cepas son sus principales ventajas. Sin embargo, si la base de datos estuviera más actualizada probablemente este método podría ser capaz de identificar todas las especies del género.

**Tabla 3. Comparación de diferentes estudios en donde se ha utilizado MALDI-TOF para identificar *Aeromonas* spp.**

Referencia	Nº de cepas analizadas	Gen utilizado como método de referencia	Datos del MALDI-TOF			
			Software	Nº (%) cepas identificadas correctamente		Limitaciones
				Género	Especie	
Lamy y cols. (2011)	139 <sup>a,b</sup>	<i>rpoB</i>	Biotyper 2.0 (Bruker, Daltonics, Bremen, Alemania)	139 (100)	127 (91,4)	Redundancia en la base de datos y nomenclatura obsoleta. No diferencia las subespecies de <i>A. salmonicida</i> . 2 cepas tipo ( <i>A. bivalvium</i> CECT 868E <sup>T</sup> y <i>A. tecta</i> CECT 7082 <sup>T</sup> ) fueron mal identificadas, ya que ambas especies están ausentes en la base de datos. Sin embargo, <i>A. aquariorum</i> CECT 7289 <sup>T</sup> (= <i>A. hydrophila</i> subsp. <i>dhakensis</i> CECT 5744 <sup>T</sup> , ahora llamada <i>A. dhakensis</i> CECT 5744 <sup>T</sup> ) fue erróneamente identificada, a pesar de que en la base de datos está presente el espectro correspondiente a <i>A. hydrophila</i> subsp. <i>dhakensis</i> CECT 5744 <sup>T</sup> . Ausencia de todas las especies que conforman el género <i>Aeromonas</i> en la base de datos.
Benagli y cols. (2012)	741 <sup>a,b</sup>	<i>gyrB</i>	SARAMIS <sup>TM</sup> (BioMérieux, Francia)	741 (100)	689 (93)	No diferencia las subespecies de <i>A. salmonicida</i> . Ausencia de todas las especies que conforman el género <i>Aeromonas</i> en la base de datos.
Chen y cols. (2014a) <sup>c</sup>	100 <sup>a</sup>	<i>rpoB</i>	Biotyper (Bruker, Daltonics, Bremen, Alemania)	100 (100)	97 (97)	Ausencia de todas las especies que conforman el género <i>Aeromonas</i> en la base de datos.
Vávrová y cols. (2014)	64 <sup>a,b,d</sup>	ND	Biotyper 3.0 (Bruker, Daltonics, Bremen, Alemania)	64 (100)	41 (64)	El bajo rendimiento evidenciado, se debe a que sólo 50 (78,1%) de las 64 cepas analizadas estaban incluidas en la base de datos. Ausencia de todas las especies que conforman el género <i>Aeromonas</i> en la base de datos.
Deng y cols. (2014)	10 <sup>a,e</sup>	ARNr 16S	Vitek MS 2.0 (BioMérieux, Francia)	10 (100)	ND <sup>e</sup>	No se indica en el trabajo que especies forman la base de datos.
Shing y cols. (2015)	65 <sup>a</sup>	<i>gyrB</i> , <i>rpoB</i>	Biotyper 2.0 (Bruker, Daltonics, Bremen, Alemania)	64 (98,5)	60 (92,3)	Redundancia en la base de datos y nomenclatura obsoleta. Ausencia de todas las especies que conforman el género <i>Aeromonas</i> en la base de datos.
Este estudio	179 <sup>a</sup>	<i>rpoD</i>	Biotyper 3.0 y Biotyper 3.1 (Bruker, Daltonics, Bremen, Alemania)	176 (98,3)	163 (91,1)	Redundancia en la base de datos y nomenclatura obsoleta. Ausencia de todas las especies que conforman el género <i>Aeromonas</i> en la base de datos.

Origen de las cepas: <sup>a</sup>Clínico, <sup>b</sup>Ambiental; <sup>c</sup>Estos autores utilizaron primero 217 (61 *A. veronii*, 61 *A. caviae*, 58 *A. dhakensis*, 35 *A. hydrophila* subsp. *hydrophila*, 1 *A. sanarellii* y 1 *A. taiwanensis*) cepas de origen clínico identificadas genéticamente mediante secuenciación del gen *rpoB*, con las que estandarizaron el método y crearon su propia base de datos; <sup>d</sup>En este estudio se utilizaron 64 cepas, que incluían las 27 cepas tipo descritas hasta el año 2014 y cepas de referencia, pertenecientes a la Colección Checa de Microorganismos (CCM); <sup>e</sup>En este estudio, se analizaron 73 aislados de origen clínico, pero sólo 10 pertenecieron al género *Aeromonas*. Además, en relación a la identificación a nivel de especie, esta se expone de forma poco clara, por lo tanto, los resultados son inconclusos para el género *Aeromonas*; ND: no disponible.

**Tabla 4. Contenido de las base de datos (n= 46 cepas) de los software Biotyper 3.0 y Biotyper 3.1.**

<i>Aeromonas</i> spp.	Nº cepas	Referencia
<i>A. bestiarum</i>	2	<b>CETC 4227<sup>T</sup>, DSM 13956<sup>T</sup></b>
<i>A. caviae</i>	3	60PIM, <b>CECT838<sup>T</sup>, DSM 7323<sup>T</sup></b>
<i>A. encheleia</i>	2	<b>CECT 4342<sup>T</sup>, DSM 11577<sup>T</sup></b>
<i>A. enteropelogenes</i> <sup>a</sup>	3	DSM 6394 <sup>T</sup> , DSM 7312, DSM 9381
<i>A. eucrenophila</i>	2	<b>CECT 4224<sup>T</sup>, DSM 17534<sup>T</sup></b>
<i>A. hydrophila</i>	5	
<i>A. hydrophila</i> subsp. <i>hydrophila</i>		<b>CECT 839<sup>T</sup></b>
<i>A. hydrophila</i> subsp. <i>anaerogenes</i> <sup>b</sup>		DSM30188 <sup>T</sup>
<i>A. hydrophila</i> subsp. <i>hydrophila</i>		<b>DSM 30187<sup>T</sup></b>
<i>A. hydrophila</i> subsp. <i>hydrophila</i>		LMG 21108
<i>A. hydrophila</i> subsp. <i>ranae</i>		LMG 19707 <sup>T</sup>
<i>A. ichthiosmia</i> <sup>c</sup>	1	DSM 6393 <sup>T</sup>
<i>A. jandaei</i>	2	<b>CECT 4228<sup>T</sup>, DSM 7311<sup>T</sup></b>
<i>A. media</i>	4	<b>CECT 4232<sup>T</sup>, DSM 4881<sup>T</sup></b> , ST_00655_09 ERL, ST_02485_08 ERL
<i>A. molluscorum</i>	2	<b>848<sup>T</sup>, DSM 17090<sup>T</sup></b>
<i>A. popoffii</i>	1	LMG 17541 <sup>T</sup>
<i>A. punctata</i> <sup>b</sup>	1	LMG 3773
<i>A. salmonicida</i>	5	
<i>A. salmonicida</i> subsp. <i>masoucida</i>		LMG 3782 <sup>T</sup>
<i>A. salmonicida</i> subsp. <i>pectinolytica</i>		DSM 12609 <sup>T</sup>
<i>A. salmonicida</i> subsp. <i>salmonicida</i>		CCM 1307
<i>A. salmonicida</i> subsp. <i>salmonicida</i>		<b>CECT 894<sup>T</sup></b>
<i>A. salmonicida</i> subsp. <i>salmonicida</i>		<b>LMG 3780<sup>T</sup></b>
<i>A. schubertii</i>	2	<b>CECT 4240<sup>T</sup>, DSM 4882<sup>T</sup></b>
<i>A. simiae</i>	1	DSM 16559 <sup>T</sup>
<i>A. sobria</i>	2	<b>CECT 4245<sup>T</sup>, LMG 3783<sup>T</sup></b>
<i>Aeromonas</i> sp.	1	[2] VA 12051_09 ERL
<i>A. veronii</i>	7	0807M090438 IBS, <b>CECT4199<sup>Td</sup>, CECT 4257<sup>T</sup>, CECT 5761<sup>Te</sup>, DSM 11576<sup>Td</sup>, DSM 17676<sup>e</sup>, DSM 7386<sup>T</sup></b>

En negrita se muestran las referencias que corresponden a una misma cepa, por ejemplo, para *A. bestiarum* CETC 4227<sup>T</sup>= DSM 13956<sup>T</sup>, por lo tanto, esta base de datos sólo cuenta con una cepa de *A. bestiarum*. <sup>a</sup>Este nombre está obsoleto y actualmente corresponde a *A. trota*; <sup>b</sup>Esta subespecie no existe y ahora corresponde a *A. caviae*; <sup>c</sup>Este nombre está obsoleto y actualmente corresponde a *A. veronii*; <sup>d</sup>Ambas cepas están mal etiquetadas y corresponden a la cepa tipo de la especie *A. allosaccharophila* (CECT 4199<sup>T</sup>= DSM 11576<sup>T</sup>); <sup>e</sup>Las cepas CECT 5761<sup>T</sup> y DSM 17676, corresponden a la antigua especie *A. culicicola*, que fue sinonimizada con *A. veronii*, siendo este último nombre el aceptado.

#### 4.4. Estudio polifásico de potenciales nuevas líneas filogenéticas

**4.4.1. *Aeromonas aquatica* sp. nov., *Aeromonas finlandiensis* sp. nov. and *Aeromonas lacus* sp. nov. isolated from Finnish waters associated with cyanobacterial blooms. Beaz-Hidalgo R, Latif-Eugenín F, Hossain MJ, Berg K, Niemi RM, Rapala J, Lyra C, Liles MR, Figueras MJ. Syst. Appl. Microbiol. (2015) 38:161-168.**

##### Resumen

Tres grupos de cepas del género *Aeromonas* aisladas a partir de lagos de Finlandia con afloramientos de cianobacterias no pudieron ser asignadas a ninguna de las especies del género mediante secuenciación de los genes ARNr 16S y *rpoD*. El análisis filogenético multilócico (MLPA) de secuencias de siete genes (*gyrB*, *rpoD*, *recA*, *dnaJ*, *gyrA*, *dnaX* y *atpD*; 4093 pb) demostró que los tres grupos de cepas no se agruparon con ninguna de las especies conocidas de *Aeromonas*, formando tres líneas filogenéticas independientes. Otro análisis filogenético en base a 15 genes (los siete anteriores y *cpn60*, *dnaK*, *gltA*, *mdh*, *radA*, *rpoB*, *tsf* y *zipA*; 8751 pb) con las especies filogenéticamente más cercanas a las candidatas nuevas especies demostró de nuevo las tres líneas filogenéticas independientes. Además los resultados del ANI entre los genomas de las cepas tipo de las tres potenciales nuevas especies y de las especies estrechamente relacionadas fueron < 96%, punto de cohorte previamente propuesto para delimitar nuevas especies dentro del género *Aeromonas*. Los valores del DDH *insilico* de las tres cepas tipo de las nuevas especies también mostraron valores de re-asociación < 70% con las especies más cercanas, demostrando que corresponden a nuevas especies. Varios caracteres fenotípicos pudieron diferenciar los tres grupos de cepas entre ellas y de otras especies conocidas de *Aeromonas*. Este estudio polifásico reveló que los tres grupos de cepas representan tres nuevas especies de *Aeromonas* y se proponen los nombres *Aeromonas aquatica* sp. nov. (cepa tipo AE235<sup>T</sup>= CECT 8025<sup>T</sup>= LMG 26712<sup>T</sup>), *Aeromonas finlandiensis* sp. nov. (cepa tipo 4287D<sup>T</sup>= CECT 8028<sup>T</sup>= LMG 26709<sup>T</sup>) y *Aeromonas lacus* sp. nov. (cepa tipo AE122<sup>T</sup>= CECT 8024<sup>T</sup>= LMG 26710<sup>T</sup>).





Contents lists available at ScienceDirect

# Systematic and Applied Microbiology

journal homepage: [www.elsevier.de/syapm](http://www.elsevier.de/syapm)



## *Aeromonas aquatica* sp. nov., *Aeromonas finlandiensis* sp. nov. and *Aeromonas lacus* sp. nov. isolated from Finnish waters associated with cyanobacterial blooms<sup>☆</sup>



R. Beaz-Hidalgo<sup>a</sup>, F. Latif-Eugenín<sup>a</sup>, M.J. Hossain<sup>b</sup>, K. Berg<sup>c</sup>, R.M. Niemi<sup>d</sup>, J. Rapala<sup>e</sup>,  
C. Lyra<sup>c</sup>, M.R. Liles<sup>b</sup>, M.J. Figueras<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Unitat de Microbiologia, Departament de Ciències Mèdiques Bàsiques, Facultat de Medicina i Ciències de la Salut, IISPV, Universitat Rovira i Virgili, Reus, Spain

<sup>b</sup> Department of Biological Sciences, Auburn University, Auburn, AL, United States

<sup>c</sup> Department of Food and Environmental Sciences, University of Helsinki, Helsinki, Finland

<sup>d</sup> Finnish Environment Institute, Ecosystem Change, Helsinki, Finland

<sup>e</sup> Ministry of Social Affairs and Health, Department of Promotion of Welfare and Health, Helsinki, Finland

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 31 March 2014

Received in revised form 18 February 2015

Accepted 27 February 2015

#### Keywords:

Aeromonas  
New taxa  
Polyphasic  
ANI  
Water

### ABSTRACT

Three groups of *Aeromonas* strains isolated from Finland lakes experiencing cyanobacterial blooms could not be assigned to any known species of this genus on the basis of 16S rRNA and *rpoD* gene sequences. The Multilocus Phylogenetic Analysis (MLPA) of the concatenated sequence of seven genes (*gyrB*, *rpoD*, *recA*, *dnaJ*, *gyrA*, *dnaX* and *atpD*; 4093 bp) showed that the three groups of strains did not cluster with any known *Aeromonas* spp. and formed three independent lineages. This was confirmed by performing the analysis with their closest relatives using 15 genes (the latter 7 and *cpn60*, *dnaK*, *gltA*, *mdh*, *radA*, *rpoB*, *tsf*, *zipA*; 8751 bp). Furthermore, ANI results between the genomes of the type strains of the three potential new species and those of their close relatives were all <96% which is the previously proposed cutoff value for differentiating species within this genus. The *in silico* DDH values of the three type strains of the new species also showed a similarity <70% with the most closely related species indicating they belong to different taxa. The three groups of strains could be differentiated from each other and from other known *Aeromonas* species on the basis of several phenotypic characters. This polyphasic study revealed that the 3 groups of strains represent 3 novel *Aeromonas* species for which the names *Aeromonas aquatica* sp. nov. (type strain AE235<sup>T</sup> = CECT 8025<sup>T</sup> = LMG 26712<sup>T</sup>), *Aeromonas finlandiensis* sp. nov. (type strain 4287D<sup>T</sup> = CECT 8028<sup>T</sup> = LMG 26709<sup>T</sup>) and *Aeromonas lacus* sp. nov. (type strain AE122<sup>T</sup> = CECT 8024<sup>T</sup> = LMG 26710<sup>T</sup>) are proposed.

© 2015 Elsevier GmbH. All rights reserved.

The genus *Aeromonas* belongs to the domain Bacteria, Phylum *Proteobacteria*, Class *Gammaproteobacteria*, Order *Aeromonadales* and Family *Aeromonadaceae* and include oxidase-positive, facultatively anaerobic, Gram-negative bacilli [26]. Key phenotypic

characteristics for the recognition of *Aeromonas* are resistance to the vibriostatic agent O/129 (2,4-diamino-6,7-diisopropyl pteridine at concentrations of 150 mg/disk) with the exceptions of *Aeromonas cavernicola* and *Aeromonas australiensis* that are sensitive [5,27], inability to ferment inositol and to grow on media containing 6% NaCl although they grow on nutrient agar at 0% NaCl [26].

Since the last review of the genus performed by Janda and Abbott [23], 8 new species have been described: *Aeromonas piscicola* isolated from diseased salmon [7], *Aeromonas fluvialis* [4], *Aeromonas rivuli* [15], *A. australiensis* [5] and *A. cavernicola* [27] (the latter species has not yet been validly published) from water and 3 new clinical species recovered from wound infections: *Aeromonas taiwanensis*, *Aeromonas sanarellii* [3] and *Aeromonas diversa* (previously Enteric group 501) [32]. Furthermore *Aeromonas aquariorum* [30] and *A. hydrophila* subspecies *dhakensis*

<sup>☆</sup> The GenBank/EMBL/DBJ accession numbers of the 16S rRNA gene sequences of strains 4287D<sup>T</sup> (=CECT 8028<sup>T</sup> = LMG 26709<sup>T</sup>), AE235<sup>T</sup> (=CECT 8025<sup>T</sup> = LMG 26712<sup>T</sup>) and AE122<sup>T</sup> (=CECT 8024<sup>T</sup> = LMG 26710<sup>T</sup>) are LM654283, HG970952 and HG970953, respectively. The *gyrB*, *rpoD*, *recA*, *dnaJ*, *gyrA*, *dnaX* and *atpD* of the other strains of the three novel species have also been deposited under the accession numbers HG970918–HG970928, HG970940–HG970950, HG970929–HG970939, HG970885–HG970895, HG970907–HG970917, HG970896–HG970906, HG970874–HG970883, respectively.

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

E-mail address: [mariajose.figueras@urv.cat](mailto:mariajose.figueras@urv.cat) (M.J. Figueras).



[22] have recently been synonymised under the name *Aeromonas dhakensis* [9].

Phenotypic characterization shows different levels of precision for the identification of *Aeromonas* species and tends to overestimate the clinical and environmental relevance of the species *A. hydrophila*, thus hampering the establishment of the true incidence of other new or rare species [14,16,23,25].

Molecular identification of *Aeromonas* species using the 16S rRNA gene can also have limitations due to the high interspecies sequence similarity of this gene (96.7–100%) and due to the presence of *rrn* microheterogeneities [2,16]. Housekeeping genes like *rpoD*, *gyrB*, *rpoB* and *dnaJ* among others are used as an alternative because they can precisely identify *Aeromonas* spp. [24,35,40]. Furthermore, a Multilocus Sequence Analysis (MLSA) or Multilocus Phylogenetic Analysis (MLPA) using the concatenated sequences of five or more housekeeping genes, as recommended by the *ad hoc* committee for the re-evaluation of the species definition in bacteriology [41] has been used for the delineation of *Aeromonas* species [3–5,15,27] and shows a good concordance with DNA-DNA hybridization (DDH) results [29,38]. Therefore such analysis has been proposed as an alternative to DDH and is being used for the description of new bacterial species [16,29,36,41]. Also the correlation found between DDH results >70% with values of 95–96% for the *in silico* determined average nucleotide identity (ANI) between two genomes has led to the proposal of using ANI as the “gold standard” for the substitution of DDH for the description of new bacterial species [18,37]. Recently we have recommended the use of ANI between type or *bona fide* strains or the use of a MLSA in order to verify the correct taxonomic affiliation of genomes [8,17].

During a survey carried out in Finnish waters where cyanobacterial blooms were suspected to have caused adverse human health effects (fever, gastrointestinal symptoms) 116 *Aeromonas* strains were recovered and identified with partial sequences of the 16S rRNA gene [10]. A re-analysis of these strains (study in preparation) using the *rpoD* gene showed that 11 of them formed 3 independent clusters (with 7, 2 and 2 strains each) and could not be assigned to any of the known *Aeromonas* species. The aim of the present study was to use a polyphasic approach to characterize these 3 potential new species.

Genomic DNA was extracted from a single colony grown on TSA plates at 30 °C for 24 h using the Instagene Matrix (Bio-Rad) according to the manufacturer’s instructions. The 11 isolates were genotyped using the enterobacterial repetitive intergenic consensus (ERIC)-PCR and all isolates showed different ERIC patterns indicating that they were different strains (Fig. S1). The 16S rRNA and the genes used in the multilocus analyses (*rpoD*, *gyrB*, *recA*, *dnaJ*, *gyrA*, *dnaX*, *atpD*) were amplified and sequenced using primers and conditions described previously [28,29,40]. Genetic distances and clustering were obtained using Kimura’s two-parameter model, alignments and phylogenetic trees were constructed by the neighbour-joining method using MEGA software version 5 [42]. The percentages of the inter-species ranges of nucleotide substitution of the 3 new taxa with respect to their most closely related species were also calculated with the MEGA software.

The almost complete 16S rRNA gene (1405 bp) was obtained and the unknown strains formed three new, monophyletic phylogenetic clades when compared with those from the type strains of all known *Aeromonas* species (Fig. 1). The percentage ranges of the inter- and intra-species sequence similarities of the 16S rRNA gene of the three new *Aeromonas* species are illustrated in Table 1. The high inter-species similarity of the 16S rRNA gene (99.07–99.72%) for the new species with the closest relatives is not rare in *Aeromonas* and fall within the range described for this genus [16,39]. However, a detailed analysis of the variable regions of the 16S rRNA gene sequences of the 3 new species revealed

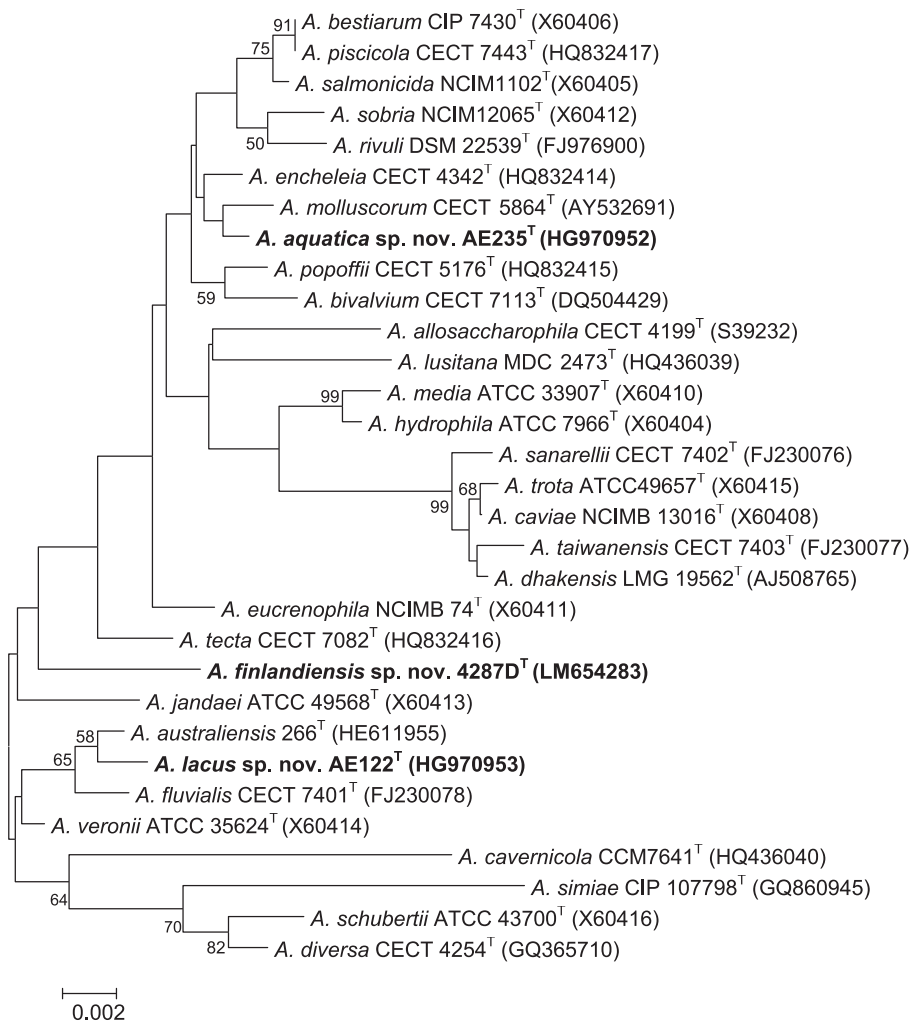
unique nucleotides at concrete positions (Table 2). These signature nucleotides were located in the variable regions V2 and V3 which have previously been considered useful regions for the delineation of *Aeromonas* species [28].

The tree constructed with the concatenated sequence of 7 genes (*gyrA*, *gyrB*, *rpoD*, *recA*, *dnaJ*, *atpD* and *dnaX*, 4093 bp) showed that the 3 groups of strains formed well supported (bootstrap >94%) independent clusters from the rest of the species of the genus. The new candidate species *Aeromonas lusitana* which has not yet been formally described was included in the analysis in order to demonstrate that the three new species do not belong to this species.

The nearest phylogenetic neighbors were different than those obtained with the 16S rRNA phylogeny which is not strange considering the low bootstrap values obtained with the latter gene (Figs. 1 and 2). The most related species in the MLSA for *A. finlandiensis* sp. nov. were *A. allosaccharophila*, *A. australiensis* and *A. veronii*; for *A. aquatica* sp. nov., *A. encheleia* and *A. eucrenophila* and for *A. lacus* sp. nov., *A. jandaei* (Figs. 2 and 3). As can be seen in the present study and in many others [3,4,7,9,15,27,30] the resolution of the MLSA is better than the one provided by the 16S rRNA gene and the overall phylogenetic relatedness is more robust (bootstrap values of 100% for all the species clusters). With the 7 concatenated genes, the inter-species ranges of substitution of the new species with their closest relatives were: 2.67–3.41% for *A. finlandiensis* with *A. allosaccharophila* (3.04% between the type strains), 2.97–3.61% for *A. finlandiensis* with *A. veronii* (3.30% between the type strains), 4.10–4.61% for *A. aquatica* and *A. encheleia* (4.61% between type strains), 4.15–4.47% for *A. aquatica* and *A. eucrenophila* (4.17% between the type strains) and 2.67–3.31% for *A. lacus* and *A. jandaei* (2.87% between the type strains). Other species within the genus share similar or lower inter-species ranges like *A. allosaccharophila* and *A. veronii* (2.87–3.53%, 3.21% between type strains) or *A. bestiarum* and *A. piscicola* (2.36–3.34%, 2.63% between type strains) as has previously been demonstrated [29].

To confirm these results a more complete analysis was performed using the concatenated sequence of 15 genes of the type strains of the new species with those of their closest relatives using *A. piscicola* and *A. bestiarum* as reference of the lowest inter-species separation within the genus [29]. The additional genes *cpn60*, *dnaK*, *gltA*, *mdh*, *radA*, *rpoB*, *tsf* and *zipA* were retrieved from the genome sequences performing a BLAST search using the Basic Local Alignment Search Tool (from the NCBI web interface). The new tree confirmed that the 3 proposed species formed new independent phylogenetic lines within the genus (Fig. 3) because the length of the branches that separate them from the closest relatives were equivalent to those shown by other accepted species of the genus (i.e. *A. piscicola* and *A. bestiarum*). The inter-species nucleotide substitution rates for these 15 genes between the type strains of the new species and their close relatives were similar to those obtained with 7 genes, i.e. *A. finlandiensis* 4287D<sup>T</sup>-*A. allosaccharophila* CECT 4199<sup>T</sup> (3.32%), *A. finlandiensis* 4287D<sup>T</sup>-*A. veronii* CECT 4257<sup>T</sup> (3.60%), *A. aquatica* AE235<sup>T</sup>-*A. encheleia* CECT 4342<sup>T</sup> (4.9%) and *A. lacus* AE122<sup>T</sup>-*A. jandaei* CECT 4228<sup>T</sup> (2.85%). However, it was slightly lower (by 0.44%) for *A. aquatica* AE235<sup>T</sup>-*A. eucrenophila* CECT 4224<sup>T</sup> (3.73%). As in the 7 gene analysis all inter-species values between the type strains and those of their close relatives were lower than those obtained for *A. bestiarum* CECT 4227<sup>T</sup>-*A. piscicola* CECT 7443<sup>T</sup> (2.56%), and all except one (*A. lacus*-*A. jandaei*) were also lower than *A. allosaccharophila* CECT 4199<sup>T</sup> - *A. veronii* CECT 4257<sup>T</sup> (2.97%). These highly similar inter-species nucleotide substitution values could be an indication that the rate of evolution of the different genes between those species is constant.

The genome sequences of strains *A. aquatica* AE235<sup>T</sup> and *A. lacus* AE122<sup>T</sup> have recently been published [20] and using the same methodology we also obtained the genome of *A.*



**Fig. 1.** Unrooted neighbour joining phylogenetic tree derived from the 16S rRNA sequences (1405 bp) showing the relationships of the type strains of the 3 new species with other type strains of all *Aeromonas* species. Numbers at the node indicate bootstrap values (>50%). Bar, 0.002 estimated substitutions per site.

*finlandiensis* 4287D<sup>T</sup> (accession number JRGK00000000). Genomes of the type strains of the most closely related species for each new species on the basis of the 16S rRNA gene phylogeny and the MLSA, were retrieved from the GenBank and ANI calculations were performed using three platforms: the ANI calculator web-interface (<http://enve-omics.ce.gatech.edu/ani/index>),

the EzGenome (<http://www.ezbiocloud.net/ezgenome/ani>) and the JSpecies software (<http://www.imedeia.uib.es/jspecies>). The ANI results are shown in Table 3 and all were <96%, that is the cutoff value previously proposed for the genus *Aeromonas* [8,12]. This clearly indicated that the three type strains belong to 3 new species.

**Table 1**

Intra- and inter-species 16S rRNA gene similarity (%) of *Aeromonas aquatica* sp. nov., *Aeromonas finlandiensis* sp. nov. and *Aeromonas lacus* sp. nov. with other *Aeromonas* species sharing the highest percentage similarity.

	16S rRNA similarity		
	<i>A. aquatica</i> (n = 2) (%)	<i>A. finlandiensis</i> (n = 7) (%)	<i>A. lacus</i> (n = 2) (%)
<i>A. allosaccharophila</i> CECT 4199 <sup>T</sup>	98.79	98.29–98.51	99.22
<i>A. australiensis</i> CECT 8023 <sup>T</sup>	98.36	98.72–98.86	<b>99.64–99.72</b>
<i>A. bestiarum</i> CIP 7430 <sup>T</sup>	99.50	98.08–98.36	98.15–98.22
<i>A. encheleia</i> CECT 4342 <sup>T</sup>	<b>99.72</b>	98.51–98.65	99.22–99.29
<i>A. eucrenophila</i> NCIMB 74 <sup>T</sup>	99.57	<b>99.07–99.43</b>	98.36–98.43
<i>A. fluvialis</i> CECT 7401 <sup>T</sup>	98.43	98.65–98.93	<b>99.36–99.43</b>
<i>A. jandaei</i> ATCC 49568 <sup>T</sup>	98.43	98.93–99.22	99.22–99.29
<i>A. molluscorum</i> CECT 5864 <sup>T</sup>	<b>99.72</b>	98.36–98.72	98.08–98.15
<i>A. piscicola</i> CECT 7443 <sup>T</sup>	99.50	98.05–98.36	98.15–98.22
<i>A. popoffii</i> CECT 5176 <sup>T</sup>	<b>99.64</b>	98.65–98.93	98.29–98.36
<i>A. tecta</i> CECT 7082 <sup>T</sup>	99.43	<b>99.07–99.43</b>	98.65–98.72
<i>A. veronii</i> ATCC 35624 <sup>T</sup>	98.65	<b>99.15–99.29</b>	<b>99.36–99.43</b>
Intra-species similarity	100.00	99.64–100.00	99.79

In bold are the 3 most similar *Aeromonas* species.

**Table 2**  
 Comparison of signature nucleotide positions of the 16S rRNA gene of the three new species with those of other *Aeromonas* species (type strains) that show similar nucleotides and that share high percentage similarity in their sequences.

Species	Localization <sup>a</sup> of signature nucleotides					
	141	260	266	471–473	475	1013–1014
<i>A. aquatica</i> sp. nov. (n=2)	G	<b>G</b>	T	<b>CGC</b>	T	<b>CA</b>
<i>A. finlandiensis</i> sp. nov. (n=7)	<b>A</b>	A	T	CCC	<b>A</b>	TA
<i>A. lacus</i> sp. nov. (n=2)	G	A	<b>C</b>	TCT	C	<b>AA</b>
<i>A. allosaccharophila</i> CECT 4199 <sup>T</sup>	G	A	T	ACT	C	AA
<i>A. australiensis</i> CECT 8023 <sup>T</sup>	G	A	T	ACT	C	AA
<i>A. bestiarum</i> CIP 7430 <sup>T</sup>	G	G	T	CGT	T	CA
<i>A. diversa</i> CECT 4254 <sup>T</sup>	G	A	C	ACT	C	CA
<i>A. encheleia</i> CECT 4342 <sup>T</sup>	G	G	T	CGT	T	TA
<i>A. eucrenophila</i> NCIMB 74 <sup>T</sup>	G	G	T	CGC	T	TA
<i>A. fluvialis</i> CECT 7401 <sup>T</sup>	G	A	T	ACT	C	CA
<i>A. jandaei</i> ATCC 49568 <sup>T</sup>	G	A	C	TCT	C	CA
<i>A. media</i> ATCC33007 <sup>T</sup>	G	A	T	CGC	T	CA
<i>A. molluscorum</i> CECT 5864 <sup>T</sup>	G	A	T	CGC	T	CA
<i>A. piscicola</i> CECT 7443 <sup>T</sup>	G	G	T	CGT	T	CA
<i>A. popoffii</i> CECT 5176 <sup>T</sup>	G	G	T	CCC	G	CA
<i>A. schubertii</i> ATCC 43700 <sup>T</sup>	G	A	C	CCT	C	TA
<i>A. tecta</i> CECT 7082 <sup>T</sup>	G	G	T	CGC	T	TA
<i>A. veronii</i> ATCC 35624 <sup>T</sup>	G	A	T	ACT	C	TA

<sup>a</sup> According to *E. coli* numbering system. In bold, key signature nucleotides at specific positions in the 16S rRNA gene that differentiate the new species from other *Aeromonas* species.

Estimation of *in silico* DDH (isDDH) was performed using the Genome-to Genome Distance Calculator (GGDC) [6,31]. The partial genome files were uploaded to the GGDC 2.0 Web interface (<http://ggd-c.dsmz.de/distcalc2.php>) and the Formula 2 was used as recommended for the calculation of isDDH for incomplete genomes [6,31]. All isDDH values of the three new species were <70% with their most closely related species confirming that they were different taxa (Table 3).

Cellular size, morphology and presence of flagella were determined by electron microscopy as described previously [11] and motility was observed under light microscopy. All strains were motile under a light microscope and a single polar flagellum could be seen on all type strains under the electron microscope (data not shown). For the physiological and biochemical characterization of the 3 groups of strains, 29 phenotypic tests listed in a previous study [27] and acid production from 21 carbohydrates were performed as described by Alperi et al. [4]. In addition the commercial identification kit API50CH was used for the evaluation of acid production of additional carbohydrates following the manufacturer's instructions. The ability to grow at different temperatures was assayed in trypticase soy agar (TSA) at 4, 15, 30 and 45 °C and growth at different pH (3, 4, 5, 6, 7, 7.5, 8, 8.5, 9) and salinity concentrations (0, 3 and 4.5% NaCl) was evaluated in trypticase soy broth (TSB). All phenotypic tests were performed for the strains of the new candidate species in triplicate at 30 °C and for all the type strains of known *Aeromonas* species using appropriate positive and negative controls in parallel. So this incubation temperature should be used to reproduce the behaviour described here for these new species.

**Table 3**  
 Results of ANI calculations using ANI calculator, EzGenome tools and JSpecies software and *in silico* DDH of the 3 new species with respect to the most closely related species.

Species	ANI Calculator (ANiB)	EzGenome (ANiB)	JSpecies (ANiB)	JSpecies (ANIm)	GGDC
<i>A. aquatica</i> AE235 <sup>T</sup> vs. <i>A. encheleia</i> CECT 4342 <sup>T</sup>	89.53	89.19	89.32	91.42	37.80
<i>A. aquatica</i> AE235 <sup>T</sup> vs. <i>A. eucrenophila</i> CECT 4224 <sup>T</sup>	93.05	93.01	93.05	93.81	50.50
<i>A. aquatica</i> AE235 <sup>T</sup> vs. <i>A. molluscorum</i> 848 <sup>T</sup>	83.22	81.21	81.22	87.77	25.20
<i>A. finlandiensis</i> 4287D <sup>T</sup> vs. <i>A. allosaccharophila</i> CECT 4199 <sup>T</sup>	92.30	92.24	92.26	93.43	48.40
<i>A. finlandiensis</i> 4287D <sup>T</sup> vs. <i>A. australiensis</i> CECT 8023 <sup>T</sup>	90.56	90.50	90.30	92.14	42.40
<i>A. finlandiensis</i> 4287D <sup>T</sup> vs. <i>A. veronii</i> CECT 4257 <sup>T</sup>	92.28	92.03	92.08	93.43	47.90
<i>A. lacus</i> AE122 <sup>T</sup> vs. <i>A. australiensis</i> CECT 8023 <sup>T</sup>	88.20	87.75	87.65	90.62	34.40
<i>A. lacus</i> AE122 <sup>T</sup> vs. <i>A. jandaei</i> CECT 4228 <sup>T</sup>	95.16	95.17	95.44	95.74	63.20

Accession numbers for the draft genome sequences of the *Aeromonas* strains AE235<sup>T</sup>, 4287D<sup>T</sup>, and AE122<sup>T</sup> are JRGLO0000000, JRGK00000000, and JRGMO0000000, respectively. GGDC, Genome to genome distance calculator.

The phenotypic characteristics that differentiate each new species from the other species in the genus are shown in Table 4. A key differential character was the acid production of D-saccharose because strains belonging to the 3 new species were negative and 21 of the 27 *Aeromonas* spp. produce acid from this substrate. Furthermore other key differential tests useful for the recognition of the 3 new species include Voges Proskauer (VP), Methyl Red (MR), acid production from lactose, glycerol and cellobiose and hydrolysis of aesculin (Table 4).

One of the typical characteristics of the genus *Aeromonas* is its inability to ferment inositol, but despite that, 2 of the 7 strains belonging to *A. finlandiensis* sp. nov. (4287D<sup>T</sup> and AE93) produce acid from inositol by both the nutrient broth and the API 50CH methods. Recently, Hossain et al. [21] demonstrated that *A. hydrophila* strains involved in epidemic outbreaks in channel catfish can use *myo*-inositol as a sole carbon source and suggested that this characteristic could be involved in the virulence of the strains. Considering this finding we have evaluated the ability of the 7 *A. finlandiensis* strains to use *myo*-inositol using the procedure described by Hossain et al. [21]. It was demonstrated that in addition to fermenting *myo*-inositol, strains 4287D<sup>T</sup> and AE93 could also use it as a sole carbon source.

This polyphasic study that included phenotypic and genetic characterization revealed that these 3 groups of strains represent 3 new *Aeromonas* species, for which the names *Aeromonas aquatica* sp. nov., *Aeromonas finlandiensis* sp. nov. and *Aeromonas lacus* sp. nov. are proposed. For the species *A. finlandiensis* sp. nov. the strain 4287D<sup>T</sup> (=CECT 8028<sup>T</sup> = LMG 26709<sup>T</sup>) was chosen as the type

**Table 4**  
 Differential characteristics of *A. aquatica* sp. nov., *A. finlandiensis* sp. nov. and *A. lacus* sp. nov. from other members of the genus.

Character	A	B	C	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
Indole	+	+	V(-)	+(+)	+(+)	+(-)	V(+)	+(+)	+(+)	+(+)	+(+)	+(+)	+(+)	-(-)	+(+)	+(+)
VP	-	-	+	+(+)	V(+)	V(+)	-(-)	-(-)	-(-)	-(-)	+(+)	+(+)	V(-)	V(-)	-(-)	-(-)
RM	+	+	-	nd(+)	nd(-)	nd(+)	nd(+)	nd(+)	nd(+)	nd(+)	nd(-)	nd(+)	nd(-)	nd(+)	nd(+)	nd(+)
Utilization of citrate	-	+ <sup>a</sup>	+	+(+)	-(-)	+(-)	+(+)	V(+)	-(-)	+(+)	V(-)	+(+)	+(+)	V(+)	+(+)	-(-)
Acid from																
D-cellobiose	+	+	+	-(-)	V(-)	V(-)	+(+)	+(+)	V(+)	+(+)	V(-)	-(-)	V(+)	-(-)	+(+)	-(-)
D-saccharose	-	-	-	+(+)	+(+)	+(+)	+(+)	+(+)	V(+)	+(+)	+(+)	-(-)	+(+)	-(-)	V(-)	V(+)
Lactose	+	-	-	V(-)	-(-)	+(-)	V(-)	V(+)	-(+)	-(-)	-(-)	-(-)	V(-)	-(-)	-(-)	-(-)
Glycerol	+	+	+	+(+)	+(+)	+(+)	V(-)	V(+)	-(-)	+(+)	+(+)	+(+)	+(+)	-(-)	V(+)	+(+)
Hydrolysis of aesculin	+	-	-	+(+)	V(+)	+(+)	V(+)	V(+)	V(+)	-(-)	-(-)	-(-)	+(+)	-(-)	-(-)	V(+)
SDS	-	V <sup>b</sup> (-)	-	-(-)	nd(-)	-(-)	-(-)	-(-)	-(-)	V(-)	V(-)	V(-)	+(+)	+(+)	+(+)	-(-)
Character	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	
Indole	+(+)	V(-)	-(-)	-(-)	+(+)	+(+)	-(-)	+(+)	+(+)	+(+)	+(+)	-(-)	+(+)	+(+)	-(-)	
VP	-(-)	+(+)	-(-)	-(-)	-(-)	+(+)	V(+)	-(-)	+(+)	-(-)	-(-)	-(-)	V(+)	+(+)	+(+)	
MR	nd(+)	nd(-)	nd(-)	+(+)	+(+)	nd(-)	+(+)	nd(-)	-(-)	nd(-)	nd(+)	nd(+)	+(+)	nd(-)	+(+)	
Utilization of citrate	V(-)	+(+)	nd(-)	+(+)	+(+)	V(+)	V(-)	+(+)	nd(-)	+(+)	-(-)	v(+)	nd(-)	-(-)	+(+)	
Acid from																
D-cellobiose	+(+)	-(-)	+(+)	V(+)	nd(-)	-(-)	-(-)	+(+)	V(+)	-(-)	-(-)	V(+)	-(-)	-(-)	-(-)	
D-saccharose	+(+)	-(-)	+(+)	+(+)	+(+)	+(+)	-(-)	+(+)	+(+)	+(+)	+(+)	+(+)	-(-)	+(+)	-(-)	
Lactose	-(-)	-(-)	-(-)	-(-)	-(-)	-(-)	-(-)	+(+)	-(-)	-(-)	-(-)	-(-)	-(-)	-(-)	-(-)	
Glycerol	+(+)	+(+)	+(+)	+(+)	+(+)	+(+)	+(+)	+(+)	+(+)	+(+)	+(+)	-(-)	nd(+)	+(+)	+(+)	
Hydrolysis of aesculin	V(+)	-(-)	V(-)	+(+)	+(+)	+(+)	V(+)	-(-)	+(+)	+(+)	+(+)	+(+)	-(-)	-(-)	+(+)	
SDS	nd(-)	nd(-)	nd(-)	nd(-)	nd(+)	nd(-)	nd(+)	nd(-)	nd(-)	nd(-)	nd(-)	nd(-)	nd(+)	nd(-)	-(-)	

Taxa: A, *A. aquatica* (n=2); B, *A. finlandiensis* (n=7); C, *A. lacus* (n=2); 1, *A. hydrophila* (n=25); 2, *A. bestiarum* (n=16); 3, *A. salmonicida* (n=13); 4, *A. caviae* (n=25); 5, *A. media* (n=11); 6, *A. eucrenophila* (n=9); 7, *A. sobria* (n=2); 8, *A. veronii biovar sobria* (n=25); 9, *A. jandaei* (n=15); 10, *A. veronii biovar veronii* (n=10); 11, *A. schubertii* (n=12); 12, *A. trota* (n=16); 13, *A. encheleia* (n=4); 14, *A. allosaccharophila* (n=3); 15, *A. popoffii* (n=7); 16, *A. simiae* (n=1) [19]; 17, *A. molluscorum* (n=5) ([33], tested at 25 °C); 18, *A. bivalvium* (n=2) ([34], tested at 25–30 °C); 19, *A. dhakensis* (n=13) [30]; 20, *A. tecta* (n=5) [13]; 21, *A. fluvialis* (n=1) [4]; 22, *A. piscicola* (n=5) ([7], tested at 25 °C); 23, *A. taiwanensis* (n=1) [3]; 24, *A. sanarellii* (n=1) [3]; 25, *A. rivuli* (n=2) [15]; 26, *A. diversa* (n=2) [32]; 27, *A. australiensis* (n=1) ([5], tested also at 35 °C); 28, *A. cavernicola* (n=1) [27]. All tests were performed at 30 °C (with the exception of *A. salmonicida* that was performed at room temperature). Data obtained from other studies tested at other temperatures is indicated. Data from 1 to 15 were obtained from Abbott et al. [1] that performed the tests at 35 °C with the exceptions of *A. popoffii* and *A. sobria* which were at 25 °C. Abbreviations: +, 85–100% of strains positive; -, 0–15% of strains positive; V, 16–84% of strains positive. Results performed for the type strains under the same conditions as the new strains are given in parentheses as (+) or (-). VP, Voges-Proskauer; MR, methyl red; nd, no data available.

<sup>a</sup> Strain AE119 was negative.

<sup>b</sup> Strains HE40 and HE110 were positive.

strain as was one strain that showed the unusual ability to ferment inositol. The selection of the type strains for *A. aquatica* sp. nov. and *A. lacus* sp. nov. was random, strains AE235<sup>T</sup> (=CECT 8025<sup>T</sup> =LMG 26712<sup>T</sup>) and AE122<sup>T</sup> (CECT 8024<sup>T</sup> =LMG 26710<sup>T</sup>) being selected, respectively.

### Description of *Aeromonas aquatica* sp. nov.

*Aeromonas aquatica* (*a. qua' ti. ca. Latin fem. adj. "living in water"*)

Cells are motile Gram-negative rods, non-encapsulated and non spore forming, 1.2–1.9 µm long and 0.4–0.7 µm wide with a polar flagella of 9.8–12.7 nm wide. The 2 strains (AE235<sup>T</sup>, HE157) are cytochrome oxidase positive, reduce nitrates to nitrites, are positive for glucose oxidation and fermentation, are resistant to the vibriostatic agent O/129 (150 µg) and grow at 0% NaCl but not at 6% NaCl. No brown diffusible pigment is observed on TSA and both strains are able to grow on Thiosulfate-citrate-bile salts-sucrose agar (TCBS) and on MConkey agar fermenting lactose. Haemolysis on sheep blood agar is positive for the type strain (AE235<sup>T</sup>) but negative for strain HE157. Both strains are positive for MR and dehydrolyse arginine (ADH), produce gas from glucose and indol from tryptohan and have β-galactosidase activity. However, they are negative for lysine decarboxylase (LDC), ornithine decarboxylase (ODC), VP, urocanic acid, they do not use citrate, do not produce sulphhydic acid and do not oxidize gluconate.

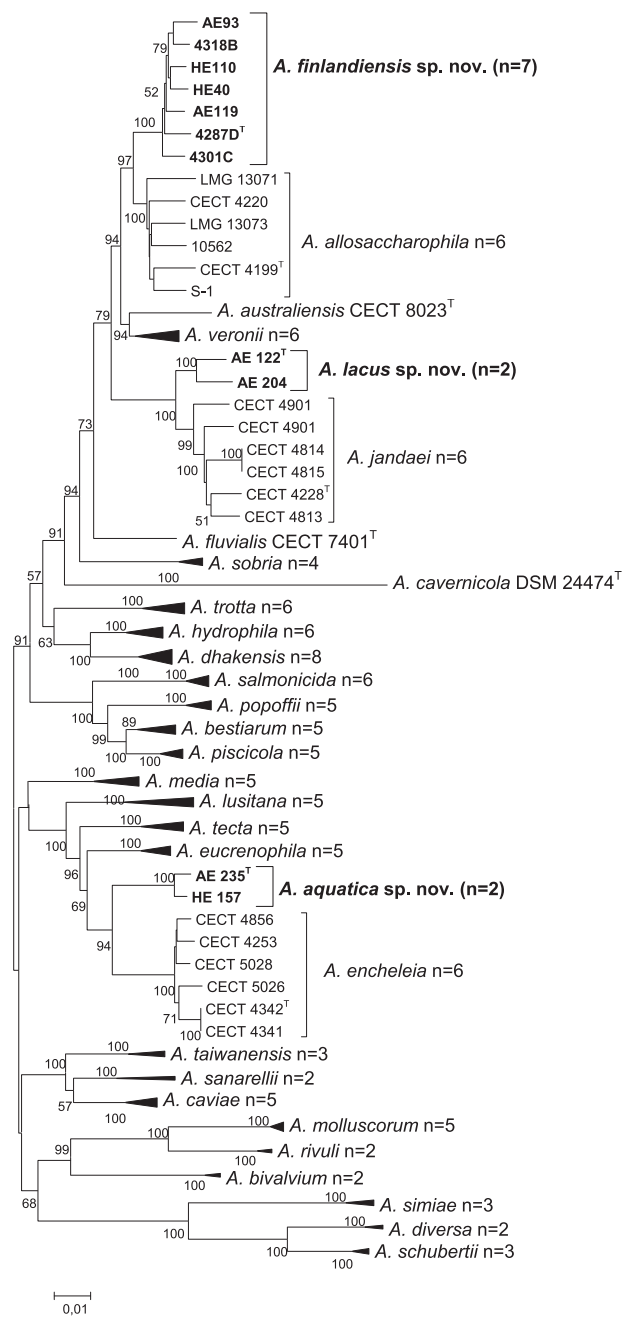
Both strains are able to grow in potassium cyanide (KCN) medium and hydrolyse gelatin, starch, esculine, Tween 80, casein, DNA and egg yolk but not elastase, arbutin or sodium dodecyl

sulfate (SDS). The 2 strains show growth at 15 and 30 °C but not at 4 °C or 45 °C in TSA. Both strains also grow in nutrient agar containing 3% NaCl but not at 4.5% NaCl. Growth is observed at pH 5–9 but not at pH 3 or 4 in TSB. Optimal growth conditions are at 30 °C in TSA and pH 9 in TSB. Acid is produced in nutrient broth from glycerol, cellobiose, D-mannose, D-mannitol, lactose, maltose, trehalose, dextrin, D-galactose, salicine and glucose. Acid production is observed for the following carbohydrates with the API 50CH kit: D-ribose, D-fructose, N-acetylglucosamine, arbutin, starch, glycogen and potassium gluconate. Variable response on the production of acid is observed in methyl-β-D-glucopyranoside and the type strain is positive after 48 h incubation. Acid is not produced in nutrient broth from raffinose, dulcitol, D-saccharose, D-sorbitol, L-proline, DL-lactate, inositol (they also do not use it as a sole carbon source), L-arabinose, rhamnose and glycine. Acid production is not observed for the following carbohydrates with the API 50CH kit: erythritol, D-arabinose, D-xylose, L-xylose, D-adenitol, methyl-β-D-xylopiranoside, L-sorbose, methyl-α-D-mannopyranoside, amygdalin, D-melibiose, inulin, D-melezitose, xylitol, gentiobiose, D-turanose, D-lyxose, D-tagatose, D-fucose, L-fucose, D-arabitol, L-arabitol and 2- and 5-ketogluconate. Production of acid from rhamnose is positive for strain AE235<sup>T</sup> but negative for strain HE 157.

### Habitat description

The two strains belonging to *A. aquatica* sp. nov. were isolated from two lakes (Table S1) and the type strain of the species AE235<sup>T</sup> (=CECT 8025<sup>T</sup> = LMG 26712<sup>T</sup>) was isolated from the medium-sized humic lake Haukkajärvi (municipality Valkeala), which has no





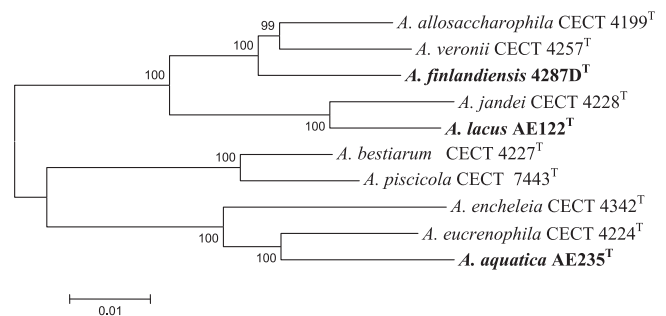
**Fig. 2.** MLSA tree performed from the concatenated sequenced fragments of seven housekeeping genes (*gyrB*, *rpoD*, *recA*, *dnaJ*, *gyrA*, *dnaX* and *atpD*; 4093 bp) showing the relationships of all strains of the 3 new species with all other *Aeromonas* species. Numbers at the node indicate bootstrap values (>50%). Bar, 0.01 estimated substitutions per site.

faecal contamination, and is used as a water source to produce drinking water.

### Description of *Aeromonas finlandiensis* sp. nov.

*Aeromonas finlandiensis* (*fin.lan.di.en'sis*. N.L. fem. Adj. *finlandiensis* of belonging to Finland)

Cells are motile Gram-negative rods, non-encapsulated and non spore forming, 1.7–1.9 μm long and 0.5–0.7 μm wide with a polar flagella of 9.6–16.1 nm wide. The 7 strains show reactions that are typical of the genus, being positive for cytochrome oxidase,



**Fig. 3.** MLSA tree performed from the concatenated sequenced fragments of 15 housekeeping genes (*cpn60*, *dnaK*, *gltA*, *mdh*, *radA*, *rpoB*, *tsf*, *zipA*, *gyrA*, *gyrB*, *rpoD*, *recA*, *dnaJ*, *atpD* and *dnaX*, 8751 bp) showing the relationships of the type strains of the 3 new species and those of their closely related *Aeromonas* species. The species *A. piscicola* and *A. bestiarum* are included as reference of the lowest inter-species separation within the genus [29]. Numbers at the node indicate bootstrap values (>50%). Bar, 0.01 estimated substitutions per site.

reducing nitrates to nitrites, positive for glucose oxidation and fermentation, resistant to the vibriostatic agent O/129 (150 μg) and growing at 0% NaCl but not at 6% NaCl. No brown diffusible pigment is observed on TSA and all strains are able to grow on TCBS and on McConkey agar without fermenting lactose. Haemolysis is observed on sheep blood agar in 6 of the 7 strains. The strains show β-galactosidase activity and are positive for ADH and LDC (except strain HE110 that is LDC negative), the production of gas from glucose, indole from tryptophan and MR. However, they are negative for ODC, VP, urocanic acid, do not oxidize gluconate and do not produce sulphydric acid. All strains are able to grow in KCN medium, use citrate (except strain AE119 that is unable to use citrate) and hydrolyze gelatin, starch, Tween 80, casein, DNA (except strain HE110 that was negative for DNA) and egg yolk (except strain HE40) but not aesculine, elastase, arbutin or SDS (except strains HE40 and HE110 that are positive for SDS). The 7 strains grow at 15 and 30 °C but not at 4 °C or 45 °C in TSA. All of them also grow in nutrient agar containing 3% NaCl but not at 4.5% NaCl. Growth is observed at pH 5–9 but not at pH 3 and 4 in TSB. Optimal growth conditions are at 30 °C in TSA and at pH 8.5–9 in TSB. Acid is produced in nutrient broth from glycerol, cellobiose, D-mannose, maltose, trehalose, dextrin, D-galactose and glucose. Acid production is observed for the following carbohydrates with the API 50CH kit: D-ribose, D-fructose, starch, glycogen and N-acetylglucosamine. Variable response on the production of acid is observed for D-mannitol (only strain HE110 is negative), methyl-β-D-glucopyranoside (only strains AE 93 and HE40 are negative), potassium gluconate (strains 4287D<sup>T</sup>, 4301C and HE40 are negative), L-fucose (strains 4287D<sup>T</sup> and AE93 are positive and can also use it as a sole carbon source), D-melibiose and gentiobiose (only strain HE 110 is positive for both tests). Acid is not produced in nutrient broth from raffinose, dulcitol, D-saccharose, D-sorbitol, lactose, L-proline, salicine, DL-lactate, rhamnose, L-arabinose and glycine. Acid production is not observed for the following carbohydrates with the API 50CH kit: erythritol, D-arabinose, D-xylose, L-xylose, D-adonitol, methyl-β-D-xylopiranoside, L-sorbose, methyl-α-D-mannopyranoside, amygdalin, D-melibiose, inulin, D-melezitose, xylitol, D-turanose, D-lyxose, D-tagatose, D-fucose, D-arabitol, L-arabitol and 2- and 5-ketogluconate.

### Habitat description

The 7 strains belonging to *A. finlandiensis* sp. nov. were isolated from 6 different Finnish lakes and from a river in 7 different

municipalities (Table S1). The type strain of the species is 4287D<sup>T</sup> (=CECT 8028<sup>T</sup>=LMG 26709<sup>T</sup>) and was isolated from the Lake Pyhälampi (municipality Hauho), which showed elevated nitrogen content.

### Description of *Aeromonas lacus* sp. nov.

*Aeromonas lacus* (*la'*cus. *L. gen. n. lacus, of a lake*)

Cells are motile Gram-negative rods, non-encapsulated and non spore forming, 1.3–2.3 μm long and 0.6–0.8 μm wide with a polar flagella of 17.9–20.3 nm wide. Both strains (AE122<sup>T</sup>, AE204) are cytochrome oxidase positive, reduce nitrates to nitrites, are positive for glucose oxidation and fermentation, are resistant to the vibriostatic agent O/129 (150 μg) and grow at 0% NaCl but not at 6% NaCl. No brown diffusible pigment is observed on TSA and both strains are able to grow on TCBS and on McConkey agar without fermenting lactose. Haemolysis on sheep blood agar, LDC and production of indole from tryptohan are variable and the type strain is positive for haemolysis and LDC but negative for indole. Both strains are positive for ADH and VP. However, they are negative for ODC, MR, urocanic acid, do not produce sulphydric acid and do not grow in KCN medium. The two strains produce gas from glucose, are able to use citrate, oxidize gluconate and both have β-galactosidase activity. The strains hydrolyse gelatin, starch, Tween 80, DNA, egg yolk and casein but not esculin, elastase, arbutin or SDS. The 2 strains show growth at 15 and 30 °C but not at 4 °C or 45 °C in TSA. Both strains also grow in nutrient agar containing 3% NaCl but not at 4.5% NaCl. Growth is observed at pH 5–9 but not at pH 3, 4 in TSB. Optimal growth conditions are at 30 °C and pH 7–9. Acid is produced in nutrient broth from glycerol, cellobiose, D-mannose, D-mannitol, maltose, trehalose, dextrin, D-galactose and glucose. Acid production is observed for the following carbohydrates with the API 50CH kit: D-ribose, D-fructose, N-acetylglucosamine, starch and glycogen. Variable response for the production of acid is observed in methyl-β-D-glucopyranoside and D-melibiose, to which the type strain AE122<sup>T</sup> is positive and negative, respectively, as opposed to strain AE 204 after 48 h incubation. Acid is not produced in nutrient broth from raffinose, dulcitol, D-saccharose, D-sorbitol, lactose, L-proline, salicine, DL-lactate, inositol (they also do not use it as a sole carbon source), L-arabinose, rhamnose and glycine. Acid production is not observed for the following carbohydrates with the API 50CH kit: erythritol, D-arabinose, D-xylose, L-xylose, D-adonitol, methyl-β-D-xylopiranoside, L-sorbose, methyl-α-D-mannopyranoside, amygdalin, inulin, D-melezitose, xylitol, gentiobiose, D-turanose, D-lyxose, D-tagatose, D-fucose, L-fucose, D-arabitol, L-arabitol, gentiobiose and 2- and 5-ketogluconate.

