



TAXONOMÍA Y EPIDEMIOLOGÍA DEL GÉNERO AEROMONAS

Anabel Alperi Vega

Dipòsit Legal: T.1022-2011

ADVERTIMENT. La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX (www.tesisenxarxa.net) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

ADVERTENCIA. La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR (www.tesisenred.net) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

WARNING. On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX (www.tesisenxarxa.net) service has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized neither its spreading and availability from a site foreign to the TDX service. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service is not authorized (framing). This rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.



UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
FACULTAT DE MEDICINA I CIÈNCIES DE LA SALUT

TAXONOMÍA Y EPIDEMIOLOGÍA
DEL GÉNERO *Aeromonas*.

Anabel Alperi Vega
Tesis Doctoral
2009

8µm

Agradecimientos:

Ha llegado el momento de agradecer, ha llegado el momento de recordar a todas aquellas personas que me han ayudado y contribuido de alguna manera en la elaboración y desarrollo de esta tesis doctoral.

En primer lugar mis agradecimientos son para la directora de esta tesis, la Dra. M^a José Figueras Salvat, trabajadora incansable, por su dedicación, entusiasmo y minuciosidad en cada uno de los aspectos de este trabajo. Asimismo, quiero agradecer al co-director de esta tesis, el Dr. Martínez-Murcia, sus críticas y valoraciones. Gracias.

También quiero mostrar mi agradecimiento a todos los miembros de esta Unidad de Microbiología, en especial al director de este equipo, el Dr. Guarro que sin pretenderlo ha sido un gran ejemplo para mí, y al Dr. Pastor, porque quieras o no, todos los becarios formamos parte de este "rebaño".

Llegamos a mis COMPAÑERAS. Para vosotras son mis más tiernos agradecimientos. ¿Cómo habría terminado esto sin vosotras? Txutxis!!! Catí, sin tu ayuda esto hubiera durado mucho más de 4 años, pero lo que más te agradezco es tu amistad. De verdad, gracias txutxina. Ester!!! Esos cafés de "banco" con Murphy ... Caracola loca de Mar, si no hubieses abierto "el bar del laboratorio" ¿dónde iríamos a ahogar nuestras penas? A Eduardo y Valentina, mucho más para mí que compañeros de laboratorio y de piso en los últimos tiempos. Luílli, porque la santa caña existe. Gracias. Gracias Mar y Enrique, almas de los antifúngicos. A las VETERANAS, Mabel por tus invaluable consejos tanto profesionales como personales, y Dania, abuela!!! porque sin ti los "fitis" no serían lo mismo. Haybrig, yo nunca dije que mordiera!!! Josep, mi pez predilecto. En serio, gracias Nuria, Sarah, Roxana, Yesica, Mónica, Marsal, Mery, Hugo, Kendra. Espero no dejarme a nadie. Gracias a todos y cada uno de vosotros.

A mi familia. A ellos va dedicada esta tesis. Mamá, tanto que me has enseñado en esta vida, mi luchadora favorita. Gracias por ser como eres y por escuchar las interminables quejas de esta "niña rebelde". Apí, porque a tu manera haces que todo funcione. Juancar y Pili, gracias por esas charlas, es un alivio para el espíritu teneros cerca. Mo y Javi,

gracias a los dos, porque también es culpa vuestra que hoy esté aquí escribiendo los agradecimientos de esta tesis. Tito y Tita, mi par sin igual, ¿qué nieto soñaría con unos abuelos mejores que vosotros? Gracias a todos por soportarme.

Nico. Mi compañero en este viaje. Tú me has traído la calma y la paz. Eres todo un ejemplo de fortaleza y determinación. Gracias cariño, gracias por escucharme, apoyarme y estar siempre a mi lado. Gracias por todos nuestros momentos, los buenos y los malos, por reconfortarme tantas y tantas veces, por mostrarme lo que no podía ver y por enseñarme tantas otras cosas. Gracias por sostenerme, por ser la luz de mi oscuridad, por ser el faro que me guía.

Al fin y al cabo, todos vamos en el mismo barco y nos dirigimos a un destino común. LA TESIS.

GRACIAS, una palabra que implica un profundo sentimiento por mi parte.

	Página
1. INTRODUCCIÓN	
1.1. <i>Aeromonas</i> , perspectivas históricas.....	1
1.2. Taxonomía de género <i>Aeromonas</i>	4
1.2.1. Gen ARNr 16S.....	5
1.2.2. Hibridación ADN-ADN (DDH).....	8
1.2.2.1. DDH en <i>Aeromonas</i>	10
1.2.3. Genes que codifican proteínas esenciales: <i>housekeeping</i>	14
1.2.4. Estudio fenotípico.....	17
1.2.4.1. Características fenotípicas clásicas.....	17
1.2.4.2. Sistemas no automatizados.....	17
1.2.4.3. Sistemas automatizados.....	18
1.2.5. Técnicas de tipado molecular.....	19
1.3. Epidemiología del género <i>Aeromonas</i>	22
1.3.1. Ecología.....	22
1.3.2. Infecciones por <i>Aeromonas</i> en humanos.....	24
1.3.2.1. Intestinales.....	24
1.3.2.2. Extraintestinales.....	26
1.3.3. Factores de Virulencia.....	31
1.3.3.1. Productos extracelulares.....	31
1.3.3.2. Sistemas de secreción.....	36
1.3.3.3. Componentes estructurales.....	40
1.3.4. Resistencia a agentes antimicrobianos.....	47
2. INTERÉS Y OBJETIVOS.....	51
3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	55
3.1. Origen y aislamiento de las cepas.....	56
3.1.1. Cepas clínicas.....	56
3.1.2. Cepas animales.....	56
3.1.3. Cepas ambientales.....	56
3.1.4. Cepas de colección y referencia.....	56
3.1.5. Resiembra y conservación de cepas.....	56
3.2. Caracterización fenotípica.....	57

3.2.1. Cepas clínicas humanas y animales.....	57
3.2.2. Cepas ambientales.....	57
3.2.3. Cepas pertenecientes a nuevas líneas filogenéticas.....	57
3.3. Caracterización genética.....	59
3.3.1. Extracción de ADN.....	59
3.3.2. RFLP del ADNr 16S.....	60
3.3.3. Secuenciación.....	61
3.3.3.1. Gen ARNr 16S.....	61
3.3.3.2. Gen <i>rpoD</i>	62
3.3.3.3. Gen <i>gyrB</i> , <i>gyrA</i> y <i>dnaJ</i>	62
3.3.3.4. Gen <i>recA</i>	63
3.3.4. Análisis de secuencias y construcción de árboles filogenéticos.....	63
3.3.5. Hibridación ADN-ADN.....	64
3.3.6. Técnicas de tipado molecular.....	69
3.3.6.1. ERIC-PCR.....	69
3.3.6.2. RAPD-PCR.....	69
3.3.6.3. PFGE.....	69
3.4. Detección de factores de virulencia.....	70
3.4.1. Detección y secuenciación de los genes que codifican para las toxinas Shiga <i>stx</i> ₁ y <i>stx</i> ₂	72
3.4.2. Detección de la producción de toxinas Shiga 1 y 2.....	72
3.4.3. Extracción de plásmidos.....	73
3.5. Sensibilidad a agentes antimicrobianos.....	73

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Taxonomía del género <i>Aeromonas</i>	76
4.1.1. MJ Figueras, A Alperi , J Guarro, AJ Martínez-Murcia. Genotyping of isolates included in the description of a novel species should be mandatory. <i>Int J Syst Evol Microbiol</i> . 2006. 56:1183-1184.....	77
4.1.2. MJ Figueras, A Alperi , J Guarro. On the identification of clinical <i>Aeromonas</i> by a new restriction fragment length polymorphism of 16S rDNA method. <i>Lett Appl Microbiol</i> . 2007. 45:692-463.....	80
4.1.3. A Alperi , MJ Figueras, I Inza, AJ Martínez-Murcia. Analysis of the 16S rRNA gene mutations in a subset of <i>Aeromonas</i> strains and their impact in species delineation. <i>Int Microbiol</i> . 2008.11: 185-194.....	83
4.1.4. Análisis de las secuencias de los operones del gen ARNr 16S en <i>Aeromonas</i>	96

4.1.5.	AJ Martínez-Murcia, A Monera, A Alperi , MJ Figueras, MJ Saavedra. Phylogenetic evidence indicated that <i>Aeromonas hydrophila</i> subsp. <i>dhakensis</i> Huys <i>et al.</i> , 2002 is a synonym of <i>Aeromonas aquariorum</i> sp. nov. <i>Curr Microbiol.</i> 2009. 58:76-80.....	99
4.1.6.	A Alperi , AJ Martínez-Murcia, A Monera, MJ Saavedra, MJ Figueras. <i>Aeromonas fluvialis</i> sp. nov., isolated from Spanish river. <i>Int J Syst Evol Microbiol.</i> En prensa.....	105
4.1.7.	A Alperi , AJ Martínez-Murcia, WC Ko, A Monera, MJ Saavedra, MJ Figueras. <i>Aeromonas taiwanensis</i> sp. nov. and <i>Aeromonas sanarellii</i> sp. nov., two new clinical species from Taiwan. <i>Int J Syst Evol Microbiol.</i> En revisión.....	123
4.1.8.	R Beaz-Hidalgo, A Alperi , MJ Figueras, J Romalde. <i>Aeromonas piscicola</i> sp. nov., isolated from diseased fish. <i>Syst Appl Microbiol.</i> En prensa.....	143
4.1.9.	MJ Figueras, A Alperi , R Beaz-Hidalgo, E Stackebrandt, E Brambilla, A Monera, AJ Martínez-Murcia. <i>Aeromonas rivuli</i> sp. nov. isolated from the upstream region of a karst water rivulet in Germany. <i>Int J Syst Evol Microbiol.</i> En revisión.....	165
4.2.	Epidemiología del género <i>Aeromonas</i>	
4.2.1.	MJ Figueras, A Alperi , MJ Saavedra, WC Ko, N Gonzalo, M Navarro, AJ Martínez-Murcia. Clinical relevance of the recently described <i>Aeromonas aquariorum</i> . <i>J Clin Microbiol.</i> En revisión.....	181
4.2.2.	MJ Figueras, MJ Aldea, N Fernández, C Aspíroz, A Alperi , J Guarro. <i>Aeromonas</i> hemolytic uremic syndrome. A case and a review of the literature. <i>Diagn Microbiol Infect.</i> 2007. 58:23-24.....	194
4.2.3.	A Alperi , MJ Figueras. Shiga toxin (<i>stx</i> ₁ and <i>stx</i> ₂) genes in <i>Aeromonas</i> clinical strains show sequences which are highly similar to those of the most virulent human variants of shiga toxin producing <i>E. coli</i> . <i>Clin Microbiol Infec.</i> En revisión.....	199
4.2.4.	D Tena, C Aspíroz, MJ Figueras, A González-Praetorius, MJ Aldea, A Alperi , J Bisquert. Surgical site infection due to <i>Aeromonas</i> species: Report of nine cases and literature review. <i>Scand J Infect Dis.</i> 2009. 41:164-170.....	208
4.2.5.	J Sánchez-Céspedes, MJ Figueras, C Aspíroz, MJ Aldea, M Toledo, A Alperi , F Marco, J Vila. Development of imipenem resistance in an <i>Aeromonas veronii</i> biovar sobria clinical isolate recovered from a patient with cholangitis. <i>J Med Microbiol.</i> 2009. 58: 451-455.....	216
5.	DISCUSIÓN GENERAL	222
6.	CONCLUSIONES	236

7. BIBLIOGRAFÍA.....	239
ANEXOS.....	268
1. Cepas de origen clínico identificadas.....	269
2. Cepas de origen animal identificadas.....	277
3. Cepas identificadas proporcionadas por diversos autores.....	283
4. Cepas de origen ambiental identificadas.....	288
5. Cepas utilizadas en el estudio 4.1.1.....	290
6. Cepas utilizadas en el estudio 4.1.3.....	290
7. Cepas utilizadas en el estudio 4.2.1.....	292
8. Cepas utilizadas en el estudio 4.2.3.....	293
9. Cepas utilizadas en el estudio 4.2.4.....	293
10. Cartas de aceptación de los artículos en prensa.....	294
11. Justificantes de los trabajos en revisión.....	297

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.). El género incluye en la actualidad 19 especies y un Grupo de Hibridación (GH) denominado GH13 o Grupo 501 (**Tabla 1**). Estos microorganismos se caracterizan por ser bacilos Gram negativos, oxidasa y catalasa positivos, capaces de degradar nitratos a nitritos, fermentadores de la glucosa y resistentes al factor vibriostático O/129 (2,4-Diamino-6,7-di-iso-propilpteridina fosfato). A pesar de ser considerados microorganismos autóctonos del medio acuático, también han sido aislados con frecuencia en alimentos destinados al consumo humano, peces enfermos y en diversos procesos infecciosos en humanos (Borrell y cols., 1998; Martin-Carnahan y Joseph, 2005, Figueras 2005).

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 Kluver and van Niel 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.

El género *Aeromonas* ha residido en la familia *Vibrionaceae* desde 1965 junto a los géneros *Vibrio* y *Plesiomonas*. 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 hidroxapatita y una temperatura de reasociación óptima de 60°C (Martin-Carnahan y Joseph, 2005).

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 (Martínez-Murcia y cols., 1992a) corroboraron la posición del género y la propuesta de Colwell y cols. (1986).

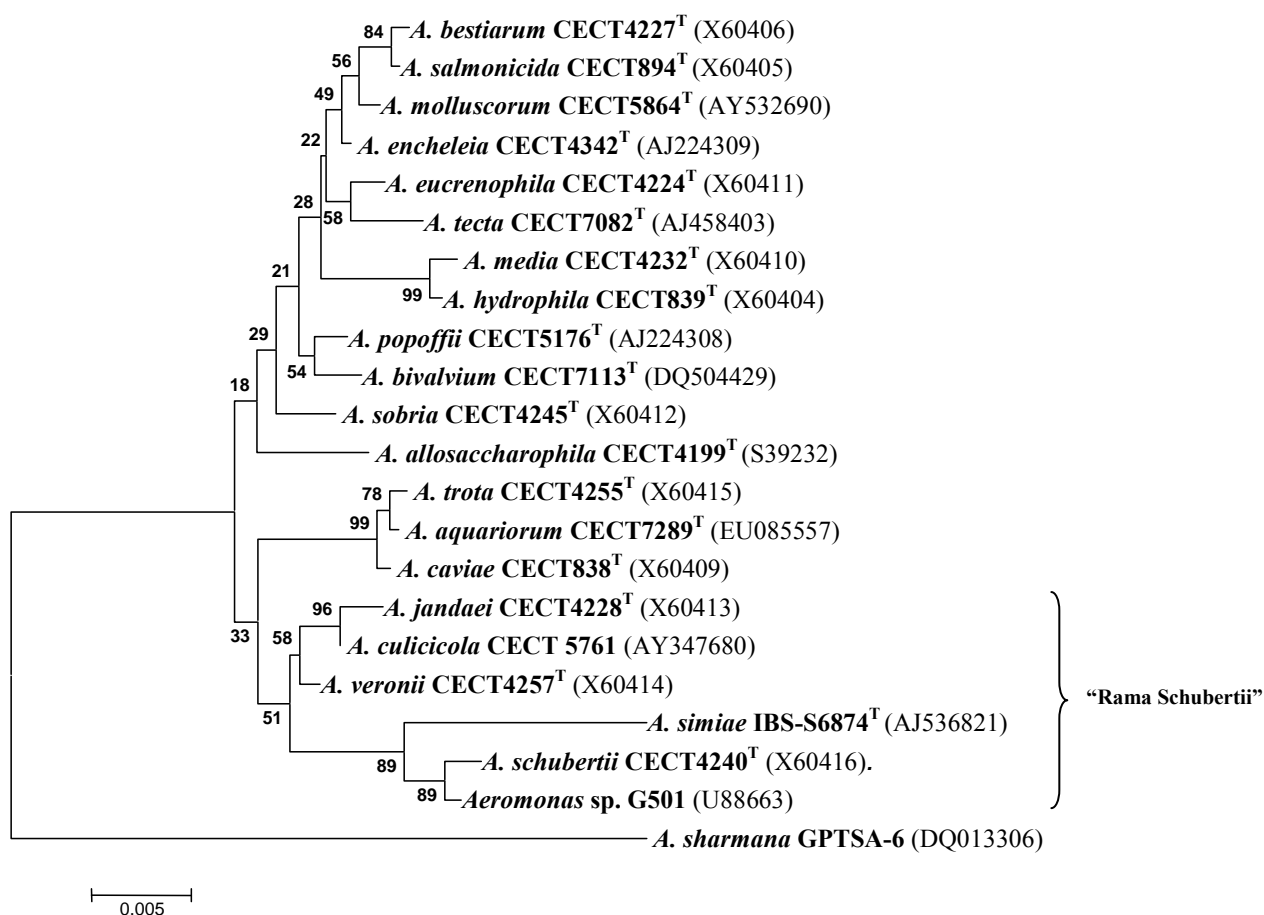


Figura 1. Relación filogenética entre las distintas especies incluidas en el género *Aeromonas* establecida en base a la secuencia del gen 16S rRNA.

Desde 1992 hasta la fecha se han descrito 10 (**Tabla 1 y Figura 1**) nuevas especies en el género *Aeromonas*: *A. allosaccharophila* (Martínez-Murcia y cols., 1992b), *A. encheleia* (Esteve y cols., 1995c) a la que también pertenece el GH11 (Huys y cols., 1997b), *A. popoffii* (Huys y cols., 1997a), *A. culicicola* (Pidiyar y cols., 2002), *A. simiae* (Harf-Monteil y cols., 2004), *A. molluscorum* (Miñana-Galbis y cols., 2004), *A. sharmana* (Saha y Chakrabarti, 2006), *A. bivalvium* (Miñana-Galbis y cols., 2007), *A. tecta* (Demarta y cols., 2008) y *A. aquariorum* (Martínez-Murcia y cols., 2008). Sin embargo, se vio poco después de su descripción que *A. culicicola* era un sinónimo de *A. veronii* (Huys y cols., 2005) y se ha demostrado recientemente que *A. sharmana* no pertenece al género *Aeromonas* (Martínez-Murcia y cols., 2007). Pero, esta última propuesta está pendiente de validación por parte del Comité Internacional para la Sistemática de Procariotas. En la actualidad están aceptadas 8 subespecies en el género *Aeromonas*, 3 pertenecen a *A. hydrophila* (subsp. *ranae*, *dhakensis* e *hydrophila*) y 5 a *A. salmonicida* (subsp. *salmonicida*, *achromogenes*, *mausoicida*, *smithia* y *pectinolytica*).