### Habitat description

The strains belonging to *A. lacus* sp nov. were recovered from two lakes (Table S1) and the type strain of the species AE122<sup>T</sup> (=CECT 8024<sup>T</sup>=LMG 26710<sup>T</sup>) was isolated from the small humic lake Huutjärvi (municipality Pyhtää), which has elevated nitrogen levels.

### Acknowledgements

The authors thank Catalina Núñez for her technical assistance. This work was supported in part by the projects AGL2011-30461-C02-02 of the Ministerio de Ciencia e Innovación (Spain) and JPIW2013-095-CO3 from the Ministerio de Economía y Competitividad (WATER JPI).

### Appendix A. Supplementary data

Supplementary material related to this article can be found, in the online version, at <http://dx.doi.org/10.1016/j.syapm.2015.02.005>.

### References

- [1] Abbott, S.L., Cheung, W.K., Janda, J.M. (2003) The genus *Aeromonas*: biochemical characteristics, atypical reactions, and phenotypic identification schemes. *J. Clin. Microbiol.* 41, 2348–2357.
- [2] Alperi, A., Figueras, M.J., Inza, I., Martínez-Murcia, A.J. (2008) Analysis of 16S rRNA gene mutations in a subset of *Aeromonas* strains and their impact in species delineation. *Int. Microbiol.* 11, 185–194.
- [3] Alperi, A., Martínez-Murcia, A.J., Ko, W., Monera, A., Saavedra, M.J., Figueras, M.J. (2010) *Aeromonas taiwanensis* sp. nov., and *Aeromonas sanarellii* sp. nov., two new clinical species from Taiwan. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 60, 2048–2055.
- [4] Alperi, A., Martínez-Murcia, A., Monera, A., Saavedra, M.J., Figueras, M.J. (2010) *Aeromonas fluviatilis* sp. nov., isolated from a Spanish river. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 60, 72–77.
- [5] Aravena-Román, M., Beaz-Hidalgo, R., Inglis, T.J., Riley, T.V., Martínez-Murcia, A.J., Chang, B.J., Figueras, M.J. (2013) *Aeromonas australiensis* sp. nov., isolated from irrigation water in Western Australia. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 63, 2270–2276.
- [6] Auch, A.F., von Jan, M., Klenk, H.P., Göker, M. (2010) Digital DNA–DNA hybridization for microbial species delineation by means of genome-to-genome sequence comparison. *Stand. Genomic Sci.* 2, 117–134.
- [7] Beaz-Hidalgo, R., Alperi, A., Figueras, M.J., Romalde, J.L. (2009) *Aeromonas piscicola* sp. nov., isolated from diseased fish. *Syst. Appl. Microbiol.* 32, 471–479.
- [8] Beaz-Hidalgo, R., Hossain, M.H., Liles, M.R., Figueras, M.J. (2015) Strategies to avoid wrongly labeled genomes using as example the detected wrong taxonomic affiliation for *Aeromonas* genomes in the GenBank database. *PLoS ONE* 10, e0115813.
- [9] Beaz-Hidalgo, R., Martínez-Murcia, A.J., 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.
- [10] Berg, K.A., Lyra, C., Sivonen, K., Paulin, L., Suomalainen, S., Tuomi, P., Rapala, J. (2009) High diversity of cultivable heterotrophic bacteria in association with cyanobacterial water blooms. *ISME J.* 3, 314–325.
- [11] Collado, L., Cleenwerck, I., Van Trappen, S., De Vos, P., Figueras, M.J. (2009) *Arcobacter mytili* sp. nov., an indoxyl acetate hydrolysis negative bacterium isolated from mussels. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 59, 1391–1396.
- [12] Colston, S., Fullmer, M., Beka, L., Lamy, B., Gogarten, J.P., Graf, J. (2014) Evaluation of bioinformatic genome comparisons for taxonomic and phylogenetic assignments using *Aeromonas* as a test case. *mBio* 5, e02136.
- [13] Demarta, A., Küpfer, M., Riegel, P., Harf-Monteil, C., Tonolla, M., Peduzzi, R., Monera, A., Saavedra, M.J., Martínez-Murcia, A. (2008) *Aeromonas tecta* sp. nov., isolated from clinical and environmental sources. *Syst. Appl. Microbiol.* 31, 278–286.
- [14] Figueras, M.J. (2005) Clinical relevance of *Aeromonas*. *Rev. Med. Microbiol.* 16, 145–153.
- [15] Figueras, M.J., Alperi, A., Beaz-Hidalgo, R., Stackebrandt, E., Brambilla, E., Monera, A., Martínez-Murcia, A.J. (2011) *Aeromonas rivuli* sp. nov., isolated from the upstream region of a karst water rivulet in Germany. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 61, 242–248.
- [16] Figueras, M.J., Beaz-Hidalgo, R., Collado, L., Martínez-Murcia, A.J. (2011) Point of view on the recommendations for new bacterial species description and their impact on the genus *Aeromonas* and *Arcobacter*. *Bull. Bergey's Int. Soc. Microb. Syst.* 2, 1, 1–16.
- [17] Figueras, M.J., Beaz-Hidalgo, R., Hossain, M.H., Liles, M.R. (2014) Taxonomic affiliation of new genomes should be verified using Average Nucleotide identity and Multilocus Phylogenetic Analysis. *Genome Announc.* 2, e00927.
- [18] Goris, J., Konstantinidis, K.T., Klappenbach, J.A., Coenye, T., Vandamme, P., Tiedje, J.M. (2007) DNA–DNA hybridization values and their relationship to whole-genome sequence similarities. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 57, 81–91.
- [19] Harf-Monteil, C., Flèche, A.L., Riegel, P., Prévost, G., Bermond, D., Grimont, P.A., Monteil, H. (2004) *Aeromonas simiae* sp. nov., isolated from monkey faeces. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 54, 481–485.
- [20] Hossain, M.J., Beaz-Hidalgo, R., Figueras, M.J., Liles, M.R. (2014) Draft genome sequences of two novel *Aeromonas* species recovered in association with cyanobacterial blooms. *Genome Announc.* 2, e01181.
- [21] Hossain, M.J., Waldbier, G.C., Sun, D., Capps, N.K., Hemstreet, W.B., Carlisle, K., Griffin, M.J., Khoo, L., Goodwin, A.E., Sonstegard, T.S., Schroeder, S., Hayden, K., Newton, J.C., Terhune, J.S., Liles, M.R. (2013) Implication of lateral genetic transfer in the emergence of *Aeromonas hydrophila* isolates of epidemic outbreaks in channel catfish. *PLoS ONE* 8, e80943.
- [22] 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.

- [23] Janda, J.M., Abbott, S.L. (2010) The genus *Aeromonas*: taxonomy, pathogenicity, and infection. *Clin. Microbiol. Rev.* 23, 35–73.
- [24] 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.
- [25] Lamy, B., Laurent, F., Verdier, I., Decousser, J.W., Lecaillon, E., Marchandin, H., Roger, F., Tigaud, S., de Montclos, H., Kodjo, A., colBVH Study Group (2010) Accuracy of 6 commercial systems for identifying clinical *Aeromonas* isolates. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 67, 9–14.
- [26] Martin-Carnahan, A., Joseph, S.W., Family, I. (2005) *Aeromonadaceae* Colwell, MacDonell and DeLey 1986, in: Brennan, D.J., Krieg, N.R., Staley, J.T., Garrity, G.N. (Eds.), *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, vol. 2, second ed., Springer-Verlag, New York, NY, pp. 556–578.
- [27] Martínez-Murcia, A., Beaz-Hidalgo, R., Saavedra, M.J., Figueras, M.J., Sedlacek, I. (2013) *Aeromonas cavernicola* sp. nov., isolated from fresh water of a brook in a cavern. *Curr. Microbiol.* 66, 197–204.
- [28] Martínez-Murcia, A.J., Benlloch, S., Collins, M.D. (1992) Phylogenetic interrelationships of members of the genera *Aeromonas* and *Plesiomonas* determined by 16S ribosomal DNA sequencing: lack of congruence with results of DNA-DNA hybridizations. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 42, 412–421.
- [29] Martínez-Murcia, A., Morena, A., Saavedra, M.J., Ocina, R., López-Álvarez, M., Lara, E., Figueras, M.J. (2011) Multilocus phylogenetic analysis of the genus *Aeromonas*. *Syst. Appl. Microbiol.* 34, 189–199.
- [30] 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. *Int. J. Syst. Evolution. Microbiol.* 58, 1169–1175.
- [31] Meier-Kotloff, J.P., Auch, A.F., Klenk, H.P., Göker, M. (2013) Genome sequence-based species delimitation with confidence intervals and improved distance functions. *BMC Bioinformatics* 14, 60.
- [32] Miñana-Galbis, D., Farfan, M., Loren, 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.
- [33] Miñana-Galbis, D., Farfán, M., Fusté, M.C., Lorén, J.G. (2004) *Aeromonas molluscorum* sp. nov., isolated from bivalve molluscs. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 54, 2073–2078.
- [34] Miñana-Galbis, D., Farfán, M., Fusté, M.C., Lorén, J.G. (2007) *Aeromonas bivalvium* sp. nov., isolated from bivalve molluscs. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 57, 582–587.
- [35] 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*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 57, 1232–1237.
- [36] Richter, D., Postic, D., Sertour, N., Livey, I., Matuschka, F.R., Baranton, G. (2006) Delineation of *Borrelia burgdorferi sensu lato* species by multilocus sequence analysis and confirmation of the delineation of *Borrelia spielmanii* sp. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 56, 873–881.
- [37] Richter, M., Rosselló-Mora, R. (2009) Shifting the genomic gold standard for the prokaryotic species definition. *PNAS* 106, 19126–19131.
- [38] Roger, F., Marchandin, H., Jumas-Bilak, E., Kodjo, A., Bvh, C., Lamy, B. (2012) Multilocus genetics to reconstruct aeromonad evolution. *BMC Microbiol.* 12, 62.
- [39] Saavedra, M.J., Figueras, M.J., Martínez-Murcia, A.J. (2006) Updated phylogeny of the genus *Aeromonas*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 56, 2481–2487.
- [40] 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. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 54, 1511–1519.
- [41] 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 reevaluation of the species definition in bacteriology. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 52, 1043–1047.
- [42] 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.

#### 4.4.2. Caracterización de 4 nuevas especies de *Aeromonas*

Tal y como se ha comentado previamente en algunos de los estudios realizados en estas tesis (4.2.3, 4.3.6 y 4.4.1) algunas cepas no pudieron ser identificadas a nivel de especie mediante secuenciación del gen *rpoD*, ya que no se agruparon con las cepas tipo de ninguna de las 30 especies conocidas del género *Aeromonas*, representando cuatro potenciales nuevas líneas filogenéticas. Estas correspondieron en concreto a:

*Aeromonas* sp. nov. 1, representada sólo por la cepa 1178C<sup>T</sup>, aislada de heces de un paciente varón de 45 años de edad (estudio 4.3.6), que presentó un cuadro diarreico de dos meses de duración sin nauseas, vómitos o fiebre, tras un tratamiento para una candidiasis urogenital con fluconazol (150 mg) y un probiótico (Kaleidon, formado por *Lactobacillus rhamnosus*). En el análisis de las heces no se detectaron ni virus ni parásitos aislándose como único microorganismo *A. hydrophila* identificada mediante el sistema MicroScan W/A en el Hospital Universitario Sant Joan de Reus.

*Aeromonas* sp. nov. 2, también con una única cepa, 113634<sup>T</sup>, recuperada de las heces de una paciente de 32 años de edad (estudio 4.3.6), que consultó a su médico por un cuadro de dolor abdominal de varios días de evolución. No presentó nauseas, vómito, diarrea o fiebre. En el análisis de las heces no se detectaron ni virus ni parásitos aislándose como único microorganismo *A. sobria* identificada mediante el sistema Vitek II, en el Hospital Universitario de Guadalajara (España).

*Aeromonas* sp. nov. 3, representada por cuatro cepas recuperadas de diferentes moluscos bivalvos procedentes del estudio 4.2.3. Dos cepas, AOSE3-14A<sup>T</sup> y SOSE5-14A, fueron aisladas de ostrones, mientras que AALE1-13D y AMJE2-14D fueron recuperadas de almeja y mejillón respectivamente. Estos moluscos fueron cultivados en el Delta del río Ebro y expuestos durante 48h a agua del Canal del Poble Nou, cuyas aguas están contaminadas con las aguas residuales generadas por la población del municipio del Poble Nou.

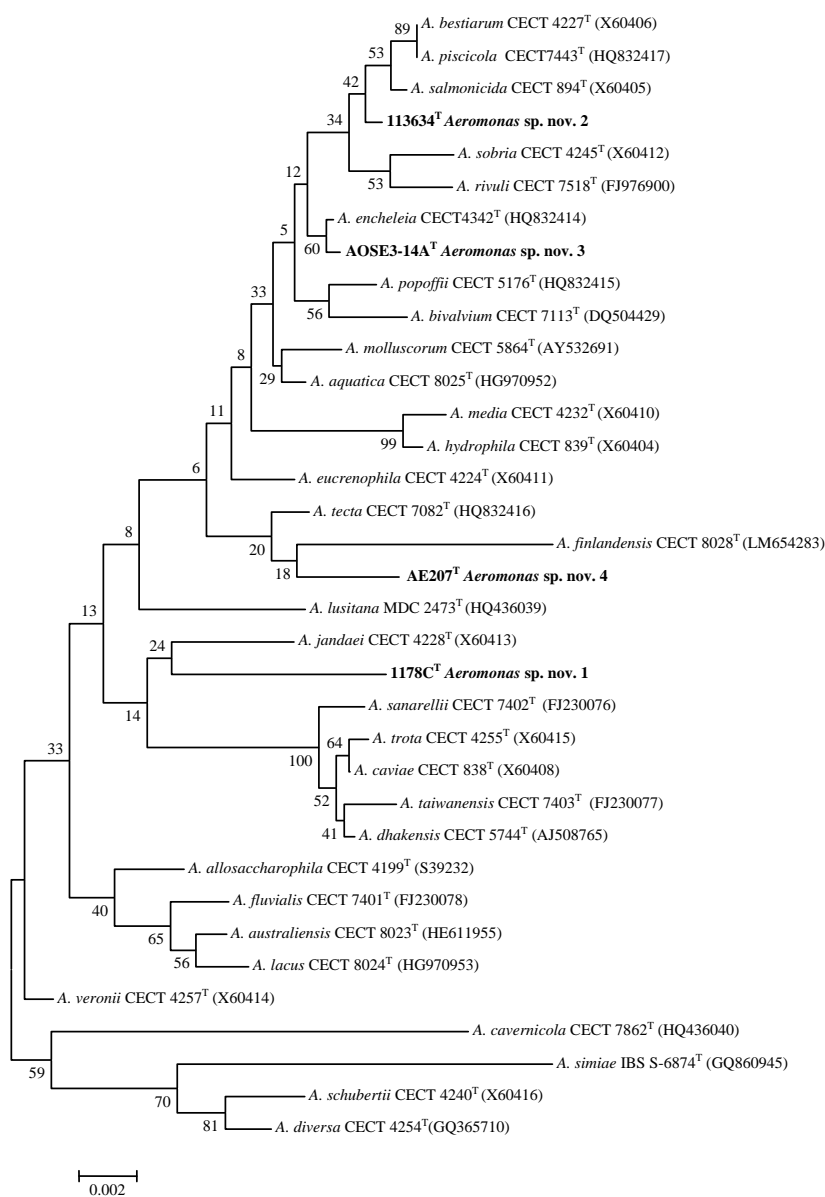
*Aeromonas* sp. nov. 4 representada sólo por una cepa, AE 207<sup>T</sup>, obtenida en el estudio realizado en colaboración con la Universidad de Helsinki (Finlandia), en el que se re-identificaron en nuestro laboratorio 116 aislados recuperados de agua de ríos y lagos que experimentaron episodios de afloramientos de cianobacterias. En esta re-identificación se descubrieron 3 nuevas especies, *Aeromonas aquatica* sp. nov., *Aeromonas finlandiensis* sp. nov. y *Aeromonas lacus* sp. nov., ya descritas en una



publicación reciente (estudio 4.4.1) y posteriormente se descubrió la cepa AE 207<sup>T</sup> que se estudia en este apartado.

Al analizar la secuencias obtenidas del gen ARNr 16S (1393 pb) de las cepas tipo de estas 4 potenciales nuevas especies se observó (Figura 1) que forman ramas independientes del resto de especies incluidas en el género *Aeromonas* tal y como se había observado previamente con el gen *rpoD*.

**Figura 1.** Árbol filogenético derivado de las secuencias del gen ARNr 16S (1393 pb) que muestra la relación entre las cepas tipo de las 4 nuevas especies con las otras cepas tipo de todas las especies de *Aeromonas*. Los números en los nodos indican los valores de bootstrap (1000 replicas). La escala indica 0,02 sustituciones nucleotídicas por posición.



Los porcentajes de similitud inter-especie de las secuencias del gen ARNr 16S de las cepas tipo de cada una de las 4 especies nuevas con las especies más relacionadas se ilustran en la Tabla 1. Como se observa en esta, los valores de similitud inter-especie, variaron entre 98,62% y el 99,93%. Por otro lado, sólo *Aeromonas* sp. nov. 3, engloba a más de una cepa y su porcentaje de variabilidad intra-especie varió entre 99,27-99,63%.

**Tabla 1. Porcentaje de similitud del gen ARNr 16S de las 4 nuevas especies de *Aeromonas* con las especies más cercanas dentro del género.**

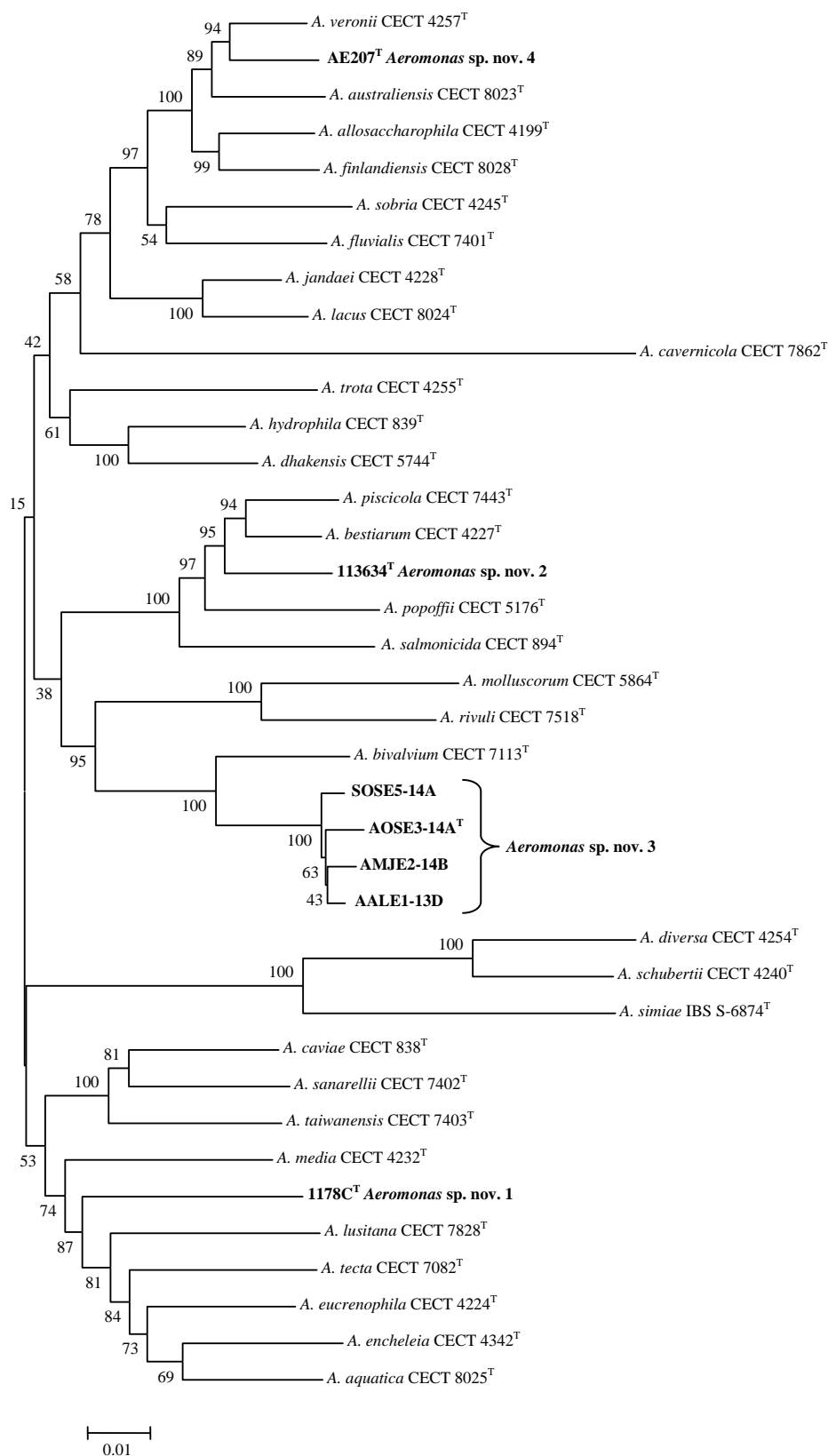
<i>Aeromonas</i> spp.	Porcentaje de similitud del gen ARNr 16S			
	<i>Aeromonas</i> sp. nov. 1 (1178C <sup>T</sup> , n= 1)	<i>Aeromonas</i> sp. nov. 2 (113634 <sup>T</sup> , n= 1)	<i>Aeromonas</i> sp. nov. 3 (AOSE3-14A <sup>T</sup> , n= 4)	<i>Aeromonas</i> sp. nov. 4 (AE 207 <sup>T</sup> , n= 1)
<i>A. dhakensis</i> CECT 5744 <sup>T</sup>	<b>98,63</b>			
<i>A. hydrophila</i> CECT 839 <sup>T</sup>	98,56			
<i>A. taiwanensis</i> CECT 7403 <sup>T</sup>	98,56			
<i>A. caviae</i> CECT 838 <sup>T</sup>	<b>98,63</b>			
<i>A. media</i> CECT 4232 <sup>T</sup>	98,56			
<i>A. veronii</i> CECT 4257 <sup>T</sup>	<b>98,70</b>			<b>99,28</b>
<i>A. jandaei</i> CECT 4228 <sup>T</sup>	<b>98,85</b>			98,78
<i>A. aquatica</i> CECT 8025 <sup>T</sup>		99,49	99,20 - 99,64	98,92
<i>A. salmonicida</i> CECT 894 <sup>T</sup>		<b>99,86</b>	98,98 - 99,57	98,70
<i>A. bestiarum</i> CECT 4227 <sup>T</sup>		<b>99,71</b>	98,98 - 99,56	
<i>A. piscicola</i> CECT 7443 <sup>T</sup>		<b>99,71</b>	98,98 - 99,56	
<i>A. encheleia</i> CECT 4342 <sup>T</sup>		<b>99,78</b>	<b>99,34 - 99,93</b>	
<i>A. rivuli</i> CECT 7518 <sup>T</sup>		99,50	<b>98,62 - 99,71</b>	
<i>A. sobria</i> CECT 4245 <sup>T</sup>			<b>98,69 - 99,81</b>	
<i>A. popofii</i> CECT 5176 <sup>T</sup>			98,98 - 99,49	
<i>A. bivalvium</i> CECT 7113 <sup>T</sup>			98,76 - 99,57	
<i>A. eucrenophila</i> CECT 4224 <sup>T</sup>			98,91 - 99,49	<b>99,21</b>
<i>A. tecta</i> CECT 7082 <sup>T</sup>			98,76 - 99,35	<b>99,50</b>
<i>A. molluscorum</i> CECT 5864 <sup>T</sup>			99,05 - 99,49	98,78
<i>A. australiensis</i> CECT 8023 <sup>T</sup>				98,85
<i>A. finlandensis</i> CECT 8028 <sup>T</sup>				98,77
<i>A. fluvialis</i> CECT 7401 <sup>T</sup>				98,92
<i>A. lacus</i> CECT 8024 <sup>T</sup>				98,92

En negrita aparecen los mayores porcentajes de similitud.

En el árbol filogenético (Figura 2) construido con las secuencias concatenadas de los siete genes *housekeeping* (*rpoD*, *gyrB*, *gyrA*, *recA*, *dnaJ*, *dnaX* y *atpD*, 4108 pb), se observa que las 4 cepas tipo formaban también grupos independientes, bien soportados, con valores bootstrap superiores al 70%.

La cepa tipo de *A. lusitana* MDC 2473<sup>T</sup> (CECT 7828<sup>T</sup>), que aún no ha sido descrita, fue incluida en los análisis filogenéticos para demostrar que ninguna de las cuatro nuevas líneas filogenéticas corresponden a esta especie.

**Figura 2.** Árbol filogenético basado en las secuencias concatenadas de 7 genes *housekeeping* (*rpoD*, *gyrB*, *gyrA*, *recA*, *dnaX*, *dnaJ* y *atpD*, 4108 pb) mostrando la relación de todas las cepas de las 4 nuevas especies con las otras especies de *Aeromonas*. Los números en los nodos indican los valores de bootstrap (1000 replicas). La escala indica 0,01 sustituciones nucleotídicas por posición.



Se obtuvieron los genomas de las cepas seleccionadas como cepas tipo de las 4 nuevas especies (no se dispone todavía de los números de acceso al GenBank) y se compararon, utilizando el ANI y el DDH<sub>is</sub> (Tabla 2) con los genomas de las cepas tipo de las especies estrechamente relacionadas considerando las posiciones en los árboles filogenéticos construidos con el gen ARNr 16S y el MLPA (Figuras 1 y 2). Como se muestra en la Tabla 2, en todos los casos, para el ANI los valores fueron < 96% y para la DDH<sub>is</sub> < 70%.

**Tabla 2. Resultados de la comparación de los genomas de las cepas tipo de las 4 nuevas especies respecto de las especies estrechamente relacionadas en base al ANI (obtenido mediante 3 herramientas informáticas: ANI calculator, EzGenome y JSpecies) y al DDH<sub>is</sub>**

Especies	ANI calculator (ANIb)	EzGenome (ANIb)	JSpecies (ANIb)	JSpecies (ANIm)	DDH <sub>is</sub>
<b><i>Aeromonas</i> sp. nov. 1 (1178C<sup>T</sup>)</b>					
1178C vs <i>A. encheleia</i> CECT 4342 <sup>T</sup>	86,41	86,12	86,08	89,23	31,0
1178C vs <i>A. jandaei</i> CECT 4228 <sup>T</sup>	83,79	82,13	82,51	87,84	26,1
1178C vs <i>A. tecta</i> CECT 7082 <sup>T</sup>	86,50	86,37	86,59	89,38	31,5
1178C vs <i>A. media</i> CECT 4232 <sup>T</sup>	86,18	85,78	nd	nd	30,7
1178C vs <i>A. aquatica</i> CECT 8025 <sup>T</sup>	<b>86,68</b>	<b>86,42</b>	<b>86,92</b>	<b>89,43</b>	<b>31,8</b>
<b><i>Aeromonas</i> sp. nov. 2 (113634<sup>T</sup>)</b>					
113634 vs <i>A. bestiarum</i> CECT 4227 <sup>T</sup>	<b>93,19</b>	<b>93,14</b>	<b>94,12</b>	<b>94,12</b>	<b>52,0</b>
113634 vs <i>A. piscicola</i> CECT 7443 <sup>T</sup>	92,47	92,13	92,43	92,43	48,6
113634 vs <i>A. popoffii</i> CECT 5176 <sup>T</sup>	90,80	90,66	92,24	92,24	42,6
113634 vs <i>A. salmonicida</i> CECT 894 <sup>T</sup>	88,73	88,73	nd	nd	37,1
<b><i>Aeromonas</i> sp. nov. 3 (AOSE3-14A<sup>T</sup>)</b>					
AOSE3-14A vs <i>A. bivalvium</i> CECT 7113 <sup>T</sup>	<b>93,87</b>	<b>93,77</b>	<b>93,98</b>	<b>94,48</b>	<b>54,2</b>
AOSE3-14A vs <i>A. encheleia</i> CECT 4342 <sup>T</sup>	84,90	83,53	83,72	88,59	27,3
AOSE3-14A vs <i>A. molluscorum</i> CECT 5864 <sup>T</sup>	85,27	84,86	85,25	88,58	29,2
AOSE3-14A vs <i>A. rivuli</i> CECT 7518 <sup>T</sup>	85,81	85,35	85,65	88,88	29,7
<b><i>Aeromonas</i> sp. nov. 4 (AE 207<sup>T</sup>)</b>					
AE 207 vs <i>A. allosaccharophila</i> CECT 4199 <sup>T</sup>	93,07	92,97	93,92	94,0	21,4
AE 207 vs <i>A. australiensis</i> CECT 8023 <sup>T</sup>	91,72	91,63	91,85	92,99	45,9
AE 207 vs <i>A. eurenophila</i> CECT 4224 <sup>T</sup>	84,16	82,76	83,37	88,01	26,9
AE 207 vs <i>A. tecta</i> CECT 7082 <sup>T</sup>	83,99	82,51	82,84	87,91	26,9
AE 207 vs <i>A. veronii</i> CECT 4257 <sup>T</sup>	<b>94,58</b>	<b>94,07</b>	<b>94,16</b>	<b>95,18</b>	<b>58,1</b>
AE 207 vs <i>A. finlandensis</i> CECT 8028 <sup>T</sup>	91,76	91,49	91,92	93,05	46,1

En negrita se destacan las especies más cercana en base a los valores de ANI y DDH<sub>is</sub>. nd: no disponible.

Los resultados de la caracterización fenotípica de estas especies mediante pruebas bioquímicas se muestran en la Tabla 3, donde se puede observar la diferenciación de todas ellas de las especies ya descritas dentro del género *Aeromonas*. En este sentido la cepa clínica 1178C<sup>T</sup> (*Aeromonas* sp. nov. 1) se diferencia del resto de especies por la producción de ácido a partir de la sacarosa, lactosa y arabinosa, LDC y DL-lactato,

mientras que la hidrólisis de las elastina y la producción de ácido de sacarosa y salicina son las características diferenciales para la cepa clínica 113634<sup>T</sup> (*Aeromonas* sp. nov. 2). Así mismo la cepa AOSE3-14A<sup>T</sup> (*Aeromonas* sp. nov. 3) procedente de moluscos bivalvos se caracteriza por su respuesta a la LDC, DL-lactato y producción de ácido de arabinosa. Finalmente, la cepa AE 207<sup>T</sup> (*Aeromonas* sp. nov. 4), presenta como pruebas diferenciales su resistencia al agente vibriostático O/129 y la producción de ácido a partir del manitol, tal como se observa en la Tabla 3.

## Discusión

Las cepas 1178C<sup>T</sup> y 113634<sup>T</sup>, ambas de origen clínico, fueron inicialmente identificadas con los sistemas comerciales semiautomatizados (MicroScan W/A y Vitek II respectivamente). En ambos casos, la identificación obtenida con estos sistemas fue errónea ya que encubrieron estas nuevas especies bajo especies conocidas como *A. hydrophila* y *A. sobria* respectivamente. Estos resultados son congruentes con los publicados previamente por otros autores (Lamy y cols., 2010; Soler y cols., 2003b; Figueras, 2005; Figueras y Beaz-Hidalgo, 2015) quienes alertaron sobre la baja fiabilidad de estos sistemas, porque tienden a confundir la mayoría de los aislados como *A. hydrophila*, tal como se demostró también en el estudio 4.3.6. En relación al origen de estas cepas, nueve de las 30 especies descritas en el género *Aeromonas* han sido aisladas a partir de muestras clínicas y de estas, sólo cuatro, *A. jandaei*, *A. trota*, *A. tecta* y *A. dhakensis*, de heces (Carnahan y cols., 1991; Demarta y cols., 2008; Beaz-Hidalgo y cols., 2013).

En cuanto a la especie *Aeromonas* sp. nov. 4 representada por la cepa AE 207<sup>T</sup>, esta fue inicialmente identificada como *A. veronii* en la Universidad de Helsinki mediante secuenciación parcial del gen ARNr 16S (468 pb) en base a la similitud de la secuencia obtenida con el Ribosomal Database Project (RDP). Como ya indicamos en la introducción del gen ARNr 16S no es útil para la diferenciación de algunas de las especies del género *Aeromonas* (Martínez-Murcia y cols., 1992a; Figueras y cols., 2011b). Los altos valores de similitud inter-especie observados para el gen ARNr 16S, 98,62% y 99,63% para las 4 especies están dentro del rango descrito para el género *Aeromonas* (Martínez-Murcia y cols., 1992a; Figueras y cols., 2011b).

**Table 3. Características bioquímicas diferenciales de las 4 nuevas especies de *Aeromonas* de las otras especies del género.**

Prueba bioquímica	A	B	C	D	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
LDC	(+)	(+)	(-)	(+)	+(+)	V(+)	V(+)	(-)	(-)	(-)	+(+)	+(+)	+(+)	+(+)	V(+)*	+(+)	(-)	+(+)
Utilización de																		
DL-lactato	(-)	(+)	+(+)	(-)	V(+)	(-)	(-)	+(+)	V(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	V(+)	+(+)	(-)	(-)
Ácido de:																		
Salicina	(-)	(+)	(-)	(+)	V(-)	V(+)	V(-)	V(+)	V(+)	V(-)	(-)	(-)	(-)	+(+)	(-)	(-)	(-)	(-)
D-sacarosa	(-)	(-)	+(+)	(+)	+(+)	+(+)	+(+)	+(+)	+(+)	V(+)	+(+)	+(+)	(-)	+(+)	(-)	V(-)	V(+)	+(+)
Lactosa	(+)	(-)	(-)	(-)	V(-)	(-)	+(+)	V(-)	V(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	V(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
L-arabinosa	(-)	(+)	+(+)	(-)	V(+)	+(+)	+(+)	+(+)	+(+)	V(+)	V(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	V(+)
D-manitol	(+)	(+)	+(+)	(-)	+(+)	+(+)	+(+)	+(+)	+(+)	+(+)	+(+)	+(+)	+(+)	+(+)	(-)	V(+)	+(+)	+(+)
Hidrólisis de																		
Elastina	(-)	(+)	(-)	(-)	V(+)	(+)	V(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
O/129 R	(+)	(+)	+(+)	(-)	+(+)	+(+)	+(+)	+(+)	+(+)	+(+)	+(+)	+(+)	+(+)	+(+)	+(+)	+(+)	+(+)	+(+)

Prueba bioquímica	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31
LDC	(-)	+(+)	(-)	+(+)	+(+)	V(+)	(-)	+(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	(-)	(-)	V(+)	(-)
Utilización de																	
DL-lactato	V(+)	nd(+)*	V(-)	+(+)	(-)	(-)	nd(-)	(-)	nd(+)	nd(+)	(-)	nd(-)	(+)*	(-)	(-)	(-)	(-)
Ácido de:																	
Salicina	(-)	(-)	nd(+)	+(+)	+(+)	V(-)	+(+)	+(+)	+(+)	+(+)	+(+)	(-)	(-)	(-)	+(+)	(-)	(-)
D-sacarosa	(-)	+(+)	+(+)	+(+)	+(+)	(-)	+(+)	+(+)	+(+)	+(+)	+(+)	(-)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)
Lactosa	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	+(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	(-)	(-)
L-Arabinosa	V(+)	(-)	+(+)	+(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	+(+)	+(+)	(-)	(-)	(-)	(+)	(-)	(-)	(-)
D-manitol	+(+)	(-)	+(+)	+(+)	+(+)	+(+)	nd(+)	+(+)	+(+)	+(+)	+(+)	(-)	(+)	(+)	+(+)	+(+)	+(+)
Hidrólisis de																	
Elastina	(-)	nd(-)	(-)	(-)	nd(+)	nd(-)	(-)	+(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
O/129 R	+(+)	+(+)	+(+)	+(+)	+(+)	+(+)	+(+)	+(+)	+(+)	+(+)	+(+)	+(+)	(-)	(-)	(+)	+(+)	+(+)

Especies: A, *Aeromonas* sp. nov. 1 (1178C<sup>T</sup>); B, *Aeromonas* sp. nov. 2 (113634<sup>T</sup>); C, *Aeromonas* sp. nov. 3 (AOSE3-14A<sup>T</sup>, n=4); *Aeromonas* sp. nov. 4 (AE 207<sup>T</sup>); 1, *A. hydrophila* (n=25); 2, *A. bestiarum* (n=16); 3, *A. salmonicida* (n=13); 4, *A. caviae* (n=25); 5, *A. media* (n=11); 6, *A. eucrenophila* (n=9); 7, *A. sobria* (n=2); 8, *A. veronii* biovar *sobria* (n=25); 9, *A. jandaei* (n=15); 10, *A. veronii* biovar *veronii* (n=10); 11, *A. schubertii* (n=12); 12, *A. trolita* (n=16); 13, *A. encheleia* (n=4); 14, *A. allosaccharophila* (n=3); 15, *A. popoffii* (n=7); 16, *A. simiae* (n=1); 17, *A. molluscorum* (n=5) [incubadas a 25°C]; 18, *A. bivalvium* (n=2) [incubadas a 25-30°C]; 19, *A. dhakensis* (n=13); 20, *A. tecta* (n=5); 21, *A. fluvialis* (n=1); 22, *A. piscicola* (n=5); incubadas a 25°C]; 23, *A. taiwanensis* (n=1); 24, *A. sanarellii* (n=1); 25, *A. rivuli* (n=2) ; 26, *A. diversa* (n=2); 27, *A. australiensis* (n=1), incubadas a 35°C]; 28, *A. cavernicola* (n=1); 29, *A. aquatica* (n= 2); 30, *A. finlandiensis* (n= 7); 31, *A. lacus* (n= 1). Todas las pruebas fueron realizadas a 30°C (con la excepción de para *A. salmonicida* que fueron realizadas a temperatura ambiente). Los datos del 1 al 15 fueron obtenidos de: Abbott y cols., 2003 (que incubaron todas las pruebas a 35°C, excepto para *A. popoffii* y *A. sobria*, que fueron incubadas a 25°C); 16: Harf-Monteil y cols., 2007; 17, 18: Miñana-Galbis y cols., 2004, 2007; 19: Martínez-Murcia y cols., 2008; 20: Demarta y cols., 2008; 21: Alperi y cols., 2010b; 22: Beaz-Hidalgo y cols., 2009; 23, 24: Alperi y cols., 2010a; 25: Figueras y cols., 2011a; 26: Miñana-Galbis y cols., 2010; 27: Aravena-Román y cols., 2013; 28: Martínez-Murcia y cols., 2013; 29, 30,31: Beaz-Hidalgo y cols., 2015b. \*Reacción positiva a 30°C pero no a 35°C. Abreviaciones: +, 85-100% de cepas positivas; -, 0-15% de las cepas son positivas; V, 16-84% de las cepas son positivas. Los resultados correspondientes a las cepas tipo aparecen entre paréntesis. LDC: lisina descarboxilasa; R: resistente; nd: no disponible.

La diferencia observada entre las topologías correspondientes a la filogenia del gen ARNr 16S y la del MLPA, puede explicarse con los bajos valores de bootstrap obtenidos con el gen ARNr 16S. Como se observa en la Figura 1, en base al gen ARNr 16S, la especie genéticamente más cercana a la cepa 1178C<sup>T</sup> es *A. jandaei*. Llama nuestra atención, que en la rama en la que queda ubicada esta cepa, lo hacen también especies aisladas principalmente en clínica. Por el contrario, la cepa 113634<sup>T</sup>, se agrupa con *A. salmonicida*, *A. bestiarum* y *A. piscicola*, todas estas de mayor relevancia en animales y en el ambiente, pero puntualmente asociadas a muestras clínicas. En el caso de la cepa AOSE3-14A<sup>T</sup>, esta se agrupa con la especie *A. encheleia* y la cepa AE 207<sup>T</sup> con la especie *A. finlandiensis*.

En base al MLPA, pudimos establecer que las especies más relacionadas con la nueva especie clínica *Aeromonas* sp. nov. 1 (cepa 1178C<sup>T</sup>) fueron *A. media*, *A. tecta* y “*A. lusitana*”. En realidad tanto *A. media* como *A. tecta* se han aisladas previamente de heces humanas (Figueras y Beaz-Hidalgo, 2015). En el caso de la cepa 113634<sup>T</sup>, las especies más cercanas fueron coincidentes a las comentadas como mas cercanas en base al gen ARNr 16S *A. bestiarum*, *A. salmonicida* y *A. popofiii*. Mientras que para las cepas aisladas de bivalvos moluscos, representadas por la cepa AOSE3-14A<sup>T</sup>, la especie más cercana fue *A. bivalvium* aislada de berberechos (*Cardium* sp.) y navajas (*Ensis* sp.) también en Cataluña (España) por Miñana-Galbis y cols. (2007), encontrándose en el mismo clado otra especie aislada por estos mismos autores (Miñana-Galbis y cols., 2004) también de moluscos bivalvos (*A. molluscorum*). Finalmente, las especies más cercanas a la cepa AE 207<sup>T</sup> fueron *A. veronii* frecuentemente asociada a muestras clínicas (Figueras y Beaz-Hidalgo, 2015) y *A. australiensis* (Aravena-Román y cols., 2013) aislada también de agua pero en este caso de un efluente de agua tratada utilizada para de riego.

Al comparar lo genomas de las especies tipo de las 4 nuevas especies las especies más cercanas en base al mayor porcentaje de ANI lo fueron también para los valores del DDH<sub>is</sub> y en todos los casos los valores fueron < 96% y < 70%, respectivamente. Estos datos ratifican que son 4 nuevas especies en base a los puntos de cohorte establecidos para el género *Aeromonas* para el ANI (< 96%) y valores del DDH<sub>is</sub> (< 70%) obtenidos por otros autores (Coslton y cols., 2014; Beaz-Hidalgo y cols., 2015a). Los estudios 4.4.1 y 4.4.2 son los primeros que utilizan la comparación de genomas basadas en el ANI y el DDH<sub>is</sub> para la definición de nuevas especies en el



género *Aeromonas* y corroboran su fiabilidad y su correlación con los resultados obtenidos mediante el MLPA. De acuerdo con el comité de sistemática de procariotas para la definición de una nueva especie es imprescindible que esta se diferencie por lo menos en una características fenotípica del resto de especies del género (Stackebrandt y cols., 2002; Figueras y cols., 2011b). Las 4 nuevas especies pueden diferenciarse por más de una característica fenotípica de sus especies más cercanas (Tabla 3). La utilidad de la D-sacarosa está basada en el hecho de que 21 de las 31 *Aeromonas* spp. producen ácido de este sustrato y tanto la cepa 1178C<sup>T</sup> como la cepa 113634<sup>T</sup> dieron negativa esta reacción, mientras que 24 *Aeromonas* spp., no producen ácido a partir de la lactosa y la cepa 1178C<sup>T</sup> si lo hace. Por otro lado, sólo 6 especies hidrolizan la elastina al igual que la cepa 113634<sup>T</sup>. Es interesante destacar que la nueva especie *Aeromonas* sp. nov. 4 (AE 207<sup>T</sup>), es la tercera especie del género, después de *A. cavernicola* y *A. australiensis*, que es sensible al factor vibriostático O/129, ya que hasta el año 2013 la resistencia a dicho factor era una característica distintiva del género. Además, esta misma especie correspondería a la quinta especie manitol negativo, después de *A. schubertii*, *A. simiae*, *A. diversa* y *A. australiensis* (Hichman-Brenner y cols., 1988, Harf-Monteil y cols., 2004, Miñana-Galbis y cols., 2010; Martínez-Murcia y cols., 2013, Aravena-Román y cols., 2013).

### **Descripción de las especies:**

Como todas las especies del género, estas 4 nuevas especies cepas corresponden a bacilos Gram negativo con disposición irregular. En este momento, está pendiente asignarles un nombre a cada una de las especies y la realización de su análisis mediante la microscopía electrónica, necesaria para la determinación precisa del tamaño celular, así como de la visualización del flagelo. A continuación se describen las características fisiológicas y bioquímicas de cada nueva especie.

#### ***Aeromonas* sp. nov. 1 (1178C<sup>T</sup>)**

Como era de esperar, esta cepa fue citocromo oxidasa y catalasa positivo, redujo los nitratos a nitritos, fue positiva para la oxidación y fermentación de la glucosa, creció a 0% de NaCl, pero no ha 6% de NaCl, y fue resistente al agente vibriostático O/129. En TSA creció a 15°C, 30°C y 45°C, pero no ha 4°C, además creció a pH 5; 6; 7;7,5; 8 y 8,5, pero no a pH igual o menor a 4. En agar nutritivo con NaCl, crece a concentraciones de 0%, 3% y 4,5%. No produce pigmento, ni hemólisis en agar sangre. Crece en agar TCBS

y agar MacConkey en donde fermenta la lactosa. Produce indol de triptófano, gas de glucosa y es VP positivo, pero es RM negativo y no produce H<sub>2</sub>S. Es capaz de hidrolizar la gelatina, DNA, esculina, almidón, tween 80, caseína y yema de huevo, pero no la elastina, urea y SDS. Da reacción positiva para la LDC y ADH, ácido urocánico, pero no para la ODC, citrato y DL-lactato. En caldo nutritivo produce ácido de celobiosa, lactosa, D-manitol, N-acetil glucosamina, manosa, glicerol, glucosa, dextrina, galactosa y trehalosa, pero no de sacarosa, L-arabinosa, rafinosa, L-ramnosa, mio-inositol, inositol, D-sorbitol y salicina (esta reacción fue positiva con API 50CH). Cuando el sistema API 50CH fue utilizado, producción de ácido fue observada para glicerol, D-ribosa, D-galactosa, D-glucosa, D-fructosa, D-manosa, D-manitol, N-acetil-glucosamina, arbutina, esculina, salicina, D-celobiosa, D-maltosa, D-lactosa, D-trehalosa, almidón, glicógeno, gentibiosa y gluconato potásico, pero no con eritritol, D-arabinosa, L-arabinosa, D-xilosa, L-xilosa, D-adonitol, metil-βD-xilopiranosida, L-sorbosa, L-ramnosa, dulcitol, inositol, sorbitol, metil-αD-manopiranosida, metil-αD-glucopiranosida, amigdalina, D-melobiosa, D-sacarosa, inulina, D-melezitosa, D-rafinosa, xilitol, D-turanosa, D-lixosa, D-tagatosa, D-fucosa, L-fucosa, D-arabitol, L-arabitol, 2-ceto-gluconato potásico y 5-ceto-gluconato potásico.

Hábitat: heces humanas.

### ***Aeromonas* sp. nov. 2 (113634<sup>T</sup>)**

La cepa fue citocromo oxidasa y catalasa positivo, redujo los nitratos a nitritos, fue positiva para la oxidación y fermentación de la glucosa, creció a 0% pero no ha 6% de NaCl, y fue resistente al agente vibriostático O/129. En TSA creció a 15 °C y 30°C, pero no a 4°C y 45°C. También creció a pH 5; 6; 7; 7,5; 8; 8,5 y 9, pero no ha pH 3 y 4. En medio nutritivo con NaCl, sólo creció a concentraciones de 0% y 3%, pero a 4,5% y 6%. No produjo hemólisis en TSA suplementada con 5% de sangre de cordero, ni pigmento café difusible al medio. Creció tanto en agar TCBS y MacConkey, en donde no fermentó la lactosa. Produjo reacción positiva para indol de triptófano, gas de glucosa, RM, LDC, ADH, DL-lactato y ácido urocánico, pero no para VP, ODC, citrato y H<sub>2</sub>S. Hidroliza la elastina, gelatina, DNA, esculina, almidón, tween 80, caseína y yema de huevo, pero no la urea ni en SDS. En caldo nutritivo produce ácido desde L-arabinosa, L-ramnosa, D-manitol, N-acetil glucosamina, salicina, manosa, glicerol, glucosa, fucosa, dextrina, galactosa y trehalosa, pero no desde sacarosa, celobiosa, lactosa, rafinosa, mio-inositol, inositol y D-sorbitol. Con el sistema API 50CH, reacción de acidificación fue

observada para glicerol, L-arabinosa, D-ribosa, D-galactosa, D-glucosa, D-fructosa, D-manosa, L-ramnosa, D-manitol, N-acetil-glucosamina, arbutina, esculina, salicina, D-maltosa, D-trehalosa, D-rafinosa, almidón, L-fucosa, pero no para eritritol, D-arabinosa, D-xilosa, L-xilosa, D-adonitol, metil- $\beta$ D-xilopiramidosa, L-sorbosa, dulcitol, inositol, sorbitol, metil- $\alpha$ D-manopiranosida, metil- $\alpha$ D-glucopiranosida, amigdalina, D-celobiosa, D-lactosa, D-malobiosa, D-sacarosa, inulina, D-melezilosa, glicógeno, xilitol, gentibiosa, D-turanosa, D-lixosa, D-tagatosa, D-fucosa, D-arabitol, L-arabitol, gluconato potásico, 2-ceto-gluconato potásico y 5-ceto-gluconato potásico.

Hábitat: heces humanas.

### ***Aeromonas* sp. nov.3 (AOSE3-14A<sup>T</sup>)**

Las cuatro cepas (AOSE3-14A<sup>T</sup>, SOSE-14A, AALE1-13D y AMJE2-14D) fueron citocromo oxidasa y catalasa positivo, redujeron los nitratos a nitritos, fue positiva para la oxidación y fermentación de la glucosa, fueron resistente al agente vibriostático O/129 y crecieron a 0% y débilmente a 6% de NaCl. Todas crecieron en TSA 4°C, 15°C, 30°C y 45°C y en un rango de pH entre 5 y 9, pero no entre 3 y 4. En medio básico a diferentes concentraciones de NaCl, todas las cepas mostraron un buen crecimiento a 0, 3 y 4,5% y lo hicieron débilmente a 6%. Además, todas fueron no hemolíticas, no produjeron pigmento café difusible al medio en TSA y crecieron tanto en agar TCBS y MacConkey, donde no fermentaron la lactosa. Todas las cepas mostraron una respuesta positiva a la producción de indol desde triptófano (excepto la AALE1-13D), VP, DL-lactato y ácido urocánico, pero no para gas de glucosa, RM, LDC, ODC, ADH y citrato. Todas las cepas hidrolizaron la gelatina, DNA, tween 80, caseína, yema de huevo y la esculina (excepto la AMJE2-14B), pero ninguna hidrolizó la elastina, urea ni SDS. Las cuatro cepas produjeron ácido desde sacarosa, L-arabinosa, celobiosa, D-manitol, D-sorbitol, manosa, glicerol, glucosa, dextrina, galactosa y trehalosa, pero no desde lactosa, rafinosa, L-ramnosa, mio-inositol, inositol, salicina (mediante API 50CH esta reacción fue positiva en todas las cepas excepto AMJE2-14B, ni fucosa. Cuando el sistema API 50CH fue empleado, todas las cepas acidificaron glicerol, L-arabinosa, D-ribosa, D-xilosa (excepto AMJE2-14B y AALE1-13D), D-galactosa, D-glucosa, D-fructosa, D-manosa, D-manitol, N-acetil-glucosamina, arbutina (excepto AMJE2-14B), esculina (excepto AMJE2-14B), salicina (excepto AMJE2-14B), D-celobiosa, D-maltosa, D-sacarosa, D-trehalosa, almidón, glicógeno, gentibiosa y gluconato potásico, pero no eritritol, D-arabinosa, L-xilosa, D-adonitol, metil- $\beta$ D-xilopiramidosa, L-sorbosa, L,

ramnosa, dulcitol, inositol, sorbitol, metil- $\alpha$ D-manopiranosida, metil- $\alpha$ D-glucopiranosida, amigdalina, D-lactosa, D-melobiosa, inulina, D-melezilosa, D-rafinosa, xilitol, D-turanosa, D-lixosa, D-tagatosa, D-fucosa, L-fucosa, D-arabitol, L-arabitol, 2-ceto-gluconato potásico y 5-ceto-gluconato potásico.

Hàbitat: las cuatro cepas fueron aisladas de moluscos bivalvos cultivados en agua contaminada con agua residual. Tanto la cepa tipo AOSE3-14A<sup>T</sup> y la cepa SOSE4-14A fueron aisladas de ostrones, la cepa AALE3-13D fue aislada de almeja y la cepa AMJE2-14D de mejillón. Ninguna de las cepas fue recuperada de las muestras de agua en donde los moluscos fueron cultivados.

#### ***Aeromonas* sp. nov. 4 (AE 207<sup>T</sup>)**

La cepa presentó las características típicas del género, como ser citocromo oxidasa y catalasa positivo, reducir los nitratos a nitritos, ser positiva para la oxidación y fermentación de la glucosa, creció a 0% de NaCl, pero no a 6% de NaCl, sin embargo, fue sensible al agente vibriostático O/129 (halo 18 mm). En TSA no se observó pigmento café difusible al medio, y fue capaz de crecer en agar TCBS y agar MacConkey, sin fermentar la lactosa. Es  $\gamma$ -hemolítica. La cepa creció en TSA entre 15-30°C, pero no a 4°C y a 45°C, además creció entre pH 5 y 9, pero no a pH 3 y 4. Creció en agar nutriente entre 0 y 3% de NaCl, pero no a 4,5% de NaCl. La cepa fue positiva para la producción de indol de triptófano, VP, y ácido urocánico, pero no para el RM y tampoco produjo gas de glucosa, ni H<sub>2</sub>S y no utilizó el citrato ni el DL-lactato. Fue capaz de hidrolizar la gelatina, DNA, almidón, tween 80, caseína y yema de huevo, pero no la elastina, urea, esculina y SDS. Presentó actividad positiva para la LDC y ADH, pero no para la ODC. Ácido fue producido en caldo nutritivo desde sacarosa (esta reacción fue negativa con API 50CH), celobiosa, N-acetil glucosamina, manosa, glicerol, glucosa, dextrina, galactosa y trehalosa, pero no desde L-arabinosa, lactosa, rafinosa, L-ramnosa, mioinositol, inositol, D-manitol, D-sorbitol, salicina y fucosa. Con el sistema API 50CH, acidificación de los azúcares fue observada para glicerol, D-ribosa, D-galactosa, D-glucosa, D-fructosa, D-manosa, metil- $\alpha$ D-glucopiranosida, N-acetil-glucosamina, D-celobiosa, D-maltosa, D-trehalosa, almidón, glicógeno y gluconato potásico, pero no para eritritol, D-arabinosa, L-arabinosa, , D-xilosa, L-xilosa, D-adonitol, metil- $\beta$ D-xilopiramidosa, L-sorbosa, L-ramnosa, dulcitol, inositol, D-manitol, sorbitol, metil- $\alpha$ D-manopiranosida, amigdalina, arbutina, esculina, salicina, D-lactosa, D-melobiosa, D-sacarosa, inulina, D-melezilosa, D-rafinosa, xilitol, gentibiosa, D-turanosa, D-lixosa, D-

tagatosa, D-fucosa, L-fucosa, D-arabitol, L-arabitol, 2-ceto-gluconato potásico y 5-ceto-gluconato potásico.

Hábitat: la cepa AE 207<sup>T</sup> fue aislada de agua de lago que experimentaban afloramiento de cianobacterias en Tammela, Finlandia.

## **5. DISCUSIÓN GENERAL**



Tal como se mencionó en la introducción, el género *Aeromonas* está formado por microorganismos que han sido descritos como autóctonos del medio acuático. De hecho, de las 27 especies descritas hasta el momento de la redacción de esta tesis doctoral, la mayoría de las especies, con excepción de seis: *A. schubertii*, *A. encheleia*, *A. simiae*, *A. molluscorum*, *A. piscicola* y *A. diversa*, han sido identificadas a partir de diferentes tipos de agua (Figueira y cols., 2011; Carvalho y cols., 2012; Figueras y Beaz-Hidalgo, 2014). Sin embargo, *Aeromonas* también tiene una especial importancia en salud humana ya que provoca infecciones a nivel intestinal como extraintestinal y en salud animal donde puede generar grandes pérdidas económicas en acuicultura. La furunculosis es la principal enfermedad y se caracteriza por la presencia de hemorragias y úlceras en truchas y salmones atribuidas principalmente a la especie *A. salmonicida*, reconocida como la principal especie patógena de peces. Sin embargo, una situación diferente se encontró en el estudio 4.3.1, en el que la tres especies más prevalentes recuperados a partir de truchas fueron *A. hydrophila* (21,2%, 7/33), *A. veronii* (18,2%, 6/33) y *A. bestiarum* (18,2%, 6/33), seguidas por *A. sobria* (15,2%, 5/33), *A. media* (9,1%, 3/33), *A. popoffii* (6,1, 2/33), *A. allosaccharophila*, *A. caviae*, *A. salmonicida* (3,0%, 1/33 cada una), y un aislado (3,0%) que se agrupó con la cepa tipo de "*A. lusitana*" que se encuentra en proceso de descripción. La gran diversidad de especies encontrada en nuestro estudio es muy semejante a la encontrada en un estudio anterior realizado por Beaz-Hidalgo y cols. (2010) en nuestro laboratorio, ya que entre 35 cepas recuperadas de trucha, mediante secuenciación del gen *rpoD*, se reconocieron 5 de las 9 especies encontradas en el estudio 4.3.1 y que fueron *A. sobria* (45,5%), *A. hydrophila* (22,9%), *A. media* (11,5%), *A. piscicola* (8,6%), *A. bestiarum* (5,7%) y *A. salmonicida* (5,7%). En nuestro estudio destaca la alta prevalencia de la especie *A. veronii*, que se ha considerado clásicamente como una especies asociada a infecciones humanas pero cabe destacar que a su vez fue responsable en el año 2010 de un brote que afectó a cultivos de pez gato en Estados Unidos (Nawaz y cols., 2010). Además, de los resultados obtenidos en el estudio 4.3.1 destaca el hecho de haber aislado por primera vez *A. popoffii* a partir de trucha. Esta especie había sido previamente aislada de anguila, muestras de agua y muestras de origen humano (Soler y cols., 2002; Hua y cols., 2004; Alcaide y cols., 2010; Martone-Rocha y cols., 2010).

Por otra parte en el estudio 4.3.1, no sólo se demostró la ocurrencia de infección sistémica, ya que idénticos patrones ERIC o genotipos (E1, E11, E25 y E28 correspondientes a *A. veronii*, *A. bestiarum*, *A. media* y *A. popoffii* respectivamente)



fueron recuperados de distintos órganos en un mismo pez sino que también se observó la existencia de infecciones mixtas (dos o tres especies de *Aeromonas* fueron recuperadas desde un mismo pez).

Finalmente, al estudiar la presencia de cinco genes (*bla*<sub>IMP</sub>, *bla*<sub>CphA/IMIS</sub>, *bla*<sub>TEM</sub>, *bla*<sub>SHV</sub> y *intl1*) que codifican β-lactamasas de espectro expandido mediante PCR se demostró que el 39.6% de las cepas portaba uno o más genes de resistencia. Los tres genes detectados fueron *bla*<sub>CphA/IMIS</sub>, *intl1*, *bla*<sub>SHV</sub> en el 29,2%, 6,2% y 4,2% de los aislados respectivamente. Similares prevalencias fueron reportadas por Carvalho y cols. (2012) y Chen y cols. (2012) lo que indica que podrían estar ampliamente diseminados en el ambiente.

*Aeromonas* también fue detectada en el estudio 4.3.2, en donde se analizaron muestras de carpa común (*Cyprinus carpio*) congeladas destinadas al consumo humano donde se obtuvieron cinco aislados que correspondieron a 4 genotipos, de los cuales tres fueron identificados mediante secuenciación del gen *rpoD* como *A. salmonicida* (A3, A11= A12, A13) y uno como *A. sobria* (A8). De estas, sólo las cepas de *A. salmonicida* fueron capaces de reducir el óxido de trimetilamina (TMAO) a trimetilamina (TMA) que es un indicador de descomposición de los alimentos, demostrándose por tanto la capacidad de esta especie de producir la putrefacción de los alimentos, incluso bajo condiciones de refrigeración. Ambas especies de *Aeromonas* fueron previamente detectadas en truchas enfermas, tanto en el estudio 4.3.1 como en el trabajo de Beaz-Hidalgo y cols. (2010). También fueron identificadas a partir de tilapias (*Oreochromis niloticus*) congeladas destinadas al consumo humano en México (Castro-Escarpulli y cols., 2003). Recientemente, *A. salmonicida* fue detectada molecularmente mediante secuenciación directa del gen ARNr 16S en muestras de dorada (*Sparus aurata*) congelada (Parlapani y cols., 2013). Además, se ha comprobado que *Aeromonas* es capaz de sobrevivir e incluso multiplicarse en alimentos mantenidos hasta 10 días a temperaturas de refrigeración, De ahí la importancia de controlar la presencia de esta bacteria durante la cadena de frío de los alimentos (Figueras y Beaz-Hidalgo, 2014).

Con esta finalidad se realizó el estudio 4.1.3, destinado a evaluar la efectividad de tres medios de cultivos (ADA, SAA y BIBG-m) utilizados para la recuperación de *Aeromonas* a partir de muestras de agua y mariscos. Se encontró que el medio ADA fue superior a los otros medios para la recuperación de *Aeromonas* de muestras de agua, sin embargo, en el caso de los mariscos no hubo diferencia estadística entre los tres medios comparados. Por otro lado, cuando se evaluaron diferentes condiciones de cultivo

(enriquecido vs sin enriquecer) sólo se observó que el uso de cultivo enriquecido aumenta la detección de muestras positivas, pero no favorece la recuperación de especies de *Aeromonas* desde muestras de agua y mariscos.

Así mismo en esta tesis, en los estudios 4.1.1 y 4.1.2, se re-evaluaron y adaptaron técnicas de detección rápidas basadas en método moleculares. En el estudio 4.1.1 se optimizó un método descrito previamente (Beaz-Hidalgo y cols., 2008b) basado en la detección de los genes *fstA* (receptor de sideróforo férrico, 422 pb) y *gyrB* (760 pb), que permitió identificar de forma rápida y específica las cepas de *A. salmonicida*, aisladas tanto de peces enfermos como de portadores sanos, de las demás especies de *Aeromonas* descritas hasta esa fecha, incluida *A. bestiarum* con la cual es fenotípica y filogenéticamente cercana. Sin embargo, en el año 2009 Beaz-Hidalgo y col. describieron una nueva especie, *A. piscicola*, filogenéticamente relacionada con la dos especies citadas anteriormente. Estas tres especies presentan un similitud  $\geq$  al 99,8% en sus secuencias del gen ARNr 16S, por lo que se hizo necesario reevaluar el protocolo inicial. Con este nuevo protocolo optimizado y probado con las 25 cepas tipo de las especies descrita al momento de la publicación y con un grupo de 27 cepas de *A. salmonicida*, 13 cepas de *A. bestiarum* y 9 cepas de *A. piscicola*, se demostró que el gen *gyrB* no era específico para *A. salmonicida* ya que presentaba reacción cruzada con otras especies del género. Además bandas inespecíficas generadas durante la amplificación del gen *fstA* fueron observadas en 9 cepas de *A. bestiarum* y 6 cepas de *A. piscicola*. Sin embargo, esto fue solucionado disminuyendo el volumen de MgCl utilizado de 3  $\mu$ l a 1,5  $\mu$ l y aumentando la temperatura de hibridación (annealing) de 60°C a 64,7°C, lo que se tradujo en una PCR específica para la detección de *A. salmonicida*.

En el estudio 4.1.2 se realizó una adaptación del protocolo original para la detección de la GCAT (Glicerofosfolípido Colesterol Acetiltransferasa) mediante PCR, un marcador específico para el género *Aeromonas*, inicialmente descrito para la identificación de cepas de *Aeromonas* (Soler y cols., 2002; Chacón y cols., 2002), que permitió la detección directa de *Aeromonas* desde muestras de agua. Este método permite la detección de *Aeromonas* en solo 5 horas frente a las 29 horas necesarias por el cultivo cuando la muestra fue procesada sin enriquecimiento y de 24 horas vs 48 horas cuando las muestras fueron enriquecidas.

Por otra parte, tal y como se comentó en la introducción la identificación de las especies de *Aeromonas* en los laboratorios clínicos se realiza mayoritariamente utilizando métodos bioquímicos lo que desvirtúa la prevalencia real de las distintas especies

(Figueras, 2005) por esta razón en esta tesis en el estudio 4.3.6 se re-identificaron 422 cepas de origen clínico aisladas en diferentes hospitales de España mediante secuenciación del gen *rpoD*. Esto permito determinar que *A. caviae* (61,6%), *A. veronii* (21,6%) y *A. hydrophila* (6,4%) eran las tres especies más prevalentes que agrupaban a el 89.6% de los aislados, seguidas por *A. media* (4,5%), *A. dhakensis* (1,2%), *A. allosaccharophila* (0,5%), *A. salmonicida* (0,5%), *A. bestiarum* (0,2%), 2 (0,5%) cepas (1178C y 113634) no pudieron ser identificadas como ninguna especie conocida de *Aeromonas* y correspondieron a nuevas especies (estudio 4.4.2) y un 3,0% del total de las cepas fueron identificadas como no *Aeromonas*. Si bien esta estadística es congruente con la publicada por Figueras (2005) en donde *A. caviae*, *A. veronii* y *A. hydrophila* eran las responsables de casi el 92% de las infecciones en el hombre, y del 97,1% encontrado por Lamy y cols. (2009), está en desacuerdo con los datos publicados más recientemente, en donde *A. caviae* (29,9%); *A. dhakensis* (26,3%), *A. veronii* (24,8%) y *A. hydrophila* (15,5%) son las cuatro especies predominantes en clínica, correspondiendo al 95,6% de los aislados de acuerdo a los datos actualizados reportados por Figueras y Beaz-Hidalgo (2015). Estas discrepancias se deben a que actualmente, la especie de reciente descripción *A. dhakensis* denominada previamente *A. aquariorum* (Beaz-Hidalgo y cols., 2013) ha cobrado gran importancia, llegando a liderar esta lista en países como Malasia, Taiwán y Australia (Figueras y Beaz-Hidalgo, 2015 y referenciados). Esta especie hasta la fecha de su descripción quedaba enmascarada principalmente bajo otras especies como se demostró en el estudio 4.3.5 en donde de las 7 cepas de *Aeromonas* aisladas de sangre, e identificadas mediante métodos fenotípicos como *A. hydrophila* (4), *A. veronii* (2) y *A. caviae* (1) cuatro de ellas correspondieron a *A. dhakensis*, una a *A. hydrophila*, una a *A. veronii* y una a *A. caviae* (Morinaga y cols., 2013). Además en este estudio se demostró que las cepas de *A. dhakensis* tuvieron una mayor actividad citotóxica frente a líneas celulares de sangre humana (THP-1 y HL-60) que el resto de las especies identificadas. Estos resultados eran similares a los obtenidos por Chen y cols. (2013) quienes demostraron que *A. dhakensis* fue más virulenta y mostró mayor actividad citotóxica frente a líneas celulares de fibroblastos humanos normales de la piel, que *A. hydrophila*. Además, el genoma de la cepa clínica de *A. dhakensis* (AAK1) fue recientemente secuenciado y se demostró que contiene el gen *blaAQU-1* que codifica para  $\beta$ -lactamasas clase C (Wu y cols., 2013). Estos resultados demuestran la importancia de la correcta identificación a nivel de especie.

En relación al origen del aislamiento de las cepas clínicas estudiadas y remitidas por los distintos Hospitales, los tres de mayor frecuencia fueron las heces (86,8%), sangre (4,4% ) y herida (1,7%) y correspondiendo al 92,9% del total, tal y como era de esperar (Figueras, 2005; Janda y Abbott, 2010; Figueras y Beaz-Hidalgo, 2015). El 7.1% de las cepas restantes fueron recuperadas desde esputo, líquido ascítico, bilis, orina y secreción faríngea.

Aunque no hubo diferencias observadas por sexo (41,8% y 42,1% de afectación para hombres y mujeres respectivamente) ni por edad (41,3% y 41,7% de las *Aeromonas* fueron recuperadas desde pacientes pediátricos y adultos respectivamente), si las hubo según el tipo de infección, ya que el 63,6% de las cepas fueron recuperadas desde infecciones monomicrobianas, mientras que el 20,5% de las cepas lo fue desde procesos polimicrobianos, siendo los géneros *Campylobacter* sp. (48,4%) y *Salmonella* sp. (16,1%) los más frecuentemente identificados en asociación con *Aeromonas*. En estudios anteriores llevados a cabo en nuestro laboratorio por Borrell y cols. (1998) el número de aislamientos procedentes de heces de niños fue más alto que el de adultos.

Otro aspecto importante al que se le ha prestado atención en la presente tesis (4.3.7) es al MALDI-TOF un método relativamente nuevo de identificación a nivel de especie cada vez más utilizado en clínica, y disponible en algunos de los hospitales que han colaborado en este estudio. El MALDI-TOF no sólo se presenta como un método rápido, sino que también más económico, pero sobre todo aparentemente más fiable que los sistemas semiautomatizados, como el Vitek II y MicroScan W/A, utilizados tradicionalmente para la identificación de especies de *Aeromonas*. En este estudio se demostró que si bien, todos los métodos fenotípicos mencionados presentan porcentajes mayores al 90% en la correcta identificación a nivel de género, el sistema MALDI-TOF fue muy superior a los otros en la identificación de especies, presentando valores de 91,1% frente al 6,8% y 1,5% alcanzados por el Microscan W/A y Vitek II respectivamente. Estos métodos tienden a confundir *Aeromonas* con el género *Vibrio* y a identificar la mayoría de los aislados como *A. hydrophila*, tal como se pudo observar en los estudios 4.3.6 y 4.3.7 coincidiendo con los resultados de otros autores (Soler y cols., 2003; Lamy y cols., 2010).

En el estudio 4.3.7 con el MALDI-TOF las tres especies más prevalentes en clínica: *A. caviae*, *A. veronii* y *A. hydrophila* fueron correctamente identificadas en el 96,6%, 98,3% y 100% respectivamente, cuando los resultados fueron comparados con los obtenidos mediante secuenciación del gen *rpoD*. Tanto para *A. media* como para *A.*

*salmonicida*, el porcentaje de concordancia entre ambos métodos fue solo del 50%, mientras que para *A. bestiarum* fue de 100%. La principal limitante que presenta este método radica en su base de datos, que no incluye todas las especies descritas hasta la fecha dentro del género *Aeromonas*, es redundante, es decir incluye la misma cepa con distintas referencias ya que provienen de distintas colecciones y utiliza nomenclatura obsoleta.

Como comentamos al comienzo de la discusión, *Aeromonas* es un organismo propio de ambientes acuáticos. Actualmente el agua es un recurso cada vez más escaso. Esta situación a llevado a la reutilización del agua residual mediante procesos de depuración (conocidos como tratamientos terciarios), produciéndose la que se conoce como agua regenerada o reciclada, la que es principalmente utilizada para el riego de frutas y vegetales destinados al consumo humano. Este tipo de agua fue analizada en los estudios 4.2.1 y 4.2.2. En ambos estudios el proceso de depuración del agua residual fue diferente, ya que en estudio 4.2.1 se evaluó la efectividad del cloro y radiación ultravioleta, mientras que en el estudio 4.2.2 se evaluó la eficacia del lagunaje para la reducción de *Aeromonas* en aguas residuales tratadas, demostrándose un 100% y un 82% de efectividad para cada tipo de tratamiento respectivamente. Sin embargo, en el estudio 4.2.1 se observó la capacidad de *Aeromonas* de recrecer dentro del sistema de distribución de agua empleada para el riego, detectándose nuevamente estas bacterias en el 80% (4/5) de las muestras de agua de riego, con recuentos de  $7.0 \times 10^2$  ufc/100ml y  $2.45 \times 10^4$  NMP/100ml. Este fenómeno que puede tener una importante repercusión para la salud pública fue previamente observado por Jjemba y cols. (2010) cuando se evaluaron diferentes métodos de depuración aplicados en cuatro plantas de tratamiento de agua residual.

Si analizamos la diversidad de especies de *Aeromonas* encontrada en el agua residual no tratada y en el agua residual tratada, podemos observar un cambio en la población de especies dominantes. En el agua residual no tratada analizada en ambos estudios (4.2.1 y 4.2.2), *A. caviae* y *A. media* fueron las especies predominantes correspondiendo al 85,7% y al 91,4% del total de las cepas en cada estudio. Sin embargo, después del proceso de depuración ambas especies siguieron presentes pero en menor proporción, aumentando la presencia de las especies *A. veronii* (27,7%) y *A. salmonicida* (21,6%) en los efluentes del tratamiento terciario mediante lagunaje (estudio 4.2.2) y de *A. salmonicida* (22,2%), *A. allosaccharophila* (18,5%) y *A. popoffii* (14,8%) en el sistema de distribución de agua de riego (estudio 4.2.1). Este hecho nos hace pensar

en la posibilidad de especies de *Aeromonas* endémicas o propias de cada tipo de agua, ya que a pesar de que ambas plantas de tratamiento de aguas residuales se encuentran en zonas geográficas alejadas, el comportamiento de las especies de *Aeromonas* es similar.

Además es destacable el hecho de haber podido establecer relaciones epidemiológicas en el estudio 4.2.1 en donde una misma cepa de *A. caviae* fue detectada tanto en una muestra de agua de riego (AAR-15B) como en una de las muestras de vegetales (Sle-15D, lechuga) regadas con esta agua, demostrándose así que el agua actúa como vehículo de transmisión de estos microorganismos. Otros autores han encontrado también relaciones epidemiológicas entre cepas de origen ambiental e incluso entre estas y las aisladas de pacientes (Demarta y cols., 2000; Kajhanchi y cols., 2010; Pablos y cols., 2011). Además, en nuestro estudio demostramos que una misma cepa de la especie *A. sanarellii*, asociada principalmente a infecciones en humanos (Alperi y cols., 2010a; Beaz-Hidalgo y cols., 2012), fue aislada tanto de una muestra de perejil como de tomate, correspondiendo a su primer aislamiento de vegetales. Sin embargo, esta especie ya había sido previamente descrita en aguas residuales tratadas en Portugal (Figueira y cols., 2011) y ahora en aguas residuales no tratadas (estudio 4.2.2). En este estudio hemos demostrando su presencia, aunque en bajas proporciones, a lo largo de todo el proceso de tratamiento de las aguas residuales lo que a su vez sustenta la idea de que el agua actúa como vehículo de transmisión de microorganismos potencialmente patógenos, como *Aeromonas*.

Como se mencionó anteriormente, otra especie de importancia clínica que fue aislada en baja proporción tanto en aguas residuales tratadas como no tratadas fue *A. dhakensis* (estudio 4.2.2). Esta especie no sólo ha sido previamente encontrada en muestras clínicas en España y Taiwán por Figueras y cols. en el 2009, sino que posteriormente se describió en otras muestras clínicas por otros autores (Aravena-Román y cols., 2011; Esteve y cols., 2012; Morinaga y cols., 2013; Pauh y cols., 2013; Shin y cols., 2013), en larvas de mosquitos en Israel (Figueras y cols., 2011), en aguas residuales tratadas (Figueira y cols., 2011), agua de río, agua de sistemas de refrigeración y anguila en España (Esteve y cols., 2012) y desde tilapia (*Oreochromis niloticus*) cultivadas en México (Soto-Rodríguez y cols., 2013). Esto sugiere que esta especie no sólo es de relevancia en clínica humana, sino que está ampliamente distribuida en el ambiente, incluso fue aislada como único microorganismo patógeno a partir de un delfín (*Grampus griseus*) neonato que varó en las costas de Cataluña y que a los dos días falleció producto de neumonía y sepsis producidas por la cepa de *A. dhakensis* (Estudio 4.3.3). Esta cepa

era portadora de los genes de virulencia *aer*, *alt*, *lip* y *ser* que codifican para aerolisina/hemolisina, enterotoxina citotónica termolábil, lipasa y serina proteasa respectivamente.

En el estudio 4.2.2 se recuperó un total de 10 especies de *Aeromonas*, y aunque la gran mayoría de estas se identificaron de forma aleatoria a lo largo de todo el estudio, hubo algunas que presentaron una cierta estacionalidad, como es el caso de *A. salmonicida*, detectada específicamente entre los meses de diciembre y abril y *A. media*, aislada principalmente entre los meses de enero y marzo. Además, *A. caviae* a pesar de haber sido detectada durante todos los meses de muestreo, esta fue mayoritariamente recuperada entre los meses de junio y diciembre, correspondiendo en la mayoría de los casos a más del 70% del total de los aislados. Además se estableció una relación indirectamente proporcional entre las bajas temperaturas (< 20°C) del agua residual con una mayor efectividad del tratamiento por lagunaje (> 97%). Ambos fenómenos fueron observados previamente por Bossain y cols. (1991) y por Hassani y cols. (1992).

Las aguas residuales tratadas y no tratadas son vertidas a ríos o al mar pudiendo alterar la calidad del agua destinada al cultivo intensivo de peces y mariscos bivalvos. El impacto que podría tener este hecho sobre los moluscos bivalvos como los mejillones al ser expuestos durante siete días a el agua de un canal contaminado con aguas residuales se evaluó en el estudio 4.2.3. En este estudio se observó que el 90.1% (10/11) de las muestras investigadas fueron positivas para la presencia de *Aeromonas*. Además es importante resaltar el hecho de la diferencia en el recuento de *Aeromonas* observada entre los mejillones cultivados en la bahía de Alfacs y los mejillones cultivados en los canales de Poble Nou impactados por aguas residuales. En los primeros, el recuento de *Aeromonas* varió de 0,0 a  $2,0 \times 10^2$  ufc/100gr o de 0,0 a  $2,1 \times 10^2$  NMP/100gr, mientras que en el segundo caso el recuento de *Aeromonas* osciló entre  $2,7 \times 10^3$  y  $2,9 \times 10^3$  ufc/100gr o fue de  $3,2 \times 10^4$  NMP/100gr. Como era de esperar, *A. salmonicida* (37,8%) fue la especie más prevalente seguida por *A. media* (26,3%), *A. caviae* (18,6%) y *A. allosaccharophila* (6,4%). Además, en este estudio se estableció que existe una mayor la probabilidad (estadísticamente significativa) de aislar *A. salmonicida* y *A. caviae* de ostrones que de otros bivalvos como los mejillones y las almejas. De igual forma, se demostró una mayor prevalencia de las especies *A. media* y *A. allosaccharophila* en mejillones en relación a su prevalencia en ostrones y almejas. En el estudio 4.3.4, también realizado en mariscos, se recuperó por primera vez, la especie *A. schubertii*, específicamente desde mejillones cuando el medio de cultivo ADA fue utilizado. Considerando que esta es una especie

relativamente rara y principalmente aislada desde muestras clínicas se realizó una revisión a partir de todos los casos reportados en la literatura y se determinó que a pesar de no mostrar requerimientos especiales desde el punto de vista de los nutrientes y condiciones de cultivo, su frecuencia de aislamiento es baja y sólo ha sido citada en 18 ocasiones desde su descripción. En 9 de estas ocasiones las cepas fueron de origen clínico y en 7/9 su origen fue extraintestinal. Este hecho nos hace pensar de que *A. schubertii* pudiera ser más sensible a la presencia de sales biliares, que el resto de las especies frecuentemente aisladas en clínica. Sin embargo, este hecho necesita ser estudiado con mayor profundidad. En el caso de las cepas de origen ambiental, en 6 ocasiones *A. schubertii* fue aislada de animales (carne de rana, pollo y conejo, de camarones y peces), 2 veces fue detectada en muestras de agua (agua potable y agua de acuario) y sólo una vez fue recuperada a partir de vegetales.

Así mismo utilizando los aislados obtenidos y otros disponibles de esta especie en nuestra colección se hizo una re-evaluación fenotípica de esta especie para ver si baja prevalencia podía estar asociada a su difícil identificación. Sin embargo, se comprobó que sus características distintivas de otras especies (produce  $\beta$ -hemólisis, es positivo para la LDC, utilización del citrato y DL-lactato, pero negativo para la producción de indol y ácido desde sacarosa y manitol) eran altamente estables independientemente del origen de los aislados. Este aspecto debería facilitar tanto su identificación como su diferenciación de otras especies de *Aeromonas* también manitol negativas, como *A. simiae*, *A. diversa* y *A. australiensis* (Harf-Montail y cols., 2004; Miñana-Galbis y cols., 2010; Aravena-Román y cols., 2012). No obstante a pesar de esto los reportes de esta especie en la literatura como hemos indicado son escasos.

Finalmente, es importante destacar la utilidad del gen *rpoD*, ya que no sólo permitió la correcta identificación a nivel de especie de las cepas investigadas en esta tesis, sino que también nos permitió la detección de 7 potenciales nuevas especies, dejando claro que el punto de cohorte (97,4%) establecido por Soler y cols. (2004) para la separación de especies en base a este gen sigue siendo válido. Estas 7 potenciales líneas filogenéticas fueron confirmadas como tales mediante la realización de un estudio polifásico (estudios 4.1 y 4.2) que incluyó tanto la descripción de las características fisiológicas y bioquímicas de las cepas, y su caracterización genética mediante el uso de MLPA así como de nuevas herramientas moleculares basadas en el estudio del genoma como son el ANI y la DDHs.





## **6. CONCLUSIONES**



1. Se ha optimizado el método de la detección del gen *fstA*, para la identificación rápida de *A. salmonicida* evitando interferencias con otras especies.
2. Se ha puesto a punto la técnica de detección directa basadas en la GCAT-PCR que permite la detección de *Aeromonas* en muestras de agua en sólo 5 horas (muestra sin enriquecer) y 24 horas (muestra enriquecida).
3. El tratamiento terciario mediante la utilización de cloro y radiación ultravioleta eliminó el 100% de las *Aeromonas* y fue más efectivo que el lagunaje que sólo eliminó el 82% de éstos microorganismos.
4. El tratamiento terciario mediante lagunaje fue menos efectivo en los meses de verano (26,7%) que en los meses fríos (98,9%) lo que puede estar asociado al menor tiempo de retención y a las altas temperaturas del agua.
5. Se ha comprobado que *Aeromonas* es capaz de recrecer en los sistemas de almacenaje o distribución de agua destinada al riego de vegetales, lo que significa un riesgo para la salud pública.
6. Se ha demostrado que el agua de riego actúa como vehículo de transmisión de *Aeromonas* ya que la misma cepa de *A. caviae*, es decir una cepa con el mismo genotipo de ERIC, se aisló en el agua de riego y en una lechuga irrigada con esta. Además la misma cepa de *A. sanarelli* recuperada en una muestra de perejil se encontró también en una muestra de tomates.
7. Algunas especies de *Aeromonas* recuperadas del agua regenerada, mostraron una clara estacionalidad, por ejemplo: *A. salmonicida* fue recuperada entre los meses de diciembre y abril, mientras que *A. media* lo fue mayoritariamente entre enero y marzo. Esto indica una posible relación entre las especies recuperadas y la temperatura del agua.
8. Se comprobó que existe una mayor probabilidad de aislar *A. salmonicida* y *A. caviae* en ostrones que en mejillones y almejas, y también *A. allosaccharophila* y *A. media* en mejillones que en ostrones y almejas.
9. Se describe el primer aislamiento de *A. schubertii* a partir de mejillones, pudiendo estos actuar como una ruta de transmisión para el hombre.

10. Las cepas clínicas estudiadas correspondieron a 9 especies, 5 de las cuales: *A. caviae* (61,6%), *A. veronii* (21,6%), *A. hydrophila* (6,4%), *A. media* (4,5%) y *A. dhakensis* (1,2%) englobaron al 95,3% de las cepas.
11. La identificación de cepas de *Aeromonas* realizada en los hospitales utilizando el MALDI-TOF generan menos de un 10% de error, atribuido a la poca rigurosidad de la base de datos, que está poco actualizada, incluye cepas duplicadas y otras mal etiquetadas. Sin embargo, este método es más rápido, económico y fiable que los métodos semiautomatizados utilizados habitualmente.
12. Se aportan siete nuevas especies para la ciencia, cuatro aisladas de agua de lago, dos de heces humanas y una de moluscos bivalvos.
13. Se han publicado por primera vez nuevas especies de *Aeromonas* utilizando los genomas de sus cepas tipo y se ha comprobado que el cálculo del ANI y del DDHs utilizados para la delimitación de especies comparando sus genomas es fácil e inequívoco.

## **7. BIBLIOGRAFÍA**



- ABBOTT SL, CHEUNG WK, JANDA JM.** The genus *Aeromonas*: biochemical characteristics, atypical reactions, and phenotypic identification schemes. *J Clin Microbiol.* 2003. 41: 2348-2357.
- ABBOTT SL, CHEUNG WK, KROSKE-BYSTROM S, MALEKZADEH T, JANDA JM.** Identification of *Aeromonas* strains to the genospecies level in the clinical laboratory. *J Clin Microbiol.* 1992. 30: 1262-1266.
- ABBOTT SL, SELI LS, CATINO M JR, HARTLEY MA, JANDA JM.** Misidentification of unusual *Aeromonas* species as members of the genus *Vibrio*: a continuing problem. *J Clin Microbiol.* 1998. 36: 1103-1104.
- ABDULLAH AI, HART CA, WINSTANLEY C.** Molecular characterization and distribution of virulence associated genes amongst *Aeromonas* isolates from Libya. *J Appl Microbiol.* 2003. 95: 1001-1007.
- ABUELSAAD AS, MOHAMED I, ALLAM G, AL-SOLUMANI AA.** Antimicrobial and immunomodulating activities of hesperidin and ellagic acid against diarrheic *Aeromonas hydrophila* in a murine model. *Life Sci.* 2013. 93: 714-722.
- ABUHAMMOUR W, HASAN RA, ROGERS D.** Necrotizing fasciitis caused by *Aeromonas hydrophila* in an immunocompetent child. *Pediatr Emerg Care.* 2006. 22: 48-51.
- ACINAS SG, MARCELINO LA, KLEPAC-CERAJ V, POLZ MF.** Divergence and redundancy of 16S rRNA sequences in genomes with multiple *rrn* operons. *J Bacteriol.* 2004. 186: 2629-2635.
- AGUILERA-ARREOLA MG, HERNANDEZ-RODRIGUEZ C, ZUNIGA G, FIGUERAS MJ, CASTRO-ESCARPULLI G.** *Aeromonas hydrophila* clinical and environmental ecotypes as revealed by genetic diversity and virulence genes. *FEMS Microbiol Lett.* 2005. 242: 231-240.
- AGUILERA-ARREOLA MG, HERNÁNDEZ-RODRÍGUEZ C, ZÚÑIGA G, FIGUERAS MJ, GARDUÑO RA, CASTRO-ESCARPULLI G.** 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.* 2007. 53: 877-887.
- AL-BENWAN K, ABBOTT S, JANDA JM, HUYS G, ALBERT MJ.** Cystitis caused by *Aeromonas caviae*. *J Clin Microbiol.* 2007. 45: 2348-2350.



- ALCAIDE E, BLASCO MD, ESTEVE C.** Mechanisms of quinolone resistance in *Aeromonas* species isolated from humans, water and eels. *Res Microbiol.* 2010. 161: 40-45.
- ALI A, CARNAHAN A, ALTWEGG M, LUTHYHOTTENSTEIN J, JOSEP SW.** *Aeromonas bestiarum* sp. nov. (formely genomospecies DNA group 2 *Aeromonas hydrophila*), a new species isolated from non human sources. *Med Microbiol Lett.* 1996. 5: 156-165.
- AL-JASSIM N, ANSARI MI, HARB M, HONG PY.** Removal of bacterial contaminants and antibiotic resistance genes by conventional wastewater treatment processes in Saudi Arabia: Is the treated wastewater safe to reuse for agricultural irrigation?. *Water Res.* 2015. 15: 277-290.
- ALLEN DA, AUSTIN B, COLWELL RR.** *Aeromonas media*, a new species isolated from river water. *Int J Syst Bacteriol.* 1983. 33: 599-604
- ALPERI A.** Taxonomía y epidemiología del género *Aeromonas*. Tesis Doctoral 2009.
- ALPERI A, FIGUERAS MJ.** Human isolates of *Aeromonas* possess Shiga toxin genes (*stx1* and *stx2*) highly similar to the most virulent gene variants of *Escherichia coli*. *Clin Microbiol Infect.* 2010. 16: 1563-1567.
- ALPERI A, FIGUERAS MJ, INZA I, MARTÍNEZ-MURCIA AJ.** Analysis of 16S rRNA gene mutations in a subset of *Aeromonas* strains and their impact in species delineation. *Int Microbiol.* 2008. 11: 185-194.
- ALPERI A, MARTÍNEZ-MURCIA AJ, KO W, MONERA A, SAAVEDRA M J, FIGUERAS MJ.** *Aeromonas taiwanensis* sp. nov., and *Aeromonas sanarellii* sp. nov., two new clinical species from Taiwan. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2010a. 60: 2048-2055.
- ALPERI A, MARTÍNEZ-MURCIA A, MONERA A, SAAVEDRA MJ, FIGUERAS MJ.** *Aeromonas fluvialis* sp. nov., isolated from a spanish river. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2010b. 60: 72-77
- ALTWEGG M.** *Aeromonas* and *Plesiomonas*. En *Manual of Clinical Microbiology*. Eds. Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Tenover FC y Tenover RH. ASM Press. 1999. pp. 507-516. EEUU.
- ALTWEGG M, MARTINETTI-LUCCHINI G, LÜTHYHOTTENSTEIN J, ROHRBACH M.** *Aeromonas* associated gastroenteritis after consumption of contaminated shrimp. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 1991. 10: 44-45.

- ARAVENA-ROMÁN M, BEAZ-HIDALGO R, INGLIS TJ, RILEY TV, MARTÍNEZ-MURCIA AJ, CHANG BJ, FIGUERAS MJ.** *Aeromonas australiensis* sp. nov., isolated from irrigation water. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2013. 63: 2270-2276.
- ARAVENA-ROMÁN M, HARNETT GB, RILEY TV, INGLIS TJJ, CHANG BJ.** *Aeromonas aquariorum* is widely distributed in clinical and environmental specimens and can be misidentified as *Aeromonas hydrophila*. *J Clin Microbiol.* 2011a. 49: 3006-3008.
- ARAVENA-ROMÁN M, RILEY TV, INGLIS TJJ, CHANG BJ.** Phenotypic characteristics of human clinical and environmental *Aeromonas* in Western Australia. *Pathology.* 2011b. 43: 350-356.
- AUCH AF, KLENK HP, GÖKER M.** Standard operating procedure for calculating genome-to-genome distances based on high-scoring segment pairs. *Stand Genomic Sci.* 2010a. 2: 142-148.
- AUCH AF, VON JAN M, KLENK HP, GÖKER M.** Digital DNA-DNA hybridization for microbial species delineation by means of genome-to-genome sequence comparison. *Stand Genomic Sci.* 2010b. 2: 117-134.
- AUSTIN B, AUSTIN DA, DALSGAARD I, GUDMUNSDOTTIR BK, HOIE S, THORTON JM, LARSEN JL, O'HICI B, POWELL R.** Characterization of atypical *Aeromonas salmonicida* by different methods. *Syst Appl Microbiol.* 1998. 21: 50-64.
- AUSTIN DA, MCINTOSH D, AUSTIN B.** Taxonomy of fish associated *Aeromonas* spp., with the description of *Aeromonas salmonicida* subsp. *smithia* subsp. nov. *Syst Appl Microbiol.* 1989. 11: 277-290.
- AVOLIO M, LA SPISA C, MOSCARIELLO F, DE ROSA R, CAMPORESE A.** *Aeromonas hydrophila* ecthyma gangrenosum without bacteraemia in a diabetic man: the first case report in Italy. *Infez Med.* 2009. 17: 184-187.
- AZZOPARDI EA, AZZOPARDI SM, BOYCE DE, DICKSON WA.** Emerging gram-negative infections in burn wounds. *J Burn Care Res.* 2011. 32: 570-576.
- BASHIR AWAN MB, AHMED MM, BARI A, KROVACEK K.** Putative virulence factors of the *Aeromonas* spp. isolated from food and environment in Abu Dhabi, United Arab Emirates. *J Food Prot.* 2006. 69: 1713-1716.

- BAUMANN P, SCHUBERT RHW.** Family II. *Vibrionaceae*, Veron, 1965, 5245. En Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Eds. Krieg NR y Holt GH. 1984. pp. 516-617. EEUU.
- BAUTISTA-MORENO R.** Las tres generaciones de la secuenciación. Plataforma Andaluza de Bionformática, Universidad de Málaga. 2010. 3: 27-28. (Artículo en español).
- BARUAH FK, AHMED NH, GROVER RK.** Surgical site infection caused by *Aeromonas hydrophila* in a patient with underlying malignancy. J Clin Diagn Res. (EN PRENSA, doi: 10.7860/JCDR/2015/11046.5380).
- BEATSON SA, DAS GRAÇAS DE LUNA M, BACHMANN NL, ALIKHAN NF, HANKS KR, SULLIVAN MJ, WEE BA, FREITAS-ALMEIDA AC, DOS SANTOS PA, DE MELO JT, SQUIRE DJ, CUNNINGHAM AF, FITZGERALD JR, HENDERSON IR.** Genome sequence of the emerging pathogen *Aeromonas caviae*. J Bacteriol. 2011. 193: 1286-1287.
- BEAZ-HIDALGO R, ALPERI A, BUJÁN N, ROMALDE JL, FIGUERAS MJ.** Comparison of phenotypical and genetic identification of *Aeromonas* strains isolated from diseased fish. Syst Appl Microbiol. 2010. 33: 149-153.
- BEAZ-HIDALGO R, ALPERI A, FIGUERAS MJ, ROMALDE JL.** *Aeromonas piscicola* sp. nov., isolated from diseased fish. Syst Appl Microbiol. 2009. 32: 471-479.
- BEAZ-HIDALGO R, FIGUERAS MJ.** *Aeromonas* spp. whole genomes and virulence factors implicated in fish disease. J Fish Dis. 2013. 36: 371-388.
- BEAZ-HIDALGO R; FIGUERAS MJ.** Molecular detection and characterization of furunculosis and other *Aeromonas* fish infections. En: Health and Environment in Aquaculture. Ed. Carvalho E. Brasil. 2012. pp. 97-132.
- BEAZ-HIDALGO R, HOSSAIN MJ, LILES MR, FIGUERAS MJ.** Strategies to avoid wrongly labelled genomes using as example the detected wrong taxonomic affiliation for *Aeromonas* genomes in the GenBank database. PLoS One. 2015a. 10:e0115813
- BEAZ-HIDALGO R, LATIF-EUGENÍN F, HOSSAIN MJ, BERG K, NIEMI RM, RAPALA J, LYRA C, LILES MR, FIGUERAS MJ.** *Aeromonas aquatica* sp. nov., *Aeromonas finlandiensis* sp. nov. and *Aeromonas lacus* sp. nov. isolated from Finnish waters associated with cyanobacterial blooms. Syst Appl Microbiol. 2015b. 38: 161-168.

- BEAZ-HIDALGO R, LOPEZ-ROMALDE S, TORANZO AE, ROMALDE JL.** Polymerase chain reaction amplification of repetitive intergenic consensus and repetitive extragenic palindromic sequences for molecular typing of *Pseudomonas anguilliseptica* and *Aeromonas salmonicida*. *J Aquat Anim Health*. 2008a. 20: 75-85.
- BEAZ-HIDALGO R, MAGI GE, BALBOA S, BARJA JL, ROMALDE JL.** Development of a PCR protocol for the detection of *Aeromonas salmonicida* in fish by amplification of the *fstA* (ferric siderophore receptor) gene. *Vet Microbiol*. 2008b. 128: 386-394.
- BEAZ-HIDALGO R, MARTÍNEZ-MURCIA A, FIGUERAS MJ.** 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*. 2013. 36: 171-176.
- BEAZ-HIDALGO R, SHAKÈD T, LAVIAD S, HALPERN M, FIGUERAS MJ.** Chironomid egg masses harbour the clinical species *Aeromonas taiwanensis* and *Aeromonas sanarellii*. *FEMS Microbiol Lett*. 2012. 337: 48-59.
- BEHERA B, BHORIWAL S, MATHUR P, SAGAR S, SINGHAL M, MISRA MC.** Post-traumatic skin and soft tissue infection due to *Aeromonas hydrophila*. *Indian J Crit Care Med*. 2011. 15: 49-51.
- BENAGLI C, DEMARTA A, CAMINADA A, ZIEGLER D, PETRINI O, TONOLLA M.** A rapid MALDI-TOF MS identification database at genospecies level for clinical and environmental *Aeromonas* strains. *PLoS One*. 2012. 7: e48441.
- BERG KA, LYRA C, SIVONEN K, PAULIN L, SUOMALAINEN S, TUOMI P, RAPALA J.** High diversity of cultivable heterotrophic bacteria in association with cyanobacterial water blooms. *ISME J*. 2009. 3: 314-325.
- BÖHME K, FERNÁNDEZ-NO IC, BARROS-VELÁZQUEZ J, GALLARDO JM, CALO-MATA P, CAÑAS B.** Species differentiation of seafood spoilage and pathogenic gram-negative bacteria by MALDI-TOF mass fingerprinting. *J Proteome Res*. 2010. 9: 3169-3183.
- BOMAR L, GRAF J.** Investigation into the physiologies of *Aeromonas veronii* in vitro and inside the digestive tract of the medicinal leech using RNA-seq. *Biol Bull*. 2012. 223: 155-166.
- BONADONNA L, BRIANCESCO R, FILETICI E, MANUPPELLA A, POURSHABAN M, SEMPRONI M.** Genomic heterogeneity of environmental and

clinical aeromonads. *New Microbiol.* 2002. 25: 21-29.

- BORRELL N, ACINAS SG, FIGUERAS MJ, MARTÍNEZ-MURCIA AJ.** Identification of *Aeromonas* clinical isolates by restriction fragment length polymorphism of PCR amplified 16S rRNA genes. *J Clin Microbiol.* 1997. 35: 1671-1674.
- BORRELL N, FIGUERAS MJ, GUARRO J.** Phenotypic identification of *Aeromonas* genomospecies from clinical and environmental sources. *Can J Microbiol.* 1998. 44: 103-108.
- BOSSI-KÜPFER M, GENINI A, PEDUZZI R, DEMARTA A.** Tracheobronchitis caused by *Aeromonas veronii* biovar *sobria* after near-drowning. *J Med Microbiol.* 2007. 56: 1563-1564.
- BOUCHER Y, DOUADY CJ, SHARMA AK, KAMEKURA M, DOOLITTLE WF.** Intragenomic heterogeneity and intergenomic recombination among haloarchaeal rRNA genes. *J Bacteriol.* 2004. 186: 3980-3990.
- BOUSSAID A, BALEUX B, HASSANI L, LESNE J.** *Aeromonas* species in stabilization ponds in the arid region of Marrakesh, Morocco, and relation to fecal pollution and climatic factors. *Microb Ecol.* 1991. 21: 11-20.
- BRAUN M, STUBER K, SCHLATTER Y, WAHLI T, KUHNERT P, FREY J.** Characterization of an ADP ribosyltransferase toxin (*Aext*) from *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida*. *J Bacteriol.* 2002. 184: 1851-1858.
- BRAVO L, FERNÁNDEZ A, NÚÑEZ FÁ, RIVEROM LA, RAMÍREZ M, AGUILA A, LEDO Y, CRUZ Y, HERNÁNDEZ J.** *Aeromonas* spp associated to acute diarrheic disease in Cuba: case-control study. *Rev Chilena Infectol.* 2012. 29: 44-48. (Artículo en español).
- BRENNER DJ, FANNING GR, RAKE AV, JOHNSON KE.** Batch procedure for thermal elution of DNA from hydroxyapatite. *Anal Biochem.* 1969. 28: 447-459.
- CAMPO C, NAVARRO V, PÉREZ C, GUTIÉRREZ I, ALONSO R.** *Aeromonas* spp bacteremia: study of 12 cases and review of the literature. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2001. 19: 161-164.
- CARNAHAN AM, BEHRAM S, JOSEPH SW.** Aerokey II: a flexible key for identifying clinical *Aeromonas* species. *J Clin Microbiol.* 1991a. 29: 2843-2849.
- CARNAHAN AM, CHAKRABORTY T, FANNING GR, VERMA D, ALI A, JANDA JM, JOSEPH SW.** *Aeromonas trota* sp. nov., an ampicillin susceptible species isolated from clinical specimens. *J Clin Microbiol.* 1991b. 29: 1206-1210.

- CARNAHAN A, FANNING GR, JOSEPH SW.** *Aeromonas jandaei* (formerly genospecies DNA group 9 *A. sobria*), a new sucrose-negative species isolated from clinical specimens. *J Clin Microbiol.* 1991. 29: 560-564.
- CARNAHAN AM, JOSEPH SW.** Systematic assessment of geographically and clinically diverse aeromonads. *Syst Appl Microbiol.* 1993. 16: 7284.
- CARVALHO MJ, MARTÍNEZ-MURCIA A, ESTEVES AC, CORREIA A, SAAVEDRA MJ.** Phylogenetic diversity, antibiotic resistance and virulence traits of *Aeromonas* spp. from untreated waters for human consumption. *Int J Food Microbiol.* 2012. 59: 230-239.
- CASTRO-ESCARPULLI G, AGUILERA-ARREOLA MAG, GIONO S, HERNÁNDEZ-RODRÍGUEZ CH, CHACÓN M, SOLER L, OZORES A, FIGUERAS MJ.** El género *Aeromonas* ¿Un patógeno importante en México?. *Enf Infecc Microbiol.* 2002. 22: 206-216.
- CASTRO-ESCARPULLI G, FIGUERAS MJ, AGUILERA-ARREOLA G, SOLER L, FERNÁNDEZ-RENDÓN E, APARICIO GO, GUARRO J, CHACÓN M.R.** Characterization of *Aeromonas* spp. isolated from frozen fish intended for human consumption in Mexico. *Int J Food Microbiol.* 2003. 84: 41-49.
- CHACÓN MR, CASTRO-ESCARPULLI G, SOLER L, GUARRO J, FIGUERAS MJ.** A DNA probe specific for *Aeromonas* colonies. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2002. 44: 221-225.
- CHACÓN MR, FIGUERAS MJ, CASTRO-ESCARPULLI G, SOLER L, GUARRO J.** Distribution of virulence genes in clinical and environmental isolates of *Aeromonas* spp. *Antonie Van Leeuwenhoek.* 2003. 84: 269-278.
- CHACÓN MR, SOLER L, GROISMAN EA, GUARRO J, FIGUERAS MJ.** Type III secretion system genes in clinical *Aeromonas* isolates. *J Clin Microbiol.* 2004. 42: 1285-1287.
- CHAKRAVORTY S, HELB D, BURDAY M, CONNELL N, ALLAND D.** A detailed analysis of 16S ribosomal RNA gene segments for the diagnosis of pathogenic bacteria. *J Microbiol Methods.* 2007. 69: 330-339.
- CHAN KG, CHIN PS, TEE KK, CHANG CY, YIN WF, SHENG KY.** Draft genome sequence of *Aeromonas caviae* strain L12, a quorum-sensing strain isolated from a freshwater lake in Malaysia. *Genome Announc.* 2015. 3:e00079-15.
- CHANG H, HUNG YS, SHIE SS, LIN TL.** Fulminant necrotizing fasciitis caused by *Aeromonas sobria* in neutropenic patients. *Intern Med.* 2012. 51: 3287-3290.

- CHANG YC, WANG JY, SELVAM A, KAO SC, YANG SS, SHIH DY.** Multiplex PCR detection of enterotoxin genes in *Aeromonas* spp. from suspect food samples in northern Taiwan. *J Food Prot.* 2008. 71: 2094-2099.
- CHAO CM, GAU SJ, LAI CC.** *Aeromonas* genitourinary tract infection. *J Infect.* 2012a. 65: 573-575.
- CHAO CM, GAU SJ, LAI CC.** Empyema caused by *Aeromonas* species in Taiwan. *Am J Trop Med Hyg.* 2012b. 87: 933-935.
- CHAO CM, LAI CC, TANG HJ, KO WC, HSUEH PR.** Skin and soft-tissue infections caused by *Aeromonas* species. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2013a. 32: 543-547.
- CHAO CM, LAI CC, TSAI HY, WU CJ, TANG HJ, KO WC, HSUEH PR.** Pneumonia caused by *Aeromonas* species in Taiwan, 2004-2011. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2013b. 32: 1069-1075.
- CHARETTE SJ, BROCHU F, BOYLE B, FILION G, TANAKA KH, DEROME N.** Draft genome sequence of the virulent strain 01-B526 of the fish pathogen *Aeromonas salmonicida*. *J Bacteriol.* 2012. 194: 722-723.
- CHEN PL, LEE TF, WU CJ, TENG SH, TENG LJ, KO WC, HSUEH PR.** Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry can accurately differentiate *Aeromonas dhakensis* from *A. hydrophila*, *A. caviae*, and *A. veronii*. *J Clin Microbiol.* 2014a. 52: 2625-2628.
- CHEN PL, TSAI PJ, CHEN CS, LU YC, CHEN HM, LEE NY, LEE CC, LI CW, LI MC, WU CJ, KO WC.** *Aeromonas* stool isolates from individuals with or without diarrhea in southern Taiwan: Predominance of *Aeromonas veronii*. *J Microbiol Immunol Infect.* 2014b. pii: S1684-1182.
- CHEN PL, WU CJ, CHEN CS, TSAI PJ, TANG HJ, KO WC.** A comparative study of clinical *Aeromonas dhakensis* and *Aeromonas hydrophila* isolates in southern Taiwan: *A. dhakensis* is more predominant and virulent. *Clin Microbiol Infect.* 2013. 20: 428-434.
- CHEN YF, LIANG RS, ZHUO XL, WU XT, ZOU JX.** Isolation and characterization of *Aeromonas schubertii* from diseased snakehead, *Channa maculata* (Lacepède). *J Fish Dis.* 2012. 35: 421-430.
- CHOI JP, LEE SO, KWON HH, KWAK YG, CHOI SH, LIM SK, KIM MN, JEONG JY, CHOI SH, WOO JH, KIM YS.** Clinical significance of spontaneous *Aeromonas* bacterial peritonitis in cirrhotic patients: a matched case-control study. *Clin Infect Dis.* 2008. 47: 66-72.

**CHOPRA AK, PETERSON JW, XU XJ, COPPENHAVER DH, HOUSTON CW.**

Molecular and biochemical characterization of a heatlabile cytotoxic enterotoxin from *Aeromonas hydrophila*. *Microb Pathog.* 1996. 21: 357-377.

**CHUANG HC, HO YH, LAY CJ, WANG LS, TSAI YS, TSAI CC.** Different clinical characteristics among *Aeromonas hydrophila*, *Aeromonas veronii* biovar *sobria* and *Aeromonas caviae* monomicrobial bacteremia. *J Korean Med Sci.* 2011. 26: 1415-1420.

**CILIA V, LAFAY B, CHRISTEN R.** Sequence heterogeneities among 16S ribosomal RNA sequences, and their effect on phylogenetic analyses at the species level. *Mol Biol Evol.* 1996. 13: 451-461.

**CLAYTON RA, SUTTON G, HINKLE PS, JR, BULT C, FIELDS C.** Intraspecific variation in small subunit rRNA sequences in GenBank: why single sequences may not adequately represent prokaryotic taxa. *Int J Syst Bacteriol.* 1995. 45: 595-599.

**CLSI.** Methods for antimicrobial dilution and disk susceptibility testing of infrequently isolated or fastidious bacteria; approved guideline M45-A2. Wayne PA: Clinical and laboratory standard institute. 2010.

**COENYE T, VANDAMME P.** Intragenomic heterogeneity between multiple 16S ribosomal RNA operons in sequenced bacterial genomes. *FEMS Microbiol Lett.* 2003. 228: 45-49.

**COLLADO L, CLEENWERCK I, VAN TRAPPEN S, DE VOS P, FIGUERAS MJ.** *Arcobacter mytili* sp. nov., an indoxyl acetate hydrolysisnegative bacterium isolated from mussels. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2009. 59: 1391-1396.

**COLSTON SM, FULLMER MS, BEKA L, LAMY B, GOGARTEN JP, GRAF J.** Bioinformatic genome comparisons for taxonomic and phylogenetic assignments using *Aeromonas* as a test case. *MBio.* 2014. 5:e02136.

**COLWELL RR, MacDONELL MR, DE LEY J.** Proposal to recognize the family *Aeromonadaceae* fam. nov. *Int J Syst Bacteriol.* 1986. 36: 473-477.

**COUSIN S, BRAMBILLA E, YANG J, STACKEBRANDT E.** Culturable aerobic bacteria from the upstream region of a karst water rivulet. *Int Microbiol.* 2008. 11: 91-100.

**COUTINHO AS, DE MORAIS OO, GOMES CM, DE OLIVEIRA, CARNEIRO DA, MOTTA J.** Cutaneous abscess leading to sepsis by *Aeromonas hydrophila*. *Infection.* 2012. 41: 595-596.



- CREASON AL, DAVIS EW, PUTNAM ML, VANDEPUTTE OM, CHANG JH.** Use of whole genome sequences to develop a molecular phylogenetic framework for *Rhodococcus fascians* and the *Rhodococcus* genus. *Front Plant Sci.* 2014. 5: 406.1-406.12.
- DANAHER PJ, MUELLER WP.** *Aeromonas hydrophila* septic arthritis. *Mil Med.* 2011. 176: 1444-1446.
- DAVINREGLI A, BOLLET C, CHAMOREY E, COLONNA D'ISTRIA V, CREMIEUX A.** A cluster of cases of infections due to *Aeromonas hydrophila* revealed by combined RAPD and ERICPCR. *J Med Microbiol.* 1998. 47: 499-504.
- DE LEY J, CATTOIR H, REYNAERTS A.** The quantitative measurement of DNA hybridization from renaturation rates. *Eur J Biochem.* 1970. 12: 133-142.
- DEMARTA A, KÜPFER M, RIEGEL P, HARFMONTEIL C, TONOLLA M, PEDUZZI R, MONERA A, SAAVEDRA MJ, MARTÍNEZ-MURCIA AJ.** *Aeromonas tecta* sp. nov., isolated from clinical and environmental sources. *Syst Appl Microbiol.* 2008. 31: 278-286.
- DEMARTA A, TONOLLA M, CAMINADA A, BERETTA M, PEDUZZI R.** Epidemiological relationships between *Aeromonas* strains isolated from symptomatic children and household environments as determined by ribotyping. *Eur J Epidemiol.* 2000. 16: 447-453.
- DEMARTA A, TONOLLA M, CAMINADA AP, RUGGERI N, PEDUZZI R.** Signature region within the 16S rDNA sequences of *Aeromonas popoffii*. *FEMS Microbiol Lett.* 1999. 172: 239-246.
- DENG J, FU L, WANG R, YU N, DING X, JIANG L, FANG Y, JIANG C, LIN L, WANG Y, CHE X.** Comparison of MALDI-TOF MS, gene sequencing and the Vitek 2 for identification of seventy-three clinical isolates of enteropathogens. *J Thorac Dis.* 2014. 6: 539-544.
- DOS SANTOS PA, PEREIRA AC, FERREIRA AF, DE MATTOS ALVES MA, ROSA AC, FREITAS-ALMEIDA AC.** Adhesion, invasion, intracellular survival and cytotoxic activity of strains of *Aeromonas* spp. in HEp-2, Caco-2 and T-84 cell lines. *Antonie Van Leeuwenhoek.* 2015. 107: 1225-1236.
- DONOHUE MJ, BEST JM, SMALLWOOD AW, KOSTICH M, RODGERS M, SHOEMAKER JA.** Differentiation of *Aeromonas* isolated from drinking water distribution systems using matrix-assisted laser desorption/ionization-mass spectrometry. *Anal Chem.* 2007. 79: 1939-1946.

- DONOHUE MJ, SMALLWOOD AW, PFALLER S, RODGERS M, SHOEMAKER JA.** The development of a matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry-based method for the protein fingerprinting and identification of *Aeromonas* species using whole cells. *J Microbiol Methods*. 2006. 65: 380-389.
- DWIVEDI M, MISHRA A, PRASAD A, AZIM A, SINGH RK, BARONIA AK, PRASAD KN, DWIVEDI UN.** *Aeromonas caviae* septicemia in immunocompetent gastrointestinal carriers. *Braz J Infect Dis*. 2008. 12: 547-548.
- ELWITIGALA JP, HIGGS DS, NAMNYAK S, WHITE JW, YANEZA A.** Septic arthritis due to *Aeromonas hydrophila*: case report and review of the literature. *Int J Clin Pract Suppl*. 2005. 147: 121-124.
- EMEKDAS G, ASLAN G, TEZCAN S, SERIN MS, YILDIZ C, OZTURHAN H, DURMAZ R.** Detection of the frequency, antimicrobial susceptibility, and genotypic discrimination of *Aeromonas* strains isolated from municipally treated tap water samples by cultivation and AP-PCR. *Int J Food Microbiol*. 2006. 107: 310-314.
- ESSER B, BURNENS AP, LANFRANCHINI FM, SOMARUGA SGE, VON VIGIER RO, SCHAAD UB, AEBI C, BIANCHETTI MG.** Acute community acquired diarrhea requiring hospital admission in Swiss children. *Clin Infect Dis*. 2000. 31: 192-196.
- ESTEVE C.** Numerical taxonomy of *Aeromonadaceae* and *Vibrionaceae* associated with reared fish and surrounding fresh and brackish water. *Syst Appl Microbiol*. 1995. 18: 391-402.
- ESTEVE C, ALCAIDE E, BLASCO MD.** *Aeromonas hydrophila* subsp. *dhakensis* isolated from feces, water and fish in Mediterranean Spain. *Microbes Environ*. 2012. 27: 367-373.
- ESTEVE C, ALCAIDE E, CANALS R, MERINO S, BLASCO D, FIGUERAS MJ, TOMAS JM.** Pathogenic *Aeromonas hydrophila* serogroup O:14 and O:81 strains with an S layer. *Appl Environ Microbiol*. 2004. 70: 5898-5904.
- ESTEVE C, GUTIERREZ MC, VENTOSA A.** DNA relatedness among *Aeromonas allosaccharophila* strains and DNA hybridization groups of the genus *Aeromonas*. *Int J Syst Bacteriol*. 1995a. 45: 390-391.
- ESTEVE C, GUTIERREZ MC, VENTOSA A.** *Aeromonas encheleia* sp. nov., isolated from European eels. *Int J Syst Bacteriol*. 1995b. 45: 462-466.
- ETEMADI J, ARDALAN MR, MOTAVALI R, TUBBS RS, SHOJA MM.**

Thrombotic microangiopathy as a complication of medicinal leech therapy. *South Med J.* 2008. 101: 845-847.

**EVANGELISTA-BARRETO NS, VIEIRA RH, CARVALHO FC, TORRES RC, SANT'ANNA ES, RODRIGUES DP, REIS CM.** *Aeromonas* spp. isolated from oysters (*Crassostrea rhizophorea*) from a natural oyster bed, Ceará, Brazil. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* 2006. 48: 129-133.

**EZAKI T, HASHIMOTO Y, YABUCHI E.** Fluorometric deoxyribonucleic acid-deoxyribonucleic acid hybridization in microdilution wells as an alternative to membrane filter hybridization in which radioisotopes are used to determine genetic relatedness among bacterial strains. *Int J Syst Bacteriol.* 1989. 39: 224-229.

**FANNING GR, HICKMAN-BRENNER FW, FARMER JJ, BRENNER DJ.** DNA relatedness and phenotypic analysis of the genus *Aeromonas*. Abstract C116. 319. Abstracts on the annual meeting of the American Society of Microbiology. ASM. 1985. EEUU.

**FARMER JJ, ARDUINO, MJ HICKMAN-BRENNER FW.** The Genera *Aeromonas* and *Plesiomonas*. En: *The Prokaryotes, a handbook on the biology of Bacteria*. Ed. Dworkin M. Springer Science+Business Media, LLC. EEUU. 2006. pp. 564-596.

**FEHR D, CASANOVA C, LIVERMAN A, BLAZKOVA H, ORTH K, DOBBELAERE D, FREY J, BURR SE.** *AopP*, a type III effector protein of *Aeromonas salmonicida*, inhibits the NF $\kappa$ B signaling pathway. *Microbiol.* 2006. 152: 2809-2818.

**FELSENSTEIN, J.** Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. *Evolution.* 1985. 39: 783-791.

**FENOLLAR F, FOURNIER PE, LEGRE R.** Unusual case of *Aeromonas sobria* cellulitis associated with the use of leeches. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 1999. 18: 72-73.

**FIGUEIRA V, VAZ-MOREIRA I, SILVA M, MANAIA CM.** Diversity and antibiotic resistance of *Aeromonas* spp. in drinking and waste water treatment plants. *Water Res.* 2011. 45: 5599-5611.

**FIGUERAS MJ.** Clinical relevance of *Aeromonas*. *Rev Med Microbiol.* 2005. 16: 145-153.

**FIGUERAS MJ, ALPERI A, BEAZ-HIDALGO R, STACKEBRANDT E, BRAMBILLA E, MONERA A, MARTÍNEZ-MURCIA AJ.** *Aeromonas rivuli* sp.