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

Número	Especie	Cepa tipo	Equivalentes en otras colecciones	Origen	Autores
1	<i>A. hydrophila</i> ^a	ATCC 7966 ^T	CECT 839 ^T ; NCIMB 9240 ^T	Leche	Stainer, 1943
2	<i>A. bestiarum</i>	ATCC 51108 ^T	CECT 4227 ^T ; NCIMB 1134 ^T	Pez enfermo	Ali y cols., 1996
3	<i>A. salmonicida</i> ^b	NCIMB 1102 ^T	CECT 894 ^T ; ATCC 33658 ^T	Salmón	Griffin y cols., 1953
4	<i>A. caviae</i>	ATCC 15468 ^T	CECT 838 ^T , ATCC 15468 ^T	Cobaya	Schubert y Hegazi, 1988
5	<i>A. media</i>	ATCC 33907 ^T	CECT 4232 ^T ; NCIMB 2237 ^T	Agua de piscifactoría	Allen y cols., 1983
6	<i>A. eucrenophila</i>	NCIMB 74 ^T	CECT 4224 ^T ; ATCC 23309 ^T	Pez de agua dulce	Schubert y Hegazi, 1988
7	<i>A. sobria</i>	NCIMB 12065 ^T	ATCC 43979 ^T ; CECT4245 ^T	Pez	Popoff y cols., 1981
8	<i>A. veronii</i> ^c	ATCC 35624 ^T	CECT 4257 ^T ; NCIMB 13015 ^T	Espudo	Hickman-Brenner y cols., 1987
9	<i>A. jandaei</i>	ATCC 49568 ^T	CECT 4228 ^T ; LMG 12221 ^T	Heces humanas	Carnahan y cols., 1991c
10	<i>A. schubertii</i>	ATCC 43700 ^T	CECT 4240 ^T ; NCIMB 13161 ^T	Absceso cutáneo	Hickman-Brenner y cols., 1988
11	<i>A. trota</i> ^d	ATCC 49657 ^T	CECT 4255 ^T ; LMG 12223 ^T	Heces humanas	Carnahan y cols., 1991b

12	<i>A. allosaccharophila</i>	CECT 4199 ^T	ATCC 51208 ^T ; LMG 14059 ^T	Anguila	Martínez-Murcia y cols., 1992b
13	<i>A. encheleia</i>	CECT 4342 ^T	ATCC 51929 ^T ; LMG 16330 ^T	Anguila	Esteve y cols., 1995c
14	<i>A. popoffii</i>	LMG 17541 ^T	CECT 5176 ^T ; ATCC BAA-243 ^T ; NCIMB 13618 ^T	Agua potable	Huys y cols., 1997a
15	<i>A. simiae</i>	IBS S6874 ^T	CCUG 47378 ^T ; CIP 107798 ^T	Heces de mono	Harf-Monteil y cols., 2004
16	<i>A. molluscorum</i>	CECT 5864 ^T	848T ^T ; CCUG 50741 ^T ; LMG 22214 ^T	Moluscos bivalvos	Miñana-Galbis y cols., 2004
17	<i>A. bivalvium</i>	CECT 7113 ^T	868E ^T ; LMG 23376 ^T	Moluscos bivalvos	Miñana-Galbis y cols., 2007
18	<i>A. aquariorum</i> ^e	CECT 7289 ^T	MDC 47 ^T ; DSM 18362 ^T	Peces ornamentales	Martínez-Murcia y cols., 2008
19	<i>A. tecta</i>	CECT 7082 ^T	MDC 91 ^T ; DSM 17300 ^T	Heces de niño con diarrea	Demarta y cols., 2008

^a especie tipo del género *Aeromonas* para la que se han descrito tres subespecies (*A. hydrophila* subsp. *hydrophila*; *A. hydrophila* subsp. *dhakensis* y *A. hydrophila* subsp. *ranae*); ^b incluye cinco subespecies (*A. salmonicida* subsp. *salmonicida*; *A. salmonicida* subsp. *achromogenes*; *A. salmonicida* subsp. *masoucida*; *A. salmonicida* subsp. *smithia* y *A. salmonicida* subsp. *pectinolytica*); ^c incluye dos biotipos (*A. veronii* bv sobria y *A. veronii* bv *veronii*); *A. ichtiosmia* es un sinónimo de esta especie; ^d *A. enteropelogenes* es un sinónimo de esta especie. ^eEl nombre de esta especie podría variar en un futuro ya que se ha descrito que es idéntica a *A. hydrophila* subsp. *dhakensis* definida previamente por Huys y cols. (2002).

1.2. Taxonomía del género *Aeromonas*

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. Además, se recomienda la secuenciación de al menos 5 genes *housekeeping* que proporcionen una mayor información/diferenciación filogenética así como determinar la variabilidad intraespecífica con técnicas de tipado moleculares (RAPD, REP-PCR, FAFLP).

Se ha observado en diversos géneros [*Streptomyces*, (Santpierre-Bonaccio y cols., 2004), *Mycobacterium* (Rhodes y cols., 2003) así como en *Aeromonas* (Martínez-Murcia y cols., 1992a; Harayama y Kasai, 2006)] que organismos con valores de similitud del gen ARNr 16S superiores al 97% 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). 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 98-99% (Stackebrandt y Ebers, 2006).

1.2.1. 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; 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 (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, 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., 1999; Ueda y cols., 1999; Moreno y cols., 2002; Coenye y Vandamme, 2003; Marchandin y cols., 2003; Acinas y cols., 2004; Boucher y cols., 2004; Vásquez y cols., 2005). 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). 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), 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).

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), *A. culicicola* (Figueras y cols., 2005), *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^T.

Además de la secuenciación se han descrito otras técnicas moleculares basadas en este gen para la identificación de especies de *Aeromonas*.

Sondas especie-específicas de *Aeromonas*. Existen múltiples estudios para la detección de especies concretas: *A. hydrophila* (Ludwig y cols., 1994; Cascon y cols., 1996; Oakey y cols., 1999), *A. trota* (Khan y cols., 1999), *A. sobria* (Shibata y cols., 1996), *A. caviae* (Wang y cols., 1996) y *A. popoffii* (Demarta y cols., 1999). La limitación de las sondas es que requieren realizar diversas pruebas para cada uno de los aislados (Martínez-Murcia y cols., 1992) y además, pueden generar falsos resultados por la presencia de microheterogeneidades en las regiones de reconocimiento de la sonda. También se han ensayado otros oligonucleótidos concretos para el género *Aeromonas* (Kämpfer y cols., 1996).

Polimorfismo de Longitud de los Fragmentos de Restricción. 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., (2000a) 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 76 ocasiones y existen multitud de publicaciones actuales de diversos autores (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) que utilizan este método de indentificación de especies de *Aeromonas*, lo que indica que, tras casi 10 años desde su publicación, este método sigue siendo válido.

Graf en 1999 publica un estudio en el que supuestamente utiliza el protocolo de Borrell y cols. (1997) para la caracterización de 62 aislados de *Aeromonas* y observa la aparición de más de un patrón para *A. veronii* bv sobria, *A. media* y *A. encheleia*. Este autor supone que dichos patrones son generados por la existencia de microheterogeneidades en el ADNr 16S y que por tanto, el protocolo de RFLP produce identificaciones erróneas. Sin embargo, Graf no sigue fielmente el protocolo de Borrell y cols. (1997), ya que amplifica 600 pb lugar de los 1503 pb del protocolo original y utiliza endonucleasas con dianas diferentes: *AluI*, *CfoI* (GCGC) y *MnII* (CCTC) (Figueras y cols., 2000b).

Tres años después, otros autores (Lee y cols., 2002) publican un protocolo de RFLP del ADNr 16S. Estos autores utilizan cebadores específicos para la amplificación (953 pb) del gen ARNr 16S y las endonucleasas *AluI*, *CfoI*, *PvuII* (CAGCTG) y *XhoII* (RGATCY) en la digestión. Los patrones obtenidos permitían la identificación de todas las especies, excepto la diferenciación de *A. bestiarum* y *A. salmonicida*, y de *A. encheleia* y HG11, especies que si podían ser diferenciadas con el protocolo propuesto por Borrell y cols. (1997) y Figueras y cols. (2000a). Este protocolo de Lee y cols. (2002) ha sido aplicado en nuestro laboratorio para la separación de las especies *A. eucrenophila* y *A. sobria* que presentan un patrón muy similar en base al protocolo de Figueras y cols. (2000a) y permite una separación más fácil de estas especies (datos no publicados). Sin embargo, el protocolo de Lee y cols. (2002) sólo se ha utilizado en un estudio tras su publicación, por lo que los datos obtenidos por estos autores aún no han sido corroborados.

También se ha propuesto un protocolo de RFLP del espaciador intergénico (ISR) del ADNr 16S-23S para la identificación de las especies *A. hydrophila*, *A. salmonicida*, *A. bestiarum*, *A. caviae*, *A. media*, *A. schubertii*, *A. allosaccharophila*, *A. popoffii* y *A. culicicola*, utilizando 4 endonucleasas (Laganowska y Kaznowski, 2004). En el año 2005 se publica un protocolo basado en el RFLP del ADNr 16S para diferenciar *A. jandaei* de *A. culicicola* (Kaznowski y Konecka, 2005). Estos dos trabajos sólo se han citado en una ocasión y no existen otros estudios que lo utilicen y ratifiquen su utilidad con nuevas cepas.

Recientemente, Ghatak y cols. publican en el año 2007 un protocolo para la identificación de las especies clínicas de *Aeromonas*, en el que utilizando 4 endonucleasas los autores aseguran que se obtienen patrones de RFLP más sencillos de identificar que los generados con el protocolo de Borrell y cols. (1997) y Figueras y cols. (2000a). A partir de un amplificado de 1503 pb del gen ARNr 16S pueden diferenciar *A. hydrophila*, *A. caviae*, *A. jandaei* y *A. veronii*. Asimismo, proponen una diferenciación entre las dos biovariedades de *A. veronii* (sobria y veronii) tras la digestión con la endonucleasa *NruI* (TCGCGA).

1.2.2. 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 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; Rosselló-Móra, 2006; Harayama, 2006). Algunos autores han indicado que la propuesta de secuenciar 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, podrían sustituir definitivamente la técnica de DDH en la definición de especie, siempre que los genes seleccionados fueran una muestra representativa del genoma completo (Rosselló-Mora, 2006).

Los resultados de la DDH se expresan como el porcentaje de hibridación (*Relative Binding Ratio*, RBR) y representa el ADN bicatenario (ADNbc) híbrido formado al enfrentar el ADN monocatenario (ADNmc) 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 ADNbc o como el punto medio de la curva de desnaturalización térmica. Este valor es una medida de la estabilidad del ADNbc y está relacionado directamente con la concentración ($[G+C]$) de Guanina y Citosina (Roselló-Móra, 2006). Por tanto, la temperatura de hibridación depende de la $[G+C]$. El incremento de la temperatura de *melting* (ΔT_m) se define como la diferencia entre la T_m del ADN homólogo y la T_m de ADN heterólogo o híbrido. La formamida desestabiliza la formación de ADNbc lo que hace descender la T_m y por tanto la temperatura de hibridación. Se considera que la temperatura óptima de renaturalización (T_{OR}) es aquella que está entre 25°C y 30°C por debajo de la T_m . Se define como temperatura de renaturalización exacta o estricta la que está entre 10°C y 15°C por debajo de la T_m y temperatura de renaturalización no-estricta o laxa la que está entre 30°C y 50°C por debajo de la T_m (Rosselló-Mora, 2006). Dependiendo del método de DDH utilizado, los parámetros que pueden determinarse son el grado de reasociación relativo o RBR y/o el incremento de la temperatura de *melting* (ΔT_m). El punto de corte del RBR en la definición de especie se sitúa en el 70%, cuando la renaturalización se realiza a temperatura óptima o 55% a temperatura o condiciones estrictas. Dos genomas con un RBR superior a

estos valores de 70% o 55%, en función de las condiciones empleadas, se considera que pertenecen a la misma especie. Asimismo, valores de ΔT_m de 0-2°C indican que ambas cepas pertenecen a la misma subespecie, ΔT_m de 3-5°C indican que ambas cepas pertenecen a diferentes subespecies, y $\Delta T_m > 7^\circ\text{C}$ indican que ambas cepas pertenecen a diferentes especies (Grimont, 1988). A mayor temperatura de renaturalización aumenta la especificidad de la reacción, siendo la reasociación más estricta y los valores de similitud entre los dos genomas comparados menor (Rosselló-Mora, 2006; Martin-Carnahan y Joseph, 2005).

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). El método descrito por De Ley y cols. (1970) es un método espectrofotométrico en el que los ADNs se mezclan, son desnaturalizados y su renaturalización se sigue ópticamente con un espectrofotómetro especial. La medida de la reasociación se obtiene midiendo el descenso de la absorbancia del ADN de cadena sencilla (ADNmc) sin requerir marcaje de ningún ADN. La renaturalización del ADN heterólogo se evalúa en función de la reasociación del ADN homólogo. Con este método se obtienen datos tanto del ΔT_m como del RBR. En el método de Ezaki y cols. (1989) el ADN no marcado y desnaturalizado se adhiere covalentemente a los pocillos de una microplaca y en el de Johnson (1981) a un soporte de nitrocelulosa, donde tendrá lugar la hibridación. El ADN de referencia es marcado, con fosfobiotina en el método de Ezaki y con radioisótopos en el de Johnson, y se hibrida con el ADN unido a los pocillos o a la nitrocelulosa. Para descender la temperatura de hibridación y mantener la precisión del proceso se añade a la mezcla formamida, tal y como hemos indicado previamente. Tras la hibridación, el ADNmc se elimina por el tratamiento con el enzima S1. El grado de reasociación o hibridación se revela tras un ensayo ya sea con radioisótopos (Johnson, 1981), fluorométrico o colorimétrico (Ezaki y cols., 1989) pudiéndose determinar en ambos casos tanto el RBR como el ΔT_m . En el método de Ziemke y cols. (1998), el ADN de referencia es marcado con digoxigenina y biotina mientras que en el método de Brenner y cols. (1969) era marcado con radioisótopos. En ambos casos la hibridación tiene lugar en un medio líquido que contiene tampón fosfato (0.28 M), sin la presencia de formamida. La separación del ADNmc y ADNbc se realiza en una matriz de hidroxapatita. El grado de reasociación o hibridación se revela tras un ensayo inmuno-enzimático en el método de Ziemke y cols. (1998), teniendo en cuenta tanto el ADNmc como el ADNbc, y se obtienen valores del RBR pero no del ΔT_m . Por tanto, 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 ADNmc y ADNbc [por unión

específica diferencial de los mismos con hidroxapatita (Brenner y cols., 1969; Ziemke y cols., 1998) o bien porque el ADNmc se degrade mediante el uso de la endonucleasa S1 (Ezaki y cols., 1989)].

1.2.2.1. 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 (T_{OR}) que se calcula a partir de la T_m 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. Existen bastantes discrepancias en la literatura respecto a estas temperaturas, dependiendo de la fórmula y métodos empleados para su cálculo. Así, en el método de De Ley (1970) la T_{OR} se determina teniendo en cuenta sólo el %G+C:

$$\%G+C = \mathbf{a}, 57; \mathbf{b}, 63; \mathbf{c}, 60$$

$$T_{OR} = 0.51 \times (\%G+C) + 47$$

A partir de esta fórmula y del %G+C, la T_{OR} para *Aeromonas* oscila entre 76°C (**a**) y 79.13°C (**b**) con un valor medio de 77.6°C (**c**). Sin embargo, utilizando el método de Ziemke y cols. (1998) y (Urdiain y cols., 2008) y las fórmulas:

$$T_m = (\%G+C + 182.2)/2.44$$

$$T_{OR} = T_m - 30^\circ\text{C} \text{ o } T_m - 25^\circ\text{C}$$

se obtienen valores de T_{OR} que oscilan entre $T_{OR} = T_m - 30^\circ\text{C} = 68$ (**a**), 73°C (**b**) y 69.3 (**c**) o $T_{OR} = T_m - 25^\circ\text{C} = 70$ (**a**), 75°C (**b**) y 74.3°C (**c**), respectivamente.

Tal y como hemos comentado previamente, en el método de Ezaki y cols. (1989) se utiliza formamida con el fin de descender la temperatura de hibridación y mantener las condiciones de renaturalización óptimas. La formamida, como se ha mencionado, desestabiliza la formación de ADNbc, de hecho la T_m descende 0.6°C por cada porcentaje de formamida (% v/v) añadido a la mezcla de hibridación (Johnson, 1981). Un 30% de formamida en la mezcla reduce la T_m en 18°C y en 30°C cuando la concentración de formamida es del 50%. Partiendo de un valor medio de G+C del 60%

y en función de la concentración de formamida, las temperaturas óptimas de renaturalización esperadas serán $T_{OR(30\% \text{ formamida})} = [T_m - 30^\circ\text{C} - 18 = 51.3^\circ\text{C}]$ o $[T_m - 25^\circ\text{C} - 18 = 56.3^\circ\text{C}]$ y $T_{OR(50\% \text{ formamida})} = [T_m - 30^\circ\text{C} - 30 = 39.3^\circ\text{C}]$ o $[T_m - 25^\circ\text{C} - 30 = 44.3^\circ\text{C}]$.

Heterogeneidad de resultados de DDH en *Aeromonas*

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). Estas diferencias vienen dadas tanto por la utilización de métodos diferentes como por las distintas temperaturas de hibridación utilizadas en los ensayos.

Un ejemplo lo encontramos entorno a *A. allosaccharophila*, especie definida por Martínez-Murcia y cols. (1992b) en base a 3 cepas (la cepa tipo, CECT4119^T, un duplicado de la misma y la cepa ATCC35942) en cuya descripción no se realizaron experimentos de DDH pero que fueron publicados posteriormente (Esteve y cols., 1995b). Así, la independencia de esta especie fue confirmada a partir de un estudio de DDH (**Tabla 2**) de Esteve y cols. (1995b) donde la renaturalización se realizó a 54°C con el método de Johnson (1981) entre el genoma de *A. allosaccharophila* y el del resto de especies definidas hasta la época. Llama la atención que estos autores obtuvieron valores de similitud del 0% con *A. veronii*, la especie más cercana en base al gen ARNr 16S.

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

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

En el año 2001, Huys y cols. proponen que *A. allosaccharophila* debería ser considerada sinónimo de la especie *A. veronii* en base a los resultados de DDH del 78-82% obtenidos entre las cepas tipo de estas especies con el método de Ezaki y cols. (1989) a 45°C. Sin embargo, cabe destacar que en este estudio se obtienen valores de DDH entre las cepas tipo de *A. veronii* y *A. hydrophila* del 65% con un 5% de desviación estándar, frente al 60% (± 1.5) reportado por Nhung y cols. (2007), cuando en realidad estas dos especies están relativamente alejadas en base al gen ARNr 16S. Recientemente un estudio (Nhung y cols., 2007) reevalúa la taxonomía actual de *Aeromonas*

utilizando técnicas de DDH (el mismo método y temperatura de hibridación que la utilizada por Huys y cols., 2001) y un análisis filogenético del género utilizando las secuencias del gen *dnaJ*. Los valores obtenidos por este autor, 82-86% de similitud entre *A. veronii* y *A. allosaccharophila*, apoyan la propuesta de Huys y cols. (2001) de considerar sinónimos las especies *A. veronii* y *A. allosaccharophila*. Posteriormente, este problema fue abordado de nuevo en el estudio publicado por Saavedra y cols. (2007) que incluía 4 nuevos aislamientos de *A. allosaccharophila* y un análisis más extenso de la especie. Sus resultados demostraban la existencia de diferencias fenotípicas y filogenéticas, en base a los genes *gyrB* y ARNr 16S, entre *A. allosaccharophila* y *A. veronii* y contradecían los resultados publicados por Huys y cols. (2001).