- nov., isolated from the upstream region of a karst water rivulet in Germany. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2011a. 61: 242-248.
- FIGUERAS MJ, ALPERI A, GUARRO J, MARTÍNEZ-MURCIA AJ.** Genotyping of isolates included in the description of a novel species should be mandatory. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2006. 56: 1183–1184.
- FIGUERAS MJ, ALPERI A, SAAVEDRA MJ, KO WC, GONZALO N, NAVARRO M, MARTÍNEZ-MURCIA A.** Clinical relevance of the recently described *Aeromonas aquariorum*. *J Clin Microbiol.* 2009. 47: 3742-3746.
- FIGUERAS MJ, BEAZ-HIDALGO R.** *Aeromonas*: Introduction, Detection by cultural and modern techniques. En: *Encyclopedia of food microbiology*. Eds: Batt C, Tortorello ML. Elsevier Ltd. Reino Unido. 2014. pp. 25-30.
- FIGUERAS MJ, BEAZ-HIDALGO R.** *Aeromonas* infections in humans. En: *Aeromonas*. Ed. Graf J. Caister Academic Press. EEUU. 2015. pp. 65-108.
- FIGUERAS MJ, BEAZ-HIDALGO R, COLLADO L, MARTÍNEZ-MURCIA AJ.** Recommendations for a new bacterial species description based on analyses of the unrelated genera *Aeromonas* and *Arcobacter*. *The Bulletin of Bergey's International Society for Microbial Systematics.* 2011b. 2, part 1, 1-16.
- FIGUERAS MJ, BEAZ-HIDALGO R, HOSSAIN MJ, LILES MR.** Taxonomic affiliation of new genomes should be verified using average nucleotide identity and multilocus phylogenetic analysis. *Genome Announc.* 2014. 2. pii: e00927-14.
- FIGUERAS MJ, BEAZ-HIDALGO R, PAREDES K.** Furunculosis y otras infecciones producidas por *Aeromonas*. En: *Enfermedades infecciosas del cultivo de salmónidos en Chile y el mundo*. Ed. Avendaño-Herrera R. Chile. 2011c. pp. 285-374.
- FIGUERAS MJ, BEAZ-HIDALGO R, SENDEROVICH Y, LAVIAD S, HALPERN M.** Re-identification of *Aeromonas* isolates from chironomid egg masses as the potential pathogenic bacteria *Aeromonas aquariorum*. *Environ Microbiol Rep.* 2011d. 3: 239-244.
- FIGUERAS MJ, BORREGO JJ.** New perspectives in monitoring drinking water microbial quality. *J Environ Res Public Health.* 2010. 7: 4179-4202.
- FIGUERAS MJ, HORNEMAN AJ, MARTINEZ-MURCIA A, GUARRO J.** Controversial data on the association of *Aeromonas* with diarrhoea in a recent Hong Kong study. *J Med Microbiol.* 2007. 56: 996-998.
- FIGUERAS MJ, SOLER L, CHACÓN MR, GUARRO J, MARTÍNEZ-MURCIA**

- AJ.** Extended method for discrimination of *Aeromonas* spp. by 16S rDNA RFLP analysis. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2000. 50: 2069-2073.
- FINKELSTEIN R, OREN I.** Soft tissue infections caused by marine bacterial pathogens: epidemiology, diagnosis, and management. *Curr Infect Dis Rep.* 2011. 13: 470-477.
- FONTES MC, SAAVEDRA MJ, MONERA A, MARTINS C, MARTÍNEZ-MURCIA A.** Phylogenetic identification of *Aeromonas simiae* from a pig, first isolate since species description. *Vet Microbiol.* 2010. 142: 313-316.
- FRAISSE T, LECHICHE C, SOTTO A, LAVIGNE JP.** *Aeromonas* spp. infections: retrospective study in Nîmes University Hospital, 1997-2004. *Pathol Biol (Paris).* 2008. 56: 70-76.
- GARCÍA-LOZANO T, AZNAR OROVAL E, CRUZ MOJARRIETA J, MESSEGUER BADÍA F.** Vesiculobullous lesions in an immunocompromised cancer patient. *Rev Argent Microbiol.* 2012. 44: 61.
- GHENGESH KS, AHMED SF, EL-KHALEK RA, AL-GENDY A, KLENA J.** *Aeromonas*-associated infections in developing countries. *J Infect Dev Ctries.* 2008. 2: 81-98.
- GILTNER CL, BOBENCHIK AM, USLAN DZ, DEVILLE JG, HUMPHRIES RM.** Ciprofloxacin-resistant *Aeromonas hydrophila* cellulitis following leech therapy. *J Clin Microbiol.* 2013. 51: 1324-1326.
- GONZÁLEZ MJ, VILLANUEVA M, LATIF F, FERNÁNDEZ F, FERNÁNDEZ H.** Aislamiento de *Plesiomonas shigelloides* y *Aeromonas veronii* biotipo *sobria* en heces de lobo marino común sudamericano, *Otaria flavescens* (Shaw, 1800). *Rev Biol Mar Oceanogr.* 2009. 44: 763-765.
- GORIS J, KONSTANTINIDIS KT, KLAPPENBACH JA, COENYE T, VANDAMME P, TIEDJE JM.** DNA-DNA hybridization values and their relationship to whole-genome sequence similarities. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2007. 57: 81-91.
- GRAEVENITZ A VON.** The role of *Aeromonas* in diarrhea: a review. *Infection.* 2007. 35: 59-64.
- GRAF J.** Symbiosis of *Aeromonas veronii* biovar *sobria* and *Hirudo medicinalis*, the medicinal leech: a novel model for digestive tract associations. *Infect Immun.* 1999. 67: 1-7.

- GRAF J.** Symbiosis of *Aeromonas* and *Hirudo medicinalis*, the medicinal leech. ASM News. 2011. 66: 147-153.
- GRIFFIN PJ, SNIESZKO SF, FRIDDLE SB.** A more comprehensive description of *Bacterium salmonicida*. T Am Fish Soc. 1953. 82: 129-138.
- GRIM CJ, KOZLOVA EV, PONNUSAMY D, FITTS EC, SHA J, KIRTLEY ML, VAN LIER CJ, TINER BL, EROVA TE, JOSEPH SJ, READ TD, SHAK JR, JOSEPH SW, SINGLETARY E, FELLAND T, BAZE WB, HORNEMAN AJ, CHOPRA AK.** Functional genomic characterization of virulence factors from necrotizing fasciitis-causing strains of *Aeromonas hydrophila*. Appl Environ Microbiol. 2014. 80: 4162-4183.
- GRIM CJ, KOZLOVA EV, SHA J, FITTS EC, VAN LIER CJ, KIRTLEY ML, JOSEPH SJ, READ TD, BURD EM, TALL BD, JOSEPH SW, HORNEMAN AJ, CHOPRA AK, SHAK JR.** Characterization of *Aeromonas hydrophila* wound pathotypes by comparative genomic and functional analyses of virulence genes. MBio. 2013. 4:e00064-13.
- GRIMES J.** Koch's Postulates-then and now. Microbe. 2006. 1: 223-228.
- GUGLIANDOLO C, IRRERA GP, LENTINI V, MAUGERI TL.** Pathogenic *Vibrio*, *Aeromonas* and *Arcobacter* spp. associated with copepods in the straits of Messina (Italy). Mar Pollut Bull. 2008. 56: 600-606.
- GUNASEKARAN L, AMBALKAR S, SAMARJI RA, QAMRUDDIN A.** Post-traumatic osteomyelitis due to *Aeromonas* species. Indian J Med Microbiol. 2009. 27: 163-165.
- HAN JE, KIM JH, SHIN SP, JUN JW, CHAI JY, PARK SC.** Draft genome sequence of *Aeromonas salmonicida* subsp. *achromogenes* AS03, an atypical strain isolated from Crucian Carp (*Carassius carassius*) in the Republic of Korea. Genome Announc. 2013. 1:e00791-13.
- HARAYAMA S, KASAI H.** Bacterial phylogeny reconstruction from molecular sequences. En: Molecular identification, systematics, and population structure of Prokaryotes. Ed. Stackebrandt E. Springer Verlag. Alemania. 2006. pp 105-139.
- HARF-MONTEIL C, FLÈCHE AL, RIEGEL P, PRÉVOST G, BERMOND D, GRIMONT PA, MONTEIL H.** *Aeromonas simiae* sp. nov., isolated from monkey faeces. Int J Syst Evol Microbiol. 2004. 54: 481-485.

- HASAN NA, CHOI SY, EPPINGER M, CLARK PW, CHEN A, ALAM M, HALEY BJ, TAVIANI E, HINE E, SU Q, ET AL.** Genomic diversity of 2010 Haitian cholera outbreak strains. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2012. 109: E2010-E2017.
- HASSANI L, IMZILN B, BOUSSAID A, GAUTHIER MJ.** Seasonal incidence of antibiotic resistance among *Aeromonas* species isolated from domestic wastewater before and after treatment in stabilization ponds. *Microb Ecol*. 1992. 23: 227-237.
- HENRIQUES IS, FONSECA F, ALVES A, SAAVEDRA MJ, CORREIA A.** Occurrence and diversity of integrons and beta-lactamase genes among ampicillin-resistant isolates from estuarine waters. *Res Microbiol*. 2006. 157: 938-947.
- HICKMAN-BRENNER FW, FANNING GR, ARDUINO MJ, BRENNER DJ, FARMER JJ.** *Aeromonas schubertii*, a new mannitol-negative species found in human clinical specimens. *J Clin Microbiol*. 1988. 26: 1561-1564.
- HICKMAN-BRENNER FW, MACDONALD KL, STEIGERWALT AG, FANNING GR, BRENNERAND DJ, FARMER JJ.** *Aeromonas veronii*, a new ornithine decarboxylase-positive species that may cause diarrhea. *J Clin Microbiol*. 1987. 25: 900-906.
- HIRANSUTHIKUL N, TANTISIRIWAT W, LERTUTSAHAKUL K, VIBHAGOOOL A, BOONMA P.** Skin and soft tissue infections among tsunami survivors in Southern Thailand. *Clin Infect Dis*. 2005. 41: 93-96.
- HOCHEDÉZ P, HOPE-RAPP E, OLIVE C, NICOLAS M, BEAUCAIRE G, CABIÉ A.** Bacteremia caused by *Aeromonas hydrophila* complex species [corrected] complex in the Caribbean Islands of Martinique and Guadeloupe. *Am J Trop Med Hyg*. 2010. 83: 1123-1127.
- HOCHEDÉZ P, HOPE-RAPP E, OLIVE C, NICOLAS M, BEAUCAIRE G, CABIÉ A.** Bacteremia caused by *Aeromonas* species in the Caribbean Islands of Martinique and Guadeloupe. *Am J Trop Med Hyg*. 2011. 84: 842.
- HOLMES P, NICOLLS ML.** *Aeromonads* in drinking water supplies: their occurrence and significance. *J CIWEM*. 1996. 9: 464-469.
- HOOD DW, DEADMAN ME, ALLEN T, MASOUD H, MARTIN A, BRISSON JR, FLEISCHMANN R, VENTER JC, RICHARDS JC, MOXON ER.** Use of the complete genome sequence information of *Haemophilus influenzae* strain Rd to investigate lipopolysaccharide biosynthesis. *Mol Microbiol*. 1996. 22: 951-965.

- HOSSAIN MJ, BEAZ-HIDALGO R, FIGUERAS MJ, LILES MR.** Draft genome sequences of two novel *Aeromonas* species recovered in association with cyanobacterial blooms. *Genome Announc.* 2014a. 2: e01181-14.
- HOSSAIN MJ, SUN D, MCGAREY DJ, WRENN S, ALEXANDER LM, MARTINO ME, XING Y, TERHUNE JS, LILES MR.** An asian origin of virulent *Aeromonas hydrophila* responsible for disease epidemics in United States-farmed catfish. *mBio.* 2014b. 5: e00848-14.
- HOSSAIN MJ, WALDBIESER GC, SUN D, CAPPS NK, HEMSTREET WB, CARLISLE K, GRIFFIN MJ, KHOO L, GOODWIN AE, SONSTEGARD TS, SCHROEDER S, HAYDEN K, NEWTON JC, TERHUNE JS, LILES MR.** Implication of lateral genetic transfer in the emergence of *Aeromonas hydrophila* isolates of epidemic outbreaks in channel catfish. *PLoS One.* 2013. 8(8):e80943.
- HOUF K, DE ZUTTER L, VAN HOOF J, VANDAMME P.** Assessment of the genetic diversity among *Arcobacters* isolated from poultry products by using two PCR-based typing methods. *Appl Environ Microbiol.* 2002. 68: 2172-2178.
- HUA HT, BOLLET C, TERCIAN S, DRANCOURT M, RAOULT D.** *Aeromonas popoffii* urinary tract infection. *J Clin Microbiol.* 2004. 42: 5427-5428.
- HUYS G, CNOCKAERT M, SWINGS J.** *Aeromonas culicicola* (Pidiyar *et al.*, 2002) is a later subjective synonym of *Aeromonas veronii* (Hickman-Brenner *et al.*, 1987). *Syst Appl Microbiol.* 2005. 28: 604-609.
- HUYS G, COOPMAN V, VAN VARENBERGH D, CORDONNIER J.** Selective culturing and genus-specific PCR detection for identification of *Aeromonas* in tissue samples to assist the medico-legal diagnosis of death by drowning. *Forensic Sci Int.* 2012. 221: 11-15.
- HUYS G, KÄMPFER P, ALBERT MJ, KÜHN I, DENYS R, SWINGS J.** *Aeromonas hydrophila* subsp. *dhakensis* subsp. nov., isolated from children with diarrhea in Bangladesh, and extended description of *Aeromonas hydrophila* subsp. *hydrophila* (Chester 1901) Stanier 1943 (approved lists 1980). *Int J Syst Evol Microbiol.* 2002. 52: 705-712.
- HUYS G, KÄMPFER P, ALTWEGG M, COOPMAN R, JANSSEN P, GILLIS M, KERSTERS K.** 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.* 1997a. 47: 1157-1164.
- HUYS G, KÄMPFER P, ALTWEGG M, KERSTERS I, LAMB A, COOPMAN R,**



- LÜTHYHOTTENSTEIN J, VANCANNEYT M, JANSSEN P, KERSTERS K.** *Aeromonas popoffii* sp. nov., a mesophilic bacterium isolated from drinking water production plants and reservoirs. *Int J Syst Bacteriol.* 1997b. 47: 1165-1171.
- HUYS G, KÄMPFER P, SWINGS J.** New DNA-DNA hybridization and phenotypic data on the species *Aeromonas ichthiosmia* and *Aeromonas allosaccharophila*: *A. ichthiosmia* (Schubert *et al.*, 1990) is a later synonym of *A. veronii* (Hickman-Brenner *et al.* 1987). *Syst Appl Microbiol.* 2001. 24: 177-182.
- HUYS G, PEARSON M, KÄMPFER P, DENYS R, CNOCKAERT M, INGLIS V, SWINGS J.** *Aeromonas hydrophila* subsp. *ranae* subsp. nov., isolated from septicaemic farmed frogs in Thailand. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2003. 53: 885-891.
- IGBINOSA IH, OKOH AI.** Antibiotic susceptibility profile of *Aeromonas* species isolated from wastewater treatment plant. *Sci World J.* 2012. 2012: 764-563.
- IGBINOSA IH, OKOH AI.** Detection and distribution of putative virulence associated genes in *Aeromonas* species from freshwater and wastewater treatment plant. *J Basic Microbiol.* 2013. 53: 895-901.
- IGBINOSA IH, IGUMBOR EU, AGHDASI F, TOM M, OKOH AI.** Emerging *Aeromonas* species infections and their significance in public health. *Scientific World Journal.* 2012. 2012: 625023.
- İLHAN Z, GÜLHAN T, AKSAKAL A.** *Aeromonas hydrophila* associated with ovine abortion. *Small Ruminant Research.* 2006. 61: 73-78.
- IMZILN B, LAFDAL YM, JANA M.** Effect of wastewater stabilization ponds on antimicrobial susceptibility and haemolysin occurrence among motile *Aeromonas* strains. *World J Microbiol Biotechnol.* 1996. 12: 385-390.
- ISSA N, NAPOLITANO LM.** *Aeromonas* pneumonia in a trauma patient requiring extracorporeal membrane oxygenation for severe acute respiratory distress syndrome: case report and literature review. *Surg Infect (Larchmt).* 2011. 12: 241-245.
- JAGODA SS, WIJEWARDANA TG, ARULKANTHAN A, IGARASHI Y, TAN E, KINOSHITA S, WATABE S, ASAKAWA S.** Characterization and antimicrobial susceptibility of motile aeromonads isolated from freshwater ornamental fish showing signs of septicaemia. *Dis Aquat Organ.* 2014. 109: 127-137.
- JANDA JM, ABBOTT S.** Evolving concepts regarding the genus *Aeromonas*: an expanding panorama of species, disease presentations, and unanswered questions. *Clin Infect Dis.* 1998. 27: 332-344.
- JANDA JM, ABBOTT SL.** Human pathogens. The genus *Aeromonas*. En: B. Austin,

- M. Altwegg, PJ Gosling and S. Joseph. (ed). John Wiley and Sons, New York. 1996. pp. 151-174.
- JANDA JM, ABBOTT SL.** The genus *Aeromonas*: taxonomy, pathogenicity, and infection. Clin Microbiol Rev. 2010. 23: 35-73.
- JANDA JM, ABBOTT SL, KHASHE S, KELLOGG GH, SHIMADA T.** Further studies on biochemical characteristics and serologic properties of the genus *Aeromonas*. J Clin Microbiol. 1996. 34: 1930-1933.
- JJEMBA PK, WEINRICH LA, CHENG W, GIRALDO E, LECHEVALLIER MW.** Regrowth of potential opportunistic pathogens and algae in reclaimed-water distribution systems. Appl Environ Microbiol. 2010. 76: 4169-4178.
- JOHNSON JL.** Genetic characterization. En: Manual of methods for general bacteriology. Eds. Gerhardt P, Murray RGE, Costilaw RN, Nester EW, Wood WA, Krieg NR y Phillips GB. American Society for Microbiology. EEUU. 1981. pp. 450-472.
- JOLLEY KA, BLISS CM, BENNETT JS, BRATCHER HB, BREHONY C, COLLES FM, WIMALARATHNA H, HARRISON OB, SHEPPARD SK, CODY AJ, MAIDEN MC.** Ribosomal multilocus sequence typing: universal characterization of bacteria from domain to strain. Microbiol. 2012. 158: 1005-1015.
- JOLLEY KA, MAIDEN MC.** BIGSdb: Scalable analysis of bacterial genome variation at the population level. BMC Bioinf. 2010. 11: 595.
- JOLLEY KA, MAIDEN MC.** Using multilocus sequence typing to study bacterial variation: prospects in the genomic era. Fut Microbiol. 2014. 9: 623-630.
- JUAN HJ, TANG RB, WU TC, YU KW.** Isolation of *Aeromonas hydrophila* in children with diarrhea. J Microbiol Immunol Infect. 2000. 33: 115-117.
- KHAJANCHI BK, FADL AA, BOCHARDT MA, BERG RL, HORNEMAN AJ, STEMPER ME, JOSEPH SW, MOYER NP, SHA J, CHOPRA AK.** Distribution of virulence factors and molecular fingerprinting of *Aeromonas* species isolates from water and clinical samples: suggestive evidence of water-to-human transmission. Appl Environ Microbiol. 2010. 76: 2313-2325.
- KALBERMATTEN DF, RIEGER UM, UIKE K, ERBA P, LAIFER G, HINTERMANN B, PIERER G.** Infection with *Aeromonas hydrophila* after use of leeches (*Hirudo medicinalis*) in a free microvascular osteo(myo)cutaneous flap-suggestions for successful management. Handchir Mikrochir Plast Chir. 2007. 39: 108111.

- KÄMPFER P, ALTWEGG M.** Numerical classification and identification of *Aeromonas* genospecies. *J Appl Bacteriol.* 1992. 72: 341-351.
- KAO HT, HUANG YC, LIN TY.** Fatal bacteremic pneumonia caused by *Aeromonas hydrophila* in a previously healthy child. *J Microbiol Immunol Infect.* 2003. 36: 209-211.
- KAO TL, KAO ML.** A fatal case of necrotizing *Aeromonas schubertii* fasciitis after penetrating injury. *Am J Emerg Med.* 2012. 30: 258.e3-e5.
- KAZNOWSKI A.** Identification of *Aeromonas* strains of different origin to the genomic species level. *J Appl Microbiol.* 1998. 84: 423-430.
- KIM OS, CHO YJ, LEE K, YOON SH, KIM M, NA H, PARK SC, JEON YS, LEE JH, YI H, WON S, CHUN J.** Introducing EzTaxon-e: a prokaryotic 16S rRNA gene sequence database with phylotypes that represent uncultured species. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2012. 62: 716-721.
- KIM M, OH HS, PARK SC, CHUN J.** Towards a taxonomic coherence between average nucleotide identity and 16S rRNA gene sequence similarity for species demarcation of prokaryotes. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2014. 64: 346-351.
- KIMURA M.** A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *J Mol Evol.* 1980. 16: 111-120.
- KIMURA M, ARAOKA H, YONEYAMA A.** *Aeromonas caviae* is the most frequent pathogen amongst cases of *Aeromonas* bacteremia in Japan. *Scand J Infect Dis.* 2013. 45: 304-309.
- KINGOMBE CIB, HUYS G, TONOLLA M, ALBERT MJ, SWINGS J, PEDUZZI R, JEMMI T.** PCR detection, characterization and distribution of virulence genes in *Aeromonas* spp. *Appl Environ Microbiol.* 1999. 65: 5293-5302.
- KINZELMAN J, MCLELLAN SL, AMICK A, PREEDIT J, SCOPEL CO, OLAPADE O, GRADUS S, SINGH A, SEDMAK G.** Identification of human enteric pathogens in gull feces at Southwestern Lake Michigan bathing beaches. *Can J Microbiol.* 2008. 54: 1006-1015.
- KLUYVER AJ, VAN NEIL CB.** Prospects for a natural system of classification of bacteria. *Zentralbl Bakteriell Parasitenkd Infektionskr Hyg Abt.* 1936. 94: 369-403.
- KO WC, LEE HC, CHUANG YC, LIU CC, WU JJ.** Clinical features and therapeutic implications of 104 episodes of monomicrobial *Aeromonas* bacteraemia. *J Infect.* 2000. 40: 267-273.

- KONSTANTINIDIS KT, RAMETTE A, TIEDJE JM.** Toward a more robust assessment of intraspecies diversity, using fewer genetic markers. *Appl Environ Microbiol.* 2006. 72: 7286-7293.
- KONSTANTINIDIS KT, TIEDJE JM.** Towards a genome-based taxonomy for prokaryotes. *J Bacteriol.* 2005. 187: 6258-6264.
- KOTLOFF KL, NATARO JP, BLACKWELDER WC, NASRIN D, FARAG TH, PANCHALINGAM S, WU Y, SOW SO, SUR D, BREIMAN RF, ET AL.** Burden and aetiology of diarrhoeal disease in infants and young children in developing countries (the Global Enteric Multicenter Study, GEMS): a prospective, case-control study. *Lancet.* 2013. 382: 209-222.
- KOZINSKA A.** Dominant pathogenic species of mesophilic *Aeromonads* isolated from diseased and healthy fish cultured in Poland. *J Fish Dis.* 2007. 30: 293-301.
- KOZINSKA A, FIGUERAS MJ, CHACÓN MR, SOLER L.** Phenotypic characteristics and pathogenicity of *Aeromonas* genomospecies isolated from common carp (*Cyprinus carpio* L.). *J Appl Microbiol.* 2002. 93: 1034-1041.
- KRAFT CA, TIMBURY MC, PLATT DJ.** Distribution and genetic location of Tn7 in trimethoprim-resistant *Escherichia coli*. *J Med Microbiol.* 1986. 22: 125-131.
- KRZYMIŃSKA S, KAZNOWSKI A, CHODYSZ M.** *Aeromonas* spp. human isolates induce apoptosis of murine macrophages. *Curr Microbiol.* 2009. 58: 252-257.
- KRZYMIŃSKA S, KAZNOWSKI A, PUK M.** Interaction of *Aeromonas* spp. human isolates with murine macrophages. *New Microbiol.* 2008. 31: 481-488.
- KUIJPER EJ, STEIGERWALT AG, SCHOENMAKERS BS, PEETERS MF, ZANEN HC, BRENNER DJ.** Phenotypic characterization and DNA relatedness in human fecal isolates of *Aeromonas* spp. *J Clin Microbiol.* 1989. 27: 132-138.
- KUIJPER EJ, PEETERS MF.** Bacteriological and clinical aspects of *Aeromonas* associated diarrhea in The Netherlands. *Experientia.* 1991.47: 432-434.
- KUMAR S, MUKHOPADHYAY P, CHATTERJEE M, BANDYOPADHYAY MK, BANDYOPADHYAY M, GHOSH T, SAMADDAR D.** Necrotizing fasciitis caused by *Aeromonas caviae*. *Avicenna J Med.* 2012. 2: 94-96.
- KÜPFER M, KUHNERT P, KORCZAK BM, PEDUZZI R, DEMARTA A.** Genetic relationships of *Aeromonas* strains inferred from 16S rRNA, *gyrB* and *rpoB* gene sequences. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2006. 56: 2743-2751.
- LAMY B, KODJO A, LAURENT F.** Prospective nationwide study of *Aeromonas* infections in France. *J Clin Microbiol.* 2009. 47: 1234-1237.

- LAMY B, KODJO A, LAURENT F, COLBVH STUDY GROUP.** Identification of *Aeromonas* isolates by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight massspectrometry. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2011. 71: 1-5.
- LAMY B, LAURENT F, VERDIER I, DECOUSSER JW, LECAILLON E, MARCHANDIN H, ROGER F, TIGAUD S, DE MONTCLOS H; COLBVH STUDY GROUP, KODJO A. ET AL.** Accuracy of 6 commercial systems for identifying clinical *Aeromonas* isolates. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 2010. 67: 9-14.
- LAU SM, PENG MY, CHANG FY.** Outcomes of *Aeromonas* bacteremia in patients with different types of underlying disease. *J Microbiol Immunol Infec.* 2000. 33: 241-247.
- LAUFER AS, SIDDALL ME, GRAF J.** Characterization of the digestive tract microbiota of *Hirudo orientalis*, a european medicinal leech. *Appl Environ Microbiol.* 2008. 74: 6151-6154.
- LAY CJ, ZHUANG HJ, HO YH, TSAI YS, WANG LS, TSAI CC.** Different clinical characteristics between polymicrobial and monomicrobial *Aeromonas* bacteremia a study of 216 cases. *Intern Med.* 2010. 49: 2415-2421.
- LEVINE SM, FRANGOS SG, HANNA B, COLEN K, LEVINE JP.** *Aeromonas* septicemia after medicinal leech use following replantation of severed digits. *Am J Crit Care.* 2010. 19: 469-471.
- LI Y, CAI SH.** Identification and pathogenicity of *Aeromonas sobria* on tail-rot disease in juvenile tilapia *Oreochromis niloticus*. *Curr Microbiol.* 2011. 62: 623-627.
- LI Y, LIU Y, ZHOU Z, HUANG H, REN Y, ZHANG Y, LI G, ZHOU Z, WANG L.** Complete genome sequence of *Aeromonas veronii* strain B565. *J Bacteriol.* 2011. 193: 3389-3390.
- LIKOPOULOS V, ARAMPATZIS S, KOURTI P, TSOLKAS T, ZAROGIANNIS S, ELEFThERiADIS T, GIANNOPOULOU, M, STEFANIDIS I.** *Aeromonas hydrophila* as a causative organism in peritoneal dialysis-related peritonitis: case report and review of the literature. *Clin Nephrol.* 2011. 75: 65-68.
- LIN WT, SU SY, LAI CC, TSAI TC, GAU SJ, CHAO CM.** Peritonitis caused by *Aeromonas* species at a hospital in southern Taiwan. *Intern Med.* 2013. 52: 2517-2521.
- LIU JY, LI AH.** First case of *Aeromonas schubertii* infection in the freshwater cultured snakehead fish, *Ophiocephalus argus* (Cantor), in China. *J Fish Dis.* 2012. 35: 335-342.

- LLOPIS F, GRAU I, TUBAU F, CISNAL M, PALLARE'S R.** Epidemiological and clinical characteristics of bacteraemia caused by *Aeromonas* spp. compared with *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa*. Scand J Infect Dis. 2004. 36: 335--341.
- LOVELY CJ, LESLIE AJ.** Normal intestinal flora of wild Nile crocodiles (*Crocodylus niloticus*) in the Okavango Delta, Botswana. J S Afr Vet Assoc. 2008. 79: 67-70.
- LU XM, LU PZ.** Characterization of bacterial communities in sediments receiving various wastewater effluents with high-throughput sequencing analysis. Microb Ecol. 2014. 67: 612-623.
- LU X, ZHANG XX, WANG Z, HUANG K, WANG Y, LIANG W, TAN Y, LIU B, TANG J.** Bacterial pathogens and community composition in advanced sewage treatment systems revealed by metagenomics analysis based on high-throughput sequencing. PLoS One. 2015. 10:e0125549.
- MACINNES JI, TRUST TJ, GROSA.** Deoxyribonucleic acid relationship among members of the genus *Aeromonas*. Can J Microbiol. 1979. 25: 579-586.
- MAETZ B, ABOU R, ANDREOLETTI JB, BRUANT-RODIER C.** Infections following the application of leeches: two case reports and review of the literature. J Med Case Rep. 2012. 6: 364.
- MAHABEER Y, KHUMALO A, KIRATU E, MLISANA K.** Posttraumatic brain abscess caused by *Aeromonas hydrophila*. J Clin Microbiol. 2014. 52: 1796-1797.
- MAIDEN MC.** Multilocus sequence typing of bacteria. Annu Rev Microbiol. 2006. 60: 561-588.
- MAIDEN MC, BYGRAVES JA, FEIL E, MORELLI G, RUSSELL JE, URWIN R, ZHANG Q, ZHOU J, ZURTH K, CAUGANT DA, FEAVERS IM, ACHTMAN M, SPRATT BG.** Multilocus sequence typing: a portable approach to the identification of clones within populations of pathogenic microorganisms. Proc Natl Acad Sci USA. 1998. 95: 3140-3145.
- MAIDEN MC, JANSEN VAN RENSBURG MJ, BRAY JE, EARLE SG, FORD SA, JOLLEY KA, MCCARTHY ND.** MLST revisited: the gene-by-gene approach to bacterial genomics. Nat Rev Microbiol. 2013. 11: 728-736.
- MAITI B, RAGHUNATH P, KARUNASAGAR I, KARUNASAGAR I.** Typing of clinical and environmental strains of *Aeromonas* spp. using two PCR based methods and whole cell protein analysis. J Microbiol Methods. 2009. 78: 312-318.

- MAKINO I, TAJIMA H, KITAGAWA H, NAKAGAWARA H, MIYASHITA T, NAKANUMA S, HAYASHI H, TAKAMURA H, FUSHIDA S, OHTA T.** A case of severe sepsis presenting marked decrease of neutrophils and interesting findings on dynamic CT. *Am J Case Rep.* 2015. 16: 322-327.
- MANDAL J, DHODAPKAR R, ACHARYA NS, SASTRY A, PARIJA SC.** Urinary tract infection due to *Aeromonas* spp., a lesser known causative bacterium. *J Infect Dev Ctries.* 2010. 4: 679-681.
- MANSOUR AM, ABD ELKHALEK R, SHAHEEN HI, EL MOHAMMADY H, REFAEY S, HASSAN K, RIDDLE M, SANDERS JW, SEBENY PJ, YOUNG SY, FRENCK R.** Burden of *Aeromonas hydrophila* associated diarrhea among children younger than 2 years in rural Egyptian community. *J Infect Dev Ctries.* 2012. 6: 842-846.
- MARCHANDIN H, TEYSSIER C, SIMEON DE BUOCHBERG M, JEANPIERRE H, CARRIERE C, JUMASBILAK E.** Intrachromosomal heterogeneity between the four 16S rRNA gene copies in the genus *Veillonella*: implications for phylogeny and taxonomy. *Microbiology.* 2003. 149: 1493-1501.
- MARTIN-CARNAHAN A, JOSEPH SW.** Order XII. Aeromonadales ord. nov. En *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology.* Eds Brenner DJ, Krieg N R, Staley JT y Garrity GM. Springer. EEUU. 2005. pp 556-578.
- MARTÍN DELGADO M, MATUTE CRUZ P, NUÑEZ GALLO D, FERNÁNDEZ GONZÁLEZ C, LÓPEZ GONZÁLEZ COVIELLA N, VALLADARES HERNÁNDEZ B, PITA TOLEDO ML, MARTÍNEZ NAVARRO F.** Diarrea del viajero asociada a *Aeromonas hydrophila*. *Rev Salut Ambient.* 2001. 1: 30-35.
- MARTÍNEZ-MURCIA AJ, ANTON AI, RODRIGUEZ-VALERA F.** Patterns of sequence variation in two regions of the 16S rRNA multigene family of *Escherichia coli*. *Int J Syst Bacteriol.* 1999. 49: 601-610.
- MARTÍNEZ-MURCIA A, BEAZ-HIDALGO R, CARVALHO MJ, ARAVENA-ROMÁN M, CORREIA A, FIGUERAS MJ, SAAVEDRA MJ.** *Aeromonas lusitana* sp. nov., isolated from untreated waters and vegetables. 2015. (Sometido).
- MARTÍNEZ-MURCIA A, BEAZ-HIDALGO R, SVEC P, SAAVEDRA MJ, FIGUERAS MJ, SEDLACEK I.** *Aeromonas cavernicola* sp. nov., isolated from fresh water of a brook in a cavern. *Curr Microbiol.* 2013. 66: 197-204.
- MARTÍNEZ-MURCIA AJ, BENLLOCH S, COLLINS MD.** 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.* 1992a. 42: 412-421.
- MARTÍNEZ-MURCIA AJ, ESTEVE C, GARAY E, COLLINS MD.** *Aeromonas allosaccharophila* sp. nov., a new mesophilic member of the genus *Aeromonas*. *FEMS Microbiol Lett.* 1992b. 70: 199-205.
- MARTÍNEZ-MURCIA AJ, FIGUERAS MJ, SAAVEDRA MJ, STACKEBRANDT E.** The recently proposed species *Aeromonas sharmana* sp. nov., isolate GPTSA6<sup>T</sup>, is not a member of the genus *Aeromonas*. *Int Microbiol.* 2007. 10: 61-64.
- MARTÍNEZ-MURCIA A, MORENA A, SAAVEDRA MJ, OCINA R, LÓPEZ-ÁLVAREZ M, LARA E, FIGUERAS MJ.** Multilocus phylogenetic analysis of the genus *Aeromonas*. *Syst Appl Microbiol.* 2011. 34: 189-199.
- MARTÍNEZ-MURCIA AJ, SAAVEDRA MJ, MOTA VR, MAIER T, STACKEBRANDT E, COUSIN S.** *Aeromonas aquariorum* sp. nov., isolated from aquaria of ornamental fish. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2008. 58: 1169-1175.
- MARTÍNEZ-MURCIA AJ, SOLER L, SAAVEDRA MJ, CHACÓN MR, GUARRO J, STACKEBRANDT E, FIGUERAS MJ.** Phenotypic, genotypic, and phylogenetic discrepancies to differentiate *Aeromonas salmonicida* from *Aeromonas bestiarum*. *Int Microbiol.* 2005. 8: 259-269.
- MARTINO ME, FASOLATO L, MONTEMURRO F, NOVELLI E, CARDAZZO B.** *Aeromonas* spp.: ubiquitous or specialized bugs?. *Environ Microbiol.* 2013. 16: 1005-1018.
- MARTINO ME, FASOLATO L, MONTEMURRO F, ROSTEGHIN M, MANFRIN A, PATARNELLO T, NOVELLI E, CARDAZZO B.** Determination of microbial diversity of *Aeromonas* strains on the basis of multilocus sequence typing, phenotype, and presence of putative virulence genes. *Appl Environ Microbiol.* 2011. 77: 4986-5000.
- MARTONE-ROCHA S, PIVELI RP, MATTÉ GR, DÓRIA MC, DROPA M, MORITA M, PETERNELLA FA, MATTÉ MH.** Dynamics of *Aeromonas* species isolated from wastewater treatment system. *J Water Health.* 2010. 8: 703-711.
- MAUEL MJ, MILLER DL, FRAZIER KS, HINES ME.** 2nd Bacterial pathogens isolated from cultured bullfrogs (*Rana castesbeiana*). *J Vet Diagn Invest.* 2002. 14: 431-433.
- MAXAM AM, GILBERT W.** A new method for sequencing DNA. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1977. 74: 560-564.



- MCLELLAN SL, HUSE SM, MUELLER-SPITZ SR, ANDREISHCHEVA EN, SOGIN ML.** Diversity and population structure of sewage-derived microorganisms in wastewater treatment plant influent. *Environ Microbiol.* 2010. 12: 378-392.
- MCCMAHON MA, WILSON IG.** The occurrence of enteric pathogens and *Aeromonas* species in organic vegetables. *Int J Food Microbiol.* 2001. 70: 155-162.
- MEIER-KOLTHOFF JP, AUCH AF, KLENK HP, GÖKER M.** Genome sequence-based species delimitation with confidence intervals and improved distance functions. *BMC Bioinf.* 2013. 14-60.
- MENDES-MARQUES CL, NASCIMENTO LM, THEOPHILO GN, HOFER E, MELO NETO OP, LEAL NC.** Molecular characterization of *Aeromonas* spp. and *Vibrio cholerae* O1 isolated during a diarrhea outbreak. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* 2012. 54: 299-304.
- MERINO S, GAVIN R, VILCHES S, SHAW JG, TOMAS JM.** A colonization factor (production of lateral flagella) of mesophilic *Aeromonas* spp. is inactive in *Aeromonas salmonicida* strains. *Appl Environ Microbiol.* 2003. 69: 663-667.
- MIGLIAVACCA R, DOCQUIER JD, MUGNAIOLI C, AMICOSANTE G, DATURI R, LEE K, ROSSOLINI GM, PAGANI L.** Simple microdilution test for detection of metallo-beta-lactamase production in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Clin Microbiol.* 2002. 40: 4388-4390.
- MILLER DL, RAJEEV S, BROOKINS M, COOK J, WHITTINGTON L, BALDWIN CA.** Concurrent infection with ranavirus, *Batrachochytrium dendrobatidis*, and *Aeromonas* in a captive anuran colony. *J Zoo Wildl Med.* 2008. 39: 445-449.
- MIÑANA-GALBIS D, FARFAN M, FUSTE MC, LOREN JG.** *Aeromonas molluscorum* sp. nov., isolated from bivalve molluscs. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2004. 54: 2073-2078.
- MIÑANA-GALBIS D, FARFAN M, FUSTE MC, LOREN JG.** *Aeromonas bivalvium* sp. nov., isolated from bivalve molluscs. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2007. 57: 582-587.
- MIÑANA-GALBIS D, FARFÁN M, LORÉN JG, FUSTÉ MC.** Biochemical identification and numerical taxonomy of *Aeromonas* spp. isolated from environmental and clinical samples in Spain. *J Appl Microbiol.* 2002. 93: 420-430.

- MIÑANA-GALBIS D, FARFAN M, LOREN JG, FUSTÉ MC.** Proposal to assign *Aeromonas diversa* sp. nov., as a novel species designation for *Aeromonas* group 501. Syst Appl Microbiol. 2010. 33: 15-19.
- MIÑANA-GALBIS D, URBIZU-SERRANO A, FARFÁN M, FUSTÉ MC, LORÉN JG.** Phylogenetic analysis and identification of *Aeromonas* species based on sequencing of the *cpn60* universal target. Int J Syst Evol Microbiol. 2009. 59: 1976-1983.
- MONAGHAN SF, ANJARIA D, MOHR A, LIVINGSTON DH.** Necrotizing fasciitis and sepsis caused by *Aeromonas hydrophila* after crush injury of the lower extremity. Surg Infect (Larchmt). 2008. 9: 459-467.
- MONFORT P, BALEUX B.** Distribution and survival of motile *Aeromonas* spp. in brackish water receiving sewage treatment effluent. Appl Environ Microbiol. 1991. 57: 2459-2467.
- MORANDI A, ZHAXYBAYEVA O, GOGARTEN JP, GRAF J.** Evolutionary and diagnostic implications of intragenomic heterogeneity in the 16S rRNA gene in *Aeromonas* strains. J Bacteriol. 2005. 187: 6561-6564.
- MOREIRA VF, LÓPEZ-SAN ROMÁN A.** Acute ileitis. Rev esp enferm dig. 2009. 101: 295. (Artículo en español).
- MORENO C, ROMERO J, ESPEJO RT.** Polymorphism in repeated 16S rRNA genes is a common property of type strains and environmental isolates of the genus *Vibrio*. Microbiol. 2002. 148: 1233-1239.
- MORINAGA Y, YANAGIHARA K, ARAKI N, HARADA Y, YAMADA K, AKAMATSU N, MATSUDA J, NISHINO T, HASEGAWA H, IZUMIKAWA K, KAKEYA H, YAMAMOTO Y, YASUOKA A, KOHNO S, KAMIHIRA S.** Clinical characteristics of seven patients with *Aeromonas* septicemia in a Japanese hospital. Tohoku J Exp Med. 2011. 225: 81-84.
- MORINAGA Y, YANAGIHARA K, LATIF EUGENIN FL, BEAZ-HIDALGO R, FIGUERAS MJ.** Identification errors of *Aeromonas* species: the considerable virulence of the new species *Aeromonas aquariorum*. Diag Microbiol Infect Dis. 2013. 76: 106-109.
- MUKHOPADHYAY C, BHARGAVA A, AYYAGARI A.** *Aeromonas hydrophila* and aspiration pneumonia: a diverse presentation. Yonsei Med J. 2003. 44: 1087-1090.

- MUKHOPADHYAY C, CHAWLA K, SHARMA Y, BAIRY I.** Emerging extra-intestinal infections with *Aeromonas hydrophila* in coastal region of southern Karnataka. J Postgrad Med. 2008. 54: 199-202.
- MUMCUOGLU KY.** Recommendations for the use of leeches in reconstructive plastic surgery. Evid Based Complement Alternat Med. 2014. 2014/205929.
- MUMCUOGLU KY, HUBERMAN L, COHEN R, TEMPER V, ADLER A, GALUN R, BLOCK C.** Elimination of symbiotic *Aeromonas* spp. from the intestinal tract of the medicinal leech, *Hirudo medicinalis*, using ciprofloxacin feeding. Clin Microbiol Infect. 2009. 16: 563-567.
- MUNIESA M, DE SIMON M, PRATS G, FERRER D, PAÑELLA H, JOFRE J.** Shiga toxin 2-converting bacteriophages associated with clonal variability in *Escherichia coli* O157:H7 strains of human origin isolated from a single outbreak. Infect Immun. 2003. 71: 4554-4562.
- MURATA H, YOSHIMOTO H, MASUO M, HITOSHI T, KITAMURA S, OTSUKA Y, MIURA Y.** Fulminant pneumonia due to *Aeromonas hydrophila* in a man with chronic renal failure and liver cirrhosis. Intern Med. 2001. 40: 118-123.
- MURRAY PR.** Matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry: usefulness for taxonomy and epidemiology. Clin Microbiol Infect. 2010. 16: 1626-1630.
- NAGAR V, SHASHIDHAR R, BANDEKAR JR.** Prevalence, characterization, and antimicrobial resistance of *Aeromonas* strains from various retail food products in Mumbai, India. J Food Sci. 2011. 76: 486-492.
- NAGAR V, SHASHIDHAR R, BANDEKAR JR.** Characterization of *Aeromonas* strains isolated from Indian foods using rpoD gene sequencing and whole cell protein analysis. World J Microbiol Biotechnol. 2013. 29: 745-752.
- NAGATA K, TAKESHIMA Y, TOMII K, IMAI Y.** Fulminant fatal bacteremic pneumonia due to *Aeromonas hydrophila* in a non-immunocompromised woman. Intern. Med. 2011. 50: 63-65.
- NAKASOME I, YAMANE N, MIYAZAKI T, ONAGA S, HIGA M.** *Aeromonas* species infection with severe clinical manifestation in Okinawa, Japan-association with gas gangrene. Rinsho Biseibutshu Jinsoku Shindan Kenkyukai Shi. 2001. 12: 15-21.

- NOVÁKOVÁ D, SVEC P, SEDLÁČEK I.** Characterization of *Aeromonas encheleia* strains isolated from aquatic environments in the Czech Republic. *Lett Appl Microbiol.* 2009. 48: 289-294.
- NAVARRO F, PEREZ-TRALLERO E, MARIMON JM, ALIAGA R, GOMARIZ M, MIRELIS B.** CMY-2-producing *Salmonella enterica*, *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella oxytoca*, *Proteus mirabilis* and *Escherichia coli* strains isolated in Spain (October 1999-December 2000). *J Antimicrob Chemother.* 2001. 48: 383-389.
- NAWAZ M, KHAN SA, KHAN AA, SUNG K, TRAN Q, KERDAHI K, STEELE R.** Detection and characterization of virulence genes and integrons in *Aeromonas veronii* isolated from catfish. *Food Microbiol.* 2010. 27: 327-331.
- NAWAZ M, SUNG K, KHAN SA, KHAN AA, STEELE R.** Biochemical and molecular characterization of tetracyclineresistant *Aeromonas veronii* isolates from catfish. *Appl Environ Microbiol.* 2006. 72: 6461-6466.
- NAYDUCH D, NOBLET GP, STUTZENBERGER FJ.** Vector potential of houseflies for the bacterium *Aeromonas caviae*. *Med Vet Entomol.* 2002. 16: 193-198.
- NEYTS K, HUYS G, UYTENDAELE M, SWINGS J, DEBEVERE J.** Incidence and identification of mesophilic *Aeromonas* spp. from retail foods. *Lett Appl Microbiol.* 2000a. 31: 359-363.
- NEYTS K, NOTEBAERT E, UYTENDAELE M, DEBEVERE J.** Modification of the bile salts-Irgasan-brilliant green agar for enumeration of *Aeromonas* species from food. *Int. J. Food Microbiol.* 2000b. 57: 211-218.
- NHUNG PH, HATA H, OHKUSU K, NODA M, SHAH MM, GOTO K, EZAKI T.** Use of the novel phylogenetic marker *dnaJ* and DNA-DNA hybridization to clarify interrelationships within the genus *Aeromonas*. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2007. 57: 1232-1237.
- NINET B, MONOD M, EMLER S, PAWLOWSKI J, METRAL C, ROHNER P, AUCKENTHALER R, HIRSCHER B.** Two different 16S rRNA genes in a mycobacterial strain. *J Clin Microbiol.* 1996. 34: 2531-2536.
- NOTEDERDAEME L, BIGAWA S, STEIGERWALT AG, BRENNER DJ, OLLEVIER F.** Numerical taxonomy and biochemical identification of fish associated motile *Aeromonas* spp. *Syst Appl Microbiol.* 1996. 19: 624-633.
- NÜESCH-INDERBINEN MT, HÄCHLER H, KAYSER FH.** Detection of genes coding for extended-spectrum SHV beta-lactamases in clinical isolates by a molecular

- genetic method, and comparison with the E test. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 1996.15: 398-402.
- NZEAKO B, OKAFOR N.** Bacterial enteropathogens and factors associated with seasonal episodes of gastroenteritis in Nsukka, Nigeria. *British J Biomed Science*. 2002. 59: 76-79.
- OAKEY HJ, ELLIS JT, GIBSON LF.** A biochemical protocol for the differentiation of current genomospecies of *Aeromonas*. *Zbl Bakteriologie*. 1996. 284: 32-46.
- OJEDA-VARGAS M, GONZÁLEZ-FERNÁNDEZ MA, ALFONSO-RODRÍGUEZ O, MONZÓN-MORENO C.** Urinary tract infection caused by bacteria of the genus *Aeromonas*. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2005. 23: 181-182.
- OKPOKWASILI GC.** *Aeromonas hydrophila*: variability of biochemical characteristics of environmental isolates. *J Basic Microbiol*. 1991. 31: 169-176.
- ORMEN O, GRANUM PE, LASSEN J, FIGUERAS MJ.** Lack of agreement between biochemical and genetic identification of *Aeromonas* spp. *APMIS*. 2005. 113: 203--207.
- OTT BM, RICKARDS A, GEHRKE L, RIO RV.** Characterization of shed medicinal leech mucus reveals a diverse microbiota. *Front Microbiol*. 2015. 5: 757.
- OTTAVIANI D, LEONI F, ROCCHIGIANI E, SANTARELLI S, MASINI L, D'ANNIBALE ML, PIANETTI A, CARRATURO A.** A severe case of *Aeromonas veronii* biovar *sobria* travellers diarrhoea characterized by *Vibrio parahaemolyticus* co-isolation. *J Med Microbiol*. 2013. 62: 161-164.
- OTTAVIANI D, PARLANI C, CITTERIO B, MASINI L, LEONI F, CANONICO C, SABATINI L, BRUSCOLINI F, PIANETTI A.** Putative virulence properties of *Aeromonas* strains isolated from food, environmental and clinical sources in Italy: a comparative study. *Int J Food Microbiol*. 2011. 144: 538-545.
- OTTAVIANI D, SANTARELLI S, BACCHIOCCHI S, MASINI L, GHITTINO C, BACCHIOCCHI I.** Occurrence and characterization of *Aeromonas* spp. in mussels from the Adriatic Sea. *Food Microbiol*. 2006. 23: 418-422.
- OUDEKIRK JP, BEKHOR D, TURETT GS, MURALI R.** *Aeromonas* meningitis complicating medicinal leech therapy. *Clin Infect Dis*. 2004. 38: 36-37.
- OVERMAN TL, KESSLER JF, SEABOLT JP.** Comparison of API 20E, API Rapid E, and API Rapid NFT for identification of members of the family *Vibrionaceae*. *J Clin Microbiol*. 1985. 22: 778-781.
- OVERMAN TL, OVERLEY JK.** Feasibility of same day identification of members of

- the family *Vibrionaceae* by the API 20E system. *J Clin Microbiol.* 1986. 23: 715-717.
- PABLOS M, HUYS G, CNOCKAERT M, RODRÍGUEZ-CALLEJA JM, OTERO A, SANTOS JA, GARCÍA-LÓPEZ ML.** Identification and epidemiological relationships of *Aeromonas* isolates from patients with diarrhea, drinking water and foods. *Int J Food Microbiol.* 2011. 147: 203-210.
- PABLOS, M., REMACHA, M.A., RODRÍGUEZ-CALLEJA, J.M., SANTOS, J.A., OTERO, A., AND GARCÍA-LÓPEZ, M.L.** Identity, virulence genes, and clonal relatedness of *Aeromonas* isolates from patients with diarrhoea and drinking water. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2010. 29: 1163–1172.
- PALUMBO SA, MAXINO F, WILLIAMS AC, BUCHANAN RL, THAYER DW.** Starch-Ampicillin Agar for the Quantitative Detection of *Aeromonas hydrophila*. *Appl Environ Microbiol.* 1985. 50: 1027-1030.
- PAMPÍN, F., BOU, G., GALEIRAS, R., FREIRE, D., BOUZA, M.T., AND ZÚÑIGA, M. DEL C.** *Aeromonas* and meningitis: An unusual presentation. *Neurocirugia (Astur).* 2012. 23: 200-202.
- PARK TS, OH SH, LEE EY, LEE TK, PARK KH, FIGUERAS MJ, CHANG CL.** Misidentification of *Aeromonas veronii* biovar *sobria* as *Vibrio alginolyticus* by the Vitek system. *Lett Appl Microbiol.* 2003. 37: 349-353.
- PARLAPANI FF, MEZITI A, KORMAS KA, BOZIARIS IS.** Indigenous and spoilage microbiota of farmed sea bream stored in ice identified by phenotypic and 16S rRNA gene analysis. *Food Microbiol.* 2013. 33: 85-89.
- PATEL KM, SVESTKA M, SINKIN J, RUFF P.** Ciprofloxacin-resistant *Aeromonas hydrophila* infection following leech therapy: A case report and review of the literature. *J Plast Reconstr Aesthet Surg.* 2013. 66: 20-22.
- PEARSON MD, HIRONO I, AOKI T, MIRANDA R, INGLIS V.** Virulence properties of motile aeromonads isolated from farmed frogs *Rana tigerina* and *R. rugulosa*. *Dis Aquat Organ.* 2000. 40: 185-193.
- PÉREZ L, ABARCA ML, LATIF-EUGENÍN F, BEAZ-HIDALGO R, FIGUERAS MJ, DOMINGO M.** *Aeromonas dhakensis* pneumonia and sepsis in a neonatal Risso's dolphin (*Grampus griseus*) from the Mediterranean Sea. *Dis Aquat Organ.* 2015. doi: 10.3354/dao02899 (EN PRENSA).
- PÉREZ-VALDESPINO A, CELESTINO-MANCERA M, VILLEGAS-RODRÍGUEZ VL, CURIEL-QUESADA E.** Characterization of mercury-resistant clinical *Aeromonas* species. *Braz J Microbiol.* 2014. 44: 1279-1283.

- PETTERSSON E, LUNDEBERG J, AHMADIAN A.** Generations of sequencing technologies. *Genomics*. 2009. 93: 105-111.
- PIANETTI A, SABATINI L, BRUSCOLINI F, CHIAVERINI F, CECCHETTI G.** Faecal contamination indicators, *Salmonella*, *Vibrio* and *Aeromonas* in water used for irrigation of agricultural products. *Epidemiol Infect*. 2004. 132: 231-238.
- PIDIYAR V, KAZNOWSKI A, NARAYAN NB, PATOLE M, SHOUCHE YS.** *Aeromonas culicicola* sp. nov., from the midgut of *Culex quinquefasciatus*. *Int J Syst Evol Microbiol*. 2002. 52: 1723-1728.
- POPOFF M, COYNAULT C, KRIEDJAN M, LEMELIN M.** Polynucleotide sequence relatedness among motile *Aeromonas* species. *Curr Microbiol*. 1981. 5: 109-114.
- POPOFF M, VÉRON M.** A taxonomic study of the *Aeromonas hydrophila*-*Aeromonas punctata* group. *J Gen Microbiol*. 1976. 94: 11-22.
- PRESLEY SM, RAINWATER TR, AUSTIN GP, PLATT SG, ZAK JC, COBB GP, MARSLAND EJ, TIAN K, ZHANG B, ANDERSON TA, ET AL.** Assessment of pathogens and toxicants in New Orleans, LA following Hurricane Katrina. *Environ Sci Technol*. 2006. 40: 468-474.
- PUAH SM, PUTHUCHEARY SD, LIEW FY, CHUA KH.** *Aeromonas aquariorum* clinical isolates: antimicrobial profiles, plasmids and genetic determinants. *Int J Antimicrob Agents*. 2013. 41: 281-284.
- PUTHUCHEARY SD, PUAH SM, CHUA KH.** Molecular characterization of clinical isolates of *Aeromonas* species from Malaysia. *PLoS One*. 2012. 7:e30205.
- PYLKKÖ P, POHJANVIRTA T, MADETOJA J, PELKONEN S.** Characterisation of atypical *Aeromonas salmonicida* infection in Arctic charr *Salvelinus alpinus* and European grayling *Thymallus thymallus*. *Dis Aquat Organ*. 2005. 66: 121-128.
- PYLKKÖ P, SUOMALAINEN LR, TIROLA M, VALTONEN ET.** Evidence of enhanced bacterial invasion during *Diplostomum spathaceum* infection in European grayling, *Thymallus thymallus* (L.). *J Fish Dis*. 2006. 29: 79-86.
- RADU S, AHMAD N, LING FH, REEZAL A.** Prevalence and resistance to antibiotics for *Aeromonas* species from retail fish in Malaysia. *Int J Food Microbiol*. 2003. 81: 261-266.
- RAHMAN M, HUYS G, KÜHN I, RAHMAN M, MÖLLBY R.** Prevalence and transmission of antimicrobial resistance among *Aeromonas* populations from a

- duckweed aquaculture based hospital sewage water recycling system in Bangladesh. Antonie Van Leeuwenhoek. 2009. 96: 313-321.
- RAZZOLINI MT, DI BARI M, SANCHEZ PS, ZANOLI MA.** *Aeromonas* detection and their toxins from drinking water from reservoirs and drinking fountains. J Water Health. 2008. 6: 117-123.
- B.O.E. 294/2007: Real Decreto 1620/2007**, de 7 de diciembre, por el que se establece el régimen jurídico de la reutilización de las aguas depuradas. pp. 50639-50661.
- REITH ME, SINGH RK, CURTIS B, BOYD JM, BOUEVITCH A, KIMBALL J, MUNHOLLAND J, MURPHY C, SARTY D, WILLIAMS J, NASH JH, JOHNSON SC, BROWN LL.** The genome of *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida* A449: Insights into the evolution of a fish pathogen. BMC Genomics. 2008. 18: 427.
- RENAULD F, FRENEY J, BOEUFGRAS JM, MONGET D, SEDAILLAN A, FLEURETTE J.** Carbon substrate assimilation patterns of clinical and environmental strains of *Aeromonas hydrophila*, *Aeromonas sobria* and *Aeromonas caviae* observed with a micromethod. Zentralbl Bakteriol Hyg A. 1998. 269: 323-330.
- RHODES MW, KATOR H, KOTOB S, VAN BERKUM P, KAATTARI I, VOGELBEIN W, QUINN F, FLOYD MM, BUTLER WR, OTTINGER CA.** *Mycobacterium shottsii* sp. nov., a slowly growing species isolated from Chesapeake Bay striped bass (*Morone saxatilis*). Int J Syst Evol Microbiol. 2003. 53: 421-424.
- RICHTER M, ROSSELLÓ-MÓRA R.** Shifting the genomic gold standard for the prokaryotic species definition. Proc Natl Acad Sci USA. 2009. 106: 19126-19131.
- ROBERTS MT, ENOCH DA, HARRIS KA, KARAS JA.** *Aeromonas veronii* biovar *sobria* bacteraemia with septic arthritis confirmed by 16S rDNA PCR in an immunocompetent adult. J Med Microbiol. 2006. 55: 241-243.
- RODRÍGUEZ LM, KONSTATINIDIS KT.** Bypassing cultivation to identify bacterial species. Microbe. 2014. 9: 111-118.
- RODRÍGUEZ-CALLEJA JM, GARCÍA-LÓPEZ I, GARCÍA-LÓPEZ ML, SANTOS JA, OTERO A.** Rabbit meat as a source of bacterial foodborne pathogens. J Food Prot. 2006. 69: 1106-1112.
- RODRÍGUEZ-SANTIAGO B, ARMENGOL L.** Next generation sequencing technology in pre- and postnatal genetic diagnosis. Diagn Prenat. 2012. 23: 56-66.
- ROGER F, LAMY B, JUMAS-BILAK E, KODJO A, COLBVH STUDY GROUP, MARCHANDIN H.** Ribosomal multi-operon diversity: an original perspective on



the genus *Aeromonas*. PLoS One. 2012a. 7:e46268.

**ROGER F, MARCHANDIN H, JUMAS-BILAK E, KODJO A, COLBVH STUDY GROUP, LAMY B.** Multilocus genetics to reconstruct aeromonads evolution. BMC Microbiol. 2012b. 12: 62.

**ROSSELLÓ-MÓRA R.** DNA-DNA reassociation methods applied to microbial taxonomy and their critical evaluation. En molecular identification, systematics, and population structure of prokaryotes. Ed. Stackebrandt E. SprigerVerlag. Alemania. 2006. pp. 23-50.

**ROSSELLÓ-MÓRA R, AMANN R.** The species concept for prokaryotes. FEMS Microbiol Rev. 2001. 25: 39-67.

**SAAVEDRA MJ, FIGUERAS MJ, MARTÍNEZMURCIA AJ.** Updated phylogeny of the genus *Aeromonas*. Int J Syst Evol Microbiol. 2006. 56: 2481-2487.

**SAHA P, CHAKRABARTI T.** *Aeromonas sharmana* sp. nov., isolated from a warm spring. Int J Syst Evol Microbiol. 2006. 56: 1905-1909.

**SAHIN I, BARUT HS.** Quinolone-resistant *Aeromonas hydrophila* peritonitis in a CAPD patient. Clin Nephrol. 2010. 73: 241-243.

**SAINT PIERRE-BONACCIO D, AMIR H, PINEAU R, LEMRISS S, GOODFELLOW M.** *Streptomyces ferralitis* sp. nov., a novel streptomycete isolated from a NewCaledonian ultramafic soil. Int J Syst Evol Microbiol. 2004. 54: 2061-2065.

**SAITOU N, NEI M.** The neighbour joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. Mol Biol Evol. 1987. 4: 406-425.

**SANGER F, NICKLEN S, COULSON AR.** DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. Proc Natl Acad Sci USA. 1977. 74: 5463-5467.

**SARTOR C, BORNET C, GUINARD D, FOURNIER PE.** Transmission of *Aeromonas hydrophila* by leeches. Lancet. 2013. 381: 1686.

**SARTOR C, LIMOUZIN-PEROTTI F, LEGRE R, CASANOVA D, BONGRAND MC, SAMBUC R, DRANCOURT M.** Nosocomial infections with *Aeromonas hydrophila* from leeches. Clin Infect Dis. 2002. 35:e1-e5.

**SCHNABL SM, KUNTZ C, UNGLAUB F, POLYKANDRIOTIS E, HORCH RE, AND DRAGU A.** Acute postoperative infection with *Aeromonas hydrophila* after using medical leeches for treatment of venous congestion. Arch Orthop Trauma Surg. 2010. 130: 1323-1328.