De los valores de reasociación obtenidos por Nhung y cols. (2007) destacan también los obtenidos entre *A. bestiarum*, *A. salmonicida* y *A. popoffii*, todas ellas pertenecientes al complejo fenotípico “*Aeromonas hydrophila*”, ya que presentan diferencias con los obtenidos en estudios anteriores (Tabla 3). Un estudio previo de Huys y cols. (1997a), donde se describe la especie *A. popoffii*, indica valores de similitud de *A. popoffii* con el resto de especies del complejo por debajo del 63%, con una temperatura de renaturalización de 76.9°C. La especie más similar, con un 53 (cepa tipo)-63%, fue *A. bestiarum* (Huys y cols., 1997a). Sin embargo, Nhung y cols. (2007) obtienen valores del 76% de similitud entre estas dos especies. A pesar del alto grado de similitud observado por estos autores entre *A. bestiarum* y *A. popoffii*, estas especies presentan suficientes diferencias fenotípicas y filogenéticas que hacen que nadie se haya cuestionado hasta la fecha que pueda tratarse de la misma especie. Contrariamente, se ha sugerido que *A. salmonicida* y *A. bestiarum* podrían representar una única especie (Martínez-Murcia y cols., 2005; Nhung y cols., 2007).

Tabla 3. Valores, condiciones y métodos de DHH entre las cepas tipo de *A. bestiarum*, *A. salmonicida* y *A. popoffii* descritos en la literatura.

Condiciones y valores de DDH (%) en distintos estudios			
Parámetros	Huys y cols., 1997a	Martínez-Murcia y cols., 2005	Nhung y cols., 2007
	1-2	ND	75.6
ADN-ADN (%)	1-3	53	ND
	2-3	39	ND
Temperatura °C	76.9	66	45
Formamida %	-	-	50
Método	Ezaki y cols., 1989	De Ley y cols., 1970	De Ley y cols., 1970

1. *A. bestiarum* CECT4227^T, 2. *A. salmonicida* CECT894^T, 3. *A. popoffii* CECT5176^T; ND No determinado.

Los altos valores de similitud por DDH (71%) obtenidos entre *A. bestiarum* y *A. salmonicida*, aunque no con la cepa tipo, ya indicaban un único taxón pero aún así, se consideraron dos especies

independientes (Ali y cols., 1996). Estudios posteriores (Martínez-Murcia y cols., 2005; Nhung y cols., 2007) obtienen valores de reasociación que apoyan los obtenidos por Ali y cols. (1996). Además, las secuencias del gen ARNr 16S de *A. bestiarum* y *A. salmonicida* presentan una similitud del 99.8 al 100% (Martínez-Murcia y cols., 1992; Martínez-Murcia y cols., 2005) y presentan sólo 2 nucleótidos distintos entre sus cepas tipos en las posiciones 1011 y 1018 (en referencia a la secuencia de *E. coli* de Brosius, 1978), mientras que las subespecies *A. salmonicida* subsp. *achromogenes* y *A. salmonicida* subsp. *masoucida* presentan la misma secuencia del ADNr 16S que *A. bestiarum*. Esta diferencia entre las secuencias no siempre puede ponerse de manifiesto ya que se ha observado que ambas especies comparten operones ribosómicos (Martínez-Murcia y cols., 2005; Reith y cols., 2008). Sin embargo, la utilización de genes estructurales, concretamente el *rpoD* y *gyrB*, permitieron la separación clara de estas dos especies (Yáñez y cols., 2003; Soler y cols., 2004). En lo referente a sus perfiles bioquímicos se ha comprobado que pruebas que se creían específicas y absolutas para la separación de estas dos especies son variables y que por tanto, *A. salmonicida* y *A. bestiarum* son difícilmente diferenciables bioquímicamente (Martínez-Murcia y cols., 2005).

Otra especie conflictiva es *A. encheleia*, descrita por Esteve y cols. (1995c) con valores de similitud con el resto de especies de *Aeromonas* por debajo del 70%, utilizado el método descrito por Johnson (1981) con una temperatura de renaturalización de 56°C (**Tabla 4**).

Tabla 4. Valores, condiciones y métodos de DDH entre las cepas tipo de *A. encheleia*, *A. eucrenophila* y Grupo de Hibridación 11 descritos en la literatura.

Condiciones y valores de DDH (%) en distintos estudios				
Parámetros		Esteve y cols., 1995c	Huys y cols., 1997b	Nhung y cols., 2007
	1-2	7	46	66.5
ADN-ADN (%)	1-3	12	84	83.5
	2-3	ND	52	62.5
Temperatura °C		56	78.3	45
Formamida %		30	-	50
Método		Johnson , 1981	De Ley y cols., 1970	Ezaki y cols., 1989

1. *A. encheleia* CECT4342¹; 2. *A. eucrenophila* CECT4224¹; 3. Grupo de Hibridación 11 CECT4253; ND No determinado

La especie más similar a *A. encheleia*, con un 49%, fue *A. salmonicida* mientras que con *A. eucrenophila* y el GH11 mostraba una similitud de 7 y 12% respectivamente. Un estudio publicado 2 años después (Huys y cols. 1997b) muestra valores de similitud entre *A. encheleia* y *A. eucrenophila* y *A. encheleia* y el GH11 de 46% y 84% respectivamente, utilizando el método de De Ley y cols. (1970) con una temperatura de renaturalización de 78.3°C. Cabe destacar que en este estudio cepas de *A. encheleia* mostraban un grado de similitud superior al 100%. Este alto valor de similitud obtenido por

Huys y cols. entre *A. encheleia* y el GH11 (Huys y cols. 1997b) dio lugar a la propuesta de considerar el GH11 como un sinónimo de *A. encheleia*. Esta propuesta se ve apoyada por los valores del 83.5% de similitud entre estas dos especies obtenido por Nhung (Nhung y cols., 2007) con el método de Ezaki (Ezaki y cols., 1989) a una temperatura de reasociación de 45°C. Los datos aportados por la DDH junto con los aportados por los diversos estudios filogenéticos de los genes *gyrB*, *rpoD*, *rpoB*, *dnaJ*, *recA* y *cpn60* (Yáñez y cols., 2003; Soler y cols., 2004; Küpfer y cols., 2006; Nhung y cols., 2007; Sepe y cols., 2008; Miñana-Galvis y cols., en prensa) indican que *A. encheleia* y GH11 representan un único taxón.

Cabe destacar también el caso de *A. hydrophila* subsp. *dhakensis*, descrita por Huys y cols. en el año 2002 en base a cepas aisladas de heces de pacientes con diarrea en Bangladesh y clasificadas en base a su perfil bioquímico de PhP (PhenePlate [PhP] types) como grupo BD-2 (Kühn y cols., 1997). Tanto el análisis bioquímico (152 pruebas) como los análisis de los perfiles de FAFLP y ERIC-PCR muestran que el grupo BD-2 era fenotípica y genómicamente diferente de *A. hydrophila* (GH1), sin embargo, los resultados de DDH mostraban un alta similitud (77%) del grupo BD-2 con la cepa tipo de *A. hydrophila*, por lo que estas cepas se definieron como una nueva subespecie de *A. hydrophila*. El método de DDH empleado fue el de Ezaki y cols. (1989) a una temperatura de renaturalización de 45°C (50% formamida). A parte de los valores de similitud del 77-78% del grupo BD-2 con *A. hydrophila*, ya mencionados, obtienen valores del 33-65% con el resto de especies del género y 77-84% entre cepas de este grupo (Huys y cols., 2002). Los estudios recientes que han incluido cepas de esta subespecie en sus análisis filogenéticos con los genes ARNr 16S, *rpoB*, *gyrB*, (Küpfer y cols., 2006), *dnaJ* (Nhung y cols., 2007) y *cpn60* (Miñana-Galvis y cols., en prensa) revelan grandes diferencias con el resto de las subespecies de *A. hydrophila*. Estos autores interpretan dichas diferencias como variabilidad intraespecífica.

En conclusión se puede decir que existe una elevada variabilidad de resultados de DDH en *Aeromonas* en función de la temperatura y métodos utilizados en la literatura, lo que unido al alto grado de similitud interespecie en base al ADNr 16S y al solapamiento de los perfiles bioquímicos de las distintas especies, dificulta en gran medida su separación.

1.2.3. Genes que codifican proteínas esenciales: *Housekeeping*

Los genes *housekeeping* son genes que codifican proteínas con funciones esenciales para la supervivencia de la bacteria. 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 (EF-G) y girasa (*gyr*) entre otros (Harayama Kasai, 2006).

En el género *Aeromonas* se han evaluado hasta la fecha 6 genes *housekeeping*: *gyrB*, *rpoD*, *rpoB*, *recA*, *dnaJ* y *cpn60* (Yáñez y cols., 2003; Soler y cols., 2004; Kúpfer y cols., 2006; Nhung y cols., 2007; Sepe y cols., 2008; Miñana-Galbis y cols., en prensa).

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*. Este gen codifica para la subunidad B de la girasa del ADN, topoisomerasa tipo II compuesta por dos subunidades codificadas por los genes *gyrA* y *gyrB*. Esta topoisomerasa actúa durante la replicación del ADN liberando las tensiones del súper-enrollamiento de las hebras efectuando cortes en las 2 cadenas. En el estudio de Yáñez y cols. (2003) se secuenciaron 1100 nucleótidos del gen de 53 cepas comprobándose que el 32% de las posiciones secuenciadas eran variables, los valores medios de similitud máxima interespecie y mínimos intraespecie eran inferiores al 97% y superiores al 98% respectivamente. El valor de similitud dentro del género mínimo del gen *gyrB* fue del 86% y con los géneros más cercanos inferior al 77% (Yáñez y cols., 2003). No obstante, en base a este gen no se pudieron diferenciar *A. encheleia* del GH11.

La taxonomía de *Aeromonas* en base al gen *rpoD* se publicó un año después, en el 2004 por Soler y cols. El gen *rpoD* codifica para la subunidad o factor sigma de la RNA polimerasa que interacciona con secuencias del promotor para determinar el sitio de inicio de la transcripción. En el trabajo de Soler y cols. (2004) se secuenciaron unos 820 nucleótidos del gen en 70 cepas observándose que el 34% de las posiciones eran variables, un valor muy similar al observado en el estudio del gen *gyrB* (Soler y cols., 2004). Los valores medios de similitud máximos interespecie y mínimos intraespecie fueron inferiores al 97% y superiores al 98% respectivamente, con un valor de similitud intragénero mínimo del 82% (Soler y cols., 2004). En base a este gen no se pudo diferenciar *A. encheleia* del GH11 pero se diferenciaban claramente *A. salmonicida* de *A. bestiarum*. En este estudio se utilizaron las mismas cepas que en el estudio del gen *gyrB* (Yáñez y cols., 2003) y se observaron topologías congruentes entre ambos árboles filogenéticos. La concatenación de las secuencias de ambos genes permitió obtener un árbol filogenético más robusto que los árboles individuales (Soler y cols., 2004).

El tercer estudio de genes *housekeeping* en *Aeromonas* fue el publicado por Kúpfer y cols. en el año 2006 en base al gen *rpoB* que codifica para la subunidad B de la polimerasa del ARN. Se

secuenciaron un total de 558 nucleótidos del gen de 54 cepas. Los valores de similitud interespecie obtenidos variaban entre el 87-94% pero no se pudieron diferenciar las especies *A. bestiarum* de *A. salmonicida* ni *A. encheleia* del GH11. En este estudio, al igual que en el de Soler y cols. (2004) se compara la topología del árbol construido, con las secuencias del gen *rpoB*, con el generado en base al *gyrB* encontrando resultados congruentes entre los dos árboles aunque, a diferencia del trabajo anterior, no llega a sumarse la información de ambos genes. Estudios recientes han demostrado, al analizar diversos géneros bacterianos, que existe una correlación entre los valores de similitud interespecie inferiores al 98% del gen *rpoB* completo con los valores de similitud de DDH inferiores al 70% proponiéndose que podría utilizarse la secuencia de dicho gen para la delimitación de especies procariotas (Adekambi y cols., 2008).

Otro de los genes investigado en *Aeromonas* es el *dnaJ*, aunque en este estudio sólo se incluyeron las cepas tipo de las distintas especies y las subespecies de *A. salmonicida* y *A. hydrophila*, se realiza conjuntamente un análisis de DDH entre las mismas (Nhung y cols., 2007). El gen *dnaJ* codifica la proteína de choque térmico 40 que actúa como una cohorte funcional de la proteína DnaK (Caplan y cols., 1993). En el estudio de Nhung y cols. (2007) se secuenciaron unos 891 nucleótidos obteniendo unos valores medios de similitud interespecie inferiores al 94.8% aunque estos valores, tal y como hemos indicado, se derivaron de comparar sólo las cepas tipo. Los valores de similitud intraespecie fueron superiores al 96.7% al comprar sólo las subespecies. El valor de similitud medio dentro del género fue del 89.2%. En base al gen *dnaJ* no se pudieron diferenciar *A. encheleia* del GH11 ni *A. allosaccharophila* de *A. veronii*.

Entre las publicaciones más recientes de genes *housekeeping* y aplicado a la taxonomía de *Aeromonas* se encuentra el *recA*, publicado por Sepe y cols. (2008), del mismo grupo de investigación que estudió el *rpoB* (Küpker y cols., 2007). El gen *recA* codifica para una proteína multifuncional implicada en la recombinación homóloga, la reparación de ADN y la respuesta SOS, concretamente se une específicamente a regiones de ADNmc, relaja los dúplex de ADN, y reconoce regiones de los cromosomas homólogos en el proceso de recombinación (Thompson y cols., 2004). En el trabajo de Sepe y cols. (2008) se secuenciaron sólo 272 pb del gen de 54 cepas [las mismas del estudio del *rpoB* de Küpfer y cols. (2006)] obteniéndose un valor de similitud interespecie medio del 92.2%. La clasificación generada en base a este gen coincide en el 85% de las cepas con la establecida en base al *gyrB* y *rpoB* en el estudio de Küpfer y cols. (2006), sin embargo, el resto de cepas se agrupan con especies diferentes (Sepe y cols., 2008). En base al gen *recA* no se pudo diferenciar *A. encheleia* del GH11.

El último gen estudiado en la discriminación de especies de *Aeromonas*, cuya publicación aún esta en prensa, es el gen *cpn60* (Miñana-Galbis y cols., en prensa). Este gen ha demostrado una buena capacidad en la separación de las especies del género pero, en algunos casos, con una escasa variabilidad intraespecie puesto que varias cepas, dentro de diversas especies, mostraron una secuencia idéntica, en especial dos cepas de *A. popoffii* (LMG17542 y LMG17543) reconocidas como diferentes

en varios estudios (Soler y cols., 2003; 2004). Este gen codifica la chaperona tipo I Cpn60 (Hsp60 o GroEl). La región secuenciada por estos autores (555 pb) se había demostrado previamente que era filogenéticamente representativa de la información contenida en el gen completo (Miñana-Galbis y cols., en prensa). La secuenciación de 35 cepas mostró que el 34.1% de las posiciones eran variables, proporción similar a la observada en los genes *gyrB* y *rpoD* (Soler y cols., 2004), con valores de similitud intraespecie superiores al 96.5% e interespecie entre el 96.3-83.1%, con un valor dentro del género mínimo del 76.7%. En base a este gen no se pudo diferenciar el GH11 de *A. encheleia* y *A. allosaccharophila* y *A. veronii* pueden diferenciarse, aunque existe un alto valor interespecie (96.3-95.5%), mientras que *A. salmonicida* y *A. bestiarum* pueden diferenciarse claramente presentando *A. salmonicida* una baja variabilidad intraespecífica (0-1.5%).

Hasta la fecha, tal y como se ha mencionado previamente, no se ha podido diferenciar filogenéticamente *A. encheleia* del considerado GH11, lo que confirma la propuesta de Huys y cols. (1997b), en base a la alta similitud de la DDH, de considerar el GH11 como un sinónimo de *A. encheleia*.

1.2.4. Estudio fenotípico

En este apartado se incluyen las características morfológicas, fisiológicas y bioquímicas. En la morfología se estudian tanto parámetros celulares: forma, presencia de flagelos, de cuerpos de inclusión, de endoesporas o la 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.

1.2.4.1. 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 positiva (Altwegg, 1999).

1.2.4.2. 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*” (Namdari y Bottone, 1990; Piersimoni y cols., 1990; Wilcox y cols., 1992), 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). De todos estos estudios se dedujo que el 85% de las cepas que se caracterizan a partir de muestras clínicas correspondían a las especies *A. hydrophila*, *A. caviae* y *A. veronii* bv sobria. De los trabajos taxonómicos que incluyen de forma mayoritaria cepas de origen ambiental (Austin y cols., 1989; Okpolwasili, 1991; Martínez-Murcia y cols., 1992; Esteve, 1995a; Noterdaeme y cols., 1996; Kaznowski, 1998; Borrell y cols., 1998; Renauld y cols., 1998), se demostró una mayor diversidad de especies, aisladas de muestras ambientales, que la observada a partir de muestras clínicas. El estudio de Miñana-Galbis y cols. (2002) incluye 202 aislados de *Aeromonas*, 101 de agua dulce, 88 de moluscos bivalvos y 13 de origen clínico, que analizan en base a 64 pruebas bioquímicas y pudiendo identificar el 91% de los aislados con sólo 16 pruebas (Miñana-Galbis y cols., 2002).

De los estudios recientes el 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 163 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, eritol 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 el año 2005 se publica el trabajo de Ormen y cols. que evalúan la concordancia entre identificación molecular, en base al RFLP del ADNr 16S (Borrell y cols., 1997; Figueras y cols., 2000a) y la identificación bioquímica, en base a 19 pruebas, en 171 cepas: 95 clínicas y 72 ambientales junto con 4 cepas de referencia. En este estudio se demuestra que las cepas de origen ambiental presentan un 96% de resultados divergentes frente al 46% observado en cepas clínicas. Estas últimas estaban constituídas principalmente (81%) por *A. caviae*, *A. jandaei*, *A. hydrophila* y *A. veronii*. Otro estudio más reciente (Kozinska, 2007) identifica con este mismo protocolo de RFLP del ADNr 16S (Borrell y cols., 1997; Figueras y cols., 2000a) 131 aislados de carpa y trucha, conjuntamente con 20 pruebas bioquímicas y observa que existe una gran diversidad fenotípica intraespecífica en las 9 especies que aísla y que además 9 cepas (el 7% de los aislados) sólo podían identificarse por el método molecular.

1.2.4.3. 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 la concordancia resultó ser muy baja (Borrell, 1998). 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), en especial con las especies *V. cholerae* y *V. fluvialis* (Soler y cols., 2003).

1.2.5. Técnicas de tipado molecular

Las técnicas de tipado se pueden clasificar en función de su diana:

1. el genoma completo: PFGE, RAPD-PCR, AFLP, REP-PCR, ERIC-PCR, BOX-PCR
2. grupos de genes: tipado de operones ribosómicos o ribotipado
3. parte de las agrupaciones de genes: Espaciador intergénico (ITS) del ADNr 16S-23S
4. genes individuales: RFLP del ADNr 16S, T-RFLP, DDGE, TGGE.

1. Genoma completo. Debido a la dificultad para identificar bioquímicamente a las especies de *Aeromonas*, la mayoría de métodos de tipado empleados en este género han sido valorados también como métodos taxonómicos. Talon y cols. en 1996 realizan un estudio de tipado por PFGE comparando las endonucleasas *XbaI*, *SpeI*, *SwaI* y *DraI*; observan que los patrones generados eran congruentes y estables excepto con el enzima *DraI*. Dos años más tarde, este mismo grupo evalúa por el método de RAPD y PFGE, 25 cepas de *A. hydrophila* de origen clínico y ambiental (Talon y cols., 1998), el RAPD se realizan con los cebadores AP3 y AP5 y utilizan la endonucleasa *XbaI* para el PFGE. Los resultados que obtuvieron eran concordantes entre las dos técnicas cuando se utilizaban los cebadores AP3 en el RAPD. Hänninen y cols. (1999) estudian la diversidad genética de 105 *A. salmonicida* atípicas de distintas localizaciones geográficas mediante PFGE, utilizando el enzima *XbaI* y el método de ribotipado. De las 105 cepas observan 31 genotipos por PFGE, muy similar a lo observado con ribotipado pero siendo el primero más discriminatorio a nivel de cepa.

En *Aeromonas* el RAPD se ha utilizado en diversos estudios obteniéndose en la mayoría de los casos resultados congruentes con los observados con otras técnicas moleculares de tipado con los cebadores AP12H-HLW74 (Davin-Regli y cols., 1998; Alavandi y cols., 2001). Recientemente Korbsrisate y cols. (2007) han determinado la diversidad genética en 110 cepas de *A. hydrophila* de

origen clínico y ambiental mediante RAPD destacando un patrón que sólo se asocia con cepas ambientales.

O'hici y cols. (2000) tipan 59 cepas de *A. salmonicida* mediante PFGE, con el enzima *SpeI*, y RAPD, con los cebadores H1,H2 y H3, obteniendo resultados concordantes. Villiari y cols. (2000) realizan un estudio de prevalencia de *Aeromonas* en comida precocinada y destacan que *A. hydrophila* predomina en alimentos de origen animal mientras que en los de origen vegetal es *A. caviae*, además observan una gran heterogeneidad en los aislados mediante PFGE (de 27 cepas de *A. hydrophila* detectan 24 genotipos diferentes y 20 entre las 23 cepas de *A. caviae*).

Girand y cols. (2004) estudian, mediante la técnica PFGE con el enzima de restricción *SpeI*, la relación clonal entre aislados de *A. salmonicida* resistentes a las quinolonas y determinan la existencia de un origen común entre los aislados resistentes. Abdullah y cols., (2003) tipan 52 cepas de origen animal, humano y ambiental mediante la misma técnica pero con el enzima *XbaI* observando una buena correlación con el RFLP del gen *aroA* (codifica para el enzima 5-enolpiruvilsiquimato-3-fosfato sintasa, necesaria para la síntesis de aminoácidos aromáticos y cuya función es esencial para la supervivencia de la bacteria), siendo el segundo el más discriminatorio. Bonnadonna y cols. en el 2002 observan una baja correlación con el tipado bioquímico, siendo la técnica molecular, PFGE, la más discriminatoria y observándose gran homogeneidad fenotípica entre los aislados clínicos.

La utilidad del AFLP y FAFLP, con las endonucleasas *ApaI* y *TaqI*, con fines taxonómicos en *Aeromonas* se evaluó en 1996 y 1999 por Huys y cols. incluyendo en ambos estudios 98 cepas tipo y de referencia. Los resultados que obtuvieron eran congruentes con la taxonomía de *Aeromonas*. Estos trabajos ha sido referenciados en numerosas ocasiones y empleadas las técnicas tanto con fines taxonómicos en la identificación de aislados (Khund y cols., 1997), en la descripción de especies y subespecies (Huys y cols., 1997a, 2002a, 2003; Demarta y cols., 2004, 2007; Miñana-Galbis y cols., 2004, 2007), en reclasificaciones (Huys y cols., 2001) así como en estudios de diversidad genética (Khund y cols., 1997a, b; Ringo y cols., 2002; Lund y cols., 2002; Rahman y cols, 2002, 2007).

El único estudio que existe hasta la fecha de tipado de *Aeromonas* en base a BOX-PCR es el realizado por Tacao y cols. (2005a) con los cebadores A1R. En este estudio se tipan 42 cepas de *Aeromonas*, identificadas genéticamente en base al RFLP del ADNr 16S (Borrell y cols., 1997; Figueras y cols., 2000a). Los perfiles genotípicos estaban formados por entre 4-16 bandas de 300 a 4500 pb. Se estableció que esta técnica era útil para el tipado a nivel de cepa pero no de especie. Existen, sin embargo, múltiples estudios en los que se han utilizado las técnicas del REP- y/o ERIC-PCR solas o en combinación con otras técnicas de tipado en *Aeromonas* (Nocáková y cols., 2009; Beaz-Hidalgo y cols., 2008; Aguilera-Arreola y cols., 2005; Szczuka y Kaznowski, 2004; Huys y cols., 2003; Soler y cols., 2003; Sechi y cols., 2002; Huys y cols., 2002; Davin-Regli y cols., 1998). 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 (Davin-Regli y cols., 1998). Sechi y cols., (2002) caracterizan 46 cepas de origen ambiental y clínico de Italia también mediante el ERIC-PCR. El estudio comparativo de Soler y cols., (2003) en 26 aislados de *A. popoffii* de diferentes orígenes geográficos mostró que el ERIC-PCR era más discriminatorio que el REP-PCR y 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. En los estudios de Huys y cols. (2002, 2003) se observa una buena correlación entre el ERIC-PCR y F-AFLP. Szczuka y Kaznowski en el 2004 tipan mediante ERIC-, REP-PCR y RAPD 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. Recientemente, estudios publicados en el año 2008 muestran que el ERIC-PCR podría ser útil para el tipado a nivel de especie (Nováková y cols., 2008) y subespecie (Beaz-Hidalgo y cols., 2008).

2. El ribotipado de operones ha sido utilizado con fines taxonómicos en el género *Aeromonas* (Martinetti Lucchini y Altwegg, 1992; Demarta y cols., 2004) aunque principalmente se ha evaluado con fines epidemiológicos (Demarta y cols., 2000). Sin embargo, se ha demostrado que el AFLP presenta un mayor poder discriminatorio que el ribotipado ya que cepas que presentaba patrones de ribotipado idénticos poseían perfiles de AFLP distintos (Demarta y cols., 2004).

3. En *Aeromonas*, concretamente en *A. hydrophila*, se ha descrito que la longitud del espaciador intergénico 16S-23S oscila entre 472 y 544 pb (Gürtler y Stanisich, 1996). El estudio de RFLP del 16S-23S ISR, como técnica de tipado, fue evaluada en 55 *A. veronii* de origen clínico y ambiental, demostrándose que dicha técnica produce patrones cepa específicos y permite reconocer cepas derivadas de un mismo clon en un sistema de distribución de agua potable (Martínez-Murcia y cols., 2000). En este mismo estudio se reconoció su utilidad en el marcaje epidemiológico al detectarse la persistencia de un único microorganismo, al menos durante una semana, en un paciente del que se pudo aislar de dos coprocultivos distintos. En el año 2003, Pidiyar y cols., secuencian el ISR del 16S-23S y el gen ARNr 23S de la cepa tipo de *A. culicicola*, en la actualidad sinónimo de *A. veronii* (Huys y cols., 2005) revelando la existencia de 10 operones ribosomales. Ese mismo año Lawanowska y Kaznowski publican un trabajo en el que analizan 69 *Aeromonas* sp. pertenecientes a los 18 Grupos de Hibridación mediante RFLP del ISR 16S-23S. Obtienen genotipos constituidos por 2-8 bandas comprendidas entre los 730 pb y los 1050 pb, pero parte de las bandas eran debidas a la existencia de heteroduplex. Aunque fueron capaces de detectar variabilidad inter- e intraespecífica, la resolución de

la técnica no permitió el agrupamiento de los genotipos a nivel de especie. Estos mismos autores, un año después (Lawanowska y Kaznowski, 2004) aumentan el número de endonucleasas utilizadas en el protocolo con: *Hind6I*, *Csp6I*, *TaqI* y *TasI*. La combinación de los distintos patrones les permitió diferenciar algunas genoespecies constituyendo grupos separados, *A. hydrophila*, *A. bestiarum* y *A. salmonicida* del denominado “Complejo *Hydrophila*” e incluso distinguir algunas subespecies de *A. salmonicida*. En el año 2005, Martínez-Murcia y cols., publican un estudio de *A. bestiarum* y *A. salmonicida* basado en varias técnicas moleculares y bioquímicas. En el análisis de RFLP del ISR 16S-23S realizaron digestiones dobles con *HinfI-CfoI* y *HinfI-TaqI* y observaron que el dendograma construido al integrar los genotipos, generados por ambas digestiones, no permitía separar *A. salmonicida* y *A. bestiarum* pero que separaba claramente *A. hydrophila* y *A. popoffii*.

4. Genes individuales. En *Aeromonas* la técnica basada en el RFLP del gen ARNr 16S, tal y como se ha comentado previamente, ha sido ampliamente utilizada con fines taxonómicos y existen multitud de protocolos para la identificación de *Aeromonas* (Borrell y cols., 1997; Graf 1999; Figueras y cols., 2000a; Lee y cols., 2002; Kaznowski y Konecka, 2005; Ghatak y cols., 2007).

En *Aeromonas* la DGGE se ha utilizado en el gen *gyrB*, amplificado con cebadores específicos de género, comprobando que las cepas que mostraban idénticas bandas eran a su vez idénticas en su secuencia (Tacao y cols., 2005b). En este estudio se pudo además comprobar la existencia de variabilidad intragenómica en el gen ARNr 16S ya que a partir de un único aislado se obtuvieron múltiples bandas cuando el amplicon de 200 pb de la RV3 se sometía a un análisis de DGGE.

1.3. Epidemiología del género *Aeromonas*

1.3.1. Ecología

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, forunculosis y septicemias, produciendo grandes pérdidas en la acuicultura (Pylkkö y cols., 2005, 2006; Treasurer y cols., 2007; Reith y cols., 2008). 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 (Saif y Bush, 1974), 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. *A. caviae* se ha aislado del tracto digestivo de moscas comunes (Nayduch y cols., 2001) mientras que la especie *A. culicicola* (en la actualidad sinónima de *A. veronii*) se aisló del intestino de mosquitos hembra de las especies *Culex quinquefasciatus* y *Aedes aegyptii* (Pidiyar y cols., 2002). Recientemente se han propuesto las masas de huevos de dípteros acuáticos como un reservorio de *Aeromonas* (Senderovich y cols., 2008).

La utilización de sanguijuelas con fines medicinales es, en numerosos casos, seguida de una infección por *Aeromonas* (Kalbermatten y cols., 2007; Etemadi y cols., 2008; Fraisse y cols., 2008). De hecho, se ha reconocido la existencia de una relación simbiótica entre las sanguijuelas y *Aeromonas*, 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 (Gaf, 1999; Siddall y cols., 2007; Laufer y cols., 2008).

Agua

Las *Aeromonas* son organismos autóctonos del medio acuático. Se han aislado de aguas superficiales, subterráneas, aguas de consumo, embotelladas, residuales, de regadío así como en aguas marinas y de estuarios (Borrell y cols., 1998; Martínez-Murcia y cols., 2000; Maalej y cols., 2002, 2003; Bonadonna y cols., 2003; Villari y cols., 2003; Pianetti y cols., 2004; Figueras y cols., 2005). En las aguas de consumo se han detectado niveles inferiores a las 10UFC/ml, su resistencia a la cloración se relaciona con la formación de biofilms, mientras que en las aguas embotelladas se han detectado concentraciones superiores a 3 log₁₀ UFC/ml (EPA, 2006). 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*. Las aguas de regadío que contienen *Aeromonas* se consideran a su vez la primera fuente de contaminación de frutas y vegetales (Pianetti y cols., 2004).

Alimentos

Las *Aeromonas* se han aislado tanto de frutas, verduras, productos lácteos, carnes y embutidos, pescados y marisco (Borrell y cols., 1998; Villari y cols., 2002) siendo estos alimentos junto con el agua contaminada la principal fuente de contaminación de *Aeromonas* en los procesos diarreicos. La temperatura, salinidad, pH, y concentración de agua son los factores que determinan el número de *Aeromonas* en estos alimentos (Maton-Carnahan y Joseph, 2005).

1.3.2. Infecciones por *Aeromonas* en humanos

Las *Aeromonas* son consideradas, actualmente, como un patógeno oportunista emergente habiéndose asilado como agente etiológico en diversos procesos infecciosos como septicemias, enfermedades pancreáticas o hepatobiliares, peritonitis, colangitis, infecciones nosocomiales, osteomielitis y como agente causal del síndrome urémico hemolítico (SUH) (Janda y Abbott, 1998; Figueras, 2005; Graevenitz, 2007). Sin embargo, las *Aeromonas* son principalmente patógenos entéricos que afectan con mayor frecuencia a niños, ancianos e individuos inmunocomprometidos (Figueras, 2005). Se han descrito numerosos casos de bacteriemias (Figueras, 2005; Dwivedi y cols., 2009) e infecciones extraintestinales tales como meningitis, neumonía, queratitis (Figueras, 2005) y osteomielitis (Gunasekaran y cols., 2009) causadas por *Aeromonas* en paciente sanos e inmunocompetentes. 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) así como la existencia de diversos Sistemas de Secreción (Vilches y cols., 2004; Seshadri y cols., 2006; Retih y cols., 2008).

Las especies mesófilas de *Aeromonas* con mayor implicación en clínica son *A. hydrophila*, *A. veronii* y *A. caviae*, responsables del 85-90% de los casos (Janda y Abbott, 1998; Figueras, 2005), sin embargo, otras 11 especies han sido aisladas en diversos casos clínicos (Figueras, 2005).

1.3.2.1. Intestinales

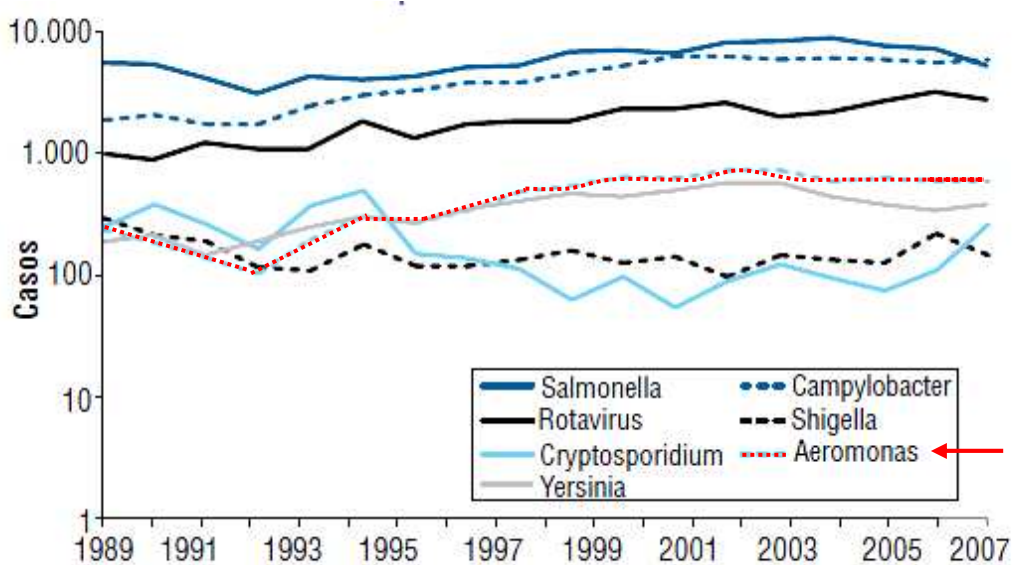
El primer aislamiento de *Aeromonas* de heces tuvo lugar en 1961 aunque ya se había asilado antes, en 1954, como agente de una miositis en una mujer jamaicana y desde entonces son numerosos los estudios que las han asociado con numerosas infecciones siendo las más comunes las gastroenteritis (Graevenitz, 2007; Figueras, 2005).

A pesar de que las *Aeromonas* se han visto implicadas como agentes causales de diarreas y gastroenteritis en numerosos casos, su papel enteropatógeno ha sido puesto en duda debido principalmente a su presencia en portadores asintomáticos y a los escasos brotes epidémicos (Figueras, 2005; Graevenitz, 2007). Aunque este argumento es poco defendible ya que esta peculiaridad también ocurre en otros enteropatógenos, de hecho, al igual que las diarreas causadas por otros microorganismos entéricos, las relacionadas con *Aeromonas* suelen ser autolimitadas con una duración inferior a una semana o bien prolongarse durante más de dos semanas pudiendo llegar a ser crónica con más de un año de duración. Las náuseas, vómitos, fiebre y calambres abdominales se dan sólo en una fracción de los pacientes, mientras que la colitis se da en un tercio de la diarreas causadas por *Aeromonas* (Graevenitz, 2007).

Las gastroenteritis producidas por *Aeromonas* son un problema entre la población pediátrica con una incidencia de entre el 2.3% y el 13% en países como Taiwan y Nigeria, respectivamente, ocupando el segundo o tercer puesto entre las bacterias enteropatógenas más frecuentes en dichos

países (Figueras, 2005) . En España, en el año 2007 (**Figura 2**) se registraron 544 casos de gastroenteritis causadas por *Aeromonas*, ocupando así el cuarto puesto de entre las bacterias entéricas, por delante de *Yersinia* y *Shigella* (Boletín Epidemiológico del Centro Nacional de Epidemiología). En el 2-20% de los casos las infecciones son monomicrobianas y sólo entre el 0-2% de los niños son portadores asintomáticos (Chopra y Houston, 1999). Las diarreas se producen principalmente en niños menores de 3 años, con una duración de una o dos semanas y heces de consistencia acuosa (Figueras, 2005).

Figura 2. Tendencias de los microorganismos más relevantes causantes de infecciones gastrointestinales en España desde 1989 hasta 2007 (Boletín Epidemiológico del Centro Nacional de Epidemiología).



Fuente: Red Nacional de Vigilancia Epidemiológica. Centro Nacional de Epidemiología.

La incidencia en adultos varía desde el 2% observado en Suecia, el 6.9% en Hong Kong en personas sanas y el 13% en pacientes inmunocomprometidos, siendo en estos últimos el segundo o tercero de entre los enteropatógenos más frecuentes (Figueras, 2005). Entre los pacientes con diarrea del viajero en España, *Aeromonas* fue definido como agente causal en el 2% de los casos (Vila y cols., 2003), mientras que en Japón se aisló en un 5.5% de los casos (Figueras, 2005) y un 8.7% en Finlandia. En el 5.5% de los casos de diarrea del viajero, la infección es monomicrobiana (Chopra y Houston, 1999). Recientemente se ha descrito el primer caso de apendicitis asociado a diarrea del viajero causada por *A. sobria* (Lim, 2009).

Aunque la existencia de brotes epidémicos es algo común entre las enterobacterias, en el caso de *Aeromonas* es complejo localizar una fuente de infección ya que se encuentran tanto en ambientes salobres como en alimentos y suelos. Las infecciones por *Aeromonas* se adquieren principalmente por el consumo de agua, comida o verdura contaminadas (Graevenitz, 2007). Son pocos los brotes epidémicos bien documentados (Altwegg y cols., 1991; Krovacek y cols., 1995; Monteil y Har-

Monteil, 1997) pero esto es debido a que las *Aeromonas* generan, en la mayoría de los casos, cuadros clínicos poco graves que se autolimitan rápidamente y hacen innecesario el estudio bacteriológico.