**SCOARIS DO, COLACITE J, NAKAMURA CV, UEDANAKAMURA T, DE-**

- ABREUFILHO BA, DIASFILHO BP.** Virulence and antibiotic susceptibility of *Aeromonas* spp. isolated from drinking water. *Antonie van Leeuwenhoek*. 2008. 93: 111-122.
- SCORTICHINI M, MARCELLETTI S, FERRANTE P, FIRRAO G.** A Genomic redefinition of *Pseudomonas avellanae* species. *PLoS One*. 2013. 8:e75794.
- SECHI LA, DERIU A, FALCHI MP, FADDA G, ZANETTI S.** Distribution of virulence genes in *Aeromonas* spp. isolated from Sardinian waters and from patients with diarrhoea. *J Appl Microbiol*. 2002. 92: 221-227.
- SEDLÁČEK I, KREJČÍ E, ANDĚLOVÁ A, SEDLÁČKOVÁ M, PORAZILOVÁ I, HOLOCHOVÁ P.** *Aeromonas hydrophila* subsp. *dhakensis* a causative agent of gastroenteritis imported into the Czech Republic. *Ann Agric Environ Med*. 2012. 19: 409-413.
- SENEROVICH Y, GERSHTEIN Y, HALEWA E, HALPERN M.** *Vibrio cholerae* and *Aeromonas*: do they share a mutual host?. *ISME J*. 2008. 2: 276-283.
- SENEROVICH Y, SHIFRA KD, VAINBLAT I, BLAU D, IZHAKI I, HALPERN M.** A molecular study on the prevalence and virulence potential of *Aeromonas* spp. recovered from patients suffering from diarrhoea in Israel. *PLoS One*. 2012. 7:e3007.
- SENG P, DRANCOURT M, GOURIET F, LA SCOLA B, FOURNIER PE, ROLAIN JM, RAOULT D.** Ongoing revolution in bacteriology: routine identification of bacteria by matrix-assisted laser desorption ionization time of flight mass spectrometry. *Clin Infect Dis*. 2009. 49: 543-551.
- SEPE A, BARBIERI P, PEDUZZI R, DEMARTA A.** Evaluation of *recA* sequencing for the classification of *Aeromonas* strains at the genotype level. *Lett Appl Microbiol*. 2008. 46: 439-444.
- SESHADRI R, JOSEPH SW, CHOPRA AK, ET AL.** Genome sequence of *Aeromonas hydrophila* ATCC 7966T: jack of all trades. *J Bacteriol*. 2006. 188: 8272-8282.
- SHAK JR, WHITAKER JA, RIBNER BS, BURD EM.** Aminoglycoside-resistant *Aeromonas hydrophila* as part of a polymicrobial infection following a traumatic fall into freshwater. *J Clin Microbiol*. 2011. 49: 1169-1170.
- SHEPPARD SK, JOLLEY KA, MAIDEN MC.** A Gene-By-Gene Approach to Bacterial Population Genomics: Whole Genome MLST of *Campylobacter*. *Genes (Basel)*. 2012. 3: 261-277.

- SHERRY NL, PADIGLIONE AA, SPELMAN DW, CLELAND H.** Microbiology of wildfire victims differs significantly from routine burns patients: Data from an Australian wildfire disaster. *Burns*. 2013. 39: 331-334.
- SHIN HB, YOON J, LEE Y, KIM MS, LEE K.** Comparison of MALDI-TOF MS, housekeeping gene sequencing, and 16S rRNA gene sequencing for identification of *Aeromonas* clinical isolates. *Yonsei Med J*. 2015. 56: 550-555.
- SHIN GW, YOU MJ, CHO HS, YI SW, LEE CS.** Severe sepsis due to *Aeromonas aquariorum* in a patient with liver cirrhosis. *Jpn J Infect Dis*. 2013. 66: 519-522.
- SHIZUMA T, TANAKA C, MORI H, FUKUYAMA N.** Investigation of Bacteremia due to *Aeromonas* species and comparison with that due to enterobacteria in patients with liver cirrhosis. *Gastroenterol Res Pract*. 2011. 2011: 930826.
- SCHUBERT RH, HEGAZI M.** *Aeromonas eucrenophila* species nova *Aeromonas caviae* a later and illegitimate synonym of *Aeromonas punctata*. *Zentralbl Bakteriell Mikrobiol Hyg A*. 1988. 268: 34-39.
- SIDDALL ME, WORTHEN PL, JOHNSON M, GRAF J.** Novel role for *Aeromonas jandaei* as a digestive tract symbiont of the North American medicinal leech. *Appl Environ Microbiol*. 2007. 73: 655-658.
- SKWOR T, SHINKO J, AUGUSTYNIAK A, GEE C, ANDRASO G.** *Aeromonas hydrophila* and *Aeromonas veronii* predominate among potentially pathogenic ciprofloxacin- and tetracycline-resistant *Aeromonas* isolates from Lake Erie. *Appl Environ Microbiol*. 2014. 80: 841-848.
- SMITH KF, SCHMIDT V, ROSEN GE, AMARAL-ZETTLER L.** Microbial diversity and potential pathogens in ornamental fish aquarium water. *PLoS One*. 2012. 7:e39971.
- SOLER L, FIGUERAS MJ, CHACÓN MR, GUARRO J, MARTÍNEZ-MURCIA AJ.** Comparison of three molecular methods for typing *Aeromonas popoffii* isolates. *Antonie van Leeuwenhoek*. 2003a. 83: 341-349.
- SOLER L, FIGUERAS MJ, CHACÓN MR, VILA J, MARCO F, MARTÍNEZ-MURCIA AJ, GUARRO J.** Potential virulence and antimicrobial susceptibility of *Aeromonas popoffii* recovered from freshwater and seawater. *FEMS Immun Med Microbiol*. 2002. 32: 243-247.
- SOLER L, MARCO F, VILA J, CHACÓN MR, GUARRO J, FIGUERAS MJ.** Evaluation of two miniaturized systems, microscan W/A and BBL crystal E/NF, for identification of clinical isolates of *Aeromonas* spp. *J Clin Microbiol*. 2003b. 41:

57325734.

- SOLER L, YAÑEZ MA, CHACÓN MR, AGUILERA-ARREOLA MG, CATALÁN V, FIGUERAS MJ, MARTÍNEZ-MURCIA AJ.** Phylogenetic analysis of the genus *Aeromonas* based on two housekeeping genes. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2004. 54: 1511-1519.
- SOLTANDALLAL MM, MOEZARDALAN K.** *Aeromonas* spp associated with children's diarrhoea in Tehran: a casecontrol study. *Ann Trop Paediatr.* 2004. 24: 45-51.
- SOOD S, NERURKAR V.** Fatal necrotizing soft tissue infection by *Aeromonas hydrophila*. *J Clin Diagn Res.* 2014. 8: DD06-DD07.
- SORIANO-VARGAS E, CASTRO-ESCARPULLI G, AGUILERA-ARREOLA MG, VEGA-CASTILLO F, SALGADO-MIRANDA C.** Aislamiento e identificación de *Aeromonas bestiarum* a partir de carpa común de cultivo (*Cyprinus carpio* L.) procedentes de Santa María Chapa de Mota, Estado de México, México. *Vet México.* 2010. 41: 111-115.
- SOTO-RODRIGUEZ SA, CABANILLAS-RAMOS J, ALCARAZ U, GOMEZ-GIL B, ROMALDE JL.** Identification and virulence of *Aeromonas dhakensis*, *Pseudomonas mosselii* and *Microbacterium paraoxydans* isolated from Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*, cultivated in Mexico. *J Appl Microbiol.* 2013. 115: 654-662.
- SPADARO S, BERSELLI A, MARANGONI E, ROMANELLO A, COLAMUSSI MV, RAGAZZI R, ZARDI S, VOLTA CA.** *Aeromonas sobria* necrotizing fasciitis and sepsis in an immunocompromised patient: a case report and review of the literature. *J Med Case Rep.* 2014. 8: 315.
- SPELDOOREN V, HEYM B, LABIA R, NICOLAS-CHANOINE MH.** Discriminatory detection of inhibitor-resistant beta-lactamases in *Escherichia coli* by single-strand conformation polymorphism-PCR. *Antimicrob Agents Chemother.* 1998. 42: 879-884.
- SPINALI S, VAN BELKUM A, GOERING RV, GIRARD V, WELKER M, VAN NUENEN M, PINCUS DH, ARSAC M, DURAND G.** Microbial typing by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry: do we need guidance for data interpretation?. *J Clin Microbiol.* 2015. 53: 760-765.
- STACKEBRANDT E, EBERS J.** Taxonomic parameters revisited: tarnished gold standards. *Microbiol Today.* 2006. 33: 152-155.
- STACKEBRANDT E, SCHUMANN P, SCHULER E, HIPPE H.** Reclassification of

- Desulfotomaculum auripigmentum* as *Desulfosporosinus auripigmenti* corrig., comb. nov. Int J Syst Evol Microbiol. 2003. 53: 1439-1443.
- STACKEBRANDT E, FREDERIKSEN W, GARRITY GM, GRIMONT PAD, KÄMPFER P, MAIDEN MCJ, NESME X, ROSSELLÓMÓRA R, SWINGS J, TRÜPER HG, VAUTERIN L, WARD AC, WHITMAN WB.** Report of the ad hoc committee for the re-evaluation of the species definition in bacteriology. Int.J Syst Evol Microbiol. 2002. 52: 1043-1047.
- STACKEBRANDT E, GOEBEL BM.** Taxonomic note: a place for DNA-DNA reassociation and 16S rRNA sequences analysis in the present species definition. Int J Syst Bacteriol. 1994. 44: 846-849.
- STAINER RY.** A note on the taxonomy of *P. hydrophilus*. J Bacteriol. 1943. 46: 213--214.
- STEER A, DALEY AJ, CURTIS N.** Suppurative sequelae of symbiosis. The Lancet. 2005. 365: 188.
- SU SY, CHAO CM, LAI CC.** *Aeromonas* bacteremia in southern Taiwan. Scand J Infect Dis. 2012. 45: 728.
- SUREK M, VIZZOTTO BS, SOUZA EM, PEDROSA FO, DALLAGASSA CB, FARAH SM, FADEL-PICHETH CM.** Identification and antimicrobial susceptibility of *Aeromonas* spp. isolated from stool samples of Brazilian subjects with diarrhoea and healthy controls. J Med Microbiol. 2010. 59: 373-374.
- SVENUNGSSON B, LAGERGREN A, EKWALL E, EVENGÅRD B, HEDLUND KO, KÄRNELL A, LÖFDAHL S, SVENSSON L, WEINTRAUB A.** Enteropathogens in adult patients with diarrhea and healthy control subjects: a 1-year prospective study in a Swedish clinic for infectious diseases. Clin Infect Dis. 2000. 30: 770-778.
- SZCZUKA E, KAZNOWSKI A.** Typing of clinical and environmental *Aeromonas* sp. strains by random amplified polymorphic DNA PCR, repetitive extragenic palindromic PCR, and enterobacterial repetitive intergenic consensus sequence PCR. J Clin Microbiol. 2004. 42: 220-228.
- TAMURA K, PETERSON D, PETERSON N, STECHER G, NEI M, KUMAR S.** MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. Mol Biol Evol. 2011. 28: 2731-2739.
- TAN WS, YIN WF, CHAN KG.** Insights into the quorum-sensing activity in

- Aeromonas hydrophila* strain M013 as revealed by whole-genome sequencing. *Genome Announc.* 2015a. 3:e01372-14.
- TAN WS, YIN WF, CHANG CY, CHAN KG.** Whole-genome sequencing analysis of quorum-sensing *Aeromonas hydrophila* strain M023 from freshwater. *Genome Announc.* 2015b. 3:e01548-14.
- TANG HJ, LAI CC, LIN HL, CHAO CM.** Clinical manifestations of bacteremia caused by *Aeromonas* species in southern Taiwan. *PLoS One.* 2014. 9:e91642.
- TENA D, ASPÍROZ C, FIGUERAS MJ, GONZÁLEZ-PRAETORIUS A, ALDEA MJ, ALPERÍ A, BISQUERT J.** Surgical site infection due to *Aeromonas* species: report of nine cases and literature review. *Scand J Infect Dis.* 2009. 41: 164-170.
- TENA D, GONZÁLEZ-PRAETORIUS A, GIMENO C, PÉREZ-POMATA MT, BISQUERT J.** Extraintestinal infection due to *Aeromonas* spp.: review of 38 cases. *Enf Inf Microbiol Clin.* 2007. 25: 235-241.
- THOMPSON JD, HIGGINS DG, GIBSON TJ.** CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, positionspecific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* 1994. 22: 4673-4680.
- TREASURER JW, BIRKBECK TH, LAIDLER LA, COX DI.** Atypical *Aeromonas salmonicida* infection in naturally and laboratory challenged farmed haddock, *Melanogrammus aeglefinus* (L.). *J Fish Dis.* 2007. 30: 313-318.
- TSAI YH, HSU RW, HUANG TJ, HSU WH, HUANG KC, LI YY, PENG KT.** Necrotizing soft-tissue infections and sepsis caused by *Vibrio vulnificus* compared with those caused by *Aeromonas* species. *J Bone Joint Surg Am.* 2007. 89: 631-636.
- TSAI YH, HUANG KC, HUANG TJ, HSU WH.** Case reports: fatal necrotizing fasciitis caused by *Aeromonas sobria* in two diabetic patients. *Clin Orthop Relat Res.* 2009. 467: 846-849.
- TSAI MS, KUO CY, WANG MC, WU HC, CHIEN CC, LIU JW.** Clinical features and risk factors for mortality in *Aeromonas* bacteremic adults with hematologic malignancies. *J Microbiol Immunol Infect.* 2006. 39: 150-154.
- UEDA K, SEKI T, KUDO T, YOSHIDA T, KATAOKA M.** Two distinct mechanisms cause heterogeneity of 16S rRNA. *J Bacteriol.* 1999. 181: 78-82.
- VALDES N, ESPINOZA C, SANHUEZA L, GONZALEZ A, CORSINI G, TELLO M.** Draft genome sequence of the Chilean isolate *Aeromonas salmonicida* strain CBA100. *FEMS Microbiol Lett.* 2015. 362: pii:fnu062.

- VALLY H, WHITTLE A, CAMERON S, DOWSE GK, WATSON T.** Outbreak of *Aeromonas hydrophila* wound infections associated with mud football. Clin Infect Dis. 2004. 38: 1084-1089.
- VANDAMME P, POT B, GILLIS M, DE VOS P, KERSTERS K, SWINGS J.** Polyphasic taxonomy, a consensus approach to bacterial systematics. Microbiol Rev. 1996. 60: 407-438.
- VANDEWALLE JL, GOETZ GW, HUSE SM, MORRISON HG, SOGIN ML, HOFFMANN RG, YAN K, MCLELLAN SL.** *Acinetobacter*, *Aeromonas* and *Trichococcus* populations dominate the microbial community within urban sewer infrastructure. Environ Microbiol. 2012. 14: 2538-2552.
- VASQUEZ A, MOLIN G, PETTERSSON B, ANTONSSON M, AHRNE S.** DNA-based classification and sequence heterogeneities in the 16S rRNA genes of *Lactobacillus casei/paracasei* and related species. Syst Appl Microbiol. 2005. 28: 430441.
- VÁVROVÁ A, BALÁŽOVÁ T, SEDLÁČEK I, TVRZOVÁ L, ŠEDO O.** Evaluation of the MALDI-TOF MS profiling for identification of newly described *Aeromonas* spp. Folia Microbiol (Praha). 2015. 60: 375-383.
- VEGA-SÁNCHEZ V, LATIF-EUGENÍN F, SORIANO-VARGAS E, BEAZ-HIDALGO R, FIGUERAS MJ, AGUILERA-ARREOLA MG, CASTRO-ESCARPULLI G.** Re-identification of *Aeromonas* isolates from rainbow trout and incidence of class 1 integron and  $\beta$ -lactamase genes. Vet Microbiol. 2014. 172: 528-533.
- VERSALOVIC J, KOEUTH T, LUPSKI JR.** Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes. Nucleic Acids Res. 1991. 19: 6823-6831.
- VILA J, RUIZ J, GALLARDO F, MARTHA V, LARA S, FIGUERAS MJ, GASCON J.** *Aeromonas* spp. and traveler's diarrhea: clinical features and antimicrobial resistance. Emerg Infect Dis. 2003. 9: 552-555.
- VILCHES S, URGELL C, MERINO S, CHACÓN M, SOLER L, CASTRO-ESCARPULLI G, FIGUERAS MJ, TOMÁS JM.** Complete type III secretion system of a mesophilic *Aeromonas hydrophila* strain. Appl Environ Microbiol. 2004. 70: 6914-6919.
- VILCHES S, WILHELMS M, YU HB, LEUNG KY, TOMÁS JM, MERINO S.** *Aeromonas hydrophila* AH-3 AexT is an ADP ribosylating toxin secreted through

- the type III secretion system. *Microb Pathog.* 2008. 44: 112.
- VILLARI P, CRISPINO M, MONTUORI P, BOCCIA S.** Molecular typing of *Aeromonas* isolates in natural mineral waters. *Appl Environ Microbiol.* 2003. 69: 697701.
- VINCENT AT, TANAKA KH, TRUDEL MV, FRENETTE M, DEROME N, CHARETTE SJ.** Draft genome sequences of two *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida* isolates harboring plasmids conferring antibiotic resistance. *FEMS Microbiol Lett.* 2015. 362.
- VIVAS J, SÁA AI, TINAJAS A, BARBEYTO L, RODRÍGUEZ LA.** Identification of motile *Aeromonas* strains with the Microscan walkaway system in conjunction with the combo negative type 1S panels. *Appl Environ Microbiol.* 2000. 66: 1764-1766.
- WANG G, CLARK CG, RODGERS FG.** Detection in *Escherichia coli* of the genes encoding the major virulence factors, the genes defining the O157:H7 serotype, and components of the type 2 Shiga toxin family by multiplex PCR. *J Clin Microbiol.* 2002. 40: 3613-3619.
- WANG EW, WARREN DK, FERRIS VM, CASABAR E, NUSSENBAUM B.** Leech-transmitted ciprofloxacin-resistant *Aeromonas hydrophila*. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg.* 2011. 137: 190-193.
- WAYNE LG, BRENNER DJ, COLWELL RR, ET AL.** International committee on systematic bacteriology. Report of the *ad hoc* committee on reconciliation of approaches to bacterial systematics. *Int J Syst Bacteriol.* 1987. 37: 463-464.
- WHITAKER IS, JOSTY IC, HAWKINS S, AZZOPARDI E, NADERI N, GRAF J, DAMARIS L, LINEAWEAVER WC, KON M.** Medicinal leeches and the microsurgeon: a four-year study, clinical series and risk benefit review. *Microsurgery.* 2011. 31: 281-287.
- WOESE CR.** Bacterial evolution. *Microbiol Rev.* 1987. 51: 221-271.
- WOODRING J, SRIJAN A, PURIPUNYAKOM P, ORANSATHID W, WONGSTITWILAIROONG B, MASON C.** Prevalence and antimicrobial susceptibilities of *Vibrio*, *Salmonella*, and *Aeromonas* isolates from various uncooked seafoods in Thailand. *J Food Prot.* 2012. 75: 41-47.
- WU CJ, LEE HC, CHANG TT, CHEN CY, LEE NY, CHANG CM, SHEU BS, CHENG PN, SHIH HI, KO WC.** *Aeromonas* spontaneous bacterial peritonitis: a highly fatal infectious disease in patients with advanced liver cirrhosis. *J Formos Med Assoc.* 2009. 108: 293-300.



- WU CJ, CHEN PL, HSUEH PR, CHANG MC, TSAI PJ, SHIH HI, WANG HC, CHOU PH, KO WC.** Clinical implications of species identification in monomicrobial *Aeromonas* bacteremia. PLoS One. 2015. 10:e0117821.
- WU CJ, CHEN PL, TANG HJ, CHEN HM, TSENG FC, SHIH HI, HUNG YP, CHUNG CH, KO WC.** Incidence of *Aeromonas* bacteremia in southern Taiwan: *Vibrio* and *Salmonella* bacteremia as comparators. J Microbiol Immunol Infect. 2012a. 47: 145-148.
- WU CJ, CHUANG YC, LEE MF, LEE CC, LEE HC, LEE NY, CHANG CM, CHEN PL, LIN YT, YAN JJ, KO WC.** Bacteremia due to extended-spectrum- $\beta$ -lactamase-producing *Aeromonas* spp. at a medical center in Southern Taiwan. Antimicrob Agents Chemother. 2011. 55: 5813-5818.
- WU CJ, TSAI PJ, CHEN PL, WU IC, LIN YT, CHEN YH, WANG LR, KO WC.** *Aeromonas aquariorum* septicemia and enterocolitis in a cirrhotic patient. Diagn Microbiol Infect Dis. 2012b. 74: 406-408.
- WU CJ, WANG HC, CHEN PL, CHANG MC, SUNNY SUN H, CHOU PH, KO WC.** AQU-1, a chromosomal class C  $\beta$ -lactamase, among clinical *Aeromonas dhakensis* isolates: distribution and clinical significance. Int J Antimicrob Agents. 2013. 42: 456-461.
- WU CJ, WANG HC, CHEN CS, SHU HY, KAO AW, CHEN PL, KO WC.** Genome sequence of a novel human pathogen, *Aeromonas aquariorum*. J Bacteriol. 2012c. 194: 4114-4115.
- WU CJ, WU JJ, YAN JJ, LEE HC, LEE NY, CHANG CM, SHIH HI, WU HM, WANG LR, KO WC.** Clinical significance and distribution of putative virulence markers of 116 consecutive clinical *Aeromonas* isolates in southern Taiwan. J Infect. 2007. 54: 151-158.
- YANG X, YANG QQ, GUO QY, YI CY, MAO HP, LIN JX, JIANG ZP, YU XQ.** *Aeromonas salmonicida* peritonitis after eating fish in a patient undergoing CAPD. Perit Dial Int. 2008. 28: 316-317.
- YANG JL, ZHAN WB, ZHOU L, XING J.** Purification, virulence and characterization of an extracellular peptidase produced by *Aeromonas salmonicida* subsp. *masoucida* isolated from cultured sea cucumber *Apostichopus japonicus*. Dis Aquat Organ. 2008. 82: 223-229.
- YANO Y, HAMANO K, TSUTSUI I, AUE-UMNEOY D, BAN M, SATOMI M.** Occurrence, molecular characterization, and antimicrobial susceptibility of

- Aeromonas* spp. in marine species of shrimps cultured at inland low salinity ponds. Food Microbiol. 2015. 47: 21-27.
- YÁÑEZ MA, CATALÁN V, APRAIZ D, FIGUERAS MJ, MARTÍNEZ-MURCIA AJ.** Phylogenetic analysis of members of the genus *Aeromonas* based on *gyrB* gene sequences. Int J Syst Evol Microbiol. 2003. 53: 875-883.
- YASTI AC, OTAN E, DOGANAY M, KAMA NA.** *Aeromonas hydrophila* in a burn patient. J Burn Care Res. 2009. 30: 898-900.
- YE L, ZHANG T.** Pathogenic bacteria in sewage treatment plants as revealed by 454 pyrosequencing. Environ Sci Technol. 2011. 45: 7173-7179.
- YI SW, YOU MJ, CHO HS, LEE CS, KWON JK, SHIN GW.** Molecular characterization of *Aeromonas* species isolated from farmed eels (*Anguilla japonica*). Vet Microbiol. 2013. 164: 195-200.
- YÜCEL N, BALCI S.** Prevalence of *Listeria*, *Aeromonas*, and *Vibrio* species in fish used for human consumption in Turkey. J Food Prot. 2010. 73: 380-384.
- YÜCEL N, ERDOGAN S.** Virulence properties and characterization of aeromonads isolated from foods of animal origin and environmental sources. J Food Prot. 2010. 73: 855-860.
- ZHANG S, HAN B, GU J, WANG C, WANG P, MA Y, CAO J, HE Z.** Fate of antibiotic resistant cultivable heterotrophic bacteria and antibiotic resistance genes in wastewater treatment processes. Chemosphere. 2015. 135: 138-145.
- ZIEMKE F, HOFLE MG, LALUCAT J, ROSSELLÓ-MÓRA R.** Reclassification of *Shewanella putrefaciens* Owen's genomic group II as *Shewanella baltica* sp. nov. Int J Syst Bacteriol. 1998. 48: 179-186.



## **8. ANEXOS**



**Anexo 1. Cepas tipo y de referencia utilizadas en este trabajo.**

<b>Especie</b>	<b>Referencia</b>	<b>Otras designaciones</b>	<b>Origen</b>	<b>Autor</b>
<i>A. hydrophila</i>	CECT 839 <sup>T</sup>	ATCC 7966 <sup>T</sup>	Leche	Stainer, 1943
<i>A. salmonicida</i> subsp. <i>salmonicida</i>	CECT 894 <sup>T</sup>	ATCC 33658 <sup>T</sup>	Salmón	Griffin y col., 1953
<i>A. sobria</i>	CECT 4245 <sup>T</sup>	ATCC 43979 <sup>T</sup>	Pez	Popoff y Veron, 1981
<i>A. media</i>	CECT 4232 <sup>T</sup>	ATCC33907 <sup>T</sup>	Agua de piscifactoría	Allen y cols., 1983
<i>A. veronii</i>	CECT 4257 <sup>T</sup>	ATCC 35624 <sup>T</sup>	Espuito	Hickman-Brenner y cols., 1987
<i>A. caviae</i>	CECT 838 <sup>T</sup>	ATCC 15468 <sup>T</sup>	Cobaya	Schubert y Hegazi, 1988
<i>A. eucrenophila</i>	CECT 4224 <sup>T</sup>	ATCC 23309 <sup>T</sup>	Pez de agua dulce	Schubert y Hegazi, 1988
<i>A. schubertii</i>	CECT 4240 <sup>T</sup>	ATCC 43700 <sup>T</sup>	Absceso cutáneo	Hickman-Brenner y cols., 1988
<i>A. jandaei</i>	CECT 4228 <sup>T</sup>	ATCC 49568 <sup>T</sup>	Heces humanas	Carnahan y cols., 1991
<i>A. trota</i>	CECT 4255 <sup>T</sup>	ATCC 49657 <sup>T</sup>	Heces humanas	Carnahan y cols., 1991
<i>A. allossacharophila</i>	CECT 4199 <sup>T</sup>	ATCC 51208 <sup>T</sup>	Anguila	Martínez-Murcia y cols., 1992
<i>A. encheleia</i>	CECT 4342 <sup>T</sup>	ATCC 51929 <sup>T</sup>	Anguila	Esteve y cols., 1995
<i>A. bestiarum</i>	CECT 4227 <sup>T</sup>	ATCC 51108 <sup>T</sup>	Pez enfermo	Ali y cols., 1996
<i>A. popoffii</i>	CECT 5176 <sup>T</sup>	ATCC BAA-243 <sup>T</sup>	Agua potable	Huys y cols., 1997
<i>A. simiae</i>	IBS S-6874 <sup>T</sup>	CIP 107798 <sup>T</sup>	Heces de mono	Harf-Monteil y cols., 2004
<i>A. molluscorum</i>	CECT 5864 <sup>T</sup>	LMG 22214 <sup>T</sup>	Moluscos bivalvos	Miñana-Galvis y cols., 2004
<i>A. bivalvium</i>	CECT 7113 <sup>T</sup>	LMG 23376 <sup>T</sup>	Moluscos bivalvos	Miñana-Galvis y cols., 2007
<i>A. tecta</i>	CECT 7082 <sup>T</sup>	DSM 17300 <sup>T</sup>	Heces de niño con diarrea	Demarta y cols., 2008
<i>A. piscicola</i>	CECT 7443 <sup>T</sup>	LMG 24783 <sup>T</sup>	Pez enfermo	Beaz-Hidalgo y cols., 2009
<i>A. fluvialis</i>	CECT 7401 <sup>T</sup>	LMG 24681 <sup>T</sup>	Agua de río	Alperi y cols., 2010
<i>A. taiwanensis</i>	CECT 7403 <sup>T</sup>	LMG24683 <sup>T</sup>	Infección de herida	Alperi y cols., 2010
<i>A. sanarellii</i>	CECT 7402 <sup>T</sup>	LMG 24682 <sup>T</sup>	Infección de herida	Alperi y cols., 2010
<i>A. diversa</i>	CECT 4254 <sup>T</sup>	ATCC 43946 <sup>T</sup>	Infección de herida	Miñana-Galvis y cols., 2010
<i>A. rivuli</i>	CECT 7518 <sup>T</sup>	DSM 22539 <sup>T</sup>	Agua de río	Figueras y cols., 2011
<i>A. cavernicola</i>	CECT 7862 <sup>T</sup>	DSM 24474 <sup>T</sup>	Agua(arroyo en una caverna)	Martínez-Murcia y cols., 2012
<i>A. australiensis</i>	CECT 8023 <sup>T</sup>	LMG 26707 <sup>T</sup>	Agua (utilizada para riego)	Aravena-Román y cols., 2013
<i>A. dhakensis</i>	CECT 5744 <sup>T</sup>	LMG 19562 <sup>T</sup>	Heces de niño con diarrea	Beaz-Hidalgo y cols., 2013
<i>A. salmonicida</i> subsp. <i>achromogenes</i>	CECT 895 <sup>T</sup>	ATCC 33659 <sup>T</sup>	Trucha ( <i>Oncorhynchus mikyss</i> )	Smith, 1963
<i>A. salmonicida</i> subsp. <i>masoucida</i>	CECT 896 <sup>T</sup>	ATCC 27013 <sup>T</sup>	Sakuramasou ( <i>Oncorhynchus masou</i> )	Kimura, 1969
<i>A. salmonicida</i> subsp. <i>pectinolytica</i>	34MEL <sup>T</sup>	CECT 5752 <sup>T</sup>	Agua de río	Pavan y cols., 2000
<i>A. salmonicida</i> subsp. <i>smithia</i>	LMG 20223 <sup>T</sup>	CECT 5179 <sup>T</sup>	Ritulus ritulus (úlceras)	Austin y cols., 1989
<i>A. salmonicida</i> subsp. <i>pectinolytica</i>	93MEL	CECT 5753	Agua de río	Pavan y cols., 2000
<i>A. salmonicida</i> subsp. <i>pectinolytica</i>	85 MEL	LMG 19570	Agua de río	Pavan y cols., 2000
" <i>A. lusitana</i> "	MDC2473 <sup>T</sup>	CECT 7828 <sup>T</sup>	Agua potable	Martínez-Murcia y cols. <sup>a</sup>
<i>A. salmonicida</i>	LMG 18998	Figueras 220C	Exudado de herida	Figueras y cols. (2000) <sup>b</sup>
<i>A. salmonicida</i>	CECT 5209	Figueras 27	Agua de mar	Figueras y cols. (2000) <sup>b</sup>
<i>A. salmonicida</i>	CECT 5220	Figueras 105	Agua de mar	Figueras y cols. (2000) <sup>b</sup>

**Anexo 1 (continuación). Cepas tipo y de referencia utilizadas en este trabajo.**

<b>Especie</b>	<b>Referencia</b>	<b>Otras designaciones</b>	<b>Origen</b>	<b>Autor</b>
<i>A. salmonicida</i>	CECT 5230	Figueras 119P	Agua de pozo	Figueras y cols. (2000) <sup>b</sup>
<i>A. salmonicida</i>	CECT 5231	Figueras 122	Agua de tubería	Figueras y cols. (2000) <sup>b</sup>
<i>A. salmonicida</i>	CECT 5227	Figueras 117F	Mejillón ( <i>Mytilus edulis</i> )	Figueras y cols. (2000) <sup>b</sup>
<i>A. salmonicida</i>	CECT 5218	Figueras 93F	Tarta	Figueras y cols. (2000) <sup>b</sup>
<i>A. salmonicida</i>	CECT 5221	Figueras 106F	Tarta	Figueras y cols. (2000) <sup>b</sup>
<i>A. salmonicida</i>	CECT 5225	ATCC BAA-234	Mejillón	Figueras y cols. (2000) <sup>b</sup>
<i>A. salmonicida</i>	LMG 19037	ATCC BAA-233	Tarta	Figueras y cols. (2000) <sup>b</sup>
<i>A. salmonicida</i>	CECT 5249	Figueras 552	Agua	Figueras y cols. (2000) <sup>b</sup>
<i>A. bestiarum</i>	CECT 5238	Figueras 150P	Agua de pozo	Figueras y cols. (2000) <sup>b</sup>
<i>A. shubertii</i>	ATCC 43701	CDC 9180-81, LMG 13473	Piel	Hickman-Brenner y cols., 1988
<i>A. shubertii</i>	CECT 4243	ATCC 43945, CDC 2508-86	Herida	Hickman-Brenner y cols., 1988
<i>A. shubertii</i>	LMG 12655	CECT 4933, AMC 1108	Herida (pierna)	Joseph, 1987
<i>A. shubertii</i>	LMG 12668	CECT 4934, AMC 4396	Herida (pierna)	Joseph, 1987
<i>A. shubertii</i>	186	ND	Herida	Aravena-Román y cols., 2011, 2014
<i>A. simiae</i>	MDC 2374	ND	Heces de cerdo	ND
<i>A. diversa</i>	CECT 5178	ATCC 700064, CDC 2555-87	Herida (fractura)	Hickman-Brenner y cols., 1988
<i>Escherichia coli</i>	CECT 747	NCTC 10974	Heces de niño con diarrea	Rowe y cols., 1974
<i>Plesiomonas shigelloides</i>	CECT 597	NCTC CL Aer2/65	Heces humanas	Novak, 1984
<i>Pseudomas aeruginosa</i>	CECT 110 <sup>T</sup>	ATCC 10145 <sup>T</sup>	NF	Kavanagh, 1977
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	CECT 588	CCM 5937	Mejillón ( <i>Mytilus edulis</i> )	Kocur, 1984

ND: no disponible.<sup>a</sup>Esta especie se encuentra en proceso de descripción, <sup>b</sup>Extended method for discrimination of *Aeromonas* spp. by 16S rDNA RFLP analysis. Int J Syst Evol Microbiol. 2000 (50): 2069-73.

**Anexo 2A. Cepas de origen clínico re-identificadas mediante secuenciación del gen *rpoD*.**

Referencia URV	Referencia hospital	Hospital	Datos del paciente				Datos de la cepa			Identificación mediante secuenciación del gen <i>rpoD</i>
			Sexo	Edad	Signos/síntomas clínicos	Infección polimicrobiana	Método de identificación	origen	Identificación fenotípica	
2006-4153 (= AEB01)	2006-4153 (= AEB01)	Univetsitario de Nagasaki	M	35 años	Septicemia primaria	No	Vitek2	Sangre	<i>A. hydrophila</i>	<i>A. hydrophila</i>
2006-4830 (= AEB02)	2006-4830 (= AEB02)	Univetsitario de Nagasaki	M	79 años	Septicemia primaria	No	Vitek2	Sangre	<i>A. hydrophila</i>	<i>A. veronii</i>
2007-7042 (= AEB03)	2007-7042 (= AEB03)	Univetsitario de Nagasaki	M	76 años	Septicemia primaria	No	Vitek2	Sangre	<i>A. hydrophila</i>	<i>A. dkakensis</i>
2010-799 (= AEB04)	2010-799 (= AEB04)	Univetsitario de Nagasaki	M	78 años	Septicemia primaria	No	Vitek2	Sangre	<i>A. hydrophila</i>	<i>A. dkakensis</i>
2009-5574 (= AEB05)	2009-5574 (= AEB05)	Univetsitario de Nagasaki	H	89 años	Septicemia primaria	No	Vitek2	Sangre	<i>A. caviae</i>	<i>A. caviae</i>
2010-4072 (= AEB06) <sup>a</sup>	2010-4072 (= AEB06)	Univetsitario de Nagasaki	M	15 años	Colangitis y septicemia	No	Vitek2	Sangre	<i>A. veronii</i> bv <i>sobria</i>	<i>A. dkakensis</i>
2010-4243 (= AEB06R) <sup>a</sup>	2010-4243 (= AEB06R)	Univetsitario de Nagasaki	M	15 años	Septicemia primaria	No	Vitek2	Sangre	<i>A. veronii</i> bv <i>sobria</i>	<i>A. dkakensis</i>
54870	54870	Universitario Guadalajara	H	76 años	Infección de herida traumática	Si (+ <i>E. aerogenes</i> )	Vitek II	Herida	<i>A. hydrophila/cavie</i>	<i>A. caviae</i>
56574	56574	Universitario Guadalajara	H	77 años	Bacteremia	No	Vitek II	Sangre	<i>A. hydrophila/cavie</i>	<i>A. caviae</i>
59798	59798	Universitario Guadalajara	M	6 años	Gastroenteritis aguda	No	Vitek II	Heces Exudado peritoneal	<i>A. caviae</i>	<i>A. caviae</i>
64719	64719	Universitario Guadalajara	M	83 años	Peritonitis	Si (+ <i>E. coli</i> )	Vitek II		<i>A. sobria</i>	<i>A. veronii</i>
64571	64571	Universitario Guadalajara	M	3 años	Gastroenteritis	No	Vitek II	Heces	<i>A. hydrophila/cavie</i>	<i>A. caviae</i>
69986	69986	Universitario Guadalajara	M	81 años	Gastroenteritis	No	Vitek II	Heces	<i>A. hydrophila/cavie</i>	<i>A. caviae</i>
70793	70793	Universitario Guadalajara	H	11 años	Gastroenteritis	No	Vitek II	Heces	<i>A. hydrophila/cavie</i>	<i>A. caviae</i>
72705	72705	Universitario Guadalajara	H	56 años	Gastroenteritis	No	Vitek II	Heces	<i>A. hydrophila/cavie</i>	<i>A. caviae</i>
73022	73022	Universitario Guadalajara	M	9 meses	Gastroenteritis	No	Vitek II	Heces	<i>A. hydrophila/cavie</i>	<i>A. caviae</i>
74377	74377	Universitario Guadalajara	H	3 años	ITU + Otitis	No	Vitek II	Heces	<i>A. hydrophila/cavie</i>	<i>A. caviae</i>
74739	74739	Universitario Guadalajara	M	44 años	Gastroenteritis	No	Vitek II	Heces	<i>A. hydrophila/cavie</i>	<i>A. media</i>



**Anexo 2A (continuación 1). Cepas de origen clínico re-identificadas mediante secuenciación del gen *rpoD*.**

Referencia URV	Referencia hospital	Hospital	Datos del paciente				Datos de la cepa			Identificación mediante secuenciación del gen <i>rpoD</i>
			Sexo	Edad	Signos/síntomas clínicos	Infección polimicrobiana	Método de identificación	origen	Identificación fenotípica	
77177	77177	Universitario Guadalajara	M	8 años	Gastroenteritis	No	Vitek II	Heces	<i>A. sobria</i>	<i>A. veronii</i>
78001	78001	Universitario Guadalajara	M	22 meses	Gastroenteritis	Si (+ <i>Salmonellasp.</i> )	Vitek II	Heces	<i>A. hydrophila/cavie</i>	<i>A. caviae</i>
78812	78812	Universitario Guadalajara	M	7 meses	Gastroenteritis	No	Vitek II	Heces	<i>A. hydrophila/cavie</i>	<i>A. caviae</i>
79807	79807	Universitario Guadalajara	H	11 meses	Gastroenteritis	No	Vitek II	Heces	<i>A. hydrophila/cavie</i>	<i>A. caviae</i>
82083	82083	Universitario Guadalajara	H	10 meses	Gastroenteritis	No	Vitek II	Heces	<i>A. hydrophila/cavie</i>	<i>A. caviae</i>
84916	84916	Universitario Guadalajara	H	12 meses	Gastroenteritis	No	Vitek II	Heces	<i>A. hydrophila/cavie</i>	<i>A. caviae</i>
94917	94917	Universitario Guadalajara	H	12 meses	Gastroenteritis	No	Vitek II	Heces Aspirado de absceso hepático	<i>A. hydrophila/cavie</i>	<i>A. caviae</i>
85390	85390	Universitario Guadalajara	M	57 años	Absceso hepático	Si (+ <i>E. coli</i> )	Vitek II	Heces	<i>A. hydrophila/cavie</i>	<i>A. caviae</i>
86777	86777	Universitario Guadalajara	H	55 años	Gastroenteritis	No	Vitek II	Heces	<i>A. hydrophila/cavie</i>	<i>A. caviae</i>
88725	88725	Universitario Guadalajara	M	14 meses	Gastroenteritis	No	Vitek II	Heces	<i>A. hydrophila/cavie</i>	<i>A. caviae</i>
88913	88913	Universitario Guadalajara	M	64 años	Gastroenteritis	No	Vitek II	Heces	<i>A. hydrophila/cavie</i>	<i>A. caviae</i>
96132	96132	Universitario Guadalajara	H	84 años	Infección de herida quirúrgica	Si (+ <i>E. coli</i> )	Vitek II	Herida quirúrgica	<i>A. sobria</i>	<i>A. veronii</i>
95901	95901	Universitario Guadalajara	H	9 meses	Gastroenteritis	Si (+ <i>E. coli</i> )	Vitek II	Heces	<i>A. hydrophila/cavie</i>	<i>A. caviae</i>
96232	96232	Universitario Guadalajara	H	14 meses	Gastroenteritis	No	Vitek II	Heces	<i>A. hydrophila/cavie</i>	<i>A. caviae</i>
100234	100234	Universitario Guadalajara	H	91 años	Gastroenteritis	No	Vitek II	Heces	<i>A. hydrophila/cavie</i>	<i>A. caviae</i>
101620	101620	Universitario Guadalajara	M	87 años	Gastroenteritis	No	Vitek II	Heces	<i>A. sobria</i>	<i>A. veronii</i>
101429	101429	Universitario Guadalajara	M	11 años	Gastroenteritis	No	Vitek II	Heces	<i>A. sobria</i>	<i>A. caviae</i>

**Anexo 2A (continuación 2). Cepas de origen clínico re-identificadas mediante secuenciación del gen *rpoD*.**

Referencia URV	Referencia hospital	Hospital	Datos del paciente				Datos de la cepa			Identificación mediante secuenciación del gen <i>rpoD</i>
			Sexo	Edad	Signos/síntomas clínicos	Infección polimicrobiana	Método de identificación	origen	Identificación fenotípica	
107044	107044	Universitario Guadalajara	H	55 años	Gastroenteritis	No	Vitek II	Heces	<i>A. hydrophila/cavie</i>	<i>A. caviae</i>
52206	52206	Universitario Guadalajara	H	55 años	Gastroenteritis	No	Vitek II	Heces	<i>A. hydrophila/cavie</i>	<i>A. caviae</i>
73331	73331	Universitario Guadalajara	M	72 años	Gastroenteritis	No	Vitek II	Heces	<i>A. hydrophila/cavie</i>	<i>A. caviae</i>
108855	108855	Universitario Guadalajara	H	57 años	Gastroenteritis	No	Vitek II	Heces	<i>A. sobria</i>	<i>A. veronii</i>
109387	109387	Universitario Guadalajara	M	3 años	Gastroenteritis	No	Vitek II	Heces	<i>A. sobria</i>	<i>A. media</i>
111851	111851	Universitario Guadalajara	H	31 años	Gastroenteritis	Si (+ <i>S. enteritidis</i> )	Vitek II	Heces	<i>A. hydrophila/cavie</i>	<i>A. caviae</i>
111845	111845	Universitario Guadalajara	M	2 meses	Gastroenteritis	Si (+ <i>S. enteritidis</i> )	Vitek II	Heces	<i>A. hydrophila/cavie</i>	<i>A. caviae</i>
113634	113634	Universitario Guadalajara	M	31 años	Gastroenteritis	No	Vitek II	Heces	<i>A. sobria</i>	<b><i>Aeromonas sp. nov. 2</i></b>
114006	114006	Universitario Guadalajara	H	9 años	Gastroenteritis	No	Vitek II	Heces	<i>A. hydrophila/cavie</i>	<i>A. caviae</i>
114997	114997	Universitario Guadalajara	H	83 años	Gastroenteritis	No	Vitek II	Heces	<i>A. sobria</i>	<i>A. veronii</i>
119333	119333	Universitario Guadalajara	H	40 años	Gastroenteritis	No	Vitek II	Heces	<i>A. hydrophila/cavie</i>	<i>A. caviae</i>
120238	120238	Universitario Guadalajara	M	2 meses	Gastroenteritis	No	Vitek II	Heces	<i>A. hydrophila/cavie</i>	<i>A. caviae</i>
122593	122593	Universitario Guadalajara	M	22 meses	Gastroenteritis	No	Vitek II	Heces	<i>A. hydrophila/cavie</i>	<i>A. caviae</i>
122647	122647	Universitario Guadalajara	H	24 meses	Gastroenteritis	Si (+ <i>C. jejuni</i> )	Vitek II	Heces	<i>A. hydrophila/cavie</i>	<i>A. caviae</i>
123384	123384	Universitario Guadalajara	H	77 años	Gastroenteritis	Si (+ <i>C. jejuni</i> )	Vitek II	Heces	<i>A. hydrophila/cavie</i>	<i>A. veronii</i>
124822	124822	Universitario Guadalajara	H	88 años	Gastroenteritis	Si (+ <i>C. difficile</i> )	Vitek II	Heces	<i>A. hydrophila/cavie</i>	<i>A. caviae</i>
126045	126045	Universitario Guadalajara	M	18 meses	Gastroenteritis	Si (+ <i>C. jejuni</i> )	Vitek II	Heces	<i>A. sobria</i>	<i>A. veronii</i>
128177	128177	Universitario Guadalajara	H	10 años	Gastroenteritis	No	Vitek II	Heces	<i>A. hydrophila/cavie</i>	<i>A. dkakensis</i>

**Anexo 2A (continuación 3). Cepas de origen clínico re-identificadas mediante secuenciación del gen *rpoD*.**

Referencia URV	Referencia hospital	Hospital	Datos del paciente				Datos de la cepa			Identificación mediante secuenciación del gen <i>rpoD</i>
			Sexo	Edad	Signos/síntomas clínicos	Infección polimicrobiana	Método de identificación	origen	Identificación fenotípica	
129644	129644	Universitario Guadalajara	M	68 años	Gastroenteritis	No	Vitek II	Heces	<i>A. hydrophila/cavie</i>	<i>A. caviae</i>
130212	130212	Universitario Guadalajara	M	5 años	Gastroenteritis	Si (+ <i>C. jejuni</i> )	Vitek II	Heces	<i>A. hydrophila/cavie</i>	<i>A. veronii</i>
130671	130671	Universitario Guadalajara	M	68 años	Gastroenteritis	No	Vitek II	Heces	<i>A. hydrophila/cavie</i>	<i>A. caviae</i>
131742	131742	Universitario Guadalajara	M	85 años	Gastroenteritis	No	Vitek II	Heces	<i>A. hydrophila/cavie</i>	No <i>Aeromonas</i>
132009	132009	Universitario Guadalajara	M	8 meses	Gastroenteritis	Si (+ <i>S. enteritidis</i> )	Vitek II	Heces	<i>A. hydrophila/cavie</i>	<i>A. caviae</i>
131474	131474	Universitario Guadalajara	M	11 meses	Gastroenteritis	No	Vitek II	Heces	<i>A. hydrophila/cavie</i>	<i>A. caviae</i>
132308	132308	Universitario Guadalajara	H	80 años	Gastroenteritis	No	Vitek II	Heces	<i>A. hydrophila/cavie</i>	<i>A. caviae</i>
132343	132343	Universitario Guadalajara	M	3 meses	Gastroenteritis	Si (+ <i>C. jejuni</i> )	Vitek II	Heces	<i>A. hydrophila/cavie</i>	<i>A. caviae</i>
133659	133659	Universitario Guadalajara	M	20 meses	Gastroenteritis	No	Vitek II	Heces	<i>A. hydrophila/cavie</i>	<i>A. caviae</i>
135559	135559	Universitario Guadalajara	H	44 años	Bacteremia	No	Vitek II	Sangre	<i>A. sobria</i>	<i>A. veronii</i>
135667	135667	Universitario Guadalajara	H	82 años	Gastroenteritis	No	Vitek II	Heces	<i>A. hydrophila/cavie</i>	<i>A. veronii</i>
136351	136351	Universitario Guadalajara	H	16 meses	Gastroenteritis	No	Vitek II	Heces	<i>A. hydrophila/cavie</i>	<i>A. caviae</i>
137163	137163	Universitario Guadalajara	M	56 años	Gastroenteritis	No	Vitek II	Heces	<i>A. hydrophila/cavie</i>	<i>A. caviae</i>
141347	141347	Universitario Guadalajara	M	83 años	Colecistitis	Si (+ <i>E. coli</i> )	Vitek II	Bilis	<i>A. hydrophila/cavie</i>	<i>A. caviae</i>
141189	141189	Universitario Guadalajara	M	76 años	Gastroenteritis	No	Vitek II	Heces	<i>A. sobria</i>	<i>A. veronii</i>
141492	141492	Universitario Guadalajara	M	24 meses	Gastroenteritis	Si (+ <i>C. jejuni</i> )	Vitek II	Heces	<i>A. hydrophila/cavie</i>	<i>A. caviae</i>
144022	144022	Universitario Guadalajara	H	54 años	Peritonitis	Si (+ <i>E. coli</i> y <i>K. pneumoniae</i> )	Vitek II	Líqu. peritoneal	<i>A. hydrophila/cavie</i>	<i>A. veronii</i>

**Anexo 2A (continuación 4). Cepas de origen clínico re-identificadas mediante secuenciación del gen *rpoD*.**

Referencia URV	Referencia hospital	Hospital	Datos del paciente				Datos de la cepa			Identificación mediante secuenciación del gen <i>rpoD</i>
			Sexo	Edad	Signos/síntomas clínicos	Infección polimicrobiana	Método de identificación	origen	Identificación fenotípica	
143857	143857	Universitario Guadalajara	H	13 meses	Gastroenteritis	No	Vitek II	Heces	<i>A. hydrophila/cavie</i>	<i>A. caviae</i>
144406	144406	Universitario Guadalajara	M	10 años	Gastroenteritis	No	Vitek II	Heces	<i>A. hydrophila/cavie</i>	<i>A. hydrophila</i>
145384	145384	Universitario Guadalajara	M	45 años	Gastroenteritis	No	Vitek II	Heces	<i>A. hydrophila/cavie</i>	<i>A. veronii</i>
846053/EX	846053/EX	Joan XXIII	M	73 años	ND	No	MicroScan W/A	Heces	<i>A. hydrophila</i>	<i>A. veronii</i>
845771/C	845771/C	Joan XXIII	M	12 meses	ND	No	MicroScan W/A	Heces	<i>A. hydrophila</i>	<i>A. caviae</i>
456688/C	456688/C	Joan XXIII	M	47 años	Diarrea	No	MicroScan W/A	Heces	<i>A. hydrophila</i>	<i>A. caviae</i>
456167/C	456167/C	Joan XXIII	M	52 años	Diarrea + VIH	No	MicroScan W/A	Heces	<i>A. hydrophila</i>	<i>A. caviae</i>
456119-2/E	456119-2/E	Joan XXIII	H	37 años	Pancolitis ulcerosa	No	MicroScan W/A	Heces	<i>A. hydrophila</i>	<i>A. caviae</i>
456236/C	456236/C	Joan XXIII	M	12 meses	Diarrea	Si (+ <i>Campylobacter</i> sp.)	MicroScan W/A	Heces	<i>A. hydrophila</i>	<i>A. caviae</i>
845236/EX	845236/EX	Joan XXIII	M	12 meses	Urticaria	No	MicroScan W/A	Heces	<i>A. hydrophila</i>	<i>A. caviae</i>
456772/C	456772/C	Joan XXIII	M	67 años	Diarrea	No	MicroScan W/A	Heces	<i>A. hydrophila</i>	<i>A. veronii</i>
845616/EX (2)	845616/EX (2)	Joan XXIII	H	54 años	Diarrea	No	MicroScan W/A	Heces	<i>A. hydrophila</i>	<i>A. caviae</i>
846686/C	846686/C	Joan XXIII	M	12 meses	ND	No	MicroScan W/A	Heces	<i>A. hydrophila</i>	<i>A. caviae</i>
842646/C	842646/C	Joan XXIII	M	12 meses	Diarrea	No	MicroScan W/A	Heces	<i>A. hydrophila</i>	<i>A. veronii</i>
(4)956543	(4)956543	Joan XXIII	H	9 meses	Diarrea	No	MicroScan W/A	Heces	<i>A. hydrophila</i>	<i>A. veronii</i>
841272/EX	841272/EX	Joan XXIII	H	13 años	ND	No	MicroScan W/A	Heces	<i>A. hydrophila</i>	<i>A. caviae</i>
847563	847563	Joan XXIII	H	2 años	Diarrea	No	MicroScan W/A	Heces	<i>A. hydrophila</i>	<i>A. caviae</i>
847570	847570	Joan XXIII	H	91 años	ND	No	MicroScan W/A	Heces	<i>A. hydrophila</i>	<i>A. veronii</i>
846315/C	846315/C	Joan XXIII	M	7 meses	Control	Si (+ <i>S. enterica</i> grupo B)	MicroScan W/A	Heces	<i>A. hydrophila</i>	<i>A. caviae</i>
846351/EX(1)	846351/EX(1)	Joan XXIII	M	12 meses	ND	No	MicroScan W/A	Heces	<i>A. hydrophila</i>	<i>A. caviae</i>
456663/C	456663/C	Joan XXIII	H	77 años	Diarrea	No	MicroScan W/A	Heces	<i>A. hydrophila</i>	<i>A. caviae</i>
52145164	52145164	Joan XXIII	H	82 años	ND	No	MicroScan W/A	Sangre	<i>A. hydrophila</i>	<i>A. caviae</i>
457034/C	457034/C	Joan XXIII	M	25 años	Diarrea	No	MicroScan W/A	Heces	<i>A. hydrophila</i>	<i>A. caviae</i>
839684/EX(2)	839684/EX(2)	Joan XXIII	H	12 meses	ND	Si (+ <i>C. jejuni</i> )	MicroScan W/A	Heces	<i>A. hydrophila</i>	<i>A. caviae</i>
840274/C	840274/C	Joan XXIII	H	12 meses	Anorexia	No	MicroScan W/A	Heces	<i>A. hydrophila</i>	NO <i>Aeromonas</i>
841085/EX	841085/EX	Joan XXIII	M	12 meses	ND	Si (+ <i>Acinetobacter</i> sp., <i>K. pneumoniae</i> , <i>S. aureus</i> , <i>S. maltiphilia</i> )	MicroScan W/A	Abceso	<i>A. hydrophila</i>	<i>A. caviae</i>
842044	842044	Joan XXIII	H	2 años	Colitis	Si (+ <i>C. coli</i> )	MicroScan W/A	Heces	<i>A. hydrophila</i>	<i>A. caviae</i>
456525-2/C	456525-2/C	Joan XXIII	M	12 meses	Gastroenteritis	Si (+ <i>C. jejuni</i> )	MicroScan W/A	Heces	<i>A. hydrophila</i>	<i>A. caviae</i>
842319/EX	842319/EX	Joan XXIII	H	85 años	ND	No	MicroScan W/A	Heces	<i>A. hydrophila</i>	<i>A. veronii</i>
456136/C	456136/C	Joan XXIII	H	72 años	Diarrea	No	MicroScan W/A	Heces	<i>A. hydrophila</i>	<i>A. caviae</i>

**Anexo 2A (continuación 5). Cepas de origen clínico re-identificadas mediante secuenciación del gen *rpoD*.**

Referencia URV	Referencia hospital	Hospital	Datos del paciente				Datos de la cepa			Identificación mediante secuenciación del gen <i>rpoD</i>
			Sexo	Edad	Signos/síntomas clínicos	Infección polimicrobiana	Método de identificación	origen	Identificación fenotípica	
456288/C	456288/C	Joan XXIII	H	77 años	ND	No	MicroScan W/A	Heces	<i>A. hydrophila</i>	<i>A. veronii</i>
840053/C	840053/C	Joan XXIII	H	21 años	Diarrea	No	MicroScan W/A	Heces	<i>A. hydrophila</i>	<i>A. caviae</i>
456137-2/C	456137-2/C	Joan XXIII	H	86 años	Diarrea	No	MicroScan W/A	Heces	<i>A. hydrophila</i>	<i>A. caviae</i>
840756/C	840756/C	Joan XXIII	M	35 años	Diarrea	No	MicroScan W/A	Heces	<i>A. hydrophila</i>	<i>A. veronii</i>
456288/C	456288/C	Joan XXIII	H	77 años	Diarrea	No	MicroScan W/A	Heces	<i>A. hydrophila</i>	<i>A. veronii</i>
846351/C	846351/C	Joan XXIII	M	12 meses	ND	No	MicroScan W/A	Heces	<i>A. hydrophila</i>	<i>A. caviae</i>
856713/EX	856713/EX	Joan XXIII	H	6 meses	ND	Si (+ <i>C. jejuni</i> )	MicroScan W/A	Heces	<i>A. hydrophila</i>	<i>A. caviae</i>
857775/C	857775/C	Joan XXIII	M	7 años	Diarrea	No	MicroScan W/A	Heces	<i>A. hydrophila</i>	No <i>Aeromonas</i>
856668/EX	856668/EX	Joan XXIII	M	12 meses	ND	No	MicroScan W/A	Heces	<i>A. hydrophila</i>	<i>A. caviae</i>
860261/C	860261/C	Joan XXIII	M	90 años	ND	No	MicroScan W/A	Heces	<i>A. hydrophila</i>	<i>A. caviae</i>
458109/C1	458109/C1	Joan XXIII	H	13 años	ND	No	MicroScan W/A	Heces	<i>A. hydrophila</i>	<i>A. caviae</i>
857906/C	857906/C	Joan XXIII	M	4 años	ND	Si (+ <i>C. jejuni</i> )	MicroScan W/A	Heces	<i>A. hydrophila</i>	<i>A. veronii</i>
856308/C	856308/C	Joan XXIII	H	2 años	Diarrea	No	MicroScan W/A	Heces	<i>A. hydrophila</i>	<i>A. caviae</i>
844016/C	844016/C	Joan XXIII	M	61 años	Diarrea	No	MicroScan W/A	Heces	<i>A. hydrophila</i>	<i>A. caviae</i>
857906/C1	857906/C1	Joan XXIII	M	4 años	Diarrea	Si (+ <i>C. jejuni</i> )	MicroScan W/A	Heces	<i>A. hydrophila</i>	<i>A. veronii</i>
457727/C3	457727/C3	Joan XXIII	H	12 meses	Diarrea con sangre	Si (+ <i>C. jejuni</i> )	MicroScan W/A	Heces	<i>A. hydrophila</i>	<i>A. caviae</i>
854599	854599	Joan XXIII	H	42 años	Diarrea	No	MicroScan W/A	Heces	<i>A. hydrophila</i>	<i>A. veronii</i>
457655(6)	457655(6)	Joan XXIII	M	82 años	Diarrea	No	MicroScan W/A	Heces	<i>A. hydrophila</i>	<i>A. veronii</i>
457656/C2	457656/C2	Joan XXIII	M	82 años	Diarrea	No	MicroScan W/A	Heces	<i>A. hydrophila</i>	<i>A. caviae</i>
457606-C	457606-C	Joan XXIII	M	18 meses	Diarrea	No	MicroScan W/A	Heces	<i>A. hydrophila</i>	<i>A. caviae</i>
855400-C	855400-C	Joan XXIII	H	66 años	Diarrea	No	MicroScan W/A	Heces	<i>A. hydrophila</i>	<i>A. veronii</i>
855421-1	855421-1	Joan XXIII	H	74 años	ND	No	MicroScan W/A	Espuito	<i>A. hydrophila</i>	<i>A. caviae</i>
854699	854699	Joan XXIII	H	12 meses	Diarrea	Si (+ <i>C. jejuni</i> )	MicroScan W/A	Heces	<i>A. hydrophila</i>	<i>A. caviae</i>
857775/C	857775/C	Joan XXIII	M	7 años	Diarrea	No	MicroScan W/A	Heces	<i>A. hydrophila</i>	No <i>Aeromonas</i>
457741-C	457741-C	Joan XXIII	M	77 años	Diarrea	No	MicroScan W/A	Heces	<i>A. hydrophila</i>	<i>A. veronii</i>
141651	141651	Joan XXIII	M	78 años	Control	Si (+ <i>C. propionicum</i> )	MicroScan W/A	Sec. faríngea	<i>A. hydrophila</i>	<i>A. caviae</i>
859905-C1	859905-C1	Joan XXIII	H	13 meses	Diarrea	Si (+ <i>Y. enterocolitica</i> )	MicroScan W/A	Heces	<i>A. hydrophila</i>	<i>A. caviae</i>
855677-VI	855677-VI	Joan XXIII	H	43 años	ND	Si (+ <i>S. aureus</i> y <i>F. magna</i> )	MicroScan W/A	Abceso	<i>A. hydrophila</i>	<i>A. hydrophila</i>
458083-C1	458083-C1	Joan XXIII	M	7 años	Diarrea sanguinolenta	Si (+ <i>C. jejuni</i> )	MicroScan W/A	Heces	<i>A. hydrophila</i>	<i>A. caviae</i>
859671-C	859671-C	Joan XXIII	M	77 años	ND	Si (+ <i>C. jejuni</i> )	MicroScan W/A	Heces	<i>A. hydrophila</i>	No <i>Aeromonas</i>
857529-C	857529-C	Joan XXIII	H	12 meses	Diarrea	No	MicroScan W/A	Heces	<i>A. hydrophila</i>	<i>A. veronii</i>
854602	854602	Joan XXIII	M	35 años	Diarrea	Si (+ <i>C. coli</i> )	MicroScan W/A	Heces	<i>A. hydrophila</i>	<i>A. veronii</i>
859665	859665	Joan XXIII	H	10 meses	ND	Si (+ <i>C. jejuni</i> )	MicroScan W/A	Heces	<i>A. hydrophila</i>	<i>A. caviae</i>
458059	458059	Joan XXIII	H	1 mes	Diarrea	No	MicroScan W/A	Heces	<i>A. hydrophila</i>	No <i>Aeromonas</i>
859665-C	859665-C	Joan XXIII	H	10 meses	Diarrea	Si (+ <i>C. jejuni</i> )	MicroScan W/A	Heces	<i>A. hydrophila</i>	<i>A. caviae</i>