Las *Aeromonas*, así como el resto de enteropatógenos, requieren de una serie de condiciones para producir una infección como son la colonización, la invasión y la proliferación. La capacidad de colonización intestinal de *Aeromonas* se ha demostrado en un modelo animal inmunocompetente tras alterar el equilibrio ecológico bacteriano intestinal por la administración de estreptomycin (Sanderson y cols., 1996; Lye, 2009). En este estudio (Lye, 2009) las especies con mayor capacidad de colonización intestinal fueron *A. caviae* (45% de colonización), *A. veronii* (43%) y *A. hydrophila* (37%) mientras que esta capacidad colonizadora era inferior en especies poco frecuentes en diarrea como *A. salmonicida* (7%), *A. allosaccharophila* (5%) o *A. encheleia* (0%). Cabe destacar del estudio de Lye (2009) que la susceptibilidad a la infección no sólo es cepa dependiente sino que también depende de las condiciones del hospedador, tal y como cabe esperar. Los primeros experimentos con ratas, ratones y conejos consiguieron demostrar la acción enterotóxica de filtrados de *Aeromonas* así como de toxinas purificadas, sin embargo, la ruta de infección utilizada no era la ruta oral natural de infección (Chopra y Houston, 1999). Es interesante destacar que, aparte de los estudios referenciados por Janda y cols. (1998), también se pudo comprobar una respuesta inmunológica en los pacientes que presentaban gastroenteritis en un estudio más reciente publicado por Demarta y cols. (2001).

1.3.2.2. Extraintestinales

Bacteriemias

Las bacteriemias causadas por *Aeromonas* suelen ocurrir en pacientes cirróticos o con una enfermedad de base, en el 40-50% se trata de procesos cancerosos, enfermedades hepatobiliares en el 15-30% de los casos y diabetes en 3-5% (Tabla 5). En el año 2005, Figueras realiza una revisión de los casos publicados desde 1998 hasta el 2005 dónde se destaca un aumento en el número de casos con enfermedades hepatobiliares (36-54%). Además en este estudio se observan características de las bacteriemias causadas por *Aeromonas* que son, en su mayoría, monomicrobianas (64-100%), no nosocomiales (59-79%) y con una tasa de mortalidad de entre el 25% y el 70% (Figueras, 2005). La mayoría de las bacteriemias monomicrobianas se relacionan con *A. hydrophila* (65%), seguidas de las producidas por *A. veronii* (23-31%) y las generadas por *A. caviae* (12%); mientras que en las polimicrobianas se aíslan generalmente *Aeromonas* junto a *Enterobacterias*, *Pseudomonas* o *Streptococcus/Enterococcus* (Janda y Abbott, 1998).

Tabla 5. Características de bacteriemias causadas por *Aeromonas*. Adaptada de Figueras, 2005.

Autor	Pacientes	Edad media	Bacteriemia		Adquisición		Presentación clínica			Enfermedad de base				
			Monomicrobiana	Polimicrobiana	Comunitario	Nosocomial	Infección hepatobiliar	Peritonitis	Infección tejido blando	Diarrea	Cáncer	Enfermedad hepatobiliar	Otras	Mortalidad
1	144	54.1	70	30	60	40	12	9	8	ND	42	38	19	31
2	104	53.6	100	0	74	26	54		ND	ND	21	54	25	32
3	42	62	64	36	79	21	19	5	16	12	33	50	16	70
4	12	50	75	25	59	41	ND		33	17	58	0	33	25
5	73	61	72	28	71	29	26	20	1.3	14	33	36	42	36
6	41	53.2	75.4	24.6	0	100	ND	ND	ND	ND	0	0	100	35.6
7	29	ND	ND	ND	ND	ND	33	22	33	0	25	13	62	38

1: Janda y Abbott, 1998; 2: Ko y cols., 2000; 3: Lau y cols., 2000; 4: Campo y cols., 2001; 5: Llopis y cols., 2004; 6: Tsai y cols., 2006; 7: Wu y cols., 2007.

La incidencia de los casos de bacteriemias por *Aeromonas* varía según la localización geográfica, aunque se desconoce la incidencia a nivel mundial. En España varía entre el 0.12-0.3% según diversos autores y en Japón alcanza el 3.3% (Figueras, 2005).

En aquellos casos en los que la vía de entrada es un traumatismo con una infección severa de la herida, la prognosis de la bacteriemia es extremadamente mala con una tasa de mortalidad superior al 90% (Janda y Abbott, 1998; Figueras, 2005). Los casos de bacteriemias en pacientes previamente sanos se relacionan principalmente con infecciones pulmonares (Janda y Abbott, 1998).

Colangitis

Las *Aeromonas* son responsables del 12% de las infecciones hepatobiliares o pancreáticas, entre las cuales la más común (el 70% de los casos) es la colangitis que afectan tanto a individuos sanos como individuos inmunodeprimidos, con cáncer de páncreas o carcinoma biliar (Figueras, 2005). Se ha visto que la obstrucción del tracto biliar es un factor de riesgo en estas infecciones (Clark y Chenoweth, 2003). La tasa de mortalidad en los pacientes con estas infecciones por *Aeromonas* está entre el 10 y el 11.8% (Figueras, 2005). Las especies más frecuentemente aisladas en estos casos fueron *A. hydrophila*, *A. caviae* y *A. veronii*, siendo los antibióticos más activos, en los casos de colangitis por *Aeromonas*, las cefalosporinas de 3ª generación, imipenem y quinolonas (Clark y Chenoweth, 2003).

Heridas

Después del tracto gastrointestinal, las heridas son la segunda vía de entrada más frecuente de *Aeromonas* en humanos. Las heridas infectadas por *Aeromonas* pueden ser superficiales generando celulitis o forunculosis o llegar a afectar a músculos, tendones, articulaciones y hueso (Janda y Abbott, 1998). En la inmensa mayoría de los casos en los que personas sanas se infectan por *Aeromonas*, la infección es consecuencia de heridas penetrantes o abrasión, con objetos contaminados o bien, es seguida de una exposición al medio acuático o suelos que contienen *Aeromonas*. Dichas heridas ocurren frecuentemente en visitantes de parques acuáticos y pescadores. Se suelen localizar en extremidades inferiores y superiores, estando relacionadas con el contacto de agua dulce más que salada (Janda y Abbott, 1998).

Otro grupo de pacientes son aquellos que han sufrido accidentes de tráfico, aéreos o náuticos, con heridas de mayor gravedad y quemaduras que dan lugar a mionecrosis, gangrena e infecciones óseas (Figueras, 2005). Sólo el 17-52% de las infecciones de heridas por *Aeromonas* son monomicrobianas, en el resto de casos bacterias entéricas, enterococos y *Bacteroides* son aislados conjuntamente con *Aeromonas*. Entre éstas, *A. hydrophila* es la más frecuente junto con *A. caviae* y *A. veronii* (Janda y Abbott, 1998).

Un tercer grupo de pacientes son los que sufren infecciones de herida quirúrgica (SSI). Las SSI son en la mayoría de los casos nosocomiales y están asociadas con una elevada mortalidad y coste

médico. Los agentes etiológicos son variados pero dependen especialmente del lugar anatómico de la cirugía siendo *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus*, *E. coli* y *Pseudomonas aeruginosa* los más frecuentes. Existen 15 casos en la literatura en los que *Aeromonas* se ha relacionado con este tipo de infecciones (Slotnick, 1970; Washington, 1972; Soussy y cols., 1975; Janda y cols., 1983; Mellersh y cols., 1984; Isaacs y cols., 1988; Villuendas y cols., 1991; King y cols., 1992; Gold y Salit, 1993; Moawad y Zeiderman, 2002; Clark y Chenoweth, 2003), sin embargo, su papel tanto en las infecciones como las características de las mismas aún no ha sido estudiada en su conjunto.

Las infecciones en quemados por *Aeromonas* no son muy frecuentes, en la actualidad existen publicados pocos estudios en la base de datos de pubmed. Las primeras referencias bibliográficas de quemados infectados por *Aeromonas* datan de 1981 y 1988 (Ampel y Peter, 1981; Purdue y Hunt, 1988), publicándose la primera revisión en 1996 por Barrillo y cols. Se aislaron *Aeromonas* de infecciones de quemaduras en el 0.1% de los casos en un hospital de USA durante un período de 35 años (Barrillo y cols., 1996), 1 caso por año en otro hospital de Australia (Kienzle y cols., 2000) o 4 casos en 5 años en Singapore (Chim y Song, 2007). En este último estudio se destaca un aumento en la resistencia a antibióticos de los aislados, hecho que también se destaca en otro estudio del mismo año en las cepas de distintas especies de *Aeromonas* aisladas de un mismo paciente (de sangre y herida) en Taiwán, que mostraron ser resistentes a cefalosporinas de tercera generación (Lai y cols., 2007b). Una revisión de los casos publicados accesibles (**Tabla 6**) muestra que la edad media de los afectados está entorno a los 26-35 años, las infecciones se producen en pacientes con quemaduras en el 8-80% del cuerpo, las bacteriemias son monomicrobianas mientras que la mayoría (40-75%) de heridas muestran infecciones polimicrobianas donde están presentes *Bacillus* spp., Enterococos, Enterobacterias y *Pseudomonas*, entre otros. De todas las bacteriemias y de la mayoría de las heridas, la especie más aislada fue *A. hydrophila* aunque de heridas también se han aislado *A. caviae* y *A. sobria* (Kienzle y cols., 2000; Lai y cols., 2007b), aunque estas identificaciones están basadas en métodos bioquímicos. La tasa de mortalidad de los afectados está entorno al 11-62%.

Tabla 6. Características de infecciones en quemados causadas por *Aeromonas*.

Autor	Pacientes	Edad	Contacto agua/suelo (%)	Monomicrobiana (%)	TBSA (%)	Bacteriemias (%)	Mortalidad (%)
1	8	33	37.5	ND	38-80	100	62
2	9	31	ND	33	16-51	11	11
3	5	26	60	60	8-45	20	20
4	4	35	0	25	35-80	50	25
5	1	ND	0	ND	40	100	0

1: Barrillo y cols., 1996; 2: Skoll y cols., 1998; 3: Kienzle y cols., 2000; 4: Chim y Song, 2007; 5: Lai y cols., 2007b.
 TSBA: Total Surface Body Area

Síndrome urémico hemolítico (SUH)

El síndrome urémico hemolítico (SUH) se caracteriza por la presencia de anemia hemolítica, trombocitopenia y daño renal agudo pudiendo generar una disfunción renal crónica e incluso la muerte. El SUH suele estar producido por *Escherichia coli* productoras de toxina Shiga (STEC) en países desarrollados mientras que en países en vías de desarrollo se ha asociado más frecuentemente con *Shigella dysenteriae* tipo I (Noris y Remuzzi, 2005). Sólo en Estados Unidos se detectan unos 100,000 casos anuales de estas infecciones generadas por STEC y en el 73% de estos casos la infección se debe al serotipo O157:H7 (Tzipori y cols., 2004). Las infecciones por STEC presentan dolor abdominal y en la mayoría de los casos diarreas sanguinolentas (colitis hemorrágica) entre los 2-5 días siguientes a la exposición. El SUH ocurre en el 5-10% de los casos varios días después del desarrollo de la colitis hemorrágica, generalmente en niños y ancianos. El principal reservorio animal de STEC es el ganado y la vía más común de infección es por consumo de comida y/o agua contaminada. *E. coli* son capaces de producir 1 o 2 exotoxinas denominadas toxinas Shiga tipo 1 (Stx1) y toxinas Shiga tipo 2 (Stx2) siendo esta última el principal factor de virulencia del SUH (Orth y cols., 2007). Aunque *E. coli* O157:H7 junto a *S. dysenteriae* tipo I son los principales productores de las toxinas Shiga, éstas se han relacionado con varios patógenos entéricos: *Vibrio cholera* y *Vibrio parahaemolyticus* de origen clínico y ambiental (O'Brien y cols., 1984), *Citrobacter freundii* (Schmidt y cols., 1993, Tschäpe y cols., 1995), *Enterobacter cloacae* (Paton y Paton, 1996), *Acinetobacter haemolyticus* (Grotiuz y cols., 2006) y *Aeromonas* (Haque y cols., 1996; Snowden y cols., 2006).

Las *Aeromonas* han estado implicadas en varios casos de SUH, 3 casos relacionados con *A. hydrophila* (Bogdanovic y cols., 1991; Robson y cols., 1992; Fang y cols., 1999) y 1 con *A. veronii* bv sobria (San Joaquin y Pickett, 1988). Una incidencia del SUH del 2.5% en niños con diarrea producida por *Aeromonas* fue la establecida por San Joaquin y Pickett en 1988 con datos recogidos a lo largo de un periodo de 20 meses. *A. caviae* fue la especie más predominante (69% de los casos) y la que producía las diarreas crónicas e intermitentes (San Joaquin y Pickett, 1988). Bogdanovic y cols. (1991) describen el caso una niña de 23 meses con SUH que presentaba una enterocolitis producida por una cepa de *A. hydrophila* capaz de generar un efecto verotóxico en células vero (Bogdanovic y cols., 1991). Un año después, Robson y cols. (1992) aportan datos de la incidencia de *Aeromonas* como productor del SUH en niños, en el 2% de los 87 casos registrados en 5 años, fue aislada *A. hydrophila* de coprocultivos y asociada como agente causal del síndrome. Fang y cols. (1999) describen un caso de SUH, en un paciente previamente sano de 36 años, en el que se aisló *A. hydrophila* de 4 hemocultivos y ningún enteropatógeno (*Shigella*, *E. coli*, *Salmonella*, *Amoeba*) de los coprocultivos.

Filler y cols. (2000) describen un caso de una paciente de 6 meses con un fallo renal agudo tras una diarrea sanguinolenta. No se pudieron aislar de coprocultivos enterobacterias patógenas (*Shigella* spp., *Salmonella* spp., *Campylobacter* spp., *E. coli* o *Yersinia* spp.) pero si *A. sobria*. Aunque

esta cepa mostró actividad verotóxica no se pudo detectar la existencia de genes *stx* por PCR con las condiciones descritas por Karch y Meyers (1989) ni la toxina por un ensayo de aglutinación (RPLA, Reverse passive latex agglutination).

1.3.3. Factores de virulencia

La presencia de factores de virulencia en las especies de *Aeromonas* es un hecho reconocido, sin embargo la patogénesis de las infecciones causadas por estos microorganismos se desconoce. La variedad de manifestaciones clínicas observadas en las infecciones causadas por *Aeromonas* concuerda con la idea de que la patogenicidad de este microorganismo es multifactorial (Yu y cols., 2005). Los factores de virulencia descritos en el género incluyen tanto componentes estructurales como productos extracelulares (Pemberton y cols., 1997; Chopra y Houston, 1999; Janda, 2001; Galindo y cols., 2006; Grevenitz, 2007).

1.3.3.1. Productos extracelulares

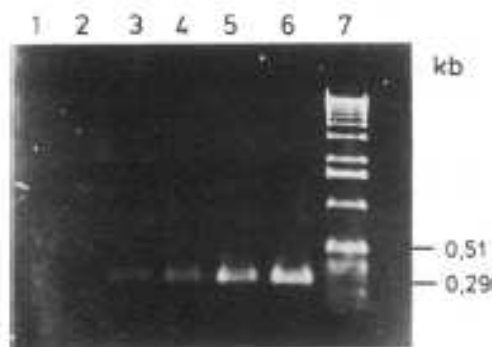
La interacción entre las bacterias patógenas y las células huéspedes viene dada, además de por los componentes extracelulares de éstas, por toxinas que son secretadas al espacio extracelular (Hueck, 1998). En *Aeromonas* existen varias toxinas que cumplen estas características, entre las cuales cabe destacar las proteasas, lipasas/fosfolipasas, DNasas, enterotoxinas citotónicas y hemolisinas (Merino y cols., 1995; Chopra y Houston, 1999; Janda, 2001; Galindo y cols., 2006) y otras no tan reconocidas como las toxinas Shiga (Haque y cols., 1996). A continuación se detallan algunas de ellas:

Toxinas Shiga

Las toxinas Shiga (Stx1 y Stx2), también denominadas verotoxinas o verocitotoxinas, son genéticamente y antigénicamente diferentes, en base a su secuencia aminoacídica ya que poseen sólo un 56% de similitud. Existen al menos 3 variantes genéticas de *stx*₁ (*stx*₁, *stx*_{1c} y *stx*_{1d}) y 5 de *stx*₂ (*stx*₂, *stx*_{2c}, *stx*_{2d}, *stx*_{2e} and *stx*_{2f}) (Eklund y cols., 2002; Leung y cols., 2003; Lee y cols., 2007), siendo las variantes *stx*₂ y *stx*_{2c} las más asociadas al SUH mientras que *stx*₁ es frecuente en cepas de STEC que producen casos de diarrea y de portadores asintomáticos (Eklund y cols., 2002; Jenkins y cols., 2003; Friedrich y cols., 2003; Orth y cols., 2007). Ambas toxinas son holotoxinas AB₅ formadas por una cadena A con actividad enzimática (32KDa) y 5 cadenas B (7KDa cada una) responsables de la unión a la célula diana. La subunidad A es una N-glicosidasa del ARNr 28S que genera la inhibición de la síntesis proteica mientras que el pentámero B es el responsable de la unión de la toxina a la célula diana por el reconocimiento del receptor, el glicolípido globotriaosilceramida [ú Gal (1→4) β Gal (1→4) β Glc-ceramida] (Gb3). Aunque Stx1 y Stx2 tienen el mismo receptor, Gb3, Stx1 poseen aproximadamente 1000 veces más afinidad por este receptor que Stx2 por Gb3, sin embargo la disociación de Stx2 del mismo es mucho más lenta (Noris y yRemuzzi, 2005).

Las toxinas Shiga están codificadas en bacteriófagos que normalmente se hallan integrados en el cromosoma bacteriano. Cuando se induce el ciclo lítico, se liberan grandes cantidades de los mismos capaces de infectar a otras bacterias, actuando como vectores de transmisión horizontal de los genes *stx* (Herold y cols., 2004).

Figura 3. Influencia de los subcultivos en la estabilidad de *stx*₂ en *C. freundii* (Schmidt y cols., 1993).



1,2: La señal de amplificación desaparece tras 2 subcultivos; 3,4: Señal tenue tras un subcultivo; 5,6: Señal intensa del amplificado del stock inicial.

En algunas enterobacterias, mencionadas anteriormente, que presentan los genes *stx* como *E. coli* (Paton y Paton, 1997; Karch y cols., 1992), *E. cloacae* (Paton y Paton, 1997), *C. freundii* (Schmidt y cols., 1993) y *A. haemolyticus* (Grotiuz y cols., 2006), se ha descrito la existencia de inestabilidad del gen *stx*₂. Karch y cols. en 1992 y Schmidt y cols. en 1993 fueron los primeros en observar que el subcultivo de las cepas portadoras generaba la desaparición de *stx*₂ (**Figura 3**). Estos autores observaron que dicha pérdida era “común” (1/3 de las cepas de *E. coli* y 5/7 de las cepas *C. freundii*) e independiente del medio de cultivo (sólido o líquido) utilizado (Karch y cols., 1992) y sugirieron que la presencia de menos de 10 copias del fago por 10⁶ ufc podría explicar este hecho (Schmidt y cols., 1993). En el género *Aeromonas* se ha detectado también la existencia de inestabilidad en el gen *cagA*-like, un conocido factor de virulencia de *Helicobacter pylori*, codificado en elementos móviles y que inicialmente fue adquirido por transmisión horizontal (Datta y cols., 2003). En 1996, Haque y cols. detectan la presencia de *stx*₁, codificado en un plásmido, en 3 cepas de *A. hydrophila* y en 1 cepa de *A. caviae*, mediante PCR, Southern y Dot Blot con sondas de *stx*₁ específicas de *E. coli*. Asimismo, fueron capaces de detectar la producción de Stx1 en estas cepas de *Aeromonas* y neutralizarla con anticuerpos específicos para Stx1 de *E. coli*, por lo que se supuso una alta similitud tanto biológica como inmunológica y genética entre ambas toxinas (Haque y cols., 1996). Diez años después, se detectó de nuevo por PCR el gen *stx*₁ en *Aeromonas*, en esta ocasión, en una cepa de *A. veronii* (Snowden y cols., 2006) empleando los cebadores y condiciones descritas por Pass y cols. (2000).

Se ha descrito que existen cepas portadoras de los genes *stx*₁ y/o *stx*₂ que no producen toxinas Shiga (García-Aljaro y cols., 2004, 2005). En los estudios de García-Aljaro y cols. (2004, 2005) se

observó, a partir de cepas de *E. coli* O157:H7 aisladas de aguas residuales de humanos, que sólo el 7% eran capaces de expresar las Stx1 y Stx2, mientras que en las aguas residuales de ganado vacuno el 75% eran capaces de expresar Stx2 frente al 0% de las aisladas de aguas de cerdos, utilizando en ambos casos un kit comercial para la detección de las toxinas (Duopath Verotoxin test).

Aerolisinas y hemolisinas

Las hemolisinas, al igual que las toxinas Shiga, fueron inicialmente descritas en *E. coli* (Inukai y Kodama, 1965). En *Aeromonas* se han definido dos tipos de hemolisinas, α y β , con diferencias fisiológicas y funcionales (Singh y Sanyal, 1992) pero que son capaces de formar poros en la membrana de la célula diana generando su lisis osmótica (Kirov, 1997; Galido y cols., 2006). La caracterización de las β -hemolisinas de *Aeromonas* se ha visto dificultada tanto por la variedad de las mismas como por la terminología múltiple y confusa con la que se las ha descrito (Hly, HlyA de 49KDa y Ahh-1, AerA, Act, Asa1) (Buckley y Howard, 1999; Erova y cols., 2007). Una de ellas, la hemolisina Act, es además entero- y citotóxica y ha demostrado ser letal en cantidades de nanogramos vía intravenosa en ratones (Galindo y cols., 2006; Erova y cols., 2007). La **aerolisina** es el prototipo de hemolisina del género y fue caracterizada en el año 1974 por Bernheimer y Avigad. Al gen estructural se le da el nombre de *aerA*. La aerolisina es secretada por el sistema de secreción tipo 2 (T2SS) que es sec-dependiente, se transcribe como una pre-pro-aerolisina que sufre diversos procesos de maduración durante su secreción para convertirse en una aerolisina activa de 47.5 kDa en el medio extracelular (Howard y cols., 1996). La aerolisina activa se une a glicoproteínas de la membrana celular del huésped, en el caso de eritrocitos o células de mamíferos, o a la glicoproteína glicosilfosfatidilinositol (Thy-1), en el caso de los linfocitos antes de oligomerizarse (Buckley, 1992; Nelson y cols., 1997). Diversos estudios han tratado de determinar la incidencia de los genes *hlyA* y *aerA* en las especies *A. hydrophila*, *A. caviae* y *A. veronii* bv sobria, habiéndose encontrado que los genotipos más frecuentes son: *aerA*⁺/*hlyA*⁺ para *A. hydrophila*, *aerA*⁺/*hlyA*⁻ para *A. veronii* y *aerA*⁻/*hlyA*⁻ para *A. caviae* (Heuzenroeder y cols., 1999; González-Rodríguez y cols., 2002).

Wang y cols. (2003) estudiaron la distribución de los genes *ahh1*, *asa1* y *aerA* en cepas de *Aeromonas* de origen clínico. Estos autores determinaron que los genotipos más frecuentes son el *ahh1*⁺/*aerA*⁺ (37.5%) y *ahh1*⁺ (36%), mientras que un 8.5% de las cepas presentaron el genotipo *asa1*⁺ (8.5%), y que sólo el 4% el genotipo *ahh1*⁺/*asa1*⁺. El 14% de las cepas no presentó ninguno de éstos genes. Las cepas con el genotipo *ahh1*⁺/*aerA*⁺ fueron las que presentaron mayor actividad citotóxica en células Vero y concluyen que las cepas con éste genotipo debían ser las que presenten mayor virulencia. Asimismo destacaron el caso de aislados de *A. caviae* que no producían citotoxinas o hemolisinas pero que recuperaban la capacidad de expresarlas tras el paso por el sistema digestivo del animal y que volvían a perderla tras varios subcultivos (Wang y cols., 2003).

Soler y cols. (2002) desarrollan una serie de PCR específicas para diversos genes de virulencia. A partir de 10 secuencias nucleotídicas de las diversas hemolisinas y aerolisinas diseñan cebadores para una región común de 431 pb que definen como aerolisina/hemolisina. Estos autores observan que el 88% de las *A. popoffii* evaluadas poseen dichos genes aunque la hemólisis depende de la temperatura y el tipo de sangre. Chacón y cols. (2003) estudiaron la distribución de diversos factores de virulencia en *Aeromonas* spp., identificadas molecularmente, de origen clínico y ambiental y observaron que la Aerolisina/hemolisina y la presencia de β -hemólisis era significativamente mayor en cepas de origen clínico que en cepas de origen ambiental.

Proteasas

Se cree que el papel principal de las proteasas es establecer y mantener la infección, sobre todo en el caso de heridas e infecciones como la celulitis (Janda, 2001). Las *Aeromonas* produce al menos tres tipos de proteasas: metaloproteasa (*ahp*, *aphB*), acetilcolinesterasa y serina proteasa (*aspA*) (Seshadri y cols., 2006; Reith y cols., 2008).

La serina proteasa ha sido implicada en la activación de la pre-pro-aerolisina (Abrami y cols., 1998) y la pro-GCAT (Eggset y cols., 1994; Vipond y cols., 1998).

Lipasas

Las *Aeromonas* spp. al igual que otras muchas bacterias patógenas secretan lipasas al medio que actúan como hidrolasas sobre los lípidos de membrana (Jaeger y cols., 1994). En *A. hydrophila* se han encontrado diversas lipasas como la Ah65 lipasa/acetiltransferasa y otras con un alto grado de homología como la lipH3, Apl-1, Lip, Pla, PlaC y GCAT, siendo la fosfolipasa C la que parece tener una implicación más clara en la virulencia ya que muestra actividad lecitinasa y capacidad citotóxica (Merino y cols., 1999). Se ha demostrado que estos genes se encuentran presentes en todas las especies del género, y observado una correlación con la actividad lipolítica de las cepas, mientras que no se han detectado diferencias entre la presencia de lipasas y el origen clínico o ambiental de las cepas (Soler y cols., 2002; Chacón y cols., 2003; Castro-Escarpulli y cols., 2003). Castro-Escarpulli y cols. (2003) evaluaron tres métodos diferentes para determinar la actividad lipolítica de las cepas (medio mantequilla-resarsurina, α -lecitina y agar tributirina) no encontrándose diferencia entre ellos.

El glicerofosfolípido colesterol acetiltransferasa, GCAT, se encuentra exclusivamente en *Aeromonas* spp. y no presenta homología a nivel de nucleótidos con ninguna otra lipasa bacteriana (Chacón y cols., 2004). La GCAT es secretada por la bacteria sobre la bicapa lipídica como pro-GCAT, la pro-GCAT es capaz de hidrolizar lípidos pero no bicapas lipídicas. Cuando la pro-GCAT sufre un corte en el extremo C-terminal su conformación cambia convirtiéndose en un dímero (GCAT activa) (Hilton y cols., 1990; Ausio y cols., 1993). Este corte puede ser producido por proteasas de la misma bacteria como la tripsina o la serina proteasa (Eggset y cols., 1994). La importancia de la

GCAT como factor de virulencia sólo ha sido estudiada en profundidad en cepas de *A. salmonicida* aisladas de peces enfermos (Lee y Ellis, 1990).

DNasas

Las DNasas son consideradas de gran importancia en *Streptococcus* para producir la infección en las células huésped humanas y hacer que ésta progrese (Podbielski y cols., 1996; Ericksson y cols., 1999). En un estudio de Soler y cols. (2002) todas las cepas de *A. popoffii* analizadas presentaron los genes de las DNasas así como la actividad fenotípica. Chacón y cols. (2003) demostraron que estos genes se encuentran significativamente más presentes en cepas de *Aeromonas* de origen clínico (95%) que ambiental (85%), aunque esta diferencia no se observó al evaluar la expresión fenotípica en un medio de cultivo con ADN. Por otro lado, este gen estaba presente en el 83% de las cepas procedentes de pescado congelado y todas las cepas presentaron actividad DNasa (Castro-Escarpulli y cols., 2003).

Enterotoxinas

Las toxinas de mayor relevancia en infecciones gastrointestinales, las denominadas enterotoxinas, están también presentes en *Aeromonas* (Graevenitz, 2007). Existen dos tipos principales de enterotoxinas: las citotóxicas y las citotónicas.

Entre las toxinas citotóxicas se ha descrito Act (52KDa), que es termolábil (56°C 20 min), secretada por el T2SS y que presenta una actividad multifuncional ya que es hemolítica, afecta al epitelio intestinal vía citoquinas y por la activación del metabolismo del ácido araquidónico, con una DL₅₀ de 27.5ng. La toxina Act es capaz de inhibir la capacidad fagocitaria de los fagocitos de ratón, aumentar los niveles del factor de necrosis tumoral (TNF)- α y la interleucina (IL)-1 β en macrófagos (Galindo y cols., 2006; Graevenitz, 2007). Aunque muestra similitud inmunológica con la toxina colérica (CT), no es neutralizada por los anticuerpos para esta. El gen *act* muestra un 75% de similitud en su secuencia nucleotídica con el gen *aer* (aerolisina) y en base a su secuencia aminoacídica entre un 79-93%. Al igual que la toxina α de *Staphylococcus aureus*, Act se activa por unión a la membrana plasmática de la célula diana. La activación de estas toxinas implica su oligomerización que da lugar a la formación de un poro en la membrana plasmática de la célula diana (Chopra y Houston, 1999; Galindo y cols., 2006).

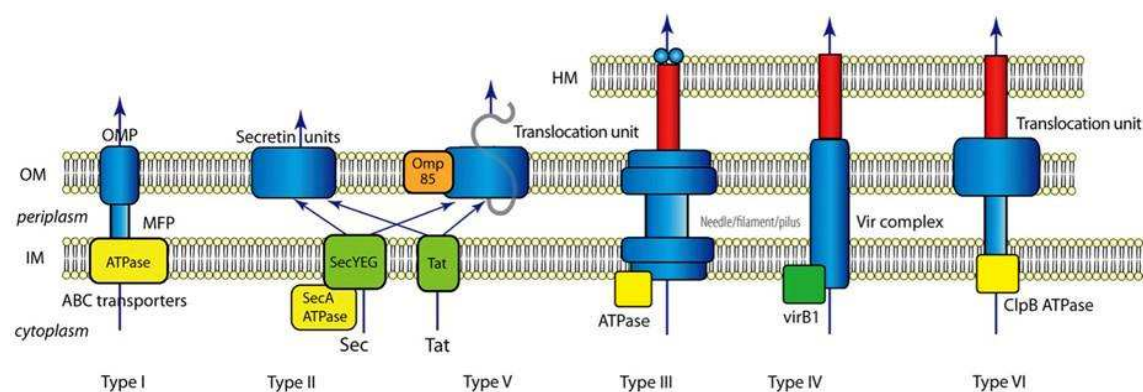
Se han descrito 2 enterotoxinas citotónicas, la primera, Alt, es termolábil (56°C 10 min) y la segunda, Ast, es termoestable (100°C 30 min). Ambas provocan un aumento del AMPc y del nivel de prostaglandinas, así como elongación en células de ovario de hamster chino (CHO) (Graevenitz, 2007). Atl (44KDa, 175aa) muestra una similitud en su secuencia aminoacídica del 45-51% con la lipasa y fosfolipasa C y no es similar inmunológicamente a la CT, por lo que no existe reconocimiento por parte de los anticuerpos anti-CT de la toxina Alt. Contrariamente, este reconocimiento sí existe para Ast (Chopra y Houston, 1999).

Se ha detectado la existencia de una correlación positiva entre Act y las enterotoxinas citotónicas en cepas de *A. hydrophila* subsp. *dhakensis* de origen diarréico en Bangladesh, sugiriendo que existe un efecto sinérgico de Alt y Ast en la severidad de la diarrea; mientras que *act* se relacionó con diarreas sanguinolentas (Kuhn y cols., 1997).

1.3.3.2. Sistemas de secreción

Se conocen en la actualidad 6 sistemas de secreción (**Figura 4**) en las bacterias Gram negativas, los sistemas de secreción tipo I, II, III, IV, V (o auto-transporte) y VI, que están implicados en el transporte de factores de virulencia al medio extracelular o directamente dentro de la célula huésped (Tseng y cols., 2009; Suárez y cols., 2008). Se ha demostrado que el sistema de secreción tipo IV en *Agrobacterium tumefaciens* está además implicado en la transferencia de plásmidos por conjugación (Rangrez y cols., 2006). Los sistemas de secreción tipo II y V son *Sec*- o *Tat*-dependientes, esto implica que los factores de virulencia secretados por estos mecanismos contienen péptidos-señal que son reconocidos por las proteínas *Sec* o *Tat*, de la vía secretora, permitiendo su translocación de la membrana interna hacia el espacio periplásmico, sin embargo, los sistemas de secreción I, III, IV y VI son *Sec*- y *Tat*-independientes y por lo tanto no requieren este sistema y exportan las proteínas directamente bien a la superficie celular o al interior de la célula huésped (Hueck y cols., 1998; Tseng y cols., 2009).

Figura 4. Resumen esquemático de los sistemas de secreción conocidos en bacterias Gram negativas (Tseng y cols., 2009).



HM, membrana de la célula diana, OM, membrana externa; IM, membrana interna; OMP, proteína de membrana externa; MFP, proteína de fusión de membranas.

El sistema de secreción tipo 1 (T1SS) es el sistema de secreción general, posee tres componentes mayoritarios: sistema de transporte ABC, factores de membrana externa y proteínas de fusión de membrana.

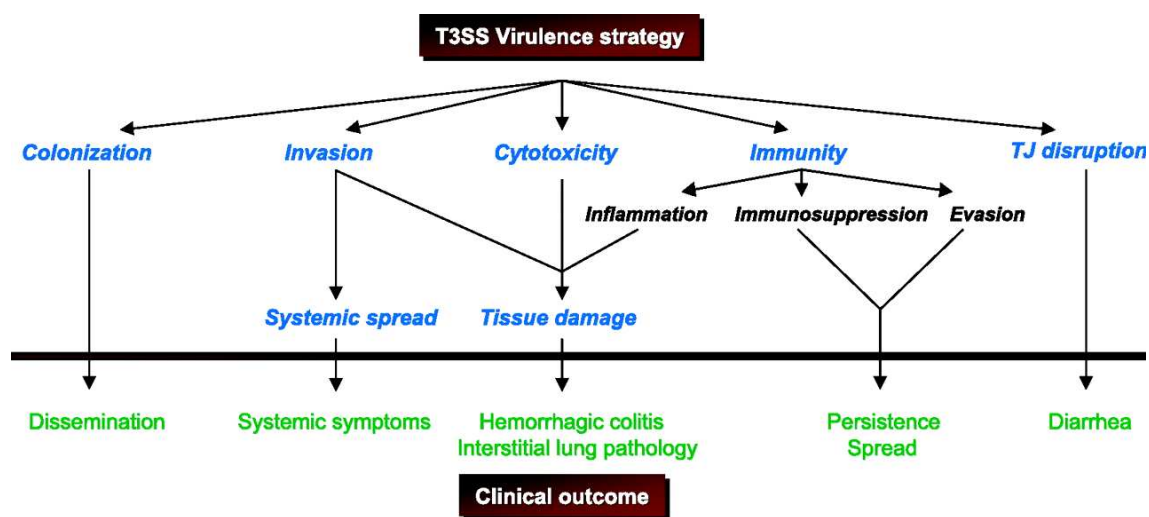
El sistema de secreción tipo 2 (T2SS) es un sistema de secreción exclusivo de las proteobacterias que muestra un origen evolutivo común con los pili de tipo IV (Cianciotto, 2005; Tseng y cols., 2009). Este sistema de secreción es esencial en la patogénesis de diversos microorganismos como *Vibrio cholerae*, *Legionella pneumophila*, *E. coli* (Cianciotto, 2005), *A. hydrophila* (Seshadri y cols., 2006) y *A. salmonicida* (Retih y cols., 2008) ya que es la vía de secreción de la toxina colérica, la toxina termolábil (*E. coli*) (Cianciotto, 2005) así como aerolisinas, amilasas, DNAsas, GCAT y proteasas (*A. salmonicida* y *A. hydrophila*) (Seshadri y cols., 2006; Retih y cols., 2008).

El sistema de secreción tipo 3 (T3SS) o inyectosoma es uno de los sistemas de secreción por los que las proteínas pueden ser inyectadas directamente desde el protoplasma de la célula bacteriana al citoplasma de la célula diana o bien al espacio extracelular (Tseng y cols., 2009). Se han identificado 7 familias del T3SS existiendo en algunas cepas de *Salmonella typhimurium* representantes del T3SS de diversas familias. Sólo 9 de las 25 proteínas necesarias para el ensamblaje de este sistema de secreción se conservan entre las 7 familias. En muchos casos los genes del T3SS están codificados en islas de patogenicidad localizadas en plásmidos (Tseng y cols., 2009) por lo que comúnmente están sujetos a la transmisión horizontal. La mayoría de los microorganismos que poseen este sistema de secreción, tanto patógenos de humanos, de animales o plantas así como simbioses, pertenecen a las proteobacterias (Cornelis, 2006). Los microorganismos patógenos de animales secretan mediante dicho sistema entre 6 y 20 proteínas efectoras que interactúan y modulan funciones, maquinaria y morfología de la célula huésped permitiendo la colonización y multiplicación del patógeno e interfieren en la respuesta inmune del huésped (Coburn y cols., 2007). Tanto la diarrea como la colitis hemorrágica se encuentran entre los efectos que generan en el hospedador las proteínas efectoras (**Figura 5**). Sin embargo, el efecto patogénico no sólo depende de la proteína efectora sino también de la célula diana y tejido (Coburn y cols., 2007). La patogenicidad asociada a este sistema de secreción ha sido probada mediante la utilización de mutaciones dirigidas en los genes estructurales y observando el descenso en la virulencia de la cepa mutante con respecto a la salvaje (Coburn y cols., 2007; Corneli y cols., 2007).