**Anexo 2A (continuación 6). Cepas de origen clínico re-identificadas mediante secuenciación del gen *rpoD*.**

Referencia URV	Referencia hospital	Hospital	Datos del paciente				Datos de la cepa			Identificación mediante secuenciación del gen <i>rpoD</i>
			Sexo	Edad	Signos/síntomas clínicos	Infección polimicrobiana	Método de identificación	origen	Identificación fenotípica	
457841-C	457841-C	Joan XXIII	H	63 años	Diarrea	No	MicroScan W/A	Heces	<i>A. hydrophila</i>	<i>A. caviae</i>
855547-C2	855547-C2	Joan XXIII	M	3 años	Diarrea	Si (+ <i>C. jejuni</i> )	MicroScan W/A	Heces	<i>A. hydrophila</i>	<i>A. caviae</i>
852204 (3)	852204 (3)	Joan XXIII	M	14 meses	Diarrea	No	MicroScan W/A	Heces	<i>A. hydrophila</i>	<i>A. caviae</i>
854699 (2)	854699 (2)	Joan XXIII	H	14 meses	ND	Si (+ <i>C. jejuni</i> )	MicroScan W/A	Heces	<i>A. hydrophila</i>	<i>A. caviae</i>
854699 (1)	854699 (1)	Joan XXIII	H	14 meses	ND	Si (+ <i>C. jejuni</i> )	MicroScan W/A	Heces	<i>A. hydrophila</i>	<i>A. caviae</i>
854702 (2)	854702 (2)	Joan XXIII	M	25 años	Diarrea	No	MicroScan W/A	Heces	<i>A. hydrophila</i>	<i>A. veronii</i>
852508	852508	Joan XXIII	M	26 meses	ND	No	MicroScan W/A	Heces	<i>A. hydrophila</i>	<i>A. media</i>
851815-C	851815-C	Joan XXIII	H	84 años	Diarrea	No	MicroScan W/A	Heces	<i>A. hydrophila</i>	<i>A. hydrophila</i>
852197 (2)	852197 (2)	Joan XXIII	H	69 años	ND	No	MicroScan W/A	Heces	<i>A. hydrophila</i>	<i>A. caviae</i>
838555-C	838555-C	Joan XXIII	M	76 años	ND	No	MicroScan W/A	Heces	<i>A. hydrophila</i>	<i>A. caviae</i>
457291-E	457291-E	Joan XXIII	M	16 meses	ND	Si (+ <i>C. jejuni</i> )	MicroScan W/A	Heces	<i>A. hydrophila</i>	<i>A. caviae</i>
456584-E	456584-E	Joan XXIII	H	30meses	Diarrea con sangre	Si (+ <i>C. jejuni</i> )	MicroScan W/A	Heces	<i>A. hydrophila</i>	<i>A. caviae</i>
838322.1-C	838322.1-C	Joan XXIII	M	24 meses	ND	Si (+ <i>S. enterica</i> grupo B)	MicroScan W/A	Heces	<i>A. hydrophila</i>	<i>A. caviae</i>
850257-C7	850257-C7	Joan XXIII	M	3 años	ND	Si (+ <i>S. enterica</i> grupo B)	MicroScan W/A	Heces	<i>A. hydrophila</i>	<i>A. media</i>
848382-C	848382-C	Joan XXIII	H	6 años	Diarrea	No	MicroScan W/A	Heces	<i>A. hydrophila</i>	<i>No Aeromonas</i>
839784-EX	839784-EX	Joan XXIII	M	11 meses	ND	No	MicroScan W/A	Heces	<i>A. hydrophila</i>	<i>A. caviae</i>
457325-C (2)	457325-C (2)	Joan XXIII	H	8 meses	Fiebre (15 días)	No	MicroScan W/A	Heces	<i>A. hydrophila</i>	<i>A. caviae</i>
839419-EX	839419-EX	Joan XXIII	M	6 meses	ND	Si (+ <i>C. jejuni</i> )	MicroScan W/A	Heces	<i>A. hydrophila</i>	<i>A. caviae</i>
850244-EX	850244-EX	Joan XXIII	ND	ND	ND	ND	MicroScan W/A	ND	<i>A. hydrophila</i>	<i>A. caviae</i>
456589-E	456589-E	Joan XXIII	H	67 años	Diarrea	Si (+ <i>H. alvei</i> )	MicroScan W/A	Heces	<i>A. hydrophila</i>	<i>A. caviae</i>
850928	850928	Joan XXIII	M	4 años	Infección vírica Deposiciones blandas	No	MicroScan W/A	Heces	<i>A. hydrophila</i>	<i>A. caviae</i>
839919-C	839919-C	Joan XXIII	M	5 meses	(1 mes)	No	MicroScan W/A	Heces	<i>A. hydrophila</i>	<i>A. caviae</i>
851082-EX	851082-EX	Joan XXIII	M	3 años	Control	Si (+ <i>C. jejuni</i> ) Si (+ <i>S. enterica</i> grupo B)	MicroScan W/A	Heces	<i>A. hydrophila</i>	<i>A. caviae</i>
850257 (2)	850257 (2)	Joan XXIII	M	2 años	Control	Si (+ <i>S. enterica</i> grupo B)	MicroScan W/A	Heces	<i>A. hydrophila</i>	<i>A. media</i>
852044-EX	852044-EX	Joan XXIII	H	85 años	ND	No	MicroScan W/A	Heces	<i>A. hydrophila</i>	<i>A. media</i>
851920-C	851920-C	Joan XXIII	H	85 años	Diarrea	No	MicroScan W/A	Heces	<i>A. hydrophila</i>	<i>A. caviae</i>
456560-C	456560-C	Joan XXIII	M	79 años	Diarrea	No	MicroScan W/A	Heces	<i>A. hydrophila</i>	<i>A. hydrophila</i>
856092-C2	856092-C2	Joan XXIII	ND	ND	ND	ND	MicroScan W/A	ND	<i>A. hydrophila</i>	<i>A. veronii</i>
860400-C1	860400-C1	Joan XXIII	M	91 años	ND	No	MicroScan W/A	Heces	<i>A. hydrophila</i>	<i>A. caviae</i>
839419-EX	839419-EX	Joan XXIII	M	6 meses	ND	Si (+ <i>C. jejuni</i> )	MicroScan W/A	Heces	<i>A. hydrophila</i>	<i>A. caviae</i>
458108-C	458108-C	Joan XXIII	H	58 años	ND	No	MicroScan W/A	Heces	<i>A. hydrophila</i>	<i>A. caviae</i>
52137631-P1	52137631-P1	Joan XXIII	M	84 años	ND	No	MicroScan W/A	Sangre	<i>A. hydrophila</i>	<i>A. caviae</i>
849166-C	849166-C	Joan XXIII	H	7 años	Diarrea	No	MicroScan W/A	Heces	<i>A. hydrophila</i>	<i>A. caviae</i>
(4)857167-E	(4)857167-E	Joan XXIII	H	2 meses	Control	No	MicroScan W/A	Heces	<i>A. hydrophila</i>	<i>A. veronii</i>

**Anexo 2A (continuación 7). Cepas de origen clínico re-identificadas mediante secuenciación del gen *rpoD*.**

Referencia URV	Referencia hospital	Hospital	Datos del paciente				Datos de la cepa			Identificación mediante secuenciación del gen <i>rpoD</i>
			Sexo	Edad	Signos/síntomas clínicos	Infección polimicrobiana	Método de identificación	origen	Identificación fenotípica	
839794-EX	839794-EX	Joan XXIII	H	5 meses	Control	Si (+ <i>C. jejuni</i> )	MicroScan W/A	Heces	<i>A. hydrophila</i>	<i>A. caviae</i>
510000616	510000616	Joan XXIII	H	8 años	inmunideprimido	No	MicroScan W/A	Sangre	<i>Aeromonas</i> sp.	<i>A. caviae</i>
510000899	510000899	Joan XXIII	H	8 años	inmunideprimido	No	MicroScan W/A	Sangre	<i>Aeromonas</i> sp.	<i>A. caviae</i>
510016179	510016179	Joan XXIII	H	64 años	Control	Si (+ <i>K. oxytoca</i> y <i>E. faecalis</i> )	MicroScan W/A	Sangre	<i>Aeromonas</i> sp.	No <i>Aeromonas</i>
510016141	510016141	Joan XXIII	M	64 años	coledocolitiasis	Si (+ <i>K. oxytoca</i> y <i>E. faecalis</i> )	MicroScan W/A	Sangre	<i>Aeromonas</i> sp.	<i>A. caviae</i>
510008785	510008785	Joan XXIII	H	64 años	Transplante renal	Si (+ <i>K. oxytoca</i> )	MicroScan W/A	Orina	<i>A. caviae</i>	<i>A. caviae</i>
1106C	8082045043	St. Joan	M	53 años	ND	No	MicroScan W/A	Heces	<i>Aeromonas</i> sp.	<i>A. veronii</i>
1107C	808101049	St. Joan	M	2 años	ND	No	MicroScan W/A	Heces	<i>Aeromonas</i> sp.	<i>A. caviae</i>
1108C	8081630970	St. Joan	H	74 años	ND	Si (+ <i>C. jejuni</i> )	MicroScan W/A	Heces	<i>Aeromonas</i> sp.	<i>A. veronii</i>
1109C	8982912391	St. Joan	H	3 años	ND	No	MicroScan W/A	Heces	<i>Aeromonas</i> sp.	<i>A. caviae</i>
1110C	8082914815	St. Joan	H	36 años	ND	No	MicroScan W/A	Heces	<i>Aeromonas</i> sp.	<i>A. caviae</i>
1111C	8082912472	St. Joan	ND	ND	ND	ND	MicroScan W/A	Heces	<i>Aeromonas</i> sp.	<i>A. caviae</i>
1112C	8082926600	St. Joan	M	80 años	ND	Si (+ <i>Salmonella</i> sp.)	MicroScan W/A	Heces	<i>Aeromonas</i> sp.	<i>A. dhakensis</i>
1113C	8083878723	St. Joan	M	12 meses	ND	No	MicroScan W/A	Heces	<i>Aeromonas</i> sp.	<i>A. veronii</i>
1114C	8083901210	St. Joan	H	75 años	ND	No	MicroScan W/A	Heces	<i>Aeromonas</i> sp.	<i>A. veronii</i>
1115C	8083917931	St. Joan	H	8 años	ND	No	MicroScan W/A	Heces	<i>Aeromonas</i> sp.	<i>A. caviae</i>
1116C	8082926600	St. Joan	H	80 años	ND	Si (+ quistes de <i>B. hominis</i> )	MicroScan W/A	Heces	<i>Aeromonas</i> sp.	No <i>Aeromonas</i>
1118C	8083901210	St. Joan	H	75 años	ND	No	MicroScan W/A	Heces	<i>Aeromonas</i> sp.	<i>A. veronii</i>
1117C	8082952717	St. Joan	M	63 años	ND	No	MicroScan W/A	Heces	<i>Aeromonas</i> sp.	<i>A. caviae</i>
1119C	8087871570	St. Joan	M	86 años	ND	No	MicroScan W/A	Heces	<i>Aeromonas</i> sp.	<i>A. caviae</i>
1120C	8089045332	St. Joan	M	12 meses	ND	No	MicroScan W/A	Heces	<i>Aeromonas</i> sp.	<i>A. caviae</i>
1121C	8091090498	St. Joan	H	14 años	ND	No	MicroScan W/A	Heces	<i>Aeromonas</i> sp.	<i>A. caviae</i>
1122C	8091143729	St. Joan	H	80 años	ND	No	MicroScan W/A	Heces	<i>Aeromonas</i> sp.	<i>A. veronii</i>
1123C	8092950288	St. Joan	H	60 años	ND	No	MicroScan W/A	Heces	<i>Aeromonas</i> sp.	<i>A. caviae</i>
1124C	809413626	St. Joan	H	53 años	ND	No	MicroScan W/A	Heces	<i>Aeromonas</i> sp.	<i>A. veronii</i>
1125C	809422168	St. Joan	H	86 años	ND	No	MicroScan W/A	Heces	<i>Aeromonas</i> sp.	<i>A. veronii</i>
1126C	8096729985	St. Joan	M	2 años	ND	No	MicroScan W/A	Heces	<i>Aeromonas</i> sp.	<i>A. veronii</i>
1127C	8098341445	St. Joan	M	3 meses	ND	No	MicroScan W/A	Heces	<i>Aeromonas</i> sp.	<i>A. caviae</i>
1128C	8098436772	St. Joan	H	63 años	ND	No	MicroScan W/A	Heces	<i>Aeromonas</i> sp.	<i>A. veronii</i>
1129C	8098444600	St. Joan	H	9 años	ND	Si (+ <i>C. jejuni</i> )	MicroScan W/A	Heces	<i>Aeromonas</i> sp.	<i>A. caviae</i>
1130C	8098550613	St. Joan	H	92 años	ND	No	MicroScan W/A	Heces	<i>Aeromonas</i> sp.	<i>A. caviae</i>

**Anexo 2A (continuación 8). Cepas de origen clínico re-identificadas mediante secuenciación del gen *rpoD*.**

Referencia URV	Referencia hospital	Hospital	Datos del paciente				Datos de la cepa			Identificación mediante secuenciación del gen <i>rpoD</i>
			Sexo	Edad	Signos/síntomas clínicos	Infección polimicrobiana	Método de identificación	origen	Identificación fenotípica	
1131C	8301254068	St. Joan	H	92 años	ND	No	MicroScan W/A	Sangre Exudado herida	<i>Aeromonas</i> sp.	<i>A. caviae</i>
1132C	8101393072	St. Joan	H	76 años	ND	Si (+ <i>S. aureus</i> )	MicroScan W/A	quirúrgica <sup>b</sup>	<i>A. hydrophila</i>	<i>A. hydrophila</i>
1133C	8081452958	St. Joan	H	59 años	ND	No	MicroScan W/A	Heces	<i>A. hydrophila</i>	<i>A. media</i>
1134C	8003856671	St. Joan	H	71 años	ND	No	MicroScan W/A	Heces	<i>A. hydrophila</i>	<i>A. veronii</i>
1135C	8001409040	St. Joan	M	2 meses	ND	Si (+ <i>C. jejuni</i> )	MicroScan W/A	Heces	<i>A. hydrophila</i>	<i>A. hydrophila</i>
1136C	8081456236	St. Joan	M	ND	ND	No	MicroScan W/A	Heces	<i>A. hydrophila</i>	<i>A. media</i>
1137C	8002433076	St. Joan	M	39 años	ND	Si (+ <i>S. enterica</i> grupo B)	MicroScan W/A	Heces	<i>A. hydrophila</i>	<i>A. media</i>
1138C	8003997704	St. Joan	H	19 años	ND	Si (+ <i>C. jejuni</i> )	MicroScan W/A	Heces	<i>A. hydrophila</i>	<i>A. veronii</i>
1139C	8009391816	St. Joan	H	64 años	ND	No	MicroScan W/A	Sangre	<i>A. hydrophila</i>	<i>A. veronii</i>
1140C	8109480721	St. Joan	H	52 años	ND	Si (+ <i>K. oxytoca</i> )	MicroScan W/A	Úlcera	<i>A. hydrophila</i>	<i>A. dkakensis</i>
1141C	310327474	St. Joan	H	56 años	ND	Si (+ <i>E. faecalis</i> )	MicroScan W/A	Orina	<i>A. hydrophila</i>	<i>A. caviae</i>
1142C	8010362557	St. Joan	M	64 años	ND	No	MicroScan W/A	Heces	<i>A. hydrophila</i>	<i>A. veronii</i>
1143C	8009657409	St. Joan	M	76 años	ND	No	MicroScan W/A	Heces	<i>A. hydrophila</i>	<i>A. hydrophila</i>
1144C	800939181	St. Joan	H	64 años	ND	No	MicroScan W/A	Heces	<i>A. hydrophila</i>	<i>A. veronii</i>
1145C	8010362557	St. Joan	M	8 años	ND	No	MicroScan W/A	Heces	<i>A. hydrophila</i>	<i>A. veronii</i>
1146C	310386020	St. Joan	H	ND	ND	Si (+ <i>K. oxytoca</i> )	MicroScan W/A	Orina	<i>A. hydrophila</i>	<i>A. hydrophila</i>
1147C	8009692727	St. Joan	H	64 años	ND	Si (+ <i>S. maltophilia</i> , <i>S. aureus</i> y <i>H. parainfluenzae</i> )	MicroScan W/A	Sec. bronquial	<i>A. hydrophila</i>	<i>A. caviae</i>
1148C	8010369551	St. Joan	M	18 meses	ND	Si (+ <i>Campylobacter</i> sp.)	MicroScan W/A	Heces	<i>A. hydrophila</i>	<i>A. media</i>
1149C	8008201878	St. Joan	M	96 años	ND	No	MicroScan W/A	Heces	<i>A. hydrophila</i>	<i>A. hydrophila</i>
1150C	8011249282	St. Joan	H	58 años	ND	No	MicroScan W/A	Heces	<i>A. hydrophila</i>	<i>A. caviae</i>
1151C	8011314246	St. Joan	M	12 meses	ND	Si (+ <i>C. jejuni</i> )	MicroScan W/A	Heces	<i>A. hydrophila</i>	<i>A. veronii</i>
1152C	8011380575	St. Joan	H	57 años	ND	No	MicroScan W/A	Heces	<i>A. hydrophila</i>	<i>A. caviae</i>
1153C	8014772873	St. Joan	H	5 años	ND	No	MicroScan W/A	Heces	<i>Aeromonas</i> sp.	<i>A. caviae</i>
1154C	9611421524	St. Joan	M	52 años	ND	Si (+ <i>C. freundii</i> y <i>K. pneumoniae</i> )	MicroScan W/A	Líqu. peritoneal	<i>A. hydrophila</i>	<i>A. hydrophila</i>
1155C	8014767470	St. Joan	M	84 años	ND	No	MicroScan W/A	Heces	<i>A. hydrophila</i>	<i>A. caviae</i>
1156C	8015999189	St. Joan	H	74 años	ND	No	MicroScan W/A	Heces	<i>Aeromonas</i> sp.	<i>A. caviae</i>
1157C	801602057	St. Joan	M	33 años	ND	Si (+ <i>C. jejuni</i> )	MicroScan W/A	Heces	<i>A. hydrophila</i>	<i>A. caviae</i>
1158C	8016050844	St. Joan	M	4 años	ND	Si (+ <i>C. jejuni</i> )	MicroScan W/A	Heces	<i>A. hydrophila</i>	<i>A. caviae</i>
1159C	8016078575	St. Joan	H	82 años	ND	No	MicroScan W/A	Heces	<i>A. hydrophila</i>	<i>A. media</i>



**Anexo 2A (continuación 9). Cepas de origen clínico re-identificadas mediante secuenciación del gen *rpoD*.**

Referencia URV	Referencia hospital	Hospital	Datos del paciente				Datos de la cepa			Identificación mediante secuenciación del gen <i>rpoD</i>
			Sexo	Edad	Signos/síntomas clínicos	Infección polimicrobiana	Método de identificación	origen	Identificación fenotípica	
1161C	8008287039	St. Joan	M	63 años	ND	No	MicroScan W/A	Heces	<i>Aeromonas</i> sp.	<i>A. media</i>
1162C	8013349004	St. Joan	M	12 meses	ND	No	MicroScan W/A	Heces	<i>A. hydrophila</i>	<i>A. caviae</i>
1163C	8018206384	St. Joan	H	67 años	ND	No	MicroScan W/A	Heces	<i>A. hydrophila</i>	<i>A. veronii</i>
1164C	8018206589	St. Joan	H	77 años	ND	No	MicroScan W/A	Heces	<i>A. hydrophila</i>	<i>A. veronii</i>
1165C	8018248893	St. Joan	H	7 meses	ND	No	MicroScan W/A	Heces	<i>A. hydrophila</i>	<i>A. caviae</i>
1166C	8018227233	St. Joan	M	1 mes	ND	Si (+ <i>Campylobacter</i> sp.)	MicroScan W/A	Heces	<i>A. hydrophila</i>	<i>A. media</i>
1167C	8118216932	St. Joan	M	73 años	ND	No	MicroScan W/A	Heces	<i>A. hydrophila</i>	No <i>Aeromonas</i>
1168C	8017571194	St. Joan	M	18 meses	ND	No	MicroScan W/A	Heces	<i>A. hydrophila</i>	<i>A. veronii</i>
1169C	8018206589	St. Joan	H	77 años	ND	No	MicroScan W/A	Heces	<i>A. hydrophila</i>	<i>A. veronii</i>
1170C	8018206384	St. Joan	H	67 años	ND	No	MicroScan W/A	Heces	<i>A. hydrophila</i>	<i>A. veronii</i>
1171C	8019818278	St. Joan	H	76 años	ND	No	MicroScan W/A	Heces	<i>A. hydrophila</i>	<i>A. veronii</i>
1172C	8347381119	St. Joan	M	76 años	ND	Si (+ <i>E. coli</i> ) Si (+ <i>S. enterica</i> grupo B)	MicroScan W/A	Sangre	<i>A. hydrophila</i>	<i>A. hydrophila</i>
1173C	8021071133	St. Joan	M	5 años	ND	No	MicroScan W/A	Heces	<i>A. hydrophila</i>	<i>A. caviae</i>
1174C	8019863214	St. Joan	M	8 meses	ND	No	MicroScan W/A	Heces	<i>A. hydrophila</i>	<i>A. veronii</i>
1175C	8019814213	St. Joan	M	12 meses	ND	No	MicroScan W/A	Heces	<i>A. hydrophila</i>	<i>A. caviae</i>
1176C	8019816801	St. Joan	H	5 años	ND	No	MicroScan W/A	Heces	<i>A. hydrophila</i>	<i>A. caviae</i>
1177C	8019824383	St. Joan	H	12 años	ND	No	MicroScan W/A	Heces	<i>A. hydrophila</i>	<i>A. dhakensis</i> <b><i>Aeromonas</i> sp. nov. 1</b>
1178C	8019883363	St. Joan	H	45 años	ND	No	MicroScan W/A	Heces	<i>A. hydrophila</i>	<i>A. veronii</i>
1179C	8019804943	St. Joan	H	78 años	ND	No	MicroScan W/A	Heces	<i>A. hydrophila</i>	<i>A. hydrophila</i>
1180C	8021375280	St. Joan	M	ND	ND	No	MicroScan W/A	Heces	<i>A. hydrophila</i>	<i>A. caviae</i>
1181C	8019887709	St. Joan	H	12 años	ND	No	MicroScan W/A	Heces	<i>A. hydrophila</i>	

ND: no disponible. <sup>a</sup>Corresponden a una misma cepa aislada de un mismo paciente, pero en ocasiones distintas; <sup>b</sup>Prótesis de rodilla derecha (15 días post cirugía). Hospital Universitario de Nagasaki, Nagasaki (Japón); Hospital Universitario de Guadalajara, Guadalajara (España), Hospital Joan XXIII, Tarragona (España); Hospital Sant Joan, Reus (España).

**Anexo 2B. Cepas de origen clínico re-identificadas mediante secuenciación del gen *rpoD*.**

Referencia URV	Referencia hospital	Hospital	Datos del paciente				Datos de la cepa				Identificación mediante secuenciación del gen <i>rpoD</i>
			Sexo	Edad	Signos/síntomas clínicos	Infección polimicrobiana	Origen	Software MALDI-TOF	Score	Identificación MALDI-TOF	
C93552	C93552	Universitario Miguel Servet	H	9 meses	Diarrea	No	Heces	Biotyper 3.0	2.3	<i>A. caviae</i>	No <i>Aeromonas</i>
C94337	C94337	Universitario Miguel Servet	M	49 años	Fiebre elevada (tratamiento inmuno supresor)	No	Heces	Biotyper 3.0	2.3	<i>A. caviae</i>	<i>A. caviae</i>
C94545	C94545	Universitario Miguel Servet	M	89 años	Diarrea	No	Heces	Biotyper 3.0	2.3	<i>A. caviae</i>	<i>A. caviae</i>
C99821	C99821	Universitario Miguel Servet	H	81 años	Diarrea	No	Heces	Biotyper 3.0	ND	<i>A. caviae</i>	<i>A. caviae</i>
D04837	D04837	Universitario Miguel Servet	H	4 años	Gastroenteritis	Si (+ <i>C. jejuni</i> )	Heces	Biotyper 3.0	2.3	<i>A. caviae</i>	<i>A. caviae</i>
D04925	D04925	Universitario Miguel Servet	M	81 años	Gastroenteritis	No	Heces	Biotyper 3.0	2.3	<i>A. caviae</i>	<i>A. caviae</i>
D05507	D05507	Universitario Miguel Servet	M	15 meses	Gastroenteritis	Si (+ <i>S. typhimurium</i> )	Heces	Biotyper 3.0	2.2	<i>A. caviae</i>	<i>A. caviae</i>
D06470	D06470	Universitario Miguel Servet	H	13 meses	Diarrea	No	Heces	Biotyper 3.0	2.2	<i>A. caviae</i>	<i>A. caviae</i>
D08068	D08068	Universitario Miguel Servet	H	49 años	Gastroenteritis	No	Heces	Biotyper 3.0	ND	<i>A. caviae</i>	<i>A. caviae</i>
D16222	D16222	Universitario Miguel Servet	H	2 años	Diarrea	Si (+ <i>S. enteritidis</i> )	Heces	Biotyper 3.0	2.1	<i>A. caviae</i>	<i>A. caviae</i>
D18872	D18872	Universitario Miguel Servet	H	12 meses	Diarrea	No	Heces	Biotyper 3.0	2.3	<i>A. caviae</i>	<i>A. caviae</i>
D18927	D18927	Universitario Miguel Servet	H	15 meses	Prurito anal	No	Heces	Biotyper 3.0	2.2	<i>A. caviae</i>	<i>A. caviae</i>
D24783	D24783	Universitario Miguel Servet	H	6 años	Gastroenteritis	No	Heces	Biotyper 3.0	2.2	<i>A. caviae</i>	<i>A. caviae</i>
D26277	D26277	Universitario Miguel Servet	H	17 meses	Gastroenteritis	Si (+ <i>C. jejuni</i> )	Heces	Biotyper 3.0	2.1	<i>A. caviae</i>	<i>A. caviae</i>
D25400	D25400	Universitario Miguel Servet	M	69 años	Diarrea	No	Heces	Biotyper 3.0	2,2	<i>A. caviae</i>	<i>A. caviae</i>
D26908	D26908	Universitario Miguel Servet	M	78 años	Diarrea	No	Heces	Biotyper 3.0	2,2	<i>A. caviae</i>	<i>A. caviae</i>
D35901	D35901	Universitario Miguel Servet	H	30 años	Diarrea	No	Heces	Biotyper 3.0	2,1	<i>A. caviae</i>	<i>A. caviae</i>
D35933	D35933	Universitario Miguel Servet	M	7 meses	Diarrea	Si (+ <i>C. jejuni</i> )	Heces	Biotyper 3.0	2,2	<i>A. caviae</i>	<i>A. caviae</i>

**Anexo 2B (Continuación 1). Cepas de origen clínico re-identificadas mediante secuenciación del gen *rpoD*.**

Referencia URV	Referencia hospital	Hospital	Datos del paciente				Datos de la cepa				Identificación mediante secuenciación del gen <i>rpoD</i>
			Sexo	Edad	Signos/síntomas clínicos	Infección polimicrobiana	Origen	Software MALDI-TOF	Score	Identificación MALDI-TOF	
D36276	D36276	Universitario Miguel Servet	M	29 años	Fiebre, politraumatismo	No	Asp. bronquial	Biotyper 3.0	2,1	<i>A. veronii</i>	<i>A. veronii</i>
D39298	D39298	Universitario Miguel Servet	M	49 años	Diarrea	No	Heces	Biotyper 3.0	2.2	<i>A. veronii</i>	<i>A. veronii</i>
D45324	D45324	Universitario Miguel Servet	H	75 años	Aumento deposiciones	Si (+ <i>C. jejuni</i> )	Heces	Biotyper 3.0	ND	<i>A. caviae</i>	<i>A. caviae</i>
D47366	D47366	Universitario Miguel Servet	H	3 años	Dolor abdominal	No	Heces	Biotyper 3.0	ND	<i>A. veronii</i>	<i>A. veronii</i>
D50233	D50233	Universitario Miguel Servet	M	56 años	Diarrea	No	Heces	Biotyper 3.0	2	<i>A. caviae</i>	<i>A. caviae</i>
D50773	D50773	Universitario Miguel Servet	H	68 años	Diarrea	No	Heces	Biotyper 3.0	ND	<i>A. caviae</i>	<i>A. veronii</i>
D54637	D54637	Universitario Miguel Servet	M	81 años	Diarrea	No	Heces	Biotyper 3.0	ND	<i>A. caviae</i>	<i>A. caviae</i>
D58299	D58299	Universitario Miguel Servet	H	10 meses	Diarrea	No	Heces	Biotyper 3.0	2,3	<i>A. caviae</i>	<i>A. caviae</i>
D60141	D60141	Universitario Miguel Servet	H	23 meses	Gastroenteritis	Si (+ <i>C. jejuni</i> )	Heces	Biotyper 3.0	2,3	<i>A. caviae</i>	<i>A. caviae</i>
D64677	D64677	Universitario Miguel Servet	M	74 años	Diarrea	No	Heces	Biotyper 3.0	ND	<i>A. caviae</i>	<i>A. caviae</i>
D64795	D64795	Universitario Miguel Servet	M	19 meses	Diarrea	No	Heces	Biotyper 3.0	2,2	<i>A. veronii</i>	<i>A. veronii</i>
D69555	D69555	Universitario Miguel Servet	M	39 años	Diarrea	No	Heces	Biotyper 3.0	2,2	<i>A. hydrophila</i>	<i>A. hydrophila</i>
D69626	D69626	Universitario Miguel Servet	M	68 años	Diarrea	No	Heces	Biotyper 3.0	2,2	<i>A. veronii</i>	<i>A. veronii</i>
D78248	D78248	Universitario Miguel Servet	H	71 años	Leucopenia severa	No	Sangre	Biotyper 3.0	2	<i>A. caviae</i>	<i>A. caviae</i>
D94491	D94491	Universitario Miguel Servet	ND	ND	ND	No	Sangre	Biotyper 3.0	ND	<i>A. hydrophila</i>	<i>A. hydrophila</i>
D88569	D88569	Universitario Miguel Servet	M	3 años	Deposiciones amarillentas	No	Heces	Biotyper 3.0	2.3	<i>A. caviae</i>	<i>A. caviae</i>
D88513	D88513	Universitario Miguel Servet	M	6 meses	Diarrea	Si (+ <i>Salmonella</i> sp.)	Heces	Biotyper 3.0	2,3	<i>A. caviae</i>	<i>A. caviae</i>
D76080	D76080	Universitario Miguel Servet	H	19 meses	Diarrea	No	Heces	Biotyper 3.0	2,3	<i>A. caviae</i>	<i>A. caviae</i>

**Anexo 2B (Continuación 2). Cepas de origen clínico re-identificadas mediante secuenciación del gen *rpoD*.**

Referencia URV	Referencia hospital	Hospital	Datos del paciente				Datos de la cepa				Identificación mediante secuenciación del gen <i>rpoD</i>
			Sexo	Edad	Signos/síntomas clínicos	Infección polimicrobiana	Origen	Software MALDI-TOF	Score	Identificación MALDI-TOF	
D78248	D78248	Universitario Miguel Servet	H	71 años	Leucopenia severa	No	Sangre	Biotyper 3.0	2	<i>A. caviae</i>	<i>A. caviae</i>
C91358	C91358	Universitario Miguel Servet	M	40 años	Diarrea	No	Heces	Biotyper 3.0	ND	<i>A. veronii</i>	<i>A. veronii</i>
D01752	D01752	Universitario Miguel Servet	M	75 años	Síndrome diarreico	No	Heces	Biotyper 3.0	2,2	<i>A. veronii</i>	<i>A. veronii</i>
D50233	D50233	Universitario Miguel Servet	M	56 años	Diarrea	No	Heces	Biotyper 3.0	2	<i>A. caviae</i>	<i>A. caviae</i>
D50300	D50300	Universitario Miguel Servet	M	74 años	Diarrea	No	Heces	Biotyper 3.0	2,1	<i>A. hydrophila</i>	<i>A. dhakensis</i>
D47366	D47366	Universitario Miguel Servet	H	3 años	Dolor abdominal	Si (+ <i>C. jejuni</i> )	Heces	Biotyper 3.0	ND	<i>A. veronii</i>	<i>A. veronii</i>
D69626	D69626	Universitario Miguel Servet	M	68 años	Síndrome diarreico	No	Heces	Biotyper 3.0	2,2	<i>A. veronii</i>	<i>A. veronii</i>
D75932	D75932	Universitario Miguel Servet	H	74 años	Úlcera en tobillo derecho	Si (+ <i>P.aeruginosa</i> y <i>E. faecalis</i> )	Úlcera	Biotyper 3.0	2,2	<i>A. hydrophila</i>	<i>A. hydrophila</i>
D75302	D75302	Universitario Miguel Servet	M	15 meses	Gastroenteritis inespecífica	No	Heces	Biotyper 3.0	1,8	<i>A. caviae</i>	<i>A. caviae</i>
D69555	D69555	Universitario Miguel Servet	M	39 años	Síndrome diarreico	Si (toxina <i>C. difficile</i> (+))	Heces	Biotyper 3.0	2,2	<i>A. hydrophila</i>	<i>A. hydrophila</i>
D64795	D64795	Universitario Miguel Servet	M	19 meses	Diarrea	No	Heces	Biotyper 3.0	2,2	<i>A. veronii</i>	<i>A. veronii</i>
D64677	D64677	Universitario Miguel Servet	M	74 años	Diarrea	No	Heces	Biotyper 3.0	ND	<i>A. caviae</i>	<i>A. caviae</i>
D60141	D60141	Universitario Miguel Servet	H	23 meses	Gastroenteritis	Si (+ <i>C. jejuni</i> )	Heces	Biotyper 3.0	2,3	<i>A. caviae</i>	<i>A. caviae</i>
D58686	D58686	Universitario Miguel Servet	H	4 años	Gastroenteritis	Si (+ <i>C. coli</i> )	Heces	Biotyper 3.0	2	<i>A. caviae</i>	<i>A. caviae</i>
D58299	D58299	Universitario Miguel Servet	H	10 meses	Diarrea	No	Heces	Biotyper 3.0	2,3	<i>A. caviae</i>	<i>A. caviae</i>
D78323	D78323	Universitario Miguel Servet	H	5 años	Gastroenteritis	No	Heces	Biotyper 3.0	2,3	<i>A. caviae</i>	<i>A. caviae</i>
D79527	D79527	Universitario Miguel Servet	H	23 meses	Gastroenteritis	Si (+ <i>Salmonella</i> grupo B)	Heces	Biotyper 3.0	2,2	<i>A. caviae</i>	<i>A. caviae</i>

**Anexo 2B (Continuación 3). Cepas de origen clínico re-identificadas mediante secuenciación del gen *rpoD*.**

Referencia URV	Referencia hospital	Hospital	Datos del paciente				Datos de la cepa				Identificación mediante secuenciación del gen <i>rpoD</i>
			Sexo	Edad	Signos/síntomas clínicos	Infección polimicrobiana	Origen	Software MALDI-TOF	Score	Identificación MALDI-TOF	
D78350	D78350	Universitario Miguel Servet	H	41 años	Gastroenteritis	No	Heces	Biotyper 3.0	2,3	<i>A. caviae</i>	<i>A. caviae</i>
C91358	C91358	Universitario Miguel Servet	M	40 años	Diarrea	No	Heces	Biotyper 3.0	ND	<i>A. veronii</i>	<i>A. veronii</i>
D84402	D84402	Universitario Miguel Servet	H	4 años	Diarrea	No	Heces	Biotyper 3.0	ND	<i>Aeromonas</i> sp.	<i>A. media</i>
D83718	D83718	Universitario Miguel Servet	H	54 años	Gastroenteritis	No	Heces	Biotyper 3.0	2,2	<i>A. caviae</i>	<i>A. veronii</i>
D83043	D83043	Universitario Miguel Servet	H	90 años	Diarrea	No	Heces	Biotyper 3.0	2,1	<i>A. caviae</i>	<i>A. caviae</i>
D83503	D83503	Universitario Miguel Servet	M	86 años	Diarrea	No	Heces	Biotyper 3.0	2,1	<i>A. veronii</i>	<i>A. veronii</i>
D83360	D83360	Universitario Miguel Servet	M	79 años	Diarrea	No	Heces	Biotyper 3.0	2,1	<i>A. caviae</i>	<i>A. caviae</i>
D82383	D82383	Universitario Miguel Servet	H	22 meses	Diarrea	No	Heces	Biotyper 3.0	2,3	<i>A. caviae</i>	<i>A. caviae</i>
D88359	D88359	Universitario Miguel Servet	M	39 años	Fiebre	No	Asp. bronquial	Biotyper 3.0	2,2	<i>A. veronii</i>	<i>A. veronii</i>
D86833	D86833	Universitario Miguel Servet	H	58 años	Diarrea	No	Heces	Biotyper 3.0	2,2	<i>A. caviae</i>	<i>A. caviae</i>
E63459	E63459	Universitario Miguel Servet	H	77 años	Diarrea	No	Heces	Biotyper 3.0	2,1	<i>A. caviae</i>	<i>A. caviae</i>
E98353	E98353	Universitario Miguel Servet	H	95 años	Diarrea	No	Heces	Biotyper 3.0	2,1	<i>A. veronii</i>	<i>A. veronii</i>
E74283	E74283	Universitario Miguel Servet	H	84 años	Diarrea	No	Heces	Biotyper 3.0	2,1	<i>A. caviae</i>	<i>A. caviae</i>
E01193	E01193	Universitario Miguel Servet	H	6 meses	Invaginación intestinal	No	Heces	Biotyper 3.0	2,2	<i>A. caviae</i>	<i>A. caviae</i>
E42091	E42091	Universitario Miguel Servet	M	22 meses	Melena	No	Heces	Biotyper 3.0	2,0	<i>A. caviae</i>	<i>A. caviae</i>
E40645	E40645	Universitario Miguel Servet	M	9 meses	Diarrea	No	Heces	Biotyper 3.0	2,2	<i>A. caviae</i>	<i>A. caviae</i>
E64820	E64820	Universitario Miguel Servet	H	12 meses	Gastroenteritis	No	Heces	Biotyper 3.0	2,2	<i>A. caviae</i>	<i>A. caviae</i>
E96044	E96044	Universitario Miguel Servet	H	5 años	Gastroenteritis	No	Heces	Biotyper 3.0	2,2	<i>A. caviae</i>	<i>A. caviae</i>

**Anexo 2B (Continuación 4). Cepas de origen clínico re-identificadas mediante secuenciación del gen *rpoD*.**

Referencia URV	Referencia hospital	Hospital	Datos del paciente				Datos de la cepa				Identificación mediante secuenciación del gen <i>rpoD</i>
			Sexo	Edad	Signos/síntomas clínicos	Infección polimicrobiana	Origen	Software MALDI-TOF	Score	Identificación MALDI-TOF	
E76024	E76024	Universitario Miguel Servet	M	6 años	Gastroenteritis	No	Heces	Biotyper 3.0	2.1	<i>A. caviae</i>	<i>A. caviae</i>
E93373	E93373	Universitario Miguel Servet	M	4 años	Gastroenteritis	No	Heces	Biotyper 3.0	2.2	<i>A. caviae</i>	<i>A. caviae</i>
E59720	E59720	Universitario Miguel Servet	H	17 meses	ND	No	Heces	Biotyper 3.0	2.2	<i>A. caviae</i>	<i>A. caviae</i>
E89692	E89692	Universitario Miguel Servet	M	11 meses	ND	No	Heces	Biotyper 3.0	2.1	<i>A. caviae</i>	<i>A. caviae</i>
E65095	E65095	Universitario Miguel Servet	M	2 años	Diarrea	No	Heces	Biotyper 3.0	2.2	<i>A. caviae</i>	<i>A. caviae</i>
E64154	E64154	Universitario Miguel Servet	M	16 meses	Diarrea	No	Heces	Biotyper 3.0	2.0	<i>A. caviae</i>	<i>A. caviae</i>
E97296	E97296	Universitario Miguel Servet	H	13 meses	Gastroenteritis	No	Heces	Biotyper 3.0	2.0	<i>A. caviae</i> <i>/hydrophila</i>	<i>A. caviae</i>
E85025	E85025	Universitario Miguel Servet	H	2 años	Diarrea	No	Heces	Biotyper 3.0	2.1	<i>A. caviae</i>	<i>A. caviae</i>
E59303	E59303	Universitario Miguel Servet	M	9 meses	Gastroenteritis	No	Heces	Biotyper 3.0	2.2	<i>A. caviae</i>	<i>A. caviae</i>
E96319-C	E96319-C	Universitario Miguel Servet	M	9 meses	Inapetencia	No	Heces	Biotyper 3.0	2.2	<i>A. caviae</i>	<i>A. caviae</i>
E96849	E96849	Universitario Miguel Servet	M	11 meses	Giardiasis	No	Heces	Biotyper 3.0	2.2	<i>A. caviae</i>	<i>A. caviae</i>
E38510	E38510	Universitario Miguel Servet	M	73 años	Fiebre	No	Sangre	Biotyper 3.0	2.3	<i>A. caviae</i>	<i>A. caviae</i>
E32762	E32762	Universitario Miguel Servet	M	16 meses	Diarrea	No	Heces	Biotyper 3.0	2.1	<i>A. caviae</i>	<i>A. caviae</i>
E59219	E59219	Universitario Miguel Servet	M	2 años	Fiebre	No	Heces	Biotyper 3.0	2.2	<i>A. caviae</i>	No <i>Aeromonas</i>
E59271	E59271	Universitario Miguel Servet	M	5 meses	Gastroenteritis	No	Heces	Biotyper 3.0	2.0	<i>A. caviae</i>	<i>A. caviae</i>
E26769	E26769	Universitario Miguel Servet	H	93 años	Diarrea	No	Heces	Biotyper 3.0	2.3	<i>A. caviae</i>	<i>A. caviae</i>
E63614	E63614	Universitario Miguel Servet	M	79 años	Gastroenteritis	No	Heces	Biotyper 3.0	2.1	<i>A. caviae</i>	<i>A. caviae</i>

**Anexo 2B (Continuación 5). Cepas de origen clínico re-identificadas mediante secuenciación del gen *rpoD*.**

Referencia URV	Referencia hospital	Hospital	Datos del paciente				Datos de la cepa				Identificación mediante secuenciación del gen <i>rpoD</i>
			Sexo	Edad	Signos/síntomas clínicos	Infección polimicrobiana	Origen	Software MALDI-TOF	Score	Identificación MALDI-TOF	
E94593	E94593	Universitario Miguel Servet	M	15 meses	Fiebre	No	Heces	Biotyper 3.0	2.2	<i>A. caviae</i>	<i>A. caviae</i>
E85568	E85568	Universitario Miguel Servet	H	8 meses	Diarrea	No	Heces	Biotyper 3.0	2.1	<i>A. caviae</i>	<i>A. caviae</i>
E12732	E12732	Universitario Miguel Servet	M	2 años	Gastroenteritis	No	Heces	Biotyper 3.0	2.1	<i>A. veronii</i>	<i>A. veronii</i>
E27053	E27053	Universitario Miguel Servet	M	4 años	Astenia	No	Heces	Biotyper 3.0	2.2	<i>A. caviae</i>	<i>A. caviae</i>
E53668	E53668	Universitario Miguel Servet	M	10 meses	Dermatitis	No	Heces	Biotyper 3.0	2.3	<i>A. caviae</i>	<i>A. caviae</i>
E09526	E09526	Universitario Miguel Servet	H	87 años	Diarrea	No	Heces	Biotyper 3.0	2.2	<i>A. caviae</i>	<i>A. caviae</i>
E51473	E51473	Universitario Miguel Servet	H	14 meses	Diarrea	No	Heces	Biotyper 3.0	2.2	<i>A. caviae</i>	<i>A. caviae</i>
E38414	E38414	Universitario Miguel Servet	M	70 años	ND	No	ND	Biotyper 3.0	2.2	<i>A. veronii</i>	<i>A. veronii</i>
E09883	E09883	Universitario Miguel Servet	H	51 años	Diarrea	No	Heces	Biotyper 3.0	2.2	<i>A. caviae</i>	<i>A. caviae</i>
E56526	E56526	Universitario Miguel Servet	H	63 años	ND	No	Heces	Biotyper 3.0	2.2	<i>A. caviae</i>	<i>A. caviae</i>
E57314	E57314	Universitario Miguel Servet	H	3 años	Diarrea	No	Heces	Biotyper 3.0	2.0	<i>A. caviae</i>	<i>A. caviae</i>
E95533	E95533	Universitario Miguel Servet	M	79 años	Diarrea	No	Heces	Biotyper 3.0	1.9	<i>A. caviae</i>	<i>A. caviae</i>
E12297	E12297	Universitario Miguel Servet	M	6 meses	Diarrea	No	Heces	Biotyper 3.0	2.2	<i>A. caviae</i>	<i>A. caviae</i>
E14978	E14978	Universitario Miguel Servet	M	63 años	Colecistitis	No	Heces Líq. ascítico	Biotyper 3.0	2.3	<i>A. caviae</i>	<i>A. caviae</i>
E95866	E95866	Universitario Miguel Servet	M	3 años	Diarrea	No	Heces	Biotyper 3.0	2.3	<i>A. caviae</i>	<i>A. caviae</i>
E12270	E12270	Universitario Miguel Servet	H	68 años	Diarrea	No	Heces	Biotyper 3.0	2.2	<i>A. veronii</i>	<i>A. veronii</i>
E99204	E99204	Universitario Miguel Servet	M	23 meses	Gastroenteritis	No	Heces	Biotyper 3.0	2.1	<i>A. veronii</i>	<i>A. media</i>
E53567	E53567	Universitario Miguel Servet	M	70 años	ND	No	Heces	Biotyper 3.0	2.2	<i>A. veronii</i>	<i>A. veronii</i>

**Anexo 2B (Continuación 6). Cepas de origen clínico re-identificadas mediante secuenciación del gen *rpoD*.**

Referencia URV	Referencia hospital	Hospital	Datos del paciente				Datos de la cepa				Identificación mediante secuenciación del gen <i>rpoD</i>
			Sexo	Edad	Signos/síntomas clínicos	Infección polimicrobiana	Origen	Software MALDI-TOF	Score	Identificación MALDI-TOF	
E03300	E03300	Universitario Miguel Servet	M	22 meses	Diarrea	No	Heces	Biotyper 3.0	2.0	<i>A. hydrophila</i>	<i>A. caviae</i>
E29779	E29779	Universitario Miguel Servet	M	2 años	Diarrea	No	Heces	Biotyper 3.0	2.2	<i>A. caviae</i>	<i>A. caviae</i>
E07947	E07947	Universitario Miguel Servet	M	82 años	Laceración	No	Herida	Biotyper 3.0	2.2	<i>A. hydrophila</i>	<i>A. hydrophila</i>
E47010	E47010	Universitario Miguel Servet	H	8 meses	Diarrea	No	Heces	Biotyper 3.0	2.3	<i>A. caviae</i>	No <i>Aeromonas</i>
E51573	E51573	Universitario Miguel Servet	M	11 meses	ND	No	Heces	Biotyper 3.0	2.2	<i>A. caviae</i>	<i>A. caviae</i>
E06319	E06319	Universitario Miguel Servet	M	14 meses	Gastroenteritis	No	Heces	Biotyper 3.0	2.1	<i>A. caviae</i>	<i>A. caviae</i>
E15652	E15652	Universitario Miguel Servet	H	56 años	ND	No	Sec. faríngea	Biotyper 3.0	2.1	<i>A. caviae</i>	<i>A. caviae</i>
E48865	E48865	Universitario Miguel Servet	H	2 años	Gastroenteritis	No	Heces	Biotyper 3.0	2.0	<i>A. caviae</i>	<i>A. caviae</i>
E54164	E54164	Universitario Miguel Servet	H	79 años	Diarrea	No	Heces	Biotyper 3.0	2.1	<i>A. caviae</i>	<i>A. caviae</i>
E94493	E94493	Universitario Miguel Servet	H	72 años	Diarrea	No	Heces	Biotyper 3.0	2.1	<i>A. caviae</i>	<i>A. caviae</i>
E90245	E90245	Universitario Miguel Servet	H	21 meses	Control	No	Heces	Biotyper 3.0	2.1	<i>A. caviae</i>	<i>A. caviae</i>
941C	A25	de Guadalajara Universitario	ND	ND	ND	ND	Heces	Biotyper 3.1	2,2	<i>A. veronii</i>	<i>A. veronii</i>
944C	A9	de Guadalajara Universitario	ND	ND	ND	ND	Heces	Biotyper 3.1	2,3	<i>A. caviae</i>	<i>A. caviae</i>
953C	AA47	de Guadalajara Universitario	ND	ND	ND	ND	Sangre	Biotyper 3.1	2,2	<i>A. veronii</i>	<i>A. veronii</i>
958C	AC87	de Guadalajara Universitario	ND	ND	ND	ND	Heces	Biotyper 3.1	2,1	<i>A. veronii</i>	<i>A. veronii</i>
1030C	AE92	de Guadalajara Universitario	ND	ND	ND	ND	Heces	Biotyper 3.1	1,5	<i>A. hydrophila</i>	<i>A. caviae</i>
1028C	AF10	de Guadalajara	ND	ND	ND	ND	Heces	Biotyper 3.1	2,2	<i>A. veronii</i>	<i>A. veronii</i>



**Anexo 2B (Continuación 7). Cepas de origen clínico re-identificadas mediante secuenciación del gen *rpoD*.**

Referencia URV	Referencia hospital	Hospital	Datos del paciente				Datos de la cepa				Identificación mediante secuenciación del gen <i>rpoD</i>
			Sexo	Edad	Signos/síntomas clínicos	Infección polimicrobiana	Origen	Software MALDI-TOF	Score	Identificación MALDI-TOF	
996C	AN65	Universitario de Guadalajara	ND	ND	ND	ND	Heces	Biotyper 3.1	1,9	<i>A. caviae</i>	<i>A. caviae</i>
1025C	AÑ11	Universitario de Guadalajara	ND	ND	ND	ND	Heces	Biotyper 3.1	2,0	<i>A. caviae</i>	<i>A. caviae</i>
AZ99	AZ99	Universitario de Guadalajara	ND	ND	ND	ND	Herida	Biotyper 3.1	2,2	<i>A. hydrophila</i>	<i>A. hydrophila</i>
1010C	BO35	Universitario de Guadalajara	ND	ND	ND	ND	Heces	Biotyper 3.1	2,0	<i>A. caviae</i>	<i>A. caviae</i>
1013C	BO66	Universitario de Guadalajara	ND	ND	ND	ND	Heces	Biotyper 3.1	2,1	<i>A. media</i>	<i>A. media</i>
1007C	PB62	Universitario de Guadalajara	ND	ND	ND	ND	Heces	Biotyper 3.1	2,2	<i>A. veronii</i>	<i>A. veronii</i>
935C	A19	Universitario de Guadalajara	ND	ND	ND	ND	Heces	Biotyper 3.1	2,3	<i>A. caviae</i>	<i>A. caviae</i>
940C	A2	Universitario de Guadalajara	ND	ND	ND	ND	Heces	Biotyper 3.1	2,1	<i>A. caviae</i>	<i>A. caviae</i>
937C	A26	Universitario de Guadalajara	ND	ND	ND	ND	Heces	Biotyper 3.1	2,2	<i>A. caviae</i>	<i>A. caviae</i>
938C	A3	Universitario de Guadalajara	ND	ND	ND	ND	Heces	Biotyper 3.1	2,2	<i>A. caviae</i>	<i>A. caviae</i>
942C	A4	Universitario de Guadalajara	ND	ND	ND	ND	Heces	Biotyper 3.1	2,1	<i>A. hydrophila</i>	<i>A. caviae</i>
939C	A5	Universitario de Guadalajara	ND	ND	ND	ND	Heces	Biotyper 3.1	2,1	<i>A. caviae</i>	<i>A. caviae</i>
965C	AA79	Universitario de Guadalajara	ND	ND	ND	ND	Espujo	Biotyper 3.1	2,2	<i>A. veronii</i>	<i>A. veronii</i>
995C	AB21	Universitario de Guadalajara	ND	ND	ND	ND	ND	Biotyper 3.1	2,2	<i>A. caviae</i>	<i>A. caviae</i>
1020C	AB22	Universitario de Guadalajara	ND	ND	ND	ND	Heces	Biotyper 3.1	2,1	<i>A. caviae</i>	<i>A. caviae</i>
AC55	AC55	Universitario de Guadalajara	ND	ND	ND	ND	Herida	Biotyper 3.1	2,1	<i>A. salmonicida</i>	<i>A. salmonicida</i>
945C	AD23	Universitario de Guadalajara	ND	ND	ND	ND	Heces	Biotyper 3.1	2,0	<i>A. hydrophila</i>	<i>A. hydrophila</i>
959C	AE100	Universitario de Guadalajara	ND	ND	ND	ND	Heces	Biotyper 3.1	2,2	<i>A. veronii</i>	<i>A. veronii</i>

**Anexo 2B (Continuación 8). Cepas de origen clínico re-identificadas mediante secuenciación del gen *rpoD*.**

Referencia URV	Referencia hospital	Hospital	Datos del paciente				Datos de la cepa				Identificación mediante secuenciación del gen <i>rpoD</i>
			Sexo	Edad	Signos/síntomas clínicos	Infección polimicrobiana	Origen	Software MALDI-TOF	Score	Identificación MALDI-TOF	
964C	AE63/5	Universitario de Guadalajara	ND	ND	ND	ND	Heces	Biotyper 3.1	2,1	<i>A. caviae</i>	<i>A. caviae</i>
1006C	AE64	Universitario de Guadalajara	ND	ND	ND	ND	Heces	Biotyper 3.1	2,2	<i>A. caviae</i>	<i>A. caviae</i>
980C	AE88	Universitario de Guadalajara	ND	ND	ND	ND	Heces	Biotyper 3.1	2,2	<i>A. caviae</i>	<i>A. caviae</i>
1026C	AE96	Universitario de Guadalajara	ND	ND	ND	ND	Heces	Biotyper 3.1	2,2	<i>A. caviae</i>	<i>A. caviae</i>
1032C	AE98	Universitario de Guadalajara	ND	ND	ND	ND	Heces	Biotyper 3.1	2,2	<i>A. caviae</i>	<i>A. caviae</i>
1029C	AF13	Universitario de Guadalajara	ND	ND	ND	ND	Heces	Biotyper 3.1	2,1	<i>A. caviae</i>	<i>A. caviae</i>
1031C	AF19	Universitario de Guadalajara	ND	ND	ND	ND	Heces	Biotyper 3.1	2,1	<i>A. caviae</i>	<i>A. caviae</i>
946C	AG50	Universitario de Guadalajara	ND	ND	ND	ND	Heces	Biotyper 3.1	2,1	<i>A. bestiarum</i>	<i>A. bestiarum</i>
AG70	AG70	Universitario de Guadalajara	ND	ND	ND	ND	Sangre	Biotyper 3.1	2,1	<i>A. caviae</i>	<i>A. caviae</i>
981C	AG89	Universitario de Guadalajara	ND	ND	ND	ND	Heces	Biotyper 3.1	2,0	<i>A. eucrenophila</i>	<i>A. media</i>
947C	AH99	Universitario de Guadalajara	ND	ND	ND	ND	Heces	Biotyper 3.1	1,8	<i>A. bestiarum</i>	<i>A. salmonicida</i>
948C	AI10	Universitario de Guadalajara	ND	ND	ND	ND	Heces	Biotyper 3.1	2,1	<i>A. hydrophila</i>	<i>A. hydrophila</i>
951C	AI64	Universitario de Guadalajara	ND	ND	ND	ND	Heces	Biotyper 3.1	2,2	<i>A. caviae</i>	<i>A. caviae</i>
AI7	AI7	Universitario de Guadalajara	ND	ND	ND	ND	Sangre	Biotyper 3.1	2,0	<i>A. veronii</i>	<i>A. veronii</i>
989C	AJ66	Universitario de Guadalajara	ND	ND	ND	ND	Heces	Biotyper 3.1	2,3	<i>A. caviae</i>	<i>A. caviae</i>
982C	AK93	Universitario de Guadalajara	ND	ND	ND	ND	Heces	Biotyper 3.1	2,1	<i>A. veronii</i>	<i>A. veronii</i>
983C	AM43	Universitario de Guadalajara	ND	ND	ND	ND	Heces	Biotyper 3.1	2,0	<i>A. hydrophila</i>	<i>A. hydrophila</i>

**Anexo 2B (Continuación 9). Cepas de origen clínico re-identificadas mediante secuenciación del gen *rpoD*.**

Referencia URV	Referencia hospital	Hospital	Datos del paciente				Datos de la cepa				Identificación mediante secuenciación del gen <i>rpoD</i>
			Sexo	Edad	Signos/síntomas clínicos	Infección polimicrobiana	Origen	Software MALDI-TOF	Score	Identificación MALDI-TOF	
994C	AM79	Universitario de Guadalajara	ND	ND	ND	ND	Heces	Biotyper 3.1	2,1	<i>A. caviae</i>	<i>A. caviae</i>
988C	AM14	Universitario de Guadalajara	ND	ND	ND	ND	ND	Biotyper 3.1	2,2	<i>A. veronii</i>	<i>A. allosaccharophila</i>
998C	AN53	Universitario de Guadalajara	ND	ND	ND	ND	Heces	Biotyper 3.1	2,1	<i>A. veronii</i>	<i>A. allosaccharophila</i>
1019C	AN62	Universitario de Guadalajara	ND	ND	ND	ND	Heces	Biotyper 3.1	2,1	<i>A. media</i>	<i>A. media</i>
999C	AN72	Universitario de Guadalajara	ND	ND	ND	ND	Heces	Biotyper 3.1	2,0	<i>A. media</i>	<i>A. media</i>
1023C	AN93	Universitario de Guadalajara	ND	ND	ND	ND	Heces	Biotyper 3.1	2,1	<i>A. caviae</i>	<i>A. caviae</i>
1022C	AÑ37	Universitario de Guadalajara	ND	ND	ND	ND	Heces	Biotyper 3.1	2,3	<i>A. caviae</i>	<i>A. caviae</i>
1004C	AÑ77	Universitario de Guadalajara	ND	ND	ND	ND	ND	Biotyper 3.1	2,2	<i>A. caviae</i>	<i>A. caviae</i>
1001C	AO14	Universitario de Guadalajara	ND	ND	ND	ND	Heces	Biotyper 3.1	2,1	<i>A. caviae</i>	<i>A. caviae</i>
AQ18	AQ18	Universitario de Guadalajara	ND	ND	ND	ND	Herida	Biotyper 3.1	2,0	<i>A. hydrophila</i>	<i>A. hydrophila</i>
985C	AS26	Universitario de Guadalajara	ND	ND	ND	ND	Heces	Biotyper 3.1	2,0	<i>A. veronii</i>	<i>A. veronii</i>
BA25	BA25	Universitario de Guadalajara	ND	ND	ND	ND	Asp. bronquial	Biotyper 3.1	2,1	<i>A. hydrophila</i>	<i>A. hydrophila</i>
BB14	BB14	Universitario de Guadalajara	ND	ND	ND	ND	Bilis	Biotyper 3.1	2,1	<i>A. hydrophila</i>	<i>A. hydrophila</i>
1017C	BO49	Universitario de Guadalajara	ND	ND	ND	ND	Heces	Biotyper 3.1	2,3	<i>A. veronii</i>	<i>A. veronii</i>
1016C	BO70	Universitario de Guadalajara	ND	ND	ND	ND	Heces	Biotyper 3.1	2,2	<i>A. hydrophila</i>	<i>A. hydrophila</i>
1015C	BP02	Universitario de Guadalajara	ND	ND	ND	ND	Heces	Biotyper 3.1	2,1	<i>A. veronii</i>	<i>A. veronii</i>
1011C	BP18	Universitario de Guadalajara	ND	ND	ND	ND	Heces	Biotyper 3.1	2,2	<i>A. caviae</i>	<i>A. caviae</i>
1014C	BP46	Universitario de Guadalajara	ND	ND	ND	ND	Heces	Biotyper 3.1	2,0	<i>A. caviae</i>	<i>A. caviae</i>

**Anexo 2B (Continuación 10). Cepas de origen clínico re-identificadas mediante secuenciación del gen *rpoD*.**

Referencia URV	Referencia hospital	Hospital	Datos del paciente				Datos de la cepa				Identificación mediante secuenciación del gen <i>rpoD</i>
			Sexo	Edad	Signos/síntomas clínicos	Infección polimicrobiana	Origen	Software MALDI-TOF	Score	Identificación MALDI-TOF	
986C	O67	Universitario de Guadalajara	ND	ND	ND	ND	Heces	Biotyper 3.1	2,0	<i>A. hydrophila</i>	<i>A. hydrophila</i>
O80	O80	Universitario de Guadalajara	ND	ND	ND	ND	Bilis	Biotyper 3.1	2,1	<i>A. hydrophila</i>	<i>A. hydrophila</i>
P28	P28	Universitario de Guadalajara	ND	ND	ND	ND	Sangre	Biotyper 3.1	2,1	<i>A. caviae</i>	<i>A. caviae</i>

ND: no disponible. Hospital Universitario Miguel Servet, Zaragoza (España); Hospital Universitario de Guadalajara, Guadalajara (España).