En *Aeromonas*, los genes del T3SS han sido ampliamente estudiados (Burr y cols., 2002; Yu y cols., 2004; Chacón y cols., 2004; Vilches y cols., 2004, 2008; Sha y cols., 2007; Tan y cols., 2008) habiéndose identificado 5 proteínas efectoras secretadas por este sistema i.e. AexT (Braun y cols., 2002), AopP (Feher y cols., 2006); AopH, AopO (Dacay y cols., 2006); AexU (Sha y cols., 2007) y 3 proteínas ExoT-like (Yu y cols., 2007). Se ha detectado que las proteínas efectoras AopH y AopO están codificadas en plásmidos mientras que AexT lo está en el genoma bacteriano y los componentes del T3SS pueden localizarse tanto en plásmidos como en el genoma bacteriano (Burr y Frey, 2007;

Seshadri y cols., 2006; Reith y cols., 2008). El inyectosoma de *Aeromonas*, al igual que el de *Pseudomonas aeruginosa*, pertenece a la familia Ysc de *Yersinia* spp. (Cornelis, 2006). En *A. salmonicida* y *A. hydrophila* se ha demostrado la virulencia del T3SS ya que al inocular *in vivo* cepas con genes estructurales del T3SS mutados se observaba un descenso en la virulencia en comparación con la cepa salvaje (Vilches y cols., 2004; Burr y Frey, 2007). Sin embargo, las mutaciones de los genes de las proteínas efectoras AexT, AopO y AopH mostraron sólo un descenso moderado de la virulencia (Burr y Frey, 2007). Los genes que codifican el T3SS son más frecuentes en cepas clínicas que ambientales de *Aeromonas* (Vilches y cols., 2004) y más frecuentes en *A. veronii* (68-80%) y *A. hydrophila* (53-80%) que en *A. caviae* (15-6%), que son las especies con mayor incidencia en clínica (Vilches y cols., 2004; Chacón y cols., 2004).

Figura 5. Funciones de las proteínas efectoras del T3SS con importancia patofisiológica (Coburn y cols., 2007).

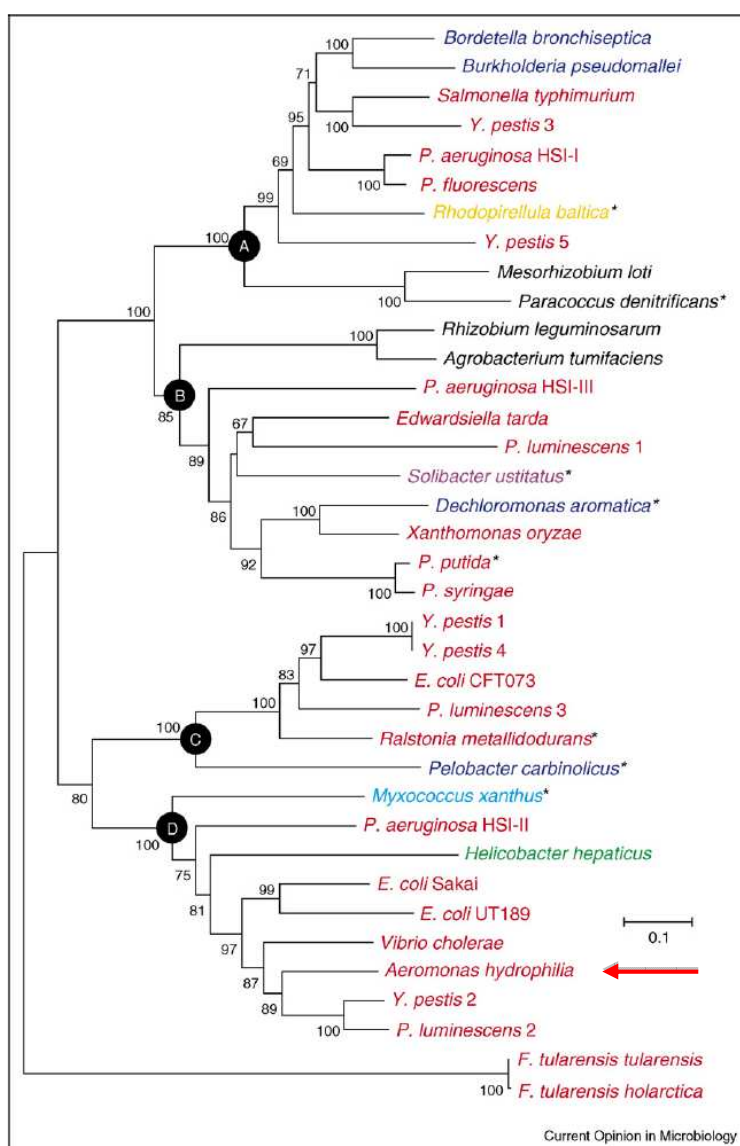


El Sistema de Secreción tipo 4 (T4SS) es el único de los sistemas de secreción capaz de transportar además de proteínas ADN, lo que le confiere un papel homólogo al sistema de conjugación bacteriano (Tseng y cols., 2009). Diversos organismos patógenos poseen T4SSs homólogos: *Agrobacterium tumefaciens* (VirB), *Bordetella pertussis* (PtI), *E. coli* (Tra), *Legionella pneumophila* (Dot), *Pseudomonas aeruginosa* (TraS/TraB) y *Helicobacter pylori* (CAG, ComB) pero sólo tienen una proteína en común VirB10 (TrbI) (Tseng y cols., 2009). Recientemente se ha descrito la presencia del T4SS en *A. culicicola* (Rangrez y cols., 2006), sinónimo de *A. veronii* (Huys y cols., 2005), y *A. caviae* (Rhodes y cols., 2004) codificado en ambos casos en un plásmido, así como el gen de la proteína CagA, factor de virulencia típico de *H. pylori* que es secretada por el T4SS (Datta y cols., 2003).

El Sistema de Secreción Tipo 6 (T6SS) o Vas (virulence-associated secretion) ha sido el último sistema de secreción en reconocerse, en el año 2006, y sin embargo, su existencia se sospechaba desde

hace una década (Bingle y cols., 2008). Al igual que los T3SS y T4SS es capaz de inyectar proteínas efectoras directamente en el citosol de la célula diana (**Figura 4**), aunque se ha identificado este sistema de secreción en organismos no patógenos ni simbiotes (Bingle y cols., 2008). De entre las proteínas efectoras secretadas las más conocidas son VgrG y Hcp.

Figura 6. Relaciones filogenéticas del T6SS a partir de las secuencias de las proteínas DUF770 y DUF877 concatenadas (Bingle y cols., 2008).



*Especies no patógenas ni simbiotes. *Alfaproteobacterias*: negro, *Betaproteobacterias*: azul, *Gammaproteobacterias*: rojo, *Deltaproteobacterias*: turquesa, *Epsilonproteobacterias*: verde, *Acidobacteria*: púrpura, *Planctomycetales*: amarillo.

La distribución del T6SS es mayoritaria en las proteobacterias. En *Aeromonas*, se detectó por primera vez en el año 2006 (**Figura 6**), con la secuenciación del genoma completo de *A. hydrophila* (Seshadri y cols., 2006) aunque se desconocía su funcionalidad. La secuenciación del genoma de *A.*

salmonicida reveló también la existencia de los genes del T6SS localizado tanto en el cromosoma, al igual que en *A. hydrophila*, como en plásmidos, aunque ninguno de los dos es funcional (Reith y cols., 2008). Asimismo se detectó en un plásmido la presencia de los genes de las proteínas efectoras VgrG y Hcp (Reith y cols., 2008). La funcionalidad de este sistema de secreción se ha demostrado en *A. hydrophila* (Suárez y cols., 2008). En este trabajo se puso de manifiesto la patogenicidad del T6SS y Hcp, mediante estudios *in vitro* e *in vivo* con mutantes, como la generación de anticuerpos frente a Hcp de *Aeromonas* (Suárez y cols., 2008).

1.3.3.3. Componentes estructurales

La adhesión de las bacterias a los tejidos del huésped es un paso crítico en la fase inicial de las infecciones causadas por muchos microorganismos. Las bacterias se adhieren a los tejidos y células del huésped y alteran sus mecanismos de defensa iniciando así la colonización (Westerlund y Korhonen, 1993).

Los componentes estructurales más estudiados en *Aeromonas* que se han involucrado en el proceso de adhesión y patogenicidad son los flagelos, pilis, cápsula, capa S, lipopolisacáridos (LPS) y las proteínas de la membrana externa (OMP).

Flagelos

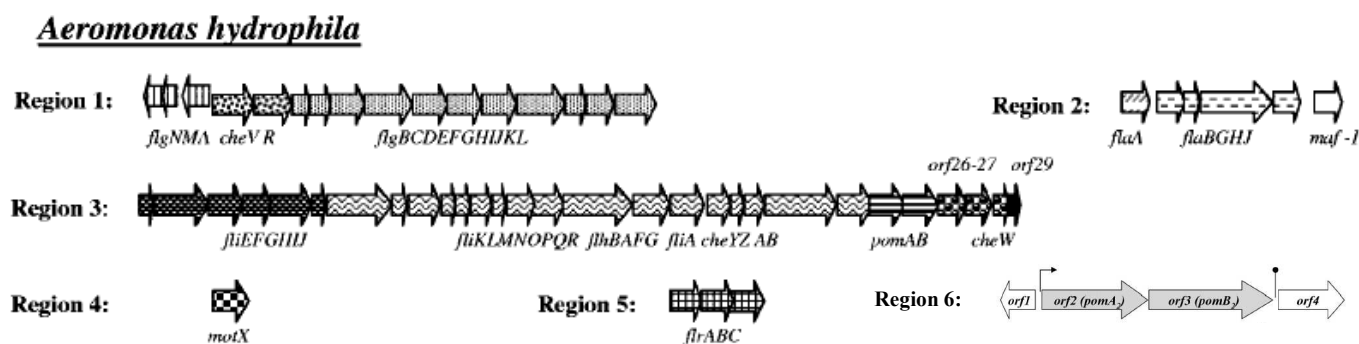
Los flagelos son orgánulos responsables de la movilidad bacteriana que se componen de un filamento, un gancho y un cuerpo basal. En algunos *Vibrio*, *Aeromonas* y en otras proteobacterias coexisten dos sistemas flagelares codificados por diferentes conjuntos de genes (Canals y cols., 2007). Los flagelos polares, constitutivos, se suelen utilizar cuando nadan en medios líquidos, mientras que los flagelos laterales, inducibles, entran en funcionamiento cuando los primeros experimentan una gran resistencia al giro, proporcionando movilidad en fluidos viscosos o sobre superficies. Además las flagelinas polares actúan como adhesinas mientras que las laterales sirven como factores de colonización (Kirov y cols., 2004). Existen cepas de *Aeromonas*, AH-3 y Sch3N, capaces de expresar estos dos tipos de flagelos (Canal y cols., 2007). Se han reconocido 2 genes, *flmA* y *flmB*, implicados en la glicosilación de ambos flagelos en las cepas AH-3 y Sch3N y en la cepa Sch3N, 3 genes más: *neuA-like*, *flmD* y *neuB-like*, localizados cerca de los genes que codifican para el flagelo polar, esenciales no sólo para la expresión de los flagelos sino que también se relacionan con los LPS (Canal y cols., 2007).

Diversos estudios han demostrado que la movilidad generada por los flagelos polares es imprescindible para la adhesión de las *Aeromonas* a su célula diana (Merino y cols., 1997; Rabaan y cols., 2001; Gryllos y cols., 2001).

Los genes que codifican para el flagelo polar de *Aeromonas* (**Figura 7**) se disponen en tándem en 6 regiones (Canals y cols., 2006b; Wilhelms y cols., 2009). La región 1 está constituida por 16 genes implicados en la biogénesis del flagelo, la región 2 contiene 6 genes implicados en la

glicosilación del flagelo, la región 3 contiene 29 genes la mayoría implicados en la estructura del cuerpo basal, la región 4 se compone de un único gen (*motX*) esencial para la funcionalidad del motor y la región 5 que contiene los genes reguladores (Canals y cols., 2006b). Recientemente se ha descrito la región 6 que contiene 2 genes adicionales (*pomA2* y *pomB2*) de la estructura del cuerpo basal (Wilhelms y cols., 2009). Esta misma distribución y organización, descrita en la cepa AH-3, se ha corroborado con la secuenciación del genoma completo de *A. hydrophila* (Seshadri y cols., 2006), así como en el genoma de *A. salmonicida* en el que se han observado mutaciones en los genes *flgL* (región 1), *maf1* (región 2) y *flrA* (región 5), lo que hace que no sea funcional, tal como se había definido la especie *A. salmonicida*, no móvil (Reith y cols., 2008).

Figura 7. Regiones genéticas del flagelo polar de *Aeromonas* en la cepa AH-3 (Canals y cols., 2006b; Wilhelms y cols., 2009).



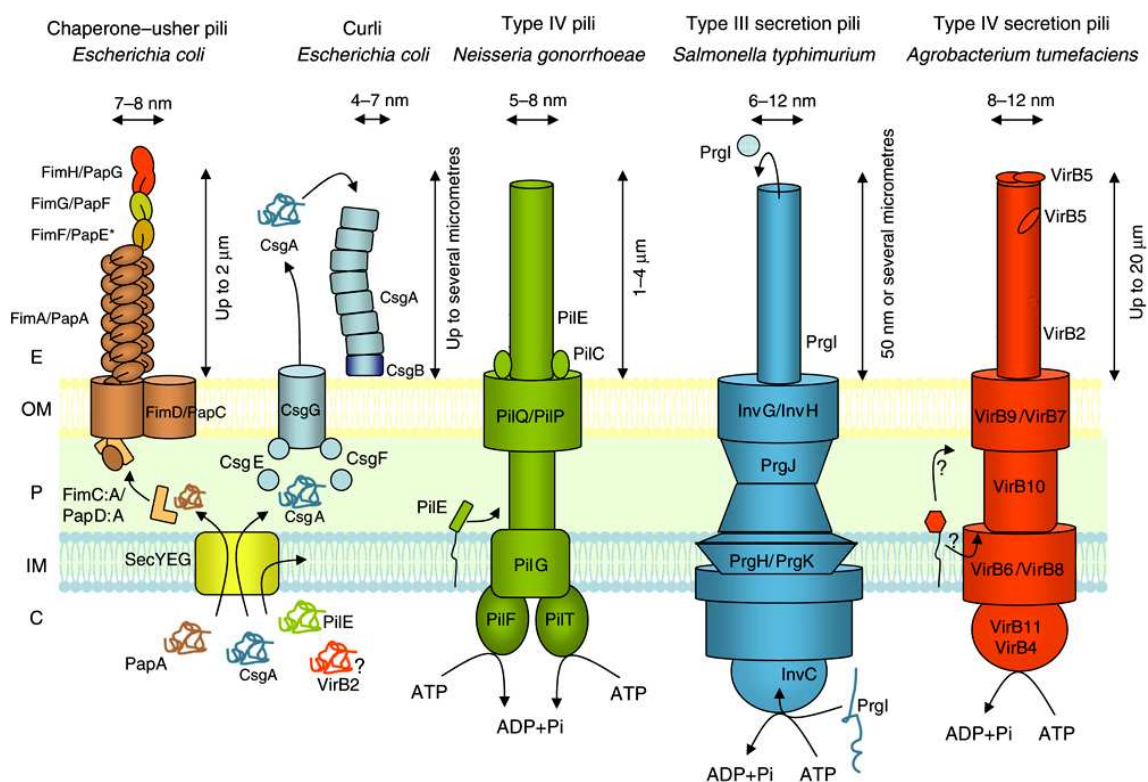
Aproximadamente el 60% de las *Aeromonas* poseen flagelos laterales (Seshadri y cols., 2006). En *A. hydrophila* AH-3 se han determinado 38 genes que codifican para los flagelos laterales (Canals y cols., 2006a) pero dichos genes no existen en la cepa tipo de esta especie (Seshadri y cols., 2006). Aunque se han detectado la presencia de genes que codifican para el flagelo lateral (*lafA-U*) en *A. salmonicida* (Merino y cols., 2003; Reith y cols., 2008) diversas mutaciones en los genes *lafA* y *lfgD* hacen que no sean funcionales (Reith y cols., 2008). Se ha demostrado que los flagelos laterales son esenciales para la adherencia a células epiteliales humanas y la formación de biofilms a partir de estudios con mutaciones en los genes *lafA1*, *lafA2*, *fliU* o *lafT* (Gavín y cols., 2002).

Pilis

Los pilis son estructuras que al igual que los flagelos tienen función de adherencia a otras bacterias o a las células del huésped. Estas estructuras se forman a partir de subunidades proteicas, llamadas pilinas, y pueden ser diferenciadas del flagelo porque tienen un diámetro menor (3-8 nm frente a 15-20 nm de los flagelos) y normalmente no presentan una estructura enrollada (Murray y cols., 2002). En las bacterias Gram negativas existen 4 clases principales de pilis (**Figura 8**) en función

de la vía de ensamblamiento: por la vía chaperonas-asociada o pili CU (*chaperone-usher*), pili tipo VI, pili curli y por la vía alternativa a la CU o pilis de la familia CS1 (Proft y Baker, 2009). Los pili CU incluyen a los pili tipo I, los pilis P, la familia de adhesinas Afa/Dr así como otras estructuras de adhesión. En este grupo los pilis se constituyen por homopolímeros o heteropolímeros de pilina que son secretados por la vía general al espacio periplásmico y se unen específicamente a una chaperona, el complejo es secretado al exterior para el ensamblaje del pili. Se ha detectado la existencia de pilis tipo I en *Aeromonas* tras la secuenciación de los genomas de *A. hydrophila* y *A. salmonicida*, existiendo un operón completo e intacto (Seshadri y cols., 2006; Reith y cols., 2008).

Figura 8. Pilis y su mecanismo de ensamblaje en bacterias Gram negativas (Frozes y cols., 2008).



E, espacio extracelular; OM, membrana externa; P, periplasma; IM, membrana interna; C, protoplasma.

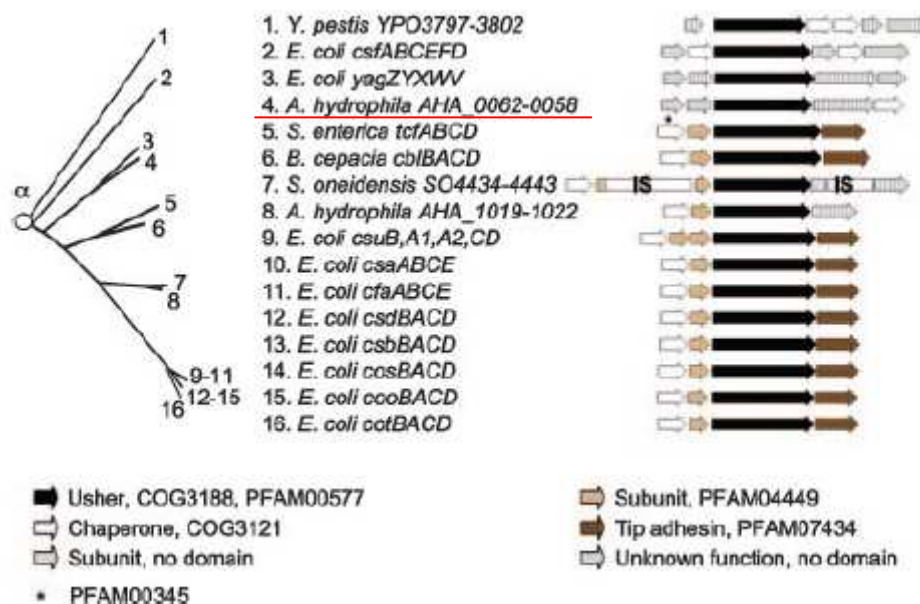
Los pili tipo IV son producidos por diversos patógenos humanos como *Neisseria gonorrhoeae*, *N. meningitidis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Vibrio cholerae*, *S. enterica*, *Legionella pneumophila* y *E. coli* enteropatógenas (EPEC) e involucrados en la auto-agregación, adhesión, movilidad “*twitching*”, formación de biofilm o invasión de la célula diana (Frozes y cols., 2008). Se distinguen dos grupos principales de pilis tipo IV, a y b, en función de las pilinas y su maduración (Proft y Baker, 2009; Frozes y cols., 2008). En *Aeromonas*, dentro del grupo de los pili IVa se han definido varias familias i.e. *tap*, *flp-like* y *msh* (Seshadri y cols., 2006; Reith y cols., 2008; Boyd y cols., 2008). Aunque en *Aeromonas* sólo la relación entre el pili tipo IV y la enteropatogenicidad ha

podido ser establecida (Graevenitz, 2007) se ha observado que los pilis Tap y Flp contribuyen en baja medida a la virulencia de *Aeromonas salmonicida* (Boy y cols., 2008).