### Anexo 3. Cepas de origen ambiental identificadas en este estudio.

Referencia URV	Origen		Identificación mediante secuenciación gen <i>rpoD</i>
	Geográfico	Tipo de agua	
4287D <sup>T</sup>	Hauho, Finlandia	Agua de lago con afloramiento de cianobacterias	<i>A. finlandensis</i>
AE119	Pyhtää, Finlandia	Agua de lago con afloramiento de cianobacterias	<i>A. finlandensis</i>
4301C	Pielavesi, Finlandia	Agua de lago con afloramiento de cianobacterias	<i>A. finlandensis</i>
4318B	Pöytyä/Aura, Finlandia	Agua de lago con afloramiento de cianobacterias	<i>A. finlandensis</i>
HE40	Lapinjärvi, Finlandia	Agua de lago con afloramiento de cianobacterias	<i>A. finlandensis</i>
AE93	Kangasala, Finlandia	Agua de lago con afloramiento de cianobacterias	<i>A. finlandensis</i>
HE110	Mäntsälä, Finlandia	Agua de lago con afloramiento de cianobacterias	<i>A. finlandensis</i>
AE122 <sup>T</sup>	Pyhtää, Finlandia	Agua de lago con afloramiento de cianobacterias	<i>A. lacus</i>
AE204	Soumussalmi, Finlandia	Agua de lago con afloramiento de cianobacterias	<i>A. lacus</i>
AE235 <sup>T</sup>	Valkeala, Finlandia	Agua de lago con afloramiento de cianobacterias	<i>A. aquatica</i>
HE157	Vihti, Finlandia	Agua de lago con afloramiento de cianobacterias	<i>A. aquatica</i>
AE207	Tammela, Finlandia	Agua de lago con afloramiento de cianobacterias	<b><i>Aeromonas</i> sp. nov.4</b>
AELE1-15A	EDAR de Reus (España)	Entrada de lagunaje	<i>A. caviae</i>
AELE1-15C	EDAR de Reus (España)	Entrada de lagunaje	<i>A. caviae</i>
AELE1-16C	EDAR de Reus (España)	Entrada de lagunaje	<i>A. caviae</i>
SELE1-15A	EDAR de Reus (España)	Entrada de lagunaje	<i>A. caviae</i>
SELE1-15B	EDAR de Reus (España)	Entrada de lagunaje	<i>A. caviae</i>
SELE1-15E	EDAR de Reus (España)	Entrada de lagunaje	<i>A. caviae</i>
SELE1-16A	EDAR de Reus (España)	Entrada de lagunaje	<i>A. caviae</i>
BELE1-15A	EDAR de Reus (España)	Entrada de lagunaje	<i>A. caviae</i>
BELE1-15C	EDAR de Reus (España)	Entrada de lagunaje	<i>A. caviae</i>
AELE2-15C	EDAR de Reus (España)	Entrada de lagunaje	<i>A. caviae</i>
AELE2-15D	EDAR de Reus (España)	Entrada de lagunaje	<i>A. caviae</i>
AELE2-16A	EDAR de Reus (España)	Entrada de lagunaje	<i>A. caviae</i>
AELE2-16B	EDAR de Reus (España)	Entrada de lagunaje	<i>A. caviae</i>
AELE2-16C	EDAR de Reus (España)	Entrada de lagunaje	<i>A. caviae</i>
AELE2-18A	EDAR de Reus (España)	Entrada de lagunaje	<i>A. caviae</i>
SELE2-15C	EDAR de Reus (España)	Entrada de lagunaje	<i>A. caviae</i>
SELE2-15D	EDAR de Reus (España)	Entrada de lagunaje	<i>A. caviae</i>
SELE2-16B	EDAR de Reus (España)	Entrada de lagunaje	<i>A. caviae</i>
SELE2-16C	EDAR de Reus (España)	Entrada de lagunaje	<i>A. caviae</i>
SELE2-17A	EDAR de Reus (España)	Entrada de lagunaje	<i>A. caviae</i>
BELE2-15A	EDAR de Reus (España)	Entrada de lagunaje	<i>A. caviae</i>
BELE2-15D	EDAR de Reus (España)	Entrada de lagunaje	<i>A. caviae</i>
BELE2-15E	EDAR de Reus (España)	Entrada de lagunaje	<i>A. caviae</i>
BELE2-16A	EDAR de Reus (España)	Entrada de lagunaje	<i>A. caviae</i>
BELE2-17A	EDAR de Reus (España)	Entrada de lagunaje	<i>A. caviae</i>
BELE2-17B	EDAR de Reus (España)	Entrada de lagunaje	<i>A. caviae</i>
AELE3-15A	EDAR de Reus (España)	Entrada de lagunaje	<i>A. caviae</i>
AELE3-15B	EDAR de Reus (España)	Entrada de lagunaje	<i>A. caviae</i>

**Anexo 3 (continuación 1). Cepas de origen ambiental identificadas en este estudio.**

Referencia URV	Origen		Identificación mediante secuenciación gen <i>rpoD</i>
	Geográfico	Tipo de agua	
AELE3-15C	EDAR de Reus (España)	Entrada de lagunaje	<i>A. caviae</i>
AELE3-15D	EDAR de Reus (España)	Entrada de lagunaje	<i>A. caviae</i>
SELE3-15A	EDAR de Reus (España)	Entrada de lagunaje	<i>A. caviae</i>
SELE3-15B	EDAR de Reus (España)	Entrada de lagunaje	<i>A. caviae</i>
SELE3-16A	EDAR de Reus (España)	Entrada de lagunaje	<i>A. caviae</i>
SELE3-16B	EDAR de Reus (España)	Entrada de lagunaje	<i>A. caviae</i>
SELE3-16D	EDAR de Reus (España)	Entrada de lagunaje	<i>A. caviae</i>
BELE3-15A	EDAR de Reus (España)	Entrada de lagunaje	<i>A. caviae</i>
BELE3-15B	EDAR de Reus (España)	Entrada de lagunaje	<i>A. caviae</i>
AELE5-15B	EDAR de Reus (España)	Entrada de lagunaje	<i>A. caviae</i>
AELE5-15C	EDAR de Reus (España)	Entrada de lagunaje	<i>A. caviae</i>
AELE5-15D	EDAR de Reus (España)	Entrada de lagunaje	<i>A. caviae</i>
AELE5-16A	EDAR de Reus (España)	Entrada de lagunaje	<i>A. caviae</i>
AEL5-16B	EDAR de Reus (España)	Entrada de lagunaje	<i>A. caviae</i>
SELE5-15A	EDAR de Reus (España)	Entrada de lagunaje	<i>A. caviae</i>
SELE5-15C	EDAR de Reus (España)	Entrada de lagunaje	<i>A. caviae</i>
SELE5-15D	EDAR de Reus (España)	Entrada de lagunaje	<i>A. caviae</i>
SELE5-16A	EDAR de Reus (España)	Entrada de lagunaje	<i>A. caviae</i>
SELE5-16C	EDAR de Reus (España)	Entrada de lagunaje	<i>A. caviae</i>
SELE5-16D	EDAR de Reus (España)	Entrada de lagunaje	<i>A. caviae</i>
BELE5-15A	EDAR de Reus (España)	Entrada de lagunaje	<i>A. caviae</i>
BELE5-15B	EDAR de Reus (España)	Entrada de lagunaje	<i>A. caviae</i>
BELE5-15C	EDAR de Reus (España)	Entrada de lagunaje	<i>A. caviae</i>
BELE5-15D	EDAR de Reus (España)	Entrada de lagunaje	<i>A. caviae</i>
BELE5-16B	EDAR de Reus (España)	Entrada de lagunaje	<i>A. caviae</i>
BELE5-16C	EDAR de Reus (España)	Entrada de lagunaje	<i>A. caviae</i>
BELE5-16D	EDAR de Reus (España)	Entrada de lagunaje	<i>A. caviae</i>
AELE6-15A	EDAR de Reus (España)	Entrada de lagunaje	<i>A. caviae</i>
AELE6-15B	EDAR de Reus (España)	Entrada de lagunaje	<i>A. caviae</i>
AELE6-15C	EDAR de Reus (España)	Entrada de lagunaje	<i>A. caviae</i>
AELE6-15D	EDAR de Reus (España)	Entrada de lagunaje	<i>A. caviae</i>
AELE6-16C	EDAR de Reus (España)	Entrada de lagunaje	<i>A. caviae</i>
SELE6-15A	EDAR de Reus (España)	Entrada de lagunaje	<i>A. caviae</i>
SELE6-15B	EDAR de Reus (España)	Entrada de lagunaje	<i>A. caviae</i>
BELE6-15C	EDAR de Reus (España)	Entrada de lagunaje	<i>A. caviae</i>
BELE6-16A	EDAR de Reus (España)	Entrada de lagunaje	<i>A. caviae</i>
BELE6-16C	EDAR de Reus (España)	Entrada de lagunaje	<i>A. caviae</i>
AELE7-15A	EDAR de Reus (España)	Entrada de lagunaje	<i>A. caviae</i>
AELE7-15C	EDAR de Reus (España)	Entrada de lagunaje	<i>A. caviae</i>
AELE7-15E	EDAR de Reus (España)	Entrada de lagunaje	<i>A. caviae</i>

**Anexo 3 (continuación 2). Cepas de origen ambiental identificadas en este estudio.**

Referencia URV	Origen		Identificación mediante secuenciación gen <i>rpoD</i>
	Geográfico	Tipo de agua	
AELE7-15F	EDAR de Reus (España)	Entrada de lagunaje	<i>A. caviae</i>
AELE7-15G	EDAR de Reus (España)	Entrada de lagunaje	<i>A. caviae</i>
AELE7-16A	EDAR de Reus (España)	Entrada de lagunaje	<i>A. caviae</i>
AELE7-16C	EDAR de Reus (España)	Entrada de lagunaje	<i>A. caviae</i>
AELE7-16D	EDAR de Reus (España)	Entrada de lagunaje	<i>A. caviae</i>
AELE7-16E	EDAR de Reus (España)	Entrada de lagunaje	<i>A. caviae</i>
AELE7-16F	EDAR de Reus (España)	Entrada de lagunaje	<i>A. caviae</i>
AELE7-16G	EDAR de Reus (España)	Entrada de lagunaje	<i>A. caviae</i>
SELE7-15A	EDAR de Reus (España)	Entrada de lagunaje	<i>A. caviae</i>
SELE7-15B	EDAR de Reus (España)	Entrada de lagunaje	<i>A. caviae</i>
SELE7-15C	EDAR de Reus (España)	Entrada de lagunaje	<i>A. caviae</i>
SELE7-15D	EDAR de Reus (España)	Entrada de lagunaje	<i>A. caviae</i>
SELE7-15E	EDAR de Reus (España)	Entrada de lagunaje	<i>A. caviae</i>
SELE7-15F	EDAR de Reus (España)	Entrada de lagunaje	<i>A. caviae</i>
SELE7-15G	EDAR de Reus (España)	Entrada de lagunaje	<i>A. caviae</i>
SELE7-16C	EDAR de Reus (España)	Entrada de lagunaje	<i>A. caviae</i>
SELE7-16D	EDAR de Reus (España)	Entrada de lagunaje	<i>A. caviae</i>
SELE7-16F	EDAR de Reus (España)	Entrada de lagunaje	<i>A. caviae</i>
SELE7-16G	EDAR de Reus (España)	Entrada de lagunaje	<i>A. caviae</i>
BELE7-15B	EDAR de Reus (España)	Entrada de lagunaje	<i>A. caviae</i>
BELE7-15E	EDAR de Reus (España)	Entrada de lagunaje	<i>A. caviae</i>
BELE7-15G	EDAR de Reus (España)	Entrada de lagunaje	<i>A. caviae</i>
BELE7-16C	EDAR de Reus (España)	Entrada de lagunaje	<i>A. caviae</i>
BELE7-16E	EDAR de Reus (España)	Entrada de lagunaje	<i>A. caviae</i>
BELE7-16F	EDAR de Reus (España)	Entrada de lagunaje	<i>A. caviae</i>
BELE7-16G	EDAR de Reus (España)	Entrada de lagunaje	<i>A. caviae</i>
AELE8-15C	EDAR de Reus (España)	Entrada de lagunaje	<i>A. caviae</i>
AELE8-15D	EDAR de Reus (España)	Entrada de lagunaje	<i>A. caviae</i>
AELE8-15F	EDAR de Reus (España)	Entrada de lagunaje	<i>A. caviae</i>
AELE8-16A	EDAR de Reus (España)	Entrada de lagunaje	<i>A. caviae</i>
AELE8-16C	EDAR de Reus (España)	Entrada de lagunaje	<i>A. caviae</i>
AELE8-16G	EDAR de Reus (España)	Entrada de lagunaje	<i>A. caviae</i>
SELE8-15E	EDAR de Reus (España)	Entrada de lagunaje	<i>A. caviae</i>
SELE8-15G	EDAR de Reus (España)	Entrada de lagunaje	<i>A. caviae</i>
SELE8-16F	EDAR de Reus (España)	Entrada de lagunaje	<i>A. caviae</i>
BELE8-15B	EDAR de Reus (España)	Entrada de lagunaje	<i>A. caviae</i>
BELE8-15E	EDAR de Reus (España)	Entrada de lagunaje	<i>A. caviae</i>
BELE8-15F	EDAR de Reus (España)	Entrada de lagunaje	<i>A. caviae</i>
BELE8-15G	EDAR de Reus (España)	Entrada de lagunaje	<i>A. caviae</i>
AELD9-12B	EDAR de Reus (España)	Entrada de lagunaje	<i>A. caviae</i>

**Anexo 3 (continuación 3). Cepas de origen ambiental identificadas en este estudio.**

Referencia URV	Origen		Identificación mediante secuenciación gen <i>rpoD</i>
	Geográfico	Tipo de agua	
AELD9-12D	EDAR de Reus (España)	Entrada de lagunaje	<i>A. caviae</i>
AELD9-13D	EDAR de Reus (España)	Entrada de lagunaje	<i>A. caviae</i>
AELD9-14B	EDAR de Reus (España)	Entrada de lagunaje	<i>A. caviae</i>
SELD9-12B	EDAR de Reus (España)	Entrada de lagunaje	<i>A. caviae</i>
SELD9-12E	EDAR de Reus (España)	Entrada de lagunaje	<i>A. caviae</i>
SELD9-13D	EDAR de Reus (España)	Entrada de lagunaje	<i>A. caviae</i>
SELD9-13E	EDAR de Reus (España)	Entrada de lagunaje	<i>A. caviae</i>
AELE9-15C	EDAR de Reus (España)	Entrada de lagunaje	<i>A. caviae</i>
AELE9-16E	EDAR de Reus (España)	Entrada de lagunaje	<i>A. caviae</i>
SELE9-15C	EDAR de Reus (España)	Entrada de lagunaje	<i>A. caviae</i>
SELE9-15D	EDAR de Reus (España)	Entrada de lagunaje	<i>A. caviae</i>
BELE9-15D	EDAR de Reus (España)	Entrada de lagunaje	<i>A. caviae</i>
AELD10-12F	EDAR de Reus (España)	Entrada de lagunaje	<i>A. caviae</i>
SELD10-12A	EDAR de Reus (España)	Entrada de lagunaje	<i>A. caviae</i>
AELE10-15C	EDAR de Reus (España)	Entrada de lagunaje	<i>A. caviae</i>
SELE10-16B	EDAR de Reus (España)	Entrada de lagunaje	<i>A. caviae</i>
SELE10-16E	EDAR de Reus (España)	Entrada de lagunaje	<i>A. caviae</i>
SELE10-16G	EDAR de Reus (España)	Entrada de lagunaje	<i>A. caviae</i>
BELE10-15C	EDAR de Reus (España)	Entrada de lagunaje	<i>A. caviae</i>
BELE10-15E	EDAR de Reus (España)	Entrada de lagunaje	<i>A. caviae</i>
BELE10-15F	EDAR de Reus (España)	Entrada de lagunaje	<i>A. caviae</i>
BELE10-15G	EDAR de Reus (España)	Entrada de lagunaje	<i>A. caviae</i>
BELE10-16A	EDAR de Reus (España)	Entrada de lagunaje	<i>A. caviae</i>
AELD11-12A	EDAR de Reus (España)	Entrada de lagunaje	<i>A. caviae</i>
AELD11-12H	EDAR de Reus (España)	Entrada de lagunaje	<i>A. caviae</i>
SELD11-12B	EDAR de Reus (España)	Entrada de lagunaje	<i>A. caviae</i>
SELD11-12G	EDAR de Reus (España)	Entrada de lagunaje	<i>A. caviae</i>
BELD11-12D	EDAR de Reus (España)	Entrada de lagunaje	<i>A. caviae</i>
BELD11-12E	EDAR de Reus (España)	Entrada de lagunaje	<i>A. caviae</i>
BELD11-12F	EDAR de Reus (España)	Entrada de lagunaje	<i>A. caviae</i>
AELE11-15C	EDAR de Reus (España)	Entrada de lagunaje	<i>A. caviae</i>
AELE11-16A	EDAR de Reus (España)	Entrada de lagunaje	<i>A. caviae</i>
AELE11-16B	EDAR de Reus (España)	Entrada de lagunaje	<i>A. caviae</i>
AELE11-16C	EDAR de Reus (España)	Entrada de lagunaje	<i>A. caviae</i>
SELE11-16C	EDAR de Reus (España)	Entrada de lagunaje	<i>A. caviae</i>
BELE11-15A	EDAR de Reus (España)	Entrada de lagunaje	<i>A. caviae</i>
BELE11-15C	EDAR de Reus (España)	Entrada de lagunaje	<i>A. caviae</i>
BELE11-16A	EDAR de Reus (España)	Entrada de lagunaje	<i>A. caviae</i>
ASLE11-15B	EDAR de Reus (España)	Entrada de lagunaje	<i>A. caviae</i>
ASLE1-15A	EDAR de Reus (España)	Entrada de lagunaje	<i>A. caviae</i>



**Anexo 3 (continuación 4). Cepas de origen ambiental identificadas en este estudio.**

Referencia URV	Origen		Identificación mediante secuenciación gen <i>rpoD</i>
	Geográfico	Tipo de agua	
ASLE1-15B	EDAR de Reus (España)	Entrada de lagunaje	<i>A. caviae</i>
ASLE1-15D	EDAR de Reus (España)	Entrada de lagunaje	<i>A. caviae</i>
ASLE1-16A	EDAR de Reus (España)	Entrada de lagunaje	<i>A. caviae</i>
ASLE1-16B	EDAR de Reus (España)	Entrada de lagunaje	<i>A. caviae</i>
SSLE1-15A	EDAR de Reus (España)	Entrada de lagunaje	<i>A. caviae</i>
SSLE1-15B	EDAR de Reus (España)	Entrada de lagunaje	<i>A. caviae</i>
SSLE1-16A	EDAR de Reus (España)	Entrada de lagunaje	<i>A. caviae</i>
SSLE1-16D	EDAR de Reus (España)	Entrada de lagunaje	<i>A. caviae</i>
BSLE1-15A	EDAR de Reus (España)	Entrada de lagunaje	<i>A. caviae</i>
BSLE1-15C	EDAR de Reus (España)	Entrada de lagunaje	<i>A. caviae</i>
ASLE2-15B	EDAR de Reus (España)	Entrada de lagunaje	<i>A. caviae</i>
ASLE2-15C	EDAR de Reus (España)	Entrada de lagunaje	<i>A. caviae</i>
ASLE2-15E	EDAR de Reus (España)	Entrada de lagunaje	<i>A. caviae</i>
ASLE2-16B	EDAR de Reus (España)	Entrada de lagunaje	<i>A. caviae</i>
ASLE2-17A	EDAR de Reus (España)	Entrada de lagunaje	<i>A. caviae</i>
SSLE2-15A	EDAR de Reus (España)	Entrada de lagunaje	<i>A. caviae</i>
SSLE2-15D	EDAR de Reus (España)	Entrada de lagunaje	<i>A. caviae</i>
SSLE2-16A	EDAR de Reus (España)	Entrada de lagunaje	<i>A. caviae</i>
SSLE2-16B	EDAR de Reus (España)	Entrada de lagunaje	<i>A. caviae</i>
BSLE2-15A	EDAR de Reus (España)	Entrada de lagunaje	<i>A. caviae</i>
BSLE2-15C	EDAR de Reus (España)	Entrada de lagunaje	<i>A. caviae</i>
BSLE2-15D	EDAR de Reus (España)	Entrada de lagunaje	<i>A. caviae</i>
BSLE2-15E	EDAR de Reus (España)	Entrada de lagunaje	<i>A. caviae</i>
BSLE2-16B	EDAR de Reus (España)	Entrada de lagunaje	<i>A. caviae</i>
BSLE3-15A	EDAR de Reus (España)	Entrada de lagunaje	<i>A. caviae</i>
BSLE3-15B	EDAR de Reus (España)	Entrada de lagunaje	<i>A. caviae</i>
BSLE3-15D	EDAR de Reus (España)	Entrada de lagunaje	<i>A. caviae</i>
BSLE3-16D	EDAR de Reus (España)	Entrada de lagunaje	<i>A. caviae</i>
ASLE10-15A	EDAR de Reus (España)	Entrada de lagunaje	<i>A. caviae</i>
ASLE10-15B	EDAR de Reus (España)	Entrada de lagunaje	<i>A. caviae</i>
ASLE10-15C	EDAR de Reus (España)	Entrada de lagunaje	<i>A. caviae</i>
ASLE11-16A	EDAR de Reus (España)	Entrada de lagunaje	<i>A. caviae</i>
SELE1-18A	EDAR de Reus (España)	Entrada de lagunaje	<i>A. media</i>
BELE3-15D	EDAR de Reus (España)	Entrada de lagunaje	<i>A. media</i>
AELE5-16C	EDAR de Reus (España)	Entrada de lagunaje	<i>A. media</i>
AELE5-16D	EDAR de Reus (España)	Entrada de lagunaje	<i>A. media</i>
SELE5-15B	EDAR de Reus (España)	Entrada de lagunaje	<i>A. media</i>
AELE6-16A	EDAR de Reus (España)	Entrada de lagunaje	<i>A. media</i>
AELE6-16D	EDAR de Reus (España)	Entrada de lagunaje	<i>A. media</i>
SELE6-16B	EDAR de Reus (España)	Entrada de lagunaje	<i>A. media</i>

**Anexo 3 (continuación 5). Cepas de origen ambiental identificadas en este estudio.**

Referencia URV	Origen		Identificación mediante secuenciación gen <i>rpoD</i>
	Geográfico	Tipo de agua	
SELE6-16C	EDAR de Reus (España)	Entrada de lagunaje	<i>A. media</i>
SELE6-16D	EDAR de Reus (España)	Entrada de lagunaje	<i>A. media</i>
BELE6-15D	EDAR de Reus (España)	Entrada de lagunaje	<i>A. media</i>
BELE7-15A	EDAR de Reus (España)	Entrada de lagunaje	<i>A. media</i>
BELE7-15D	EDAR de Reus (España)	Entrada de lagunaje	<i>A. media</i>
BELE7-16A	EDAR de Reus (España)	Entrada de lagunaje	<i>A. media</i>
BELE7-16D	EDAR de Reus (España)	Entrada de lagunaje	<i>A. media</i>
AELE8-15A	EDAR de Reus (España)	Entrada de lagunaje	<i>A. media</i>
AELE8-15B	EDAR de Reus (España)	Entrada de lagunaje	<i>A. media</i>
AELE8-15E	EDAR de Reus (España)	Entrada de lagunaje	<i>A. media</i>
AELE8-15G	EDAR de Reus (España)	Entrada de lagunaje	<i>A. media</i>
AELE8-16D	EDAR de Reus (España)	Entrada de lagunaje	<i>A. media</i>
AELE8-16E	EDAR de Reus (España)	Entrada de lagunaje	<i>A. media</i>
SELE8-15A	EDAR de Reus (España)	Entrada de lagunaje	<i>A. media</i>
SELE8-15C	EDAR de Reus (España)	Entrada de lagunaje	<i>A. media</i>
SELE8-15D	EDAR de Reus (España)	Entrada de lagunaje	<i>A. media</i>
BELE8-15A	EDAR de Reus (España)	Entrada de lagunaje	<i>A. media</i>
BELE8-15C	EDAR de Reus (España)	Entrada de lagunaje	<i>A. media</i>
BELE8-16A	EDAR de Reus (España)	Entrada de lagunaje	<i>A. media</i>
BELE8-16B	EDAR de Reus (España)	Entrada de lagunaje	<i>A. media</i>
BELE8-16C	EDAR de Reus (España)	Entrada de lagunaje	<i>A. media</i>
BELE8-16D	EDAR de Reus (España)	Entrada de lagunaje	<i>A. media</i>
BELE8-16E	EDAR de Reus (España)	Entrada de lagunaje	<i>A. media</i>
BELE8-16G	EDAR de Reus (España)	Entrada de lagunaje	<i>A. media</i>
AELD9-12A	EDAR de Reus (España)	Entrada de lagunaje	<i>A. media</i>
AELD9-12C	EDAR de Reus (España)	Entrada de lagunaje	<i>A. media</i>
AELD9-12E	EDAR de Reus (España)	Entrada de lagunaje	<i>A. media</i>
AELD9-13B	EDAR de Reus (España)	Entrada de lagunaje	<i>A. media</i>
AELD9-13E	EDAR de Reus (España)	Entrada de lagunaje	<i>A. media</i>
AELD9-14A	EDAR de Reus (España)	Entrada de lagunaje	<i>A. media</i>
AELD9-14C	EDAR de Reus (España)	Entrada de lagunaje	<i>A. media</i>
AELD9-14D	EDAR de Reus (España)	Entrada de lagunaje	<i>A. media</i>
SELD9-12A	EDAR de Reus (España)	Entrada de lagunaje	<i>A. media</i>
SELD9-12C	EDAR de Reus (España)	Entrada de lagunaje	<i>A. media</i>
SELD9-12D	EDAR de Reus (España)	Entrada de lagunaje	<i>A. media</i>
SELD9-13A	EDAR de Reus (España)	Entrada de lagunaje	<i>A. media</i>
SELD9-13C	EDAR de Reus (España)	Entrada de lagunaje	<i>A. media</i>
SELD9-14A	EDAR de Reus (España)	Entrada de lagunaje	<i>A. media</i>
SELD9-14B	EDAR de Reus (España)	Entrada de lagunaje	<i>A. media</i>
BELD9-12A	EDAR de Reus (España)	Entrada de lagunaje	<i>A. media</i>

**Anexo 3 (continuación 6). Cepas de origen ambiental identificadas en este estudio.**

Referencia URV	Origen		Identificación mediante secuenciación gen <i>rpoD</i>
	Geográfico	Tipo de agua	
BELD9-12B	EDAR de Reus (España)	Entrada de lagunaje	<i>A. media</i>
BELD9-12C	EDAR de Reus (España)	Entrada de lagunaje	<i>A. media</i>
BELD9-13A	EDAR de Reus (España)	Entrada de lagunaje	<i>A. media</i>
BELD9-13B	EDAR de Reus (España)	Entrada de lagunaje	<i>A. media</i>
BELD9-13C	EDAR de Reus (España)	Entrada de lagunaje	<i>A. media</i>
BELD9-13D	EDAR de Reus (España)	Entrada de lagunaje	<i>A. media</i>
BELD9-13E	EDAR de Reus (España)	Entrada de lagunaje	<i>A. media</i>
BELD9-14A	EDAR de Reus (España)	Entrada de lagunaje	<i>A. media</i>
BELD9-14B	EDAR de Reus (España)	Entrada de lagunaje	<i>A. media</i>
BELD9-14C	EDAR de Reus (España)	Entrada de lagunaje	<i>A. media</i>
BELD9-14D	EDAR de Reus (España)	Entrada de lagunaje	<i>A. media</i>
AELE9-15B	EDAR de Reus (España)	Entrada de lagunaje	<i>A. media</i>
AELE9-15D	EDAR de Reus (España)	Entrada de lagunaje	<i>A. media</i>
AELE9-15E	EDAR de Reus (España)	Entrada de lagunaje	<i>A. media</i>
AELE9-15F	EDAR de Reus (España)	Entrada de lagunaje	<i>A. media</i>
AELE9-16A	EDAR de Reus (España)	Entrada de lagunaje	<i>A. media</i>
AELE9-16B	EDAR de Reus (España)	Entrada de lagunaje	<i>A. media</i>
AELE9-16C	EDAR de Reus (España)	Entrada de lagunaje	<i>A. media</i>
AELE9-16D	EDAR de Reus (España)	Entrada de lagunaje	<i>A. media</i>
AELE9-16G	EDAR de Reus (España)	Entrada de lagunaje	<i>A. media</i>
SELE9-15A	EDAR de Reus (España)	Entrada de lagunaje	<i>A. media</i>
SELE9-15B	EDAR de Reus (España)	Entrada de lagunaje	<i>A. media</i>
SELE9-15E	EDAR de Reus (España)	Entrada de lagunaje	<i>A. media</i>
SELE9-15F	EDAR de Reus (España)	Entrada de lagunaje	<i>A. media</i>
SELE9-15G	EDAR de Reus (España)	Entrada de lagunaje	<i>A. media</i>
SELE9-16A	EDAR de Reus (España)	Entrada de lagunaje	<i>A. media</i>
SELE9-16E	EDAR de Reus (España)	Entrada de lagunaje	<i>A. media</i>
SELE9-16G	EDAR de Reus (España)	Entrada de lagunaje	<i>A. media</i>
BELE9-15A	EDAR de Reus (España)	Entrada de lagunaje	<i>A. media</i>
BELE9-15C	EDAR de Reus (España)	Entrada de lagunaje	<i>A. media</i>
BELE9-15F	EDAR de Reus (España)	Entrada de lagunaje	<i>A. media</i>
BELE9-15G	EDAR de Reus (España)	Entrada de lagunaje	<i>A. media</i>
BELE9-16A	EDAR de Reus (España)	Entrada de lagunaje	<i>A. media</i>
BELE9-16B	EDAR de Reus (España)	Entrada de lagunaje	<i>A. media</i>
BELE9-16D	EDAR de Reus (España)	Entrada de lagunaje	<i>A. media</i>
AELD10-12A	EDAR de Reus (España)	Entrada de lagunaje	<i>A. media</i>
AELD10-12D	EDAR de Reus (España)	Entrada de lagunaje	<i>A. media</i>
AELD10-12E	EDAR de Reus (España)	Entrada de lagunaje	<i>A. media</i>
AELD10-12G	EDAR de Reus (España)	Entrada de lagunaje	<i>A. media</i>
AELD10-13C	EDAR de Reus (España)	Entrada de lagunaje	<i>A. media</i>

Anexo 3 (continuación 7). Cepas de origen ambiental identificadas en este estudio.

Referencia URV	Origen		Identificación mediante secuenciación gen <i>rpoD</i>
	Geográfico	Tipo de agua	
AELD10-13D	EDAR de Reus (España)	Entrada de lagunaje	<i>A. media</i>
AELD10-13G	EDAR de Reus (España)	Entrada de lagunaje	<i>A. media</i>
SELD10-12B	EDAR de Reus (España)	Salida de lagunaje	<i>A. media</i>
SELD10-12D	EDAR de Reus (España)	Salida de lagunaje	<i>A. media</i>
SELD10-13E	EDAR de Reus (España)	Salida de lagunaje	<i>A. media</i>
BELD10-13C	EDAR de Reus (España)	Salida de lagunaje	<i>A. media</i>
BELD10-13D	EDAR de Reus (España)	Salida de lagunaje	<i>A. media</i>
BELD10-13E	EDAR de Reus (España)	Salida de lagunaje	<i>A. media</i>
AELE10-15D	EDAR de Reus (España)	Salida de lagunaje	<i>A. media</i>
AELE10-16G	EDAR de Reus (España)	Salida de lagunaje	<i>A. media</i>
SELE10-16D	EDAR de Reus (España)	Salida de lagunaje	<i>A. media</i>
SELE10-16F	EDAR de Reus (España)	Salida de lagunaje	<i>A. media</i>
SELE11-16A	EDAR de Reus (España)	Salida de lagunaje	<i>A. media</i>
SELD11-12H	EDAR de Reus (España)	Salida de lagunaje	<i>A. media</i>
SELD11-12E	EDAR de Reus (España)	Salida de lagunaje	<i>A. media</i>
AELD11-12B	EDAR de Reus (España)	Salida de lagunaje	<i>A. media</i>
AELD11-12D	EDAR de Reus (España)	Salida de lagunaje	<i>A. media</i>
AELD11-12E	EDAR de Reus (España)	Salida de lagunaje	<i>A. media</i>
SSLE1-15D	EDAR de Reus (España)	Salida de lagunaje	<i>A. media</i>
SSLE1-16B	EDAR de Reus (España)	Salida de lagunaje	<i>A. media</i>
BSLE1-15D	EDAR de Reus (España)	Salida de lagunaje	<i>A. media</i>
BSLE1-16A	EDAR de Reus (España)	Salida de lagunaje	<i>A. media</i>
BSLE7-15F	EDAR de Reus (España)	Salida de lagunaje	<i>A. media</i>
ASLE8-15A	EDAR de Reus (España)	Salida de lagunaje	<i>A. media</i>
ASLE8-15C	EDAR de Reus (España)	Salida de lagunaje	<i>A. media</i>
ASLE8-15E	EDAR de Reus (España)	Salida de lagunaje	<i>A. media</i>
ASLE8-15G	EDAR de Reus (España)	Salida de lagunaje	<i>A. media</i>
SSLE8-15A	EDAR de Reus (España)	Salida de lagunaje	<i>A. media</i>
SSLE8-15C	EDAR de Reus (España)	Salida de lagunaje	<i>A. media</i>
SSLE8-15G	EDAR de Reus (España)	Salida de lagunaje	<i>A. media</i>
SSLE8-16D	EDAR de Reus (España)	Salida de lagunaje	<i>A. media</i>
BSLE8-15E	EDAR de Reus (España)	Salida de lagunaje	<i>A. media</i>
ASLD9-11A	EDAR de Reus (España)	Salida de lagunaje	<i>A. media</i>
ASLD9-11D	EDAR de Reus (España)	Salida de lagunaje	<i>A. media</i>
ASLD9-11F	EDAR de Reus (España)	Salida de lagunaje	<i>A. media</i>
ASLD9-11G	EDAR de Reus (España)	Salida de lagunaje	<i>A. media</i>
ASLD9-13A	EDAR de Reus (España)	Salida de lagunaje	<i>A. media</i>
SSLD9-12C	EDAR de Reus (España)	Salida de lagunaje	<i>A. media</i>
BSLD9-11A	EDAR de Reus (España)	Salida de lagunaje	<i>A. media</i>
BSLD9-11F	EDAR de Reus (España)	Salida de lagunaje	<i>A. media</i>

Anexo 3 (continuación 8). Cepas de origen ambiental identificadas en este estudio.

Referencia URV	Origen		Identificación mediante secuenciación gen <i>rpoD</i>
	Geográfico	Tipo de agua	
BSLD9-11G	EDAR de Reus (España)	Salida de lagunaje	<i>A. media</i>
BSLD9-11I	EDAR de Reus (España)	Salida de lagunaje	<i>A. media</i>
BSLD9-11N	EDAR de Reus (España)	Salida de lagunaje	<i>A. media</i>
ASLE9-15C	EDAR de Reus (España)	Salida de lagunaje	<i>A. media</i>
ASLE9-15D	EDAR de Reus (España)	Salida de lagunaje	<i>A. media</i>
ASLE9-15E	EDAR de Reus (España)	Salida de lagunaje	<i>A. media</i>
ASLE9-15F	EDAR de Reus (España)	Salida de lagunaje	<i>A. media</i>
ASLE9-15G	EDAR de Reus (España)	Salida de lagunaje	<i>A. media</i>
ASLE9-16B	EDAR de Reus (España)	Salida de lagunaje	<i>A. media</i>
ASLE9-16D	EDAR de Reus (España)	Salida de lagunaje	<i>A. media</i>
ASLE9-16E	EDAR de Reus (España)	Salida de lagunaje	<i>A. media</i>
ASLE9-16G	EDAR de Reus (España)	Salida de lagunaje	<i>A. media</i>
SSLE9-16F	EDAR de Reus (España)	Salida de lagunaje	<i>A. media</i>
BSLE9-15C	EDAR de Reus (España)	Salida de lagunaje	<i>A. media</i>
BSLE9-15F	EDAR de Reus (España)	Salida de lagunaje	<i>A. media</i>
SELD10-13B	EDAR de Reus (España)	Salida de lagunaje	<i>A. media</i>
ASLD10-11B	EDAR de Reus (España)	Salida de lagunaje	<i>A. media</i>
ASLD10-11G	EDAR de Reus (España)	Salida de lagunaje	<i>A. media</i>
ASLE10-15E	EDAR de Reus (España)	Salida de lagunaje	<i>A. media</i>
ASLE10-16D	EDAR de Reus (España)	Salida de lagunaje	<i>A. media</i>
ASLE10-16F	EDAR de Reus (España)	Salida de lagunaje	<i>A. media</i>
SSLE10-15B	EDAR de Reus (España)	Salida de lagunaje	<i>A. media</i>
SSLE10-15C	EDAR de Reus (España)	Salida de lagunaje	<i>A. media</i>
SSLE10-15E	EDAR de Reus (España)	Salida de lagunaje	<i>A. media</i>
SSLE10-16A	EDAR de Reus (España)	Salida de lagunaje	<i>A. media</i>
SSLE10-16C	EDAR de Reus (España)	Salida de lagunaje	<i>A. media</i>
SSLE10-16E	EDAR de Reus (España)	Salida de lagunaje	<i>A. media</i>
SSLE10-16G	EDAR de Reus (España)	Salida de lagunaje	<i>A. media</i>
ASLD11-A	EDAR de Reus (España)	Salida de lagunaje	<i>A. media</i>
BSLD11-F	EDAR de Reus (España)	Salida de lagunaje	<i>A. media</i>
ASLE11-15A	EDAR de Reus (España)	Salida de lagunaje	<i>A. media</i>
SELE1-15D	EDAR de Reus (España)	Salida de lagunaje	<i>A. veronii</i>
BELE1-15B	EDAR de Reus (España)	Salida de lagunaje	<i>A. veronii</i>
SELE5-16B	EDAR de Reus (España)	Salida de lagunaje	<i>A. veronii</i>
AELD10-13A	EDAR de Reus (España)	Salida de lagunaje	<i>A. veronii</i>
BELD11-12A	EDAR de Reus (España)	Salida de lagunaje	<i>A. veronii</i>
SELE11-15C	EDAR de Reus (España)	Salida de lagunaje	<i>A. veronii</i>
BELE11-15D	EDAR de Reus (España)	Salida de lagunaje	<i>A. veronii</i>
SELD10-12E	EDAR de Reus (España)	Salida de lagunaje	<i>A. veronii</i>
ASLE2-15A	EDAR de Reus (España)	Salida de lagunaje	<i>A. veronii</i>

Anexo 3 (continuación 9). Cepas de origen ambiental identificadas en este estudio.

Referencia URV	Origen		Identificación mediante secuenciación gen <i>rpoD</i>
	Geográfico	Tipo de agua	
ASLE3-15A	EDAR de Reus (España)	Salida de lagunaje	<i>A. veronii</i>
ASLE3-16A	EDAR de Reus (España)	Salida de lagunaje	<i>A. veronii</i>
ASLE3-16C	EDAR de Reus (España)	Salida de lagunaje	<i>A. veronii</i>
ASLE3-16D	EDAR de Reus (España)	Salida de lagunaje	<i>A. veronii</i>
SSLE3-15A	EDAR de Reus (España)	Salida de lagunaje	<i>A. veronii</i>
SSLE3-15B	EDAR de Reus (España)	Salida de lagunaje	<i>A. veronii</i>
SSLE3-15C	EDAR de Reus (España)	Salida de lagunaje	<i>A. veronii</i>
SSLE3-16A	EDAR de Reus (España)	Salida de lagunaje	<i>A. veronii</i>
SSLE3-16D	EDAR de Reus (España)	Salida de lagunaje	<i>A. veronii</i>
ASLE5-15B	EDAR de Reus (España)	Salida de lagunaje	<i>A. veronii</i>
SSLE5-15A	EDAR de Reus (España)	Salida de lagunaje	<i>A. veronii</i>
SSLE5-15B	EDAR de Reus (España)	Salida de lagunaje	<i>A. veronii</i>
SSLE5-15C	EDAR de Reus (España)	Salida de lagunaje	<i>A. veronii</i>
SSLE5-15D	EDAR de Reus (España)	Salida de lagunaje	<i>A. veronii</i>
SSLE5-16A	EDAR de Reus (España)	Salida de lagunaje	<i>A. veronii</i>
SSLE5-16D	EDAR de Reus (España)	Salida de lagunaje	<i>A. veronii</i>
BSLE5-15A	EDAR de Reus (España)	Salida de lagunaje	<i>A. veronii</i>
BSLE5-15C	EDAR de Reus (España)	Salida de lagunaje	<i>A. veronii</i>
BSLE5-16A	EDAR de Reus (España)	Salida de lagunaje	<i>A. veronii</i>
BSLE5-16C	EDAR de Reus (España)	Salida de lagunaje	<i>A. veronii</i>
ASLE6-15A	EDAR de Reus (España)	Salida de lagunaje	<i>A. veronii</i>
ASLE6-15D	EDAR de Reus (España)	Salida de lagunaje	<i>A. veronii</i>
SSLE6-15A	EDAR de Reus (España)	Salida de lagunaje	<i>A. veronii</i>
SSLE6-15D	EDAR de Reus (España)	Salida de lagunaje	<i>A. veronii</i>
SSL6-16C	EDAR de Reus (España)	Salida de lagunaje	<i>A. veronii</i>
BSLE6-15A	EDAR de Reus (España)	Salida de lagunaje	<i>A. veronii</i>
BSLE6-15B	EDAR de Reus (España)	Salida de lagunaje	<i>A. veronii</i>
BSLE6-15E	EDAR de Reus (España)	Salida de lagunaje	<i>A. veronii</i>
ASLE7-15B	EDAR de Reus (España)	Salida de lagunaje	<i>A. veronii</i>
ASLE7-16E	EDAR de Reus (España)	Salida de lagunaje	<i>A. veronii</i>
SSLE7-15A	EDAR de Reus (España)	Salida de lagunaje	<i>A. veronii</i>
SSLE7-15C	EDAR de Reus (España)	Salida de lagunaje	<i>A. veronii</i>
SSLE7-15D	EDAR de Reus (España)	Salida de lagunaje	<i>A. veronii</i>
SSLE7-15F	EDAR de Reus (España)	Salida de lagunaje	<i>A. veronii</i>
SSLE7-16E	EDAR de Reus (España)	Salida de lagunaje	<i>A. veronii</i>
SSLE7-16F	EDAR de Reus (España)	Salida de lagunaje	<i>A. veronii</i>
SSLE7-16G	EDAR de Reus (España)	Salida de lagunaje	<i>A. veronii</i>
BSLE7-15C	EDAR de Reus (España)	Salida de lagunaje	<i>A. veronii</i>
BSLE7-15D	EDAR de Reus (España)	Salida de lagunaje	<i>A. veronii</i>
BSLE7-16A	EDAR de Reus (España)	Salida de lagunaje	<i>A. veronii</i>

**Anexo 3 (continuación 10). Cepas de origen ambiental identificadas en este estudio.**

Referencia URV	Origen		Identificación mediante secuenciación gen <i>rpoD</i>
	Geográfico	Tipo de agua	
BSLE7-16B	EDAR de Reus (España)	Salida de lagunaje	<i>A. veronii</i>
BSLE7-16E	EDAR de Reus (España)	Salida de lagunaje	<i>A. veronii</i>
BSLE7-16F	EDAR de Reus (España)	Salida de lagunaje	<i>A. veronii</i>
BSLE7-16G	EDAR de Reus (España)	Salida de lagunaje	<i>A. veronii</i>
SSLE8-15F	EDAR de Reus (España)	Salida de lagunaje	<i>A. veronii</i>
SSLD9-11C	EDAR de Reus (España)	Salida de lagunaje	<i>A. veronii</i>
SSLE9-16C	EDAR de Reus (España)	Salida de lagunaje	<i>A. veronii</i>
SSLE9-16D	EDAR de Reus (España)	Salida de lagunaje	<i>A. veronii</i>
ASLE10-15G	EDAR de Reus (España)	Salida de lagunaje	<i>A. veronii</i>
ASLE11-15C	EDAR de Reus (España)	Salida de lagunaje	<i>A. veronii</i>
ASLD11-C	EDAR de Reus (España)	Salida de lagunaje	<i>A. veronii</i>
ASLD11-E	EDAR de Reus (España)	Salida de lagunaje	<i>A. veronii</i>
SSLD11-A	EDAR de Reus (España)	Salida de lagunaje	<i>A. veronii</i>
SSLD11-C	EDAR de Reus (España)	Salida de lagunaje	<i>A. veronii</i>
SSLD11-D	EDAR de Reus (España)	Salida de lagunaje	<i>A. veronii</i>
BSLD11-A	EDAR de Reus (España)	Salida de lagunaje	<i>A. veronii</i>
BSLD11-C	EDAR de Reus (España)	Salida de lagunaje	<i>A. veronii</i>
BSLD11-D	EDAR de Reus (España)	Salida de lagunaje	<i>A. veronii</i>
BSLD11-G	EDAR de Reus (España)	Salida de lagunaje	<i>A. veronii</i>
SSLE11-15A	EDAR de Reus (España)	Salida de lagunaje	<i>A. veronii</i>
SSLE11-16D	EDAR de Reus (España)	Salida de lagunaje	<i>A. veronii</i>
BSLE11-15A	EDAR de Reus (España)	Salida de lagunaje	<i>A. veronii</i>
SELE8-16A	EDAR de Reus (España)	Salida de lagunaje	<i>A. salmonicida</i>
SELE8-16B	EDAR de Reus (España)	Salida de lagunaje	<i>A. salmonicida</i>
SELE8-16C	EDAR de Reus (España)	Salida de lagunaje	<i>A. salmonicida</i>
SELE9-16F	EDAR de Reus (España)	Salida de lagunaje	<i>A. salmonicida</i>
BELE9-16F	EDAR de Reus (España)	Salida de lagunaje	<i>A. salmonicida</i>
SELD10-13D	EDAR de Reus (España)	Salida de lagunaje	<i>A. salmonicida</i>
SELE8-16G	EDAR de Reus (España)	Salida de lagunaje	<i>A. salmonicida</i>
BELE8-16F	EDAR de Reus (España)	Salida de lagunaje	<i>A. salmonicida</i>
SSLE7-15G	EDAR de Reus (España)	Salida de lagunaje	<i>A. salmonicida</i>
BSLE7-15B	EDAR de Reus (España)	Salida de lagunaje	<i>A. salmonicida</i>
BSLE7-16D	EDAR de Reus (España)	Salida de lagunaje	<i>A. salmonicida</i>
ASLE10-16E	EDAR de Reus (España)	Salida de lagunaje	<i>A. salmonicida</i>
BSLD11-E	EDAR de Reus (España)	Salida de lagunaje	<i>A. salmonicida</i>
ASLE8-16B	EDAR de Reus (España)	Salida de lagunaje	<i>A. salmonicida</i>
ASLE8-16F	EDAR de Reus (España)	Salida de lagunaje	<i>A. salmonicida</i>
SSLE8-16A	EDAR de Reus (España)	Salida de lagunaje	<i>A. salmonicida</i>
SSLE8-16F	EDAR de Reus (España)	Salida de lagunaje	<i>A. salmonicida</i>
BSLE8-15A	EDAR de Reus (España)	Salida de lagunaje	<i>A. salmonicida</i>

**Anexo 3 (continuación 11). Cepas de origen ambiental identificadas en este estudio.**

Referencia URV	Origen		Identificación mediante secuenciación gen <i>rpoD</i>
	Geográfico	Tipo de agua	
BSLE8-15B	EDAR de Reus (España)	Salida de lagunaje	<i>A. salmonicida</i>
BSLE8-15D	EDAR de Reus (España)	Salida de lagunaje	<i>A. salmonicida</i>
ASLD9-11B	EDAR de Reus (España)	Salida de lagunaje	<i>A. salmonicida</i>
ASLD9-12A	EDAR de Reus (España)	Salida de lagunaje	<i>A. salmonicida</i>
ASLD9-12E	EDAR de Reus (España)	Salida de lagunaje	<i>A. salmonicida</i>
ASLD9-12F	EDAR de Reus (España)	Salida de lagunaje	<i>A. salmonicida</i>
SSLD9-11A	EDAR de Reus (España)	Salida de lagunaje	<i>A. salmonicida</i>
SSLD9-11B	EDAR de Reus (España)	Salida de lagunaje	<i>A. salmonicida</i>
SSLD9-11D	EDAR de Reus (España)	Salida de lagunaje	<i>A. salmonicida</i>
SSLD9-11E	EDAR de Reus (España)	Salida de lagunaje	<i>A. salmonicida</i>
SSLD9-11G	EDAR de Reus (España)	Salida de lagunaje	<i>A. salmonicida</i>
SSLD9-11K	EDAR de Reus (España)	Salida de lagunaje	<i>A. salmonicida</i>
BSLD9-11C	EDAR de Reus (España)	Salida de lagunaje	<i>A. salmonicida</i>
BSLD9-11D	EDAR de Reus (España)	Salida de lagunaje	<i>A. salmonicida</i>
BSLD9-11K	EDAR de Reus (España)	Salida de lagunaje	<i>A. salmonicida</i>
ASLE9-15B	EDAR de Reus (España)	Salida de lagunaje	<i>A. salmonicida</i>
ASLE9-16A	EDAR de Reus (España)	Salida de lagunaje	<i>A. salmonicida</i>
SSLE9-15A	EDAR de Reus (España)	Salida de lagunaje	<i>A. salmonicida</i>
SSLE9-15B	EDAR de Reus (España)	Salida de lagunaje	<i>A. salmonicida</i>
SSLE9-15C	EDAR de Reus (España)	Salida de lagunaje	<i>A. salmonicida</i>
SSLE9-15E	EDAR de Reus (España)	Salida de lagunaje	<i>A. salmonicida</i>
SSLE9-15F	EDAR de Reus (España)	Salida de lagunaje	<i>A. salmonicida</i>
SSLE9-15G	EDAR de Reus (España)	Salida de lagunaje	<i>A. salmonicida</i>
SSLE9-16A	EDAR de Reus (España)	Salida de lagunaje	<i>A. salmonicida</i>
SSLE9-16B	EDAR de Reus (España)	Salida de lagunaje	<i>A. salmonicida</i>
SSLE9-16E	EDAR de Reus (España)	Salida de lagunaje	<i>A. salmonicida</i>
BSLE9-15A	EDAR de Reus (España)	Salida de lagunaje	<i>A. salmonicida</i>
BSLE9-15B	EDAR de Reus (España)	Salida de lagunaje	<i>A. salmonicida</i>
BSLE9-15E	EDAR de Reus (España)	Salida de lagunaje	<i>A. salmonicida</i>
BSLE9-16E	EDAR de Reus (España)	Salida de lagunaje	<i>A. salmonicida</i>
ASLD10-11E	EDAR de Reus (España)	Salida de lagunaje	<i>A. salmonicida</i>
ASLD10-12A	EDAR de Reus (España)	Salida de lagunaje	<i>A. salmonicida</i>
SSLD10-11A	EDAR de Reus (España)	Salida de lagunaje	<i>A. salmonicida</i>
SSLD10-11C	EDAR de Reus (España)	Salida de lagunaje	<i>A. salmonicida</i>
ASLE10-15F	EDAR de Reus (España)	Salida de lagunaje	<i>A. salmonicida</i>
ASLE10-16A	EDAR de Reus (España)	Salida de lagunaje	<i>A. salmonicida</i>
ASLE10-16B	EDAR de Reus (España)	Salida de lagunaje	<i>A. salmonicida</i>
SSLE10-16D	EDAR de Reus (España)	Salida de lagunaje	<i>A. salmonicida</i>
SSLE10-16F	EDAR de Reus (España)	Salida de lagunaje	<i>A. salmonicida</i>
AELE1-16A	EDAR de Reus (España)	Salida de lagunaje	<i>A. allosaccharophila</i>



Anexo 3 (continuación 12). Cepas de origen ambiental identificadas en este estudio.

Referencia URV	Origen		Identificación mediante secuenciación gen <i>rpoD</i>
	Geográfico	Tipo de agua	
AELE2-15A	EDAR de Reus (España)	Salida de lagunaje	<i>A. allosaccharophila</i>
AELE2-15B	EDAR de Reus (España)	Salida de lagunaje	<i>A. allosaccharophila</i>
SELE2-16A	EDAR de Reus (España)	Salida de lagunaje	<i>A. allosaccharophila</i>
AELE7-15D	EDAR de Reus (España)	Salida de lagunaje	<i>A. allosaccharophila</i>
AELE7-16B	EDAR de Reus (España)	Salida de lagunaje	<i>A. allosaccharophila</i>
SELE7-16E	EDAR de Reus (España)	Salida de lagunaje	<i>A. allosaccharophila</i>
AELE8-16B	EDAR de Reus (España)	Salida de lagunaje	<i>A. allosaccharophila</i>
AELD9-13C	EDAR de Reus (España)	Salida de lagunaje	<i>A. allosaccharophila</i>
AELE9-15A	EDAR de Reus (España)	Salida de lagunaje	<i>A. allosaccharophila</i>
SELD10-12F	EDAR de Reus (España)	Salida de lagunaje	<i>A. allosaccharophila</i>
SELD10-12G	EDAR de Reus (España)	Salida de lagunaje	<i>A. allosaccharophila</i>
SELD10-13F	EDAR de Reus (España)	Salida de lagunaje	<i>A. allosaccharophila</i>
AELE10-16F	EDAR de Reus (España)	Salida de lagunaje	<i>A. allosaccharophila</i>
AELD11-12C	EDAR de Reus (España)	Salida de lagunaje	<i>A. allosaccharophila</i>
AELE11-15B	EDAR de Reus (España)	Salida de lagunaje	<i>A. allosaccharophila</i>
SELE11-15B	EDAR de Reus (España)	Salida de lagunaje	<i>A. allosaccharophila</i>
BELE11-16C	EDAR de Reus (España)	Salida de lagunaje	<i>A. allosaccharophila</i>
ASLE7-15A	EDAR de Reus (España)	Salida de lagunaje	<i>A. allosaccharophila</i>
SSLE7-15B	EDAR de Reus (España)	Salida de lagunaje	<i>A. allosaccharophila</i>
ASLD10-11A	EDAR de Reus (España)	Salida de lagunaje	<i>A. allosaccharophila</i>
ASLD10-11D	EDAR de Reus (España)	Salida de lagunaje	<i>A. allosaccharophila</i>
ASLE10-15D	EDAR de Reus (España)	Salida de lagunaje	<i>A. allosaccharophila</i>
SSLE10-16B	EDAR de Reus (España)	Salida de lagunaje	<i>A. allosaccharophila</i>
SSLE11-16B	EDAR de Reus (España)	Salida de lagunaje	<i>A. allosaccharophila</i>
BSLE11-16C	EDAR de Reus (España)	Salida de lagunaje	<i>A. allosaccharophila</i>
BSLE11-16A	EDAR de Reus (España)	Salida de lagunaje	<i>A. allosaccharophila</i>
BSLE11-15C	EDAR de Reus (España)	Salida de lagunaje	<i>A. allosaccharophila</i>
BSLE11-15B	EDAR de Reus (España)	Salida de lagunaje	<i>A. allosaccharophila</i>
BELE7-16B	EDAR de Reus (España)	Salida de lagunaje	<i>A. hydrophila</i>
SELE8-15F	EDAR de Reus (España)	Salida de lagunaje	<i>A. hydrophila</i>
SELD11-12C	EDAR de Reus (España)	Salida de lagunaje	<i>A. hydrophila</i>
SSLE1-15C	EDAR de Reus (España)	Salida de lagunaje	<i>A. hydrophila</i>
BSLE2-16A	EDAR de Reus (España)	Salida de lagunaje	<i>A. hydrophila</i>
ASLE3-15C	EDAR de Reus (España)	Salida de lagunaje	<i>A. hydrophila</i>
ASLE3-15D	EDAR de Reus (España)	Salida de lagunaje	<i>A. hydrophila</i>
SSLE3-16C	EDAR de Reus (España)	Salida de lagunaje	<i>A. hydrophila</i>
SSLE5-16B	EDAR de Reus (España)	Salida de lagunaje	<i>A. hydrophila</i>
BSLE5-15D	EDAR de Reus (España)	Salida de lagunaje	<i>A. hydrophila</i>
SSLE6-15B	EDAR de Reus (España)	Salida de lagunaje	<i>A. hydrophila</i>
BELE3-15C	EDAR de Reus (España)	Salida de lagunaje	<i>A. dhakensis</i>

**Anexo 3 (continuación 13). Cepas de origen ambiental identificadas en este estudio.**

Referencia URV	Origen		Identificación mediante secuenciación gen <i>rpoD</i>
	Geográfico	Tipo de agua	
SELE6-15C	EDAR de Reus (España)	Salida de lagunaje	<i>A. dhakensis</i>
SELE6-15D	EDAR de Reus (España)	Salida de lagunaje	<i>A. dhakensis</i>
SELE8-16D	EDAR de Reus (España)	Salida de lagunaje	<i>A. dhakensis</i>
SSLE2-15E	EDAR de Reus (España)	Salida de lagunaje	<i>A. dhakensis</i>
SSLE2-18A	EDAR de Reus (España)	Salida de lagunaje	<i>A. dhakensis</i>
SSLE3-15D	EDAR de Reus (España)	Salida de lagunaje	<i>A. dhakensis</i>
SSLE3-16B	EDAR de Reus (España)	Salida de lagunaje	<i>A. dhakensis</i>
BSLE3-15C	EDAR de Reus (España)	Salida de lagunaje	<i>A. dhakensis</i>
SSLE6-16A	EDAR de Reus (España)	Salida de lagunaje	<i>A. dhakensis</i>
BSLE8-16D	EDAR de Reus (España)	Salida de lagunaje	<i>A. sobria</i>
SSLD10-11B	EDAR de Reus (España)	Salida de lagunaje	<i>A. sobria</i>
SSLD10-11D	EDAR de Reus (España)	Salida de lagunaje	<i>A. sobria</i>
BELE11-16D	EDAR de Reus (España)	Salida de lagunaje	<i>A. sanarellii</i>
ASLD10-12B	EDAR de Reus (España)	Salida de lagunaje	<i>A. popoffii</i>
AATE2.1-15A	EDAR Castell d' Aro, Girona (España)	Agua de tratamiento 2 <sup>ario</sup>	<i>A. caviae</i>
AATE2.1-15C	EDAR Castell d' Aro, Girona (España)	Agua de tratamiento 2 <sup>ario</sup>	<i>A. caviae</i>
AATE2.1-16A	EDAR Castell d' Aro, Girona (España)	Agua de tratamiento 2 <sup>ario</sup>	<i>A. caviae</i>
AATE2.1-16B	EDAR Castell d' Aro, Girona (España)	Agua de tratamiento 2 <sup>ario</sup>	<i>A. caviae</i>
AATE2.1-16C	EDAR Castell d' Aro, Girona (España)	Agua de tratamiento 2 <sup>ario</sup>	<i>A. caviae</i>
AATE2.1-16D	EDAR Castell d' Aro, Girona (España)	Agua de tratamiento 2 <sup>ario</sup>	<i>A. caviae</i>
SATE2.1-15A	EDAR Castell d' Aro, Girona (España)	Agua de tratamiento 2 <sup>ario</sup>	<i>A. caviae</i>
SATE2.1-15B	EDAR Castell d' Aro, Girona (España)	Agua de tratamiento 2 <sup>ario</sup>	<i>A. caviae</i>
SATE2.1-15C	EDAR Castell d' Aro, Girona (España)	Agua de tratamiento 2 <sup>ario</sup>	<i>A. caviae</i>
SATE2.1-15D	EDAR Castell d' Aro, Girona (España)	Agua de tratamiento 2 <sup>ario</sup>	<i>A. caviae</i>
SATE2.1-16B	EDAR Castell d' Aro, Girona (España)	Agua de tratamiento 2 <sup>ario</sup>	<i>A. caviae</i>
BATE2.1-15B	EDAR Castell d' Aro, Girona (España)	Agua de tratamiento 2 <sup>ario</sup>	<i>A. caviae</i>
BATE2.1-15C	EDAR Castell d' Aro, Girona (España)	Agua de tratamiento 2 <sup>ario</sup>	<i>A. caviae</i>
BATE2.1-15D	EDAR Castell d' Aro, Girona (España)	Agua de tratamiento 2 <sup>ario</sup>	<i>A. caviae</i>
BATE2.1-16B	EDAR Castell d' Aro, Girona (España)	Agua de tratamiento 2 <sup>ario</sup>	<i>A. caviae</i>
AATD2.2-11C	EDAR Castell d' Aro, Girona (España)	Agua de tratamiento 2 <sup>ario</sup>	<i>A. caviae</i>
AATD2.2-12A	EDAR Castell d' Aro, Girona (España)	Agua de tratamiento 2 <sup>ario</sup>	<i>A. caviae</i>
AATD2.2-12B	EDAR Castell d' Aro, Girona (España)	Agua de tratamiento 2 <sup>ario</sup>	<i>A. caviae</i>
AATD2.2-12C	EDAR Castell d' Aro, Girona (España)	Agua de tratamiento 2 <sup>ario</sup>	<i>A. caviae</i>
SATD2.2-12A	EDAR Castell d' Aro, Girona (España)	Agua de tratamiento 2 <sup>ario</sup>	<i>A. caviae</i>
BATD2.2-11A	EDAR Castell d' Aro, Girona (España)	Agua de tratamiento 2 <sup>ario</sup>	<i>A. caviae</i>
SATE2.2-17D	EDAR Castell d' Aro, Girona (España)	Agua de tratamiento 2 <sup>ario</sup>	<i>A. caviae</i>
BATE2.2-16D	EDAR Castell d' Aro, Girona (España)	Agua de tratamiento 2 <sup>ario</sup>	<i>A. caviae</i>
BATE2.2-17B	EDAR Castell d' Aro, Girona (España)	Agua de tratamiento 2 <sup>ario</sup>	<i>A. caviae</i>
BATE2.2-17D	EDAR Castell d' Aro, Girona (España)	Agua de tratamiento 2 <sup>ario</sup>	<i>A. caviae</i>
AATD2.3-11B	EDAR Castell d' Aro, Girona (España)	Agua de tratamiento 2 <sup>ario</sup>	<i>A. caviae</i>

**Anexo 3 (continuación 14). Cepas de origen ambiental identificadas en este estudio.**

Referencia URV	Origen		Identificación mediante secuenciación gen <i>rpoD</i>
	Geográfico	Tipo de agua	
AATD2.3-12C	EDAR Castell d' Aro, Girona (España)	Agua de tratamiento 2 <sup>ario</sup>	<i>A. caviae</i>
SATD2.3-11D	EDAR Castell d' Aro, Girona (España)	Agua de tratamiento 2 <sup>ario</sup>	<i>A. caviae</i>
SATD2.3-12B	EDAR Castell d' Aro, Girona (España)	Agua de tratamiento 2 <sup>ario</sup>	<i>A. caviae</i>
BATD2.3-11A	EDAR Castell d' Aro, Girona (España)	Agua de tratamiento 2 <sup>ario</sup>	<i>A. caviae</i>
BATD2.3-11B	EDAR Castell d' Aro, Girona (España)	Agua de tratamiento 2 <sup>ario</sup>	<i>A. caviae</i>
BATD2.3-11C	EDAR Castell d' Aro, Girona (España)	Agua de tratamiento 2 <sup>ario</sup>	<i>A. caviae</i>
BATD2.3-12B	EDAR Castell d' Aro, Girona (España)	Agua de tratamiento 2 <sup>ario</sup>	<i>A. caviae</i>
AATE2.3-16B	EDAR Castell d' Aro, Girona (España)	Agua de tratamiento 2 <sup>ario</sup>	<i>A. caviae</i>
AARE2.3-16C	EDAR Castell d' Aro, Girona (España)	Agua de riego	<i>A. caviae</i>
AATE2.3-16D	EDAR Castell d' Aro, Girona (España)	Agua de riego	<i>A. caviae</i>
AATE2.3-16F	EDAR Castell d' Aro, Girona (España)	Agua de riego	<i>A. caviae</i>
AATE2.3-16H	EDAR Castell d' Aro, Girona (España)	Agua de riego	<i>A. caviae</i>
SATE2.3-16A	EDAR Castell d' Aro, Girona (España)	Agua de riego	<i>A. caviae</i>
SATE2.3-16B	EDAR Castell d' Aro, Girona (España)	Agua de riego	<i>A. caviae</i>
SATE2.3-16C	EDAR Castell d' Aro, Girona (España)	Agua de riego	<i>A. caviae</i>
BATE2.3-16A	EDAR Castell d' Aro, Girona (España)	Agua de riego	<i>A. caviae</i>
BATE2.3-16B	EDAR Castell d' Aro, Girona (España)	Agua de riego	<i>A. caviae</i>
BATE2.3-16D	EDAR Castell d' Aro, Girona (España)	Agua de riego	<i>A. caviae</i>
BATE2.3-16E	EDAR Castell d' Aro, Girona (España)	Agua de riego	<i>A. caviae</i>
AATE2.2-16B	EDAR Castell d' Aro, Girona (España)	Agua de riego	<i>A. caviae</i>
AATE2.2-16C	EDAR Castell d' Aro, Girona (España)	Agua de riego	<i>A. caviae</i>
AATE2.2-16D	EDAR Castell d' Aro, Girona (España)	Agua de riego	<i>A. caviae</i>
AATE2.217A	EDAR Castell d' Aro, Girona (España)	Agua de riego	<i>A. caviae</i>
AATE2.2-17D	EDAR Castell d' Aro, Girona (España)	Agua de riego	<i>A. caviae</i>
AARE1-15A	EDAR Castell d' Aro, Girona (España)	Agua de riego	<i>A. caviae</i>
AARE1-15B	EDAR Castell d' Aro, Girona (España)	Agua de riego	<i>A. caviae</i>
AARE1-15C	EDAR Castell d' Aro, Girona (España)	Agua de riego	<i>A. caviae</i>
AARE1-15D	EDAR Castell d' Aro, Girona (España)	Agua de riego	<i>A. caviae</i>
SARE1-16D	EDAR Castell d' Aro, Girona (España)	Agua de riego	<i>A. caviae</i>
BARE2-16A	EDAR Castell d' Aro, Girona (España)	Agua de riego	<i>A. caviae</i>
BARE2-16B	EDAR Castell d' Aro, Girona (España)	Agua de riego	<i>A. caviae</i>
AATD2.2-11A	EDAR Castell d' Aro, Girona (España)	Agua de riego	<i>A. media</i>
SATD2.2-11B	EDAR Castell d' Aro, Girona (España)	Agua de riego	<i>A. media</i>
SATD2.2-11C	EDAR Castell d' Aro, Girona (España)	Agua de riego	<i>A. media</i>
BATE2.2-17C	EDAR Castell d' Aro, Girona (España)	Agua de riego	<i>A. media</i>
AATD2.3-11A	EDAR Castell d' Aro, Girona (España)	Agua de riego	<i>A. media</i>
AATD2.311C	EDAR Castell d' Aro, Girona (España)	Agua de riego	<i>A. media</i>
AATD2.3-11D	EDAR Castell d' Aro, Girona (España)	Agua de riego	<i>A. media</i>
AATD2.3-12A	EDAR Castell d' Aro, Girona (España)	Agua de riego	<i>A. media</i>
SATD2.3-11A	EDAR Castell d' Aro, Girona (España)	Agua de riego	<i>A. media</i>

**Anexo 3 (continuación 15). Cepas de origen ambiental identificadas en este estudio.**

Referencia URV	Origen		Identificación mediante secuenciación gen <i>rpoD</i>
	Geográfico	Tipo de agua	
SATD2.3-11B	EDAR Castell d' Aro, Girona (España)	Agua de riego	<i>A. media</i>
SATD2.3-11C	EDAR Castell d' Aro, Girona (España)	Agua de riego	<i>A. media</i>
BATD2.3-12C	EDAR Castell d' Aro, Girona (España)	Agua de riego	<i>A. media</i>
BATD2.3-12D	EDAR Castell d' Aro, Girona (España)	Agua de riego	<i>A. media</i>
AATE2.2-16A	EDAR Castell d' Aro, Girona (España)	Agua de riego	<i>A. media</i>
SARE2-17A	EDAR Castell d' Aro, Girona (España)	Agua de riego	<i>A. media</i>
AARD3-11A	EDAR Castell d' Aro, Girona (España)	Agua de riego	<i>A. media</i>
BARD3-11A	EDAR Castell d' Aro, Girona (España)	Agua de riego	<i>A. media</i>
BARD3-11D	EDAR Castell d' Aro, Girona (España)	Agua de riego	<i>A. media</i>
AAPD2-C	EDAR Castell d' Aro, Girona (España)	Agua de riego	<i>A. media</i>
BAPD2-11C	EDAR Castell d' Aro, Girona (España)	Agua de riego	<i>A. media</i>
SARE3-16A	EDAR Castell d' Aro, Girona (España)	Agua de riego	<i>A. media</i>
SARE3-16G	EDAR Castell d' Aro, Girona (España)	Agua de riego	<i>A. media</i>
SARE3-16H	EDAR Castell d' Aro, Girona (España)	Agua de riego	<i>A. media</i>
AAPE2-16G	EDAR Castell d' Aro, Girona (España)	Agua de riego	<i>A. media</i>
AARD3-11F	EDAR Castell d' Aro, Girona (España)	Agua de riego	<i>A. salmonicida</i>
SARD3-11A	EDAR Castell d' Aro, Girona (España)	Agua de riego	<i>A. salmonicida</i>
SARD3-11C	EDAR Castell d' Aro, Girona (España)	Agua de riego	<i>A. salmonicida</i>
SARD3-11E	EDAR Castell d' Aro, Girona (España)	Agua de riego	<i>A. salmonicida</i>
AAPD2-11B	EDAR Castell d' Aro, Girona (España)	Agua de riego	<i>A. salmonicida</i>
AAPD2-B	EDAR Castell d' Aro, Girona (España)	Agua de riego	<i>A. salmonicida</i>
SAPD2-11C	EDAR Castell d' Aro, Girona (España)	Agua de riego	<i>A. salmonicida</i>
BAPD2-B	EDAR Castell d' Aro, Girona (España)	Agua de riego	<i>A. salmonicida</i>
SARE3-16D	EDAR Castell d' Aro, Girona (España)	Agua de riego	<i>A. salmonicida</i>
SARE3-16F	EDAR Castell d' Aro, Girona (España)	Agua de riego	<i>A. salmonicida</i>
SAPE2-16D	EDAR Castell d' Aro, Girona (España)	Agua de riego	<i>A. salmonicida</i>
BAPD2-D	EDAR Castell d' Aro, Girona (España)	Agua de riego	<i>A. salmonicida</i>
BATD2.2-11D	EDAR Castell d' Aro, Girona (España)	Agua de riego	<i>A. allosaccharopphila</i>
AARE2-16D	EDAR Castell d' Aro, Girona (España)	Agua de riego	<i>A. allosaccharopphila</i>
AARD3-11E	EDAR Castell d' Aro, Girona (España)	Agua de riego	<i>A. allosaccharopphila</i>
BAPE2-16F	EDAR Castell d' Aro, Girona (España)	Agua de riego	<i>A. allosaccharopphila</i>
AARE3-16G	EDAR Castell d' Aro, Girona (España)	Agua de riego	<i>A. allosaccharopphila</i>
AARE3-16H	EDAR Castell d' Aro, Girona (España)	Agua de riego	<i>A. allosaccharopphila</i>
SARE3-16C	EDAR Castell d' Aro, Girona (España)	Agua de riego	<i>A. allosaccharopphila</i>
AAPE2-16C	EDAR Castell d' Aro, Girona (España)	Agua de riego	<i>A. allosaccharopphila</i>
AAPE2-16D	EDAR Castell d' Aro, Girona (España)	Agua de riego	<i>A. allosaccharopphila</i>
AAPE2-16F	EDAR Castell d' Aro, Girona (España)	Agua de riego	<i>A. allosaccharopphila</i>
SAPE2-16A	EDAR Castell d' Aro, Girona (España)	Agua de riego	<i>A. allosaccharopphila</i>
AARD3-11C	EDAR Castell d' Aro, Girona (España)	Agua de riego	<i>A. popoffii</i>
AARD3-11G	EDAR Castell d' Aro, Girona (España)	Agua de riego	<i>A. popoffii</i>

**Anexo 3 (continuación 16). Cepas de origen ambiental identificadas en este estudio.**

Referencia URV	Origen		Identificación mediante secuenciación gen <i>rpoD</i>
	Geográfico	Tipo de agua	
AAPD2-11A	EDAR Castell d' Aro, Girona (España)	Agua de riego	<i>A. popoffii</i>
AAPD2-11D	EDAR Castell d' Aro, Girona (España)	Agua de riego	<i>A. popoffii</i>
AAPD2-A	EDAR Castell d' Aro, Girona (España)	Agua de riego	<i>A. popoffii</i>
AAPD2-D	EDAR Castell d' Aro, Girona (España)	Agua de riego	<i>A. popoffii</i>
SAPS2-11B	EDAR Castell d' Aro, Girona (España)	Agua de riego	<i>A. popoffii</i>
BAPD2-A	EDAR Castell d' Aro, Girona (España)	Agua de riego	<i>A. popoffii</i>
SATE2.1-16A	EDAR Castell d' Aro, Girona (España)	Agua de riego	<i>A. hydrophila</i>
BATE2.2-16B	EDAR Castell d' Aro, Girona (España)	Agua de riego	<i>A. hydrophila</i>
SATE2.3-16D	EDAR Castell d' Aro, Girona (España)	Agua de riego	<i>A. hydrophila</i>
SATE2.3-16H	EDAR Castell d' Aro, Girona (España)	Agua de riego	<i>A. hydrophila</i>
SARE1-15A	EDAR Castell d' Aro, Girona (España)	Agua de riego	<i>A. hydrophila</i>
SARE1-15D	EDAR Castell d' Aro, Girona (España)	Agua de riego	<i>A. hydrophila</i>
SATE2.2-17C	EDAR Castell d' Aro, Girona (España)	Agua de riego	<i>A. veronii</i>
AARE2-16A	EDAR Castell d' Aro, Girona (España)	Agua de riego	<i>A. veronii</i>
SARE2-16A	EDAR Castell d' Aro, Girona (España)	Agua de riego	<i>A. veronii</i>
AAPD2-11C	EDAR Castell d' Aro, Girona (España)	Agua de riego	<i>A. bestiarum</i>
BAPD2-C	EDAR Castell d' Aro, Girona (España)	Agua de riego	<i>A. bestiarum</i>
AAPE2-16A	EDAR Castell d' Aro, Girona (España)	Agua de riego	<i>A. eucrenophila</i>
ACID1-A	Delta del Ebro, (España)	Canal de Poble Nou <sup>a</sup>	<i>A. media</i>
ACID1-C	Delta del Ebro, (España)	Canal de Poble Nou <sup>a</sup>	<i>A. media</i>
ACID1-D	Delta del Ebro, (España)	Canal de Poble Nou <sup>a</sup>	<i>A. media</i>
SCID1-B	Delta del Ebro, (España)	Canal de Poble Nou <sup>a</sup>	<i>A. media</i>
ACFD1-B	Delta del Ebro, (España)	Canal de Poble Nou <sup>a</sup>	<i>A. media</i>
ACFD1-C	Delta del Ebro, (España)	Canal de Poble Nou <sup>a</sup>	<i>A. media</i>
SCFD1-A	Delta del Ebro, (España)	Canal de Poble Nou <sup>a</sup>	<i>A. media</i>
SCFD1-B	Delta del Ebro, (España)	Canal de Poble Nou <sup>a</sup>	<i>A. media</i>
ACID2-11B	Delta del Ebro, (España)	Canal de Poble Nou <sup>a</sup>	<i>A. media</i>
ACID2-12A	Delta del Ebro, (España)	Canal de Poble Nou <sup>a</sup>	<i>A. media</i>
ACID2-12C	Delta del Ebro, (España)	Canal de Poble Nou <sup>a</sup>	<i>A. media</i>
ACID2-12D	Delta del Ebro, (España)	Canal de Poble Nou <sup>a</sup>	<i>A. media</i>
SCID2-11C	Delta del Ebro, (España)	Canal de Poble Nou <sup>a</sup>	<i>A. media</i>
SCID2-11D	Delta del Ebro, (España)	Canal de Poble Nou <sup>a</sup>	<i>A. media</i>
ACIE1-15A	Delta del Ebro, (España)	Canal de Poble Nou <sup>a</sup>	<i>A. media</i>
ACIE1-15B	Delta del Ebro, (España)	Canal de Poble Nou <sup>a</sup>	<i>A. media</i>
ACIE1-16C	Delta del Ebro, (España)	Canal de Poble Nou <sup>a</sup>	<i>A. media</i>
SCIE1-15A	Delta del Ebro, (España)	Canal de Poble Nou <sup>a</sup>	<i>A. media</i>
SCIE1-16A	Delta del Ebro, (España)	Canal de Poble Nou <sup>a</sup>	<i>A. media</i>
ACFE1-15A	Delta del Ebro, (España)	Canal de Poble Nou <sup>a</sup>	<i>A. media</i>
ACFE1-15C	Delta del Ebro, (España)	Canal de Poble Nou <sup>a</sup>	<i>A. media</i>
SCFE1-15B	Delta del Ebro, (España)	Canal de Poble Nou <sup>a</sup>	<i>A. media</i>

**Anexo 3 (continuación 17). Cepas de origen ambiental identificadas en este estudio.**

Referencia URV	Origen		Identificación mediante secuenciación gen <i>rpoD</i>
	Geográfico	Tipo de agua	
SCFE1-16B	Delta del Ebro, (España)	Canal de Poble Nou <sup>a</sup>	<i>A. media</i>
BCFE1-16C	Delta del Ebro, (España)	Canal de Poble Nou <sup>a</sup>	<i>A. media</i>
SCID2-12C	Delta del Ebro, (España)	Canal de Poble Nou <sup>a</sup>	<i>A. media</i>
ACIE2-15B	Delta del Ebro, (España)	Canal de Poble Nou <sup>a</sup>	<i>A. media</i>
ACIE2-16B	Delta del Ebro, (España)	Canal de Poble Nou <sup>a</sup>	<i>A. media</i>
ACIE2-16D	Delta del Ebro, (España)	Canal de Poble Nou <sup>a</sup>	<i>A. media</i>
SCIE2-16B	Delta del Ebro, (España)	Canal de Poble Nou <sup>a</sup>	<i>A. media</i>
ACFE2-15A	Delta del Ebro, (España)	Canal de Poble Nou <sup>a</sup>	<i>A. media</i>
ACFE2-15C	Delta del Ebro, (España)	Canal de Poble Nou <sup>a</sup>	<i>A. media</i>
ACFE2-16C	Delta del Ebro, (España)	Canal de Poble Nou <sup>a</sup>	<i>A. media</i>
BCFE2-15B	Delta del Ebro, (España)	Canal de Poble Nou <sup>a</sup>	<i>A. media</i>
BCFE2-16B	Delta del Ebro, (España)	Canal de Poble Nou <sup>a</sup>	<i>A. media</i>
SCID1-A	Delta del Ebro, (España)	Canal de Poble Nou <sup>a</sup>	<i>A. caviae</i>
ACFD1-A	Delta del Ebro, (España)	Canal de Poble Nou <sup>a</sup>	<i>A. caviae</i>
ACFD1-D	Delta del Ebro, (España)	Canal de Poble Nou <sup>a</sup>	<i>A. caviae</i>
ACID2-11A	Delta del Ebro, (España)	Canal de Poble Nou <sup>a</sup>	<i>A. caviae</i>
ACID2-12B	Delta del Ebro, (España)	Canal de Poble Nou <sup>a</sup>	<i>A. caviae</i>
SCID2-11B	Delta del Ebro, (España)	Canal de Poble Nou <sup>a</sup>	<i>A. caviae</i>
BCID2-11A	Delta del Ebro, (España)	Canal de Poble Nou <sup>a</sup>	<i>A. caviae</i>
BCID2-11B	Delta del Ebro, (España)	Canal de Poble Nou <sup>a</sup>	<i>A. caviae</i>
BCID2-12A	Delta del Ebro, (España)	Canal de Poble Nou <sup>a</sup>	<i>A. caviae</i>
SCIE1-15B	Delta del Ebro, (España)	Canal de Poble Nou <sup>a</sup>	<i>A. caviae</i>
SCIE1-15C	Delta del Ebro, (España)	Canal de Poble Nou <sup>a</sup>	<i>A. caviae</i>
ACFE1-15D	Delta del Ebro, (España)	Canal de Poble Nou <sup>a</sup>	<i>A. caviae</i>
ACFE1-16A	Delta del Ebro, (España)	Canal de Poble Nou <sup>a</sup>	<i>A. caviae</i>
ACFE1-16B	Delta del Ebro, (España)	Canal de Poble Nou <sup>a</sup>	<i>A. caviae</i>
ACFE1-16D	Delta del Ebro, (España)	Canal de Poble Nou <sup>a</sup>	<i>A. caviae</i>
SCFE1-16A	Delta del Ebro, (España)	Canal de Poble Nou <sup>a</sup>	<i>A. caviae</i>
SCFE1-16C	Delta del Ebro, (España)	Canal de Poble Nou <sup>a</sup>	<i>A. caviae</i>
BCFE1-16A	Delta del Ebro, (España)	Canal de Poble Nou <sup>a</sup>	<i>A. caviae</i>
BCFE1-16D	Delta del Ebro, (España)	Canal de Poble Nou <sup>a</sup>	<i>A. caviae</i>
ACIE2-15D	Delta del Ebro, (España)	Canal de Poble Nou <sup>a</sup>	<i>A. caviae</i>
ACIE2-16C	Delta del Ebro, (España)	Canal de Poble Nou <sup>a</sup>	<i>A. caviae</i>
BCIE2-16A	Delta del Ebro, (España)	Canal de Poble Nou <sup>a</sup>	<i>A. caviae</i>
BCIE2-16C	Delta del Ebro, (España)	Canal de Poble Nou <sup>a</sup>	<i>A. caviae</i>
ACFE2-16D	Delta del Ebro, (España)	Canal de Poble Nou <sup>a</sup>	<i>A. caviae</i>
BCFE2-15D	Delta del Ebro, (España)	Canal de Poble Nou <sup>a</sup>	<i>A. caviae</i>
SCID1-C	Delta del Ebro, (España)	Canal de Poble Nou <sup>a</sup>	<i>A. salmonicida</i>
SCID2-12A	Delta del Ebro, (España)	Canal de Poble Nou <sup>a</sup>	<i>A. salmonicida</i>
SCID2-12D	Delta del Ebro, (España)	Canal de Poble Nou <sup>a</sup>	<i>A. salmonicida</i>

**Anexo 3 (continuación 18). Cepas de origen ambiental identificadas en este estudio.**

Referencia URV	Origen		Identificación mediante secuenciación gen <i>rpoD</i>
	Geográfico	Tipo de agua	
BCID2-11C	Delta del Ebro, (España)	Canal de Poble Nou <sup>a</sup>	<i>A. salmonicida</i>
ACIE1-15D	Delta del Ebro, (España)	Canal de Poble Nou <sup>a</sup>	<i>A. salmonicida</i>
ACIE1-16B	Delta del Ebro, (España)	Canal de Poble Nou <sup>a</sup>	<i>A. salmonicida</i>
SCFE1-15A	Delta del Ebro, (España)	Canal de Poble Nou <sup>a</sup>	<i>A. salmonicida</i>
BCFE1-15A	Delta del Ebro, (España)	Canal de Poble Nou <sup>a</sup>	<i>A. salmonicida</i>
SCIE2-15C	Delta del Ebro, (España)	Canal de Poble Nou <sup>a</sup>	<i>A. salmonicida</i>
SCIE2-15D	Delta del Ebro, (España)	Canal de Poble Nou <sup>a</sup>	<i>A. salmonicida</i>
SCIE2-16C	Delta del Ebro, (España)	Canal de Poble Nou <sup>a</sup>	<i>A. salmonicida</i>
BCIE2-15A	Delta del Ebro, (España)	Canal de Poble Nou <sup>a</sup>	<i>A. salmonicida</i>
BCIE2-15B	Delta del Ebro, (España)	Canal de Poble Nou <sup>a</sup>	<i>A. salmonicida</i>
BCIE2-15C	Delta del Ebro, (España)	Canal de Poble Nou <sup>a</sup>	<i>A. salmonicida</i>
ACFE2-15B	Delta del Ebro, (España)	Canal de Poble Nou <sup>a</sup>	<i>A. salmonicida</i>
ACFE2-16B	Delta del Ebro, (España)	Canal de Poble Nou <sup>a</sup>	<i>A. salmonicida</i>
SCFE2-15C	Delta del Ebro, (España)	Canal de Poble Nou <sup>a</sup>	<i>A. salmonicida</i>
SCFE2-16A	Delta del Ebro, (España)	Canal de Poble Nou <sup>a</sup>	<i>A. salmonicida</i>
SCFE2-16C	Delta del Ebro, (España)	Canal de Poble Nou <sup>a</sup>	<i>A. salmonicida</i>
BCFE2-16A	Delta del Ebro, (España)	Canal de Poble Nou <sup>a</sup>	<i>A. salmonicida</i>
BCFE2-16D	Delta del Ebro, (España)	Canal de Poble Nou <sup>a</sup>	<i>A. salmonicida</i>
SCIE1-15D	Delta del Ebro, (España)	Canal de Poble Nou <sup>a</sup>	<i>A. allosaccharophila</i>
ACIE2-16A	Delta del Ebro, (España)	Canal de Poble Nou <sup>a</sup>	<i>A. allosaccharophila</i>
SCIE2-15A	Delta del Ebro, (España)	Canal de Poble Nou <sup>a</sup>	<i>A. hydrophila</i>
BCIE2-16B	Delta del Ebro, (España)	Canal de Poble Nou <sup>a</sup>	<i>A. hydrophila</i>
SCFE2-15A	Delta del Ebro, (España)	Canal de Poble Nou <sup>a</sup>	<i>A. hydrophila</i>
SCID2-12B	Delta del Ebro, (España)	Canal de Poble Nou <sup>a</sup>	<i>A. bestiarum</i>
ACIE1-16A	Delta del Ebro, (España)	Canal de Poble Nou <sup>a</sup>	<i>A. bivalvium</i>
SCIE1-16D	Delta del Ebro, (España)	Canal de Poble Nou <sup>a</sup>	<i>A. bivalvium</i>

EDAR: Estación Depuradora de Aguas Residuales; Entrada de lagunaje: agua procedente de un tratamiento secundario de la EDAR de Reus; Salida de lagunaje: agua depurada mediante lagunaje (= tratamiento terciario); Agua de Riego: agua depurada mediante cloración y luz UV (= tratamiento terciario) almacenada en el sistema de distribución de agua destinada al riego de vegetales. <sup>a</sup>Agua de río contaminada con agua residual no tratada.

**Anexo 4. Cepas aisladas de origen animal y vegetal identificadas en este estudio.**

Referencia URV	Origen		Identificación mediante secuenciación del gen <i>rpoD</i> o <i>gyrB</i>
	Geográfico <sup>a</sup>	Tipo de alimento	
R20	Santiago de Compostela (España)	Trucha ( <i>Oncorhynchus mykiss</i> )	<i>A. salmonicida</i>
R21	Santiago de Compostela (España)	Salmón ( <i>Salmo salar</i> )	<i>A. salmonicida</i>
R23	Santiago de Compostela (España)	Rodaballo ( <i>Scophthalmus maximus</i> )	<i>A. salmonicida</i>
R25	Santiago de Compostela (España)	Rodaballo ( <i>Scophthalmus maximus</i> )	<i>A. salmonicida</i>
R29	Santiago de Compostela (España)	Almeja ( <i>Venerupis philippinarum</i> )	<i>A. salmonicida</i>
R30	Santiago de Compostela (España)	Almeja ( <i>Venerupis philippinarum</i> )	<i>A. salmonicida</i>
R64	Santiago de Compostela (España)	Trucha ( <i>Oncorhynchus mykiss</i> )	<i>A. salmonicida</i>
R67	Santiago de Compostela (España)	Rodaballo ( <i>Scophthalmus maximus</i> )	<i>A. salmonicida</i>
R103	Santiago de Compostela (España)	Salmón ( <i>Salmo salar</i> )	<i>A. salmonicida</i>
R3	Santiago de Compostela (España)	Rodaballo ( <i>Scophthalmus maximus</i> )	<i>A. bestiarum</i>
R5	Santiago de Compostela (España)	Salmón ( <i>Salmo salar</i> )	<i>A. bestiarum</i>
R54	Santiago de Compostela (España)	Rodaballo ( <i>Scophthalmus maximus</i> )	<i>A. bestiarum</i>
R72	Santiago de Compostela (España)	Trucha ( <i>Oncorhynchus mykiss</i> )	<i>A. bestiarum</i>
R77	Santiago de Compostela (España)	Rodaballo ( <i>Scophthalmus maximus</i> )	<i>A. bestiarum</i>
R80	Santiago de Compostela (España)	Salmón ( <i>Salmo salar</i> )	<i>A. bestiarum</i>
R92	Santiago de Compostela (España)	Trucha ( <i>Oncorhynchus mykiss</i> )	<i>A. bestiarum</i>
R201	Santiago de Compostela (España)	Salmón ( <i>Salmo salar</i> )	<i>A. bestiarum</i>
R208	Santiago de Compostela (España)	Salmón ( <i>Salmo salar</i> )	<i>A. bestiarum</i>
R209	Santiago de Compostela (España)	Salmón ( <i>Salmo salar</i> )	<i>A. bestiarum</i>
R215	Santiago de Compostela (España)	Salmón ( <i>Salmo salar</i> )	<i>A. bestiarum</i>
R4	Santiago de Compostela (España)	Rodaballo ( <i>Scophthalmus maximus</i> )	<i>A. piscicola</i>
R9	Santiago de Compostela (España)	Trucha ( <i>Oncorhynchus mykiss</i> )	<i>A. piscicola</i>
R94	Santiago de Compostela (España)	Trucha ( <i>Oncorhynchus mykiss</i> )	<i>A. piscicola</i>
R200	Santiago de Compostela (España)	Salmón ( <i>Salmo salar</i> )	<i>A. piscicola</i>
R210	Santiago de Compostela (España)	Salmón ( <i>Salmo salar</i> )	<i>A. piscicola</i>
R213	Santiago de Compostela (España)	Trucha ( <i>Oncorhynchus mykiss</i> )	<i>A. piscicola</i>
R214	Santiago de Compostela (España)	Salmón ( <i>Salmo salar</i> )	<i>A. piscicola</i>
R219	Santiago de Compostela (España)	Boga ( <i>Boops boops</i> )	<i>A. piscicola</i>
F24 (= F1, F25, F23)	Hidalgo y México (México)	Trucha ( <i>Oncorhynchus mykiss</i> )	<i>A. veronii</i> <sup>b</sup>
F5	Hidalgo (México)	Trucha ( <i>Oncorhynchus mykiss</i> )	<i>A. veronii</i> <sup>b</sup>
F12	Veracruz (México)	Trucha ( <i>Oncorhynchus mykiss</i> )	<i>A. veronii</i> <sup>b</sup>
F15	Veracruz (México)	Trucha ( <i>Oncorhynchus mykiss</i> )	<i>A. veronii</i> <sup>b</sup>
F16	Veracruz (México)	Trucha ( <i>Oncorhynchus mykiss</i> )	<i>A. veronii</i> <sup>b</sup>
F16	Veracruz (México)	Trucha ( <i>Oncorhynchus mykiss</i> )	<i>A. veronii</i> <sup>b</sup>
F11 (= F13)	México, y Veracruz (México)	Trucha ( <i>Oncorhynchus mykiss</i> )	<i>A. bestiarum</i> <sup>b</sup>
F2 (= F10)	Michoacán y México (México)	Trucha ( <i>Oncorhynchus mykiss</i> )	<i>A. bestiarum</i> <sup>b</sup>
F3 (= F5)	Hidalgo y México (México)	Trucha ( <i>Oncorhynchus mykiss</i> )	<i>A. bestiarum</i> <sup>b</sup>
F5	Hidalgo (México)	Trucha ( <i>Oncorhynchus mykiss</i> )	<i>A. bestiarum</i> <sup>b</sup>
F6	Hidalgo (México)	Trucha ( <i>Oncorhynchus mykiss</i> )	<i>A. bestiarum</i> <sup>b</sup>
F19	México (México)	Trucha ( <i>Oncorhynchus mykiss</i> )	<i>A. bestiarum</i> <sup>b</sup>



**Anexo 4 (continuación 1). Cepas aisladas de origen animal y vegetal identificadas en este estudio.**

Referencia URV	Origen		Identificación mediante secuenciación del gen <i>rpoD</i> o <i>gyrB</i>
	Geográfico <sup>a</sup>	Tipo de alimento	
F1(= F12)	Veracruz (México)	Trucha ( <i>Oncorhynchus mikyss</i> )	<i>A. hydrophila</i> <sup>b</sup>
F5	Hidalgo (México)	Trucha ( <i>Oncorhynchus mikyss</i> )	<i>A. hydrophilb</i> <sup>b</sup>
F8	Hidalgo (México)	Trucha ( <i>Oncorhynchus mikyss</i> )	<i>A. hydrophila</i> <sup>b</sup>
F20	Hidalgo (México)	Trucha ( <i>Oncorhynchus mikyss</i> )	<i>A. hydrophila</i> <sup>b</sup>
F20	Hidalgo (México)	Trucha ( <i>Oncorhynchus mikyss</i> )	<i>A. hydrophila</i> <sup>b</sup>
F27	Michoacán (México)	Trucha ( <i>Oncorhynchus mikyss</i> )	<i>A. hydrophila</i> <sup>b</sup>
F28	Michoacán (México)	Trucha ( <i>Oncorhynchus mikyss</i> )	<i>A. hydrophila</i> <sup>b</sup>
F6	Hidalgo (México)	Trucha ( <i>Oncorhynchus mikyss</i> )	<i>A. sobria</i> <sup>b</sup>
F8	Hidalgo (México)	Trucha ( <i>Oncorhynchus mikyss</i> )	<i>A. sobria</i> <sup>b</sup>
F10	México (México)	Trucha ( <i>Oncorhynchus mikyss</i> )	<i>A. sobria</i> <sup>b</sup>
F12	Veracruz (México)	Trucha ( <i>Oncorhynchus mikyss</i> )	<i>A. sobria</i> <sup>b</sup>
F26	Michoacán (México)	Trucha ( <i>Oncorhynchus mikyss</i> )	<i>A. sobria</i> <sup>b</sup>
F18	Veracruz (México)	Trucha ( <i>Oncorhynchus mikyss</i> )	<i>A. media</i> <sup>b</sup>
F25	Hidalgo (México)	Trucha ( <i>Oncorhynchus mikyss</i> )	<i>A. media</i> <sup>b</sup>
F8	Hidalgo (México)	Trucha ( <i>Oncorhynchus mikyss</i> )	<i>A. media</i> <sup>b</sup>
F7	Hidalgo (México)	Trucha ( <i>Oncorhynchus mikyss</i> )	<i>A. popoffii</i> <sup>b</sup>
F4	Hidalgo (México)	Trucha ( <i>Oncorhynchus mikyss</i> )	<i>A. popoffii</i> <sup>b</sup>
F21	Hidalgo (México)	Trucha ( <i>Oncorhynchus mikyss</i> )	<i>A. allosacchariphila</i> <sup>b</sup>
F22	Hidalgo (México)	Trucha ( <i>Oncorhynchus mikyss</i> )	<i>A. salmonicida</i> <sup>b</sup>
F17	Veracruz (México)	Trucha ( <i>Oncorhynchus mikyss</i> )	<i>A. caviae</i> <sup>b</sup>
F29	Hidalgo (México)	Trucha ( <i>Oncorhynchus mikyss</i> )	<i>A. lusitana</i> <sup>b,c</sup>
<sup>a</sup> A3	Buenos Aires (Argentina)	Carpa común ( <i>Cyprinus carpio</i> )	<i>A. salmonicida</i>
A8	Buenos Aires (Argentina)	Carpa común ( <i>Cyprinus carpio</i> )	<i>A. sobria</i>
A11 (= A12)	Buenos Aires (Argentina)	Carpa común ( <i>Cyprinus carpio</i> )	<i>A. salmonicida</i>
A13	Buenos Aires (Argentina)	Carpa común ( <i>Cyprinus carpio</i> )	<i>A. salmonicida</i>
A1 (= A7)	Buenos Aires (Argentina)	Carpa común ( <i>Cyprinus carpio</i> )	<i>Shewanella baltica</i> <sup>d</sup>
A6 (= A9, A10)	Buenos Aires (Argentina)	Carpa común ( <i>Cyprinus carpio</i> )	<i>Shewanella baltica</i> <sup>d</sup>
A4	Buenos Aires (Argentina)	Carpa común ( <i>Cyprinus carpio</i> )	<i>Shewanella baltica</i> <sup>d</sup>
A5	Buenos Aires (Argentina)	Carpa común ( <i>Cyprinus carpio</i> )	<i>Shewanella baltica</i> <sup>d</sup>
A2	Buenos Aires (Argentina)	Carpa común ( <i>Cyprinus carpio</i> )	<i>Shewanella baltica</i> <sup>d</sup>
GMV704	Barcelona (España)	Delfín ( <i>Grampus griseus</i> )	<i>A. dhakensis</i>
367A (= 367C, 367D)	Tarragona (España)	Mejillón	<i>A. schubertii</i>
ALeE-15A	Girona (España)	Lechuga <sup>e</sup>	<i>A. caviae</i>
ALeE-15D	Girona (España)	Lechuga <sup>e</sup>	<i>A. caviae</i>
ALeE-A6B	Girona (España)	Lechuga <sup>e</sup>	<i>A. caviae</i>
ALeE-16C	Girona (España)	Lechuga <sup>e</sup>	<i>A. caviae</i>
BLLeE-15C	Girona (España)	Lechuga <sup>e</sup>	<i>A. caviae</i>
BLLeE-16A	Girona (España)	Lechuga <sup>e</sup>	<i>A. caviae</i>
ATotE-15B	Girona (España)	Tomate <sup>e</sup>	<i>A. hydrophila</i>
BPpE-16B	Girona (España)	Perejil <sup>e</sup>	<i>A. sanarellii</i>

**Anexo 4 (continuación 2). Cepas aisladas de origen animal y vegetal identificadas en este estudio.**

Referencia URV	Origen		Identificación mediante secuenciación del gen <i>rpoD</i> o <i>gyrB</i>
	Geográfico <sup>a</sup>	Tipo de alimento	
AALD1-C	Delta del Ebro (España)	Almeja	<i>A. salmonicida</i>
SALD1-D	Delta del Ebro (España)	Almeja	<i>A. salmonicida</i>
AMJD3-C	Delta del Ebro (España)	Mejillón	<i>A. salmonicida</i>
SMJD4-11B	Delta del Ebro (España)	Mejillón	<i>A. salmonicida</i>
SMJD4-11D	Delta del Ebro (España)	Mejillón	<i>A. salmonicida</i>
SMJD4-12A	Delta del Ebro (España)	Mejillón	<i>A. salmonicida</i>
SMJD4-12B	Delta del Ebro (España)	Mejillón	<i>A. salmonicida</i>
SMJD4-12C	Delta del Ebro (España)	Mejillón	<i>A. salmonicida</i>
BMJD4-11B	Delta del Ebro (España)	Mejillón	<i>A. salmonicida</i>
BMJD4-11C	Delta del Ebro (España)	Mejillón	<i>A. salmonicida</i>
AOSD4-C	Delta del Ebro (España)	Ostrón	<i>A. salmonicida</i>
SOSD4-E	Delta del Ebro (España)	Ostrón	<i>A. salmonicida</i>
SOSD5-D	Delta del Ebro (España)	Ostrón	<i>A. salmonicida</i>
BOSD5-B	Delta del Ebro (España)	Ostrón	<i>A. salmonicida</i>
SMJD5-11C	Delta del Ebro (España)	Mejillón	<i>A. salmonicida</i>
BMJD5-11B	Delta del Ebro (España)	Mejillón	<i>A. salmonicida</i>
AOSD5-B	Delta del Ebro (España)	Ostrón	<i>A. salmonicida</i>
BOSD5-C	Delta del Ebro (España)	Ostrón	<i>A. salmonicida</i>
AOSE1-14C	Delta del Ebro (España)	Ostrón	<i>A. salmonicida</i>
AOSE1-14D	Delta del Ebro (España)	Ostrón	<i>A. salmonicida</i>
AOSE1-14F	Delta del Ebro (España)	Ostrón	<i>A. salmonicida</i>
SOSE1-14E	Delta del Ebro (España)	Ostrón	<i>A. salmonicida</i>
AOSE1-13B	Delta del Ebro (España)	Ostrón	<i>A. salmonicida</i>
AOSE1-13D	Delta del Ebro (España)	Ostrón	<i>A. salmonicida</i>
AOSE1-13E	Delta del Ebro (España)	Ostrón	<i>A. salmonicida</i>
BALE1-14B	Delta del Ebro (España)	Almeja	<i>A. salmonicida</i>
SALE1-14C	Delta del Ebro (España)	Almeja	<i>A. salmonicida</i>
SALE1-14D	Delta del Ebro (España)	Almeja	<i>A. salmonicida</i>
BALE1-13C	Delta del Ebro (España)	Almeja	<i>A. salmonicida</i>
BALE1-13D	Delta del Ebro (España)	Almeja	<i>A. salmonicida</i>
BALE1-14D	Delta del Ebro (España)	Almeja	<i>A. salmonicida</i>
SMJE3-13C	Delta del Ebro (España)	Mejillón	<i>A. salmonicida</i>
BMJE3-14D	Delta del Ebro (España)	Mejillón	<i>A. salmonicida</i>
AMJE2-13A	Delta del Ebro (España)	Mejillón	<i>A. salmonicida</i>
SMJE2-13A	Delta del Ebro (España)	Mejillón	<i>A. salmonicida</i>
SMJE2-13B	Delta del Ebro (España)	Mejillón	<i>A. salmonicida</i>
BMJE2-14B	Delta del Ebro (España)	Mejillón	<i>A. salmonicida</i>
AOSE2-13A	Delta del Ebro (España)	Ostrón	<i>A. salmonicida</i>
SOSE2-13C	Delta del Ebro (España)	Ostrón	<i>A. salmonicida</i>
SOSE2-14B	Delta del Ebro (España)	Ostrón	<i>A. salmonicida</i>

**Anexo 4 (continuación 3). Cepas aisladas de origen animal y vegetal identificadas en este estudio.**

Referencia URV	Origen		Identificación mediante secuenciación del gen <i>rpoD</i> o <i>gyrB</i>
	Geográfico <sup>a</sup>	Tipo de alimento	
BOSE2-13B	Delta del Ebro (España)	Ostrón	<i>A. salmonicida</i>
BOSE2-13D	Delta del Ebro (España)	Ostrón	<i>A. salmonicida</i>
BOSE2-14A	Delta del Ebro (España)	Ostrón	<i>A. salmonicida</i>
SOSE3-14B	Delta del Ebro (España)	Ostrón	<i>A. salmonicida</i>
SOSE3-14A	Delta del Ebro (España)	Ostrón	<i>A. salmonicida</i>
SOSE3-14B	Delta del Ebro (España)	Ostrón	<i>A. salmonicida</i>
SOSE3-14C	Delta del Ebro (España)	Ostrón	<i>A. salmonicida</i>
BOSE3-13B	Delta del Ebro (España)	Ostrón	<i>A. salmonicida</i>
BOSE3-13C	Delta del Ebro (España)	Ostrón	<i>A. salmonicida</i>
SMJD5-11C	Delta del Ebro (España)	Mejillón	<i>A. salmonicida</i>
BMJD5-11B	Delta del Ebro (España)	Mejillón	<i>A. salmonicida</i>
SMJE4-14C	Delta del Ebro (España)	Mejillón	<i>A. salmonicida</i>
SMJE4-15A	Delta del Ebro (España)	Mejillón	<i>A. salmonicida</i>
SMJE5-14A	Delta del Ebro (España)	Mejillón	<i>A. salmonicida</i>
BMJE5-14A	Delta del Ebro (España)	Mejillón	<i>A. salmonicida</i>
BMJE5-14C	Delta del Ebro (España)	Mejillón	<i>A. salmonicida</i>
SOSE4-14A	Delta del Ebro (España)	Ostrón	<i>A. salmonicida</i>
BOSE5-14B	Delta del Ebro (España)	Ostrón	<i>A. salmonicida</i>
BOSE5-15B	Delta del Ebro (España)	Ostrón	<i>A. salmonicida</i>
AMJD4-11B	Delta del Ebro (España)	Mejillón	<i>A. media</i>
AMJD4-11C	Delta del Ebro (España)	Mejillón	<i>A. media</i>
AMJD4-12B	Delta del Ebro (España)	Mejillón	<i>A. media</i>
SMJD4-11C	Delta del Ebro (España)	Mejillón	<i>A. media</i>
BMJD4-11A	Delta del Ebro (España)	Mejillón	<i>A. media</i>
BMJD4-11D	Delta del Ebro (España)	Mejillón	<i>A. media</i>
AMJD5-11A	Delta del Ebro (España)	Mejillón	<i>A. media</i>
AMJD5-11D	Delta del Ebro (España)	Mejillón	<i>A. media</i>
AMJD5-12A	Delta del Ebro (España)	Mejillón	<i>A. media</i>
SMJD5-11A	Delta del Ebro (España)	Mejillón	<i>A. media</i>
SMJD5-11D	Delta del Ebro (España)	Mejillón	<i>A. media</i>
SMJD5-12A	Delta del Ebro (España)	Mejillón	<i>A. media</i>
BMJD5-11C	Delta del Ebro (España)	Mejillón	<i>A. media</i>
BMJD5-12C	Delta del Ebro (España)	Mejillón	<i>A. media</i>
AOSD4-F	Delta del Ebro (España)	Ostrón	<i>A. media</i>
AOSD4-G	Delta del Ebro (España)	Ostrón	<i>A. media</i>
AOSD4-H	Delta del Ebro (España)	Ostrón	<i>A. media</i>
SOSD4-F	Delta del Ebro (España)	Ostrón	<i>A. media</i>
SOSD4-H	Delta del Ebro (España)	Ostrón	<i>A. media</i>
BOSD4-D	Delta del Ebro (España)	Ostrón	<i>A. media</i>
BOSD4-F	Delta del Ebro (España)	Ostrón	<i>A. media</i>

**Anexo 4 (continuación 4). Cepas aisladas de origen animal y vegetal identificadas en este estudio.**

Referencia URV	Origen		Identificación mediante secuenciación del gen <i>rpoD</i> o <i>gyrB</i>
	Geográfico <sup>a</sup>	Tipo de alimento	
BOSD5-A	Delta del Ebro (España)	Ostrón	<i>A. media</i>
AALE1-13B	Delta del Ebro (España)	Almeja	<i>A. media</i>
SALE1-13B	Delta del Ebro (España)	Almeja	<i>A. media</i>
BALE1-14C	Delta del Ebro (España)	Almeja	<i>A. media</i>
BMJE3-13B	Delta del Ebro (España)	Mejillón	<i>A. media</i>
BMJE3-14C	Delta del Ebro (España)	Mejillón	<i>A. media</i>
AMJE2-13B	Delta del Ebro (España)	Mejillón	<i>A. media</i>
SMJE2-14D	Delta del Ebro (España)	Mejillón	<i>A. media</i>
AOSE3-13A	Delta del Ebro (España)	Ostrón	<i>A. media</i>
AMJE4-14D	Delta del Ebro (España)	Mejillón	<i>A. media</i>
SMJE4-15C	Delta del Ebro (España)	Mejillón	<i>A. media</i>
BMJE4-14B	Delta del Ebro (España)	Mejillón	<i>A. media</i>
BMJE4-14C	Delta del Ebro (España)	Mejillón	<i>A. media</i>
BMJE4-15C	Delta del Ebro (España)	Mejillón	<i>A. media</i>
AMJE5-14C	Delta del Ebro (España)	Mejillón	<i>A. media</i>
AMJE5-15C	Delta del Ebro (España)	Mejillón	<i>A. media</i>
AOSE4-14A	Delta del Ebro (España)	Ostrón	<i>A. media</i>
BOSE4-14D	Delta del Ebro (España)	Ostrón	<i>A. media</i>
SOSE5-14B	Delta del Ebro (España)	Ostrón	<i>A. media</i>
SOSE5-14D	Delta del Ebro (España)	Ostrón	<i>A. media</i>
AMJD4-11D	Delta del Ebro (España)	Mejillón	<i>A. caviae</i>
AOSD4-A	Delta del Ebro (España)	Ostrón	<i>A. caviae</i>
AOSD4-E	Delta del Ebro (España)	Ostrón	<i>A. caviae</i>
SOSD4-A	Delta del Ebro (España)	Ostrón	<i>A. caviae</i>
SOSD4-B	Delta del Ebro (España)	Ostrón	<i>A. caviae</i>
SOSD4-C	Delta del Ebro (España)	Ostrón	<i>A. caviae</i>
SOSD4-D	Delta del Ebro (España)	Ostrón	<i>A. caviae</i>
SMJE4-14A	Delta del Ebro (España)	Mejillón	<i>A. caviae</i>
BMJE4-14D	Delta del Ebro (España)	Mejillón	<i>A. caviae</i>
BMJE4-15A	Delta del Ebro (España)	Mejillón	<i>A. caviae</i>
BMJE4-15B	Delta del Ebro (España)	Mejillón	<i>A. caviae</i>
AMJE5-14A	Delta del Ebro (España)	Mejillón	<i>A. caviae</i>
AMJE5-14D	Delta del Ebro (España)	Mejillón	<i>A. caviae</i>
AMJE5-15B	Delta del Ebro (España)	Mejillón	<i>A. caviae</i>
SMJE5-14B	Delta del Ebro (España)	Mejillón	<i>A. caviae</i>
SMJE5-14C	Delta del Ebro (España)	Mejillón	<i>A. caviae</i>
SMJE5-15B	Delta del Ebro (España)	Mejillón	<i>A. caviae</i>
BMJE5-14B	Delta del Ebro (España)	Mejillón	<i>A. caviae</i>
BMJE5-15B	Delta del Ebro (España)	Mejillón	<i>A. caviae</i>
AOSE4-14D	Delta del Ebro (España)	Ostrón	<i>A. caviae</i>
AOSE4-15A	Delta del Ebro (España)	Ostrón	<i>A. caviae</i>
AOSE4-15B	Delta del Ebro (España)	Ostrón	<i>A. caviae</i>

Anexo 4 (continuación 5). Cepas aisladas de origen animal y vegetal identificadas en este estudio.

Referencia URV	Origen		Identificación mediante secuenciación del gen <i>rpoD</i> o <i>gyrB</i>
	Geográfico <sup>a</sup>	Tipo de alimento	
AOSE4-15C	Delta del Ebro (España)	Ostrón	<i>A. caviae</i>
SOSE4-14C	Delta del Ebro (España)	Ostrón	<i>A. caviae</i>
SOSE4-15B	Delta del Ebro (España)	Ostrón	<i>A. caviae</i>
BOSE4-14A	Delta del Ebro (España)	Ostrón	<i>A. caviae</i>
BOSE4-15D	Delta del Ebro (España)	Ostrón	<i>A. caviae</i>
SOSE5-14C	Delta del Ebro (España)	Ostrón	<i>A. caviae</i>
SOSE5-15A	Delta del Ebro (España)	Ostrón	<i>A. caviae</i>
AMJD4-11A	Delta del Ebro (España)	Mejillón	<i>A. allosaccharophila</i>
BMJD4-12C	Delta del Ebro (España)	Mejillón	<i>A. allosaccharophila</i>
SMJD5-11B	Delta del Ebro (España)	Mejillón	<i>A. allosaccharophila</i>
AMJE4-15A	Delta del Ebro (España)	Mejillón	<i>A. allosaccharophila</i>
AMJE4-15B	Delta del Ebro (España)	Mejillón	<i>A. allosaccharophila</i>
SMJE4-14B	Delta del Ebro (España)	Mejillón	<i>A. allosaccharophila</i>
SMJE4-15B	Delta del Ebro (España)	Mejillón	<i>A. allosaccharophila</i>
BMJE4-14A	Delta del Ebro (España)	Mejillón	<i>A. allosaccharophila</i>
SMJE5-15C	Delta del Ebro (España)	Mejillón	<i>A. allosaccharophila</i>
AOSE4-15D	Delta del Ebro (España)	Ostrón	<i>A. allosaccharophila</i>
AMJD5-11B	Delta del Ebro (España)	Mejillón	<i>A. veronii</i>
BMJD5-11D	Delta del Ebro (España)	Mejillón	<i>A. veronii</i>
AOSE1-14B	Delta del Ebro (España)	Ostrón	<i>A. veronii</i>
SMJE3-13A	Delta del Ebro (España)	Mejillón	<i>A. veronii</i>
BMJE5-15C	Delta del Ebro (España)	Mejillón	<i>A. veronii</i>
AOSE3-14A <sup>T</sup>	Delta del Ebro (España)	Ostrón	<b><i>Aeromonas</i> sp. nov. 3</b>
AMJE2-14B	Delta del Ebro (España)	Ostrón	<b><i>Aeromonas</i> sp. nov. 3</b>
AALÉ1-13D	Delta del Ebro (España)	Ostrón	<b><i>Aeromonas</i> sp. nov. 3</b>
SOSE5-14A	Delta del Ebro (España)	Ostrón	<b><i>Aeromonas</i> sp. nov. 3</b>
BMJD5-11A	Delta del Ebro (España)	Mejillón	<i>A. hydrophila</i>
SOSE4-14D	Delta del Ebro (España)	Ostrón	<i>A. hydrophila</i>
BOSE4-15A	Delta del Ebro (España)	Ostrón	<i>A. hydrophila</i>
AALD1-A	Delta del Ebro (España)	Almeja	<i>A. popoffii</i>
AALD1-D	Delta del Ebro (España)	Almeja	<i>A. popoffii</i>
SOSE3-13D	Delta del Ebro (España)	Ostrón	<i>A. popoffii</i>
AMJD3-B	Delta del Ebro (España)	Mejillón	<i>A. fluvialis</i>
SMJD4-11A	Delta del Ebro (España)	Mejillón	<i>A. bestiarum</i>

<sup>a</sup>Las cepas procedentes de Santiago de Compostela fueron enviadas por el Dr. Jesús López-Romalde (Universidad Santiago de Compostela), las cepas de origen mexicano fueron remitidas por el Dr. Vicente Vega-Sánchez (Universidad Autónoma del Estado de México), las cepas procedentes de Argentina fueron enviadas por la Dra. Daniela Agüeria (Universidad Nacional del Centro de la Provincia de Buenos Aires), la cepa GMV704 procedente de Barcelona fue enviada por el Dr. Mariano Domingo (Universidad Autónoma de Barcelona), mientras que el resto de las cepas resultaron de los diferentes muestreos realizados durante este trabajo de investigación; <sup>b</sup>Las cepas de procedentes de México fueron identificadas molecularmente mediante secuenciación de los genes *rpoD* y *gyrB*; <sup>c</sup>En el árbol filogenético se agrupó con la cepa tipo de la especie *A. lusitana*, que se encuentra en proceso de descripción; <sup>d</sup>Las cepas procedentes de Argentina fueron identificadas molecularmente mediante secuenciación del gen *gyrB*; <sup>e</sup>Regados con aguas regeneradas.