No se ha encontrado ninguna referencia que indique la presencia de los pili curli (genes *csg*) en *Aeromonas*.

La familia CS1 de pilis comprende a CFA/I, CS2, CS4, CS14, CS17 Y CS19. Son también clasificados como vía alternativa a la CU, Clase 5 o α -fimbrias relacionadas con *E. coli* enterotóxicas (ETEC) que son las principales causantes de diarrea (Proft y Baker, 2009). Se han detectado genes de este grupo (**Figura 9**) en el genoma de la cepa tipo de *A. hydrophila* (Seshadri y cols., 2006; Nuccio y Bäumlér, 2007).

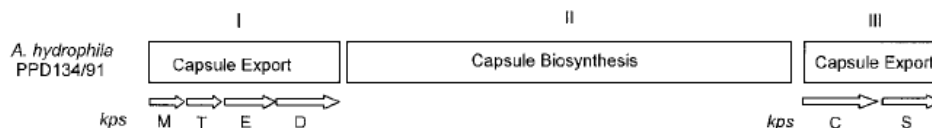
Figura 9. Relaciones filogenéticas de los operones de las α -fimbrias (Nuccio y Bäumlér, 2007).



Cápsula

La cápsula es una estructura formada por polisacáridos (disacáridos y trisacáridos) y polipéptidos que se encuentra recubriendo la membrana externa de la célula bacteriana. Ésta estructura, altamente hidratada, es importante para la supervivencia de la bacteria dentro del huésped ya que promueve la resistencia a la acción del complemento, puede actuar como barrera frente a moléculas hidrofóbicas tóxicas como los detergentes y puede ayudar a la adherencia a otras bacterias o a los tejidos del huésped (Murray y cols., 2002). La cápsula, además, se ha utilizado para la clasificación de grupos dentro de un taxón debido a sus propiedades antigénicas. En *A. hydrophila* PPD14/91 (**Figura 10**) se determinó que los genes de la cápsula se distribuían en tres regiones i.e. la RI que contiene 4 genes de proteínas transportadoras; la RII con 5 genes de la vía de síntesis de la cápsula y la RIII con 2 genes de proteínas transportadoras (Zhang y cols., 2007).

Figura 10. Organización genética del *cluster* de la cápsula de *A. hydrophila* PPD134/91 (Zhang y cols., 2007).



Capa S (Capa A)

La capa S es una capa paracrística que se encuentra, en algunas cepas, recubriendo la pared celular de la bacteria (Ishiguro y cols., 1986) protegiéndola de los mecanismos de defensa del huésped y por lo tanto facilitando la colonización del mismo (Munn y cols., 1982). La capa S está formada por subunidades proteicas (proteína A) que se disponen de forma tetragonal y que se unen a la superficie celular a través de los lipopolisacáridos (LPS) (Kay y Trust, 1991; Thomas y cols., 1992).

La capa S se ha detectado en especies de *Aeromonas* (*A. hydrophila*, *A. veronii* y *A. schubertii*) patógenas para humanos (Kokka y cols., 1991; 1992). En estas especies la capa S consiste en una única proteína ácida con un peso molecular de 52-53 kDa que se encuentra en el exterior de la pared celular (Dooley y cols., 1988; Kokka y cols., 1992) y que es codificada por el gen *ahsA* (Thomas y Trust, 1995).

No existen en el genoma de la cepa tipo de *A. hydrophila* los genes que codifican para la capa S (Seshadri y cols., 2006). Sin embargo, en el genoma de *A. salmonicida* A449 existen los genes *vapA* así como un sistema de secreción tipo 2 VapA-específico. Se ha observado que los genes que codifican la vía de síntesis y secreción de VapA en *A. salmonicida* poseen un contenido en G+C% inferior al del resto del genoma (Reith y cols., 2008).

Se ha demostrado que las cepas virulentas de *A. salmonicida* que presentaban la capa S son capaces de adherirse, invadir y sobrevivir dentro de los macrófagos de peces con una eficacia de 10 a 20 veces superior que las cepas de *A. salmonicida* sin capa S (Garduño y cols., 2000). Sin embargo en este estudio se indica que la capa S no es un factor de invasión sino una adhesina que ayuda, pero no media, la invasión en líneas no-fagocíticas de peces. Se sugirió que el gen *vapA* siempre está presente en las cepas de *A. salmonicida* (Gustafson y cols., 1992); sin embargo se ha demostrado que éste solo se encuentra en el 65-75% de las *A. salmonicida* virulentas (Austin y cols., 1998; Hoie y cols., 1999)

LPS (Lipopolisacáridos)

Los LPS consisten en tres partes estructurales (**Figura 11**): el lípido A, el polisacárido central y el antígeno O, siendo el lípido A el principal responsable de la actividad endotóxica de los LPS (Murray y cols., 2002). En el año 2001 y con base a los determinantes antigénicos únicos presentes en los LPS (antígeno O) se determinó que el género *Aeromonas* existían 96 serogrupos (Janda, 2001).

Se ha descrito la agrupación genética implicada en la biosíntesis del antígeno O en 2 cepas de *A. hydrophila*, PPD134/91, JCM3980 (Zhang y cols., 2007). El *cluster* contiene 17 genes, 7 codifican enzimas implicadas en la rutas biosintéticas de los precursores de la ramnosa y manosa, 6 genes de transferasas, 1 gen (*w wz*) implicado en la longitud del antígeno O y otro (*wzx*) implicado en translocación de proteínas a través de la membrana interna (Zhang y cols., 2007) de undecaprenil-pirofosfato (Marolda y cols., 2004).

Figura 11. Estructura y disposición de los LPS en la membrana externa de las bacterias Gram negativas.

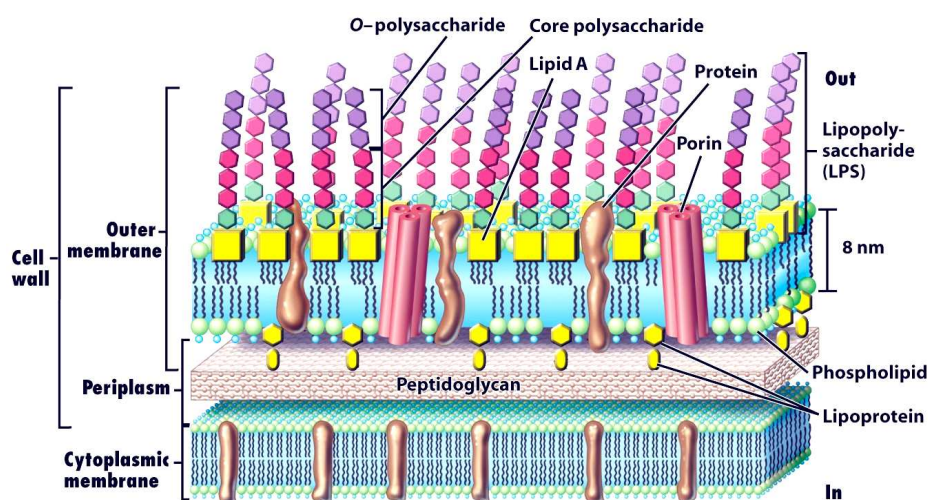
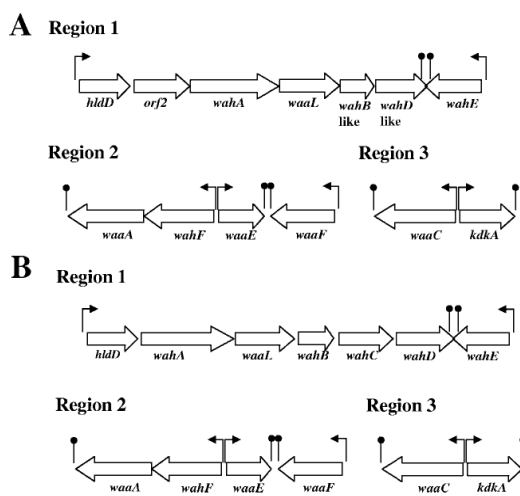


Figure 4-35a Brock Biology of Microorganisms 11/e
© 2006 Pearson Prentice Hall, Inc.

Los genes del polisacárido central han sido descritos recientemente en *A. hydrophila*, ATCC7966^T y AH-3, (Sheshadri y cols., 2006; Jiménez y cols., 2008) y *A. salmonicida* subsp. *salmonicida*, A449 y A450, (Reith y cols., 2008; Jiménez y cols., 2009) dispuestos en 3 regiones (**Figura 12**). Existe congruencia entre los genes definidos en las 2 *A. salmonicida* (Jiménez y cols., 2009) así como entre los genes de las 2 *A. hydrophila* (Jiménez y cols., 2008). Los genes de la RII y RIII de *A. hydrophila* AH-3 son idénticos a los de *A. salmonicida* A450, mientras que la RI, constituida por 7 genes, mostró 3 genes idénticos a los descritos en AH-3, 3 similares y uno único (Jiménez y cols., 2009)

Los LPS en *Aeromonas* son capaces de provocar una coagulación intravascular diseminada en individuos que presentan una septicemia (Ko y Chuang, 1995). Además se ha comprobado que el LPS que presentan las cepas con serogrupo O:34 juega un papel importante en la adherencia de la cepa a las células HEp-2 (Merino y cols., 1996). Sin embargo, un estudio realizado con mutantes para el LPS produjo una disminución de la DL₅₀ muy pequeña en comparación con la cepa salvaje, lo cual minimizaría el papel del LPS en la patogenicidad (Aguilar y cols., 1997).

Figura 12. Organización genética de las 3 regiones cromosómicas de los genes del polisacárido central del LPS de las cepas AH-3 (A) y A450 (B) (Jiménez y cols., 2009).



OMP (Proteínas de la membrana externa)

Las OMP son proteínas con dominios extracelulares de carácter hidrofóbico que se encuentran ancladas en la membrana lipídica externa de la célula. Hay poca información sobre las proteínas de membrana externa del género *Aeromonas*. La expresión de estas proteínas depende del medio de crecimiento así como de diversas características físico-químicas del mismo, sin embargo, recientemente se han demostrado diferencias entre los perfiles de OMP en cepas de *A. hydrophila* cuando son cultivadas *in vitro* e *in vivo*, siendo las proteínas que se expresan *in vivo* más numerosas y por tanto las que, deberían ser las dianas de las vacunas (Poobalane y cols., 2008). Se han caracterizado diversas OMP en *Aeromonas* y en la actualidad se cree que su función principal es la de la adherencia y aglutinación (Rocha de Souza y cols., 2008). En la **Tabla 7** se resumen las OMP que se conocen en *Aeromonas*.

Tabla 7. Características de las proteínas de membrana externa (OMP).

OMP	Tamaño del gen (pb)	Tamaño de la proteína		Especie (cepa)	Características	Conclusión del estudio
		AA	kDa			
Proteína I ¹	1337	445	47	<i>A. hydrophila</i> (Ah65) <i>A. salmonicida</i>	Maltoporina homóloga a la LamB de <i>E. coli</i>	Proteína formadora de canales
Proteína II ²	1055	351	39	<i>A. hydrophila</i> (Ah65) <i>A. hydrophila</i> (AH3)	Porina homóloga a las porinas OmpN, PhoE y OmpF de <i>E. coli</i>	Receptor C1q del complemento responsable de la activación de la ruta CPC Confiere sensibilidad al suero humano
Proteína III ³	-	-	36	<i>A. hydrophila</i> (Ah65)	Porina homóloga a la OmpC, PhoE y OmpF de <i>E. coli</i>	Proteína formadora de canales
Proteína IV ⁴	-	-	27	<i>A. hydrophila</i> (Ah65)	Porina no homóloga a otras OMP	Proteína formadora de canales
OmpAI ⁵	1019	339	33.5	<i>A. salmonicida</i> (NCIMB 1102)	Porina homóloga a la OmpA de la familia Enterobacteriaceae	Proteína formadora de canales
OmpAII ⁵	992	330	32.5	<i>A. salmonicida</i> (NCIMB 1102)	Porina homóloga a la OmpA de la familia Enterobacteriaceae	Proteína formadora de canales
- ⁶	-	-	43	<i>A. caviae</i> (Ae56, Ae391, Ae398)	Se une a la superficie celular de células HEP-2	Relacionada con la adherencia <i>in vitro</i> de <i>A. caviae</i>
Omp48 ⁷ (LamB-like)	1278	401	44	<i>A. veronii</i>	Porina no-específica	Proteína formadora de canales
Omp38 ⁸	1047	329	38	<i>A. veronii</i>	Porina no-específica	Proteína formadora de canales
LamB ⁹	1345	409	-	<i>A. hydrophila</i>	Porina específica de maltosa.	Proteína formadora de canales
OmpA ¹⁰	3877	671	30	<i>A. veronii</i>	-	-

¹Jeanteur y cols. (1992); ²Dodsworth y cols. (1993); ³Nogueras y cols. (2000); ⁴Janda (2001); ⁵Costello y cols. (1996); ⁶Rocha de Souza y cols. (2001); ⁷Vazquez-Juárez y cols., 2004; ⁸Vazquez-Juárez y cols., 2005; ⁹Upadahayaya y cols., 2007; ¹⁰Namba y cols., 2008.

1.3.4. Resistencia frente a los agentes antimicrobianos

Las especies móviles de *Aeromonas* son generalmente resistentes a la penicilina, ampicilina, carbenicilina y ticarcilina, sensibles a cefalosporinas de 2ª y 3ª generación, aminoglucósidos, carbapenem, cloranfenicol, tetraciclinas, T-S (Trimetoprim-sulfametoxazol o co-trimoxazol) y quinolonas, según Martin-Carnahan y Joseph en el 2005. Los respuestas frente a 19 antibióticos de 1051 cepas (660 cepas clínicas y 91 ambientales) evaluadas por distintos métodos obtenidos por diversos estudios recientes se incluyen en la **Tabla 8**. A pesar de mostrar resultados congruentes con los publicados anteriormente, se aprecian diferencias entre las respuestas de cepas de origen clínico y

ambiental (**Figura 13**). Las cepas de origen ambiental fueron más resistentes a la gentamicina, sulfamidas y cefalosporinas de 1ª y 3ª generación mientras que fueron más sensibles al resto de aminoglucósidos, imipenem, cefalosporinas de 2ª generación y penicilinas. Casi la totalidad de las cepas clínicas fueron resistentes a la ampicilina frente al escaso 60% de las cepas ambientales siendo los antibióticos que mostraron una mayor actividad, tanto en cepas clínicas como en ambientales, la amikacina, cefepime y ciprofloxacino. Asimismo se han detectado diferencias en la respuesta a antibióticos en cepas procedentes de diversas zonas geográficas, lo que indicaba que la resistencia a los diferentes antibióticos podría estar influenciada por factores geográficos (Ko y cols., 1996; Martin-Carnahan y Joseph, 2005) mientras que la aparición de nuevas resistencias en cepas ambientales se ha asociado a un elevado impacto humano (Goñi-Urriza y cols., 2000a,b) junto con la transmisión horizontal de los genes de resistencia codificados en elementos móviles (Martin-Carnahan y Joseph, 2005).

Tabla 8. Resistencia frente a agentes antimicrobianos de *Aeromonas*

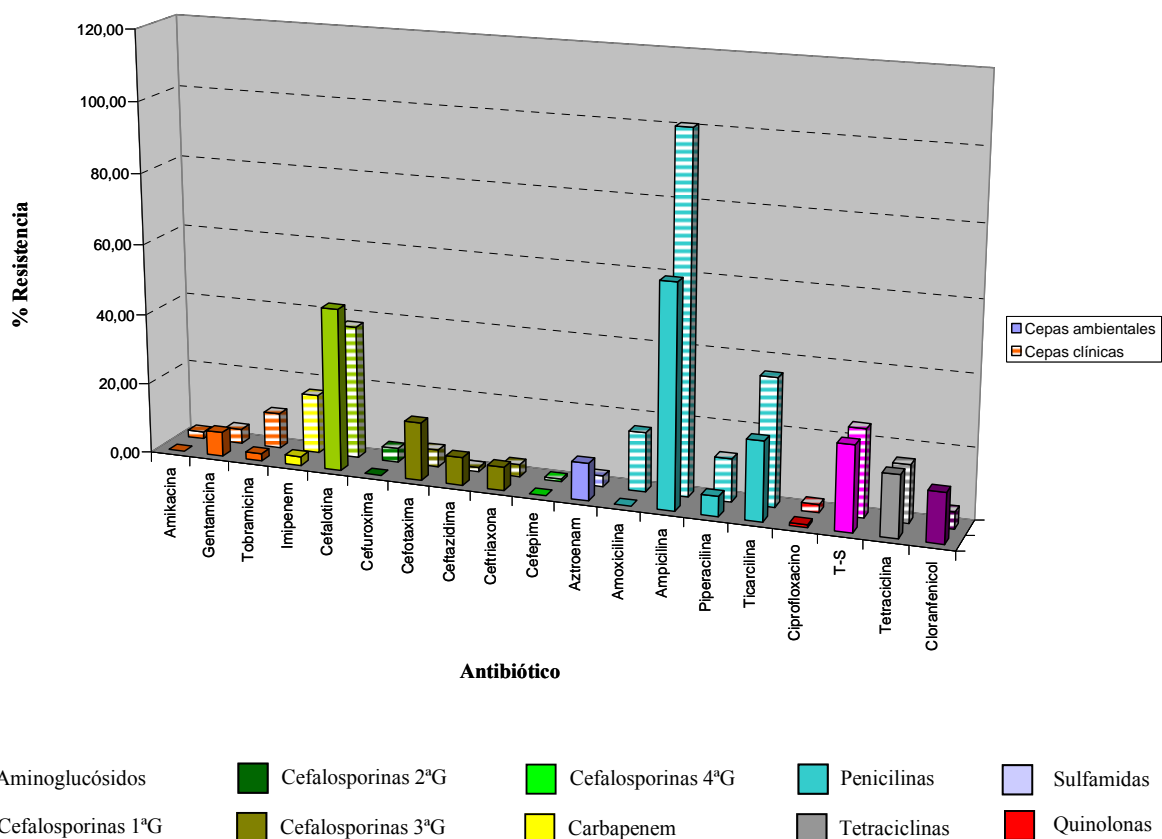
Antibiótico	Resistencia %												Total %
Amikacina	4	2	ND	0	ND	2	0	0	ND	0	ND	5	1.6
Gentamicina	12	2	1	1	ND	0	0	0	7	1	26	5	5
Tobramicina	25	16	7	16	ND	9	ND	0	ND	1	ND	0	9.25
Imipenem	9	33	0	0	ND	ND	36	0	24	6	4	8	12
Cefalotina	81	ND	93	ND	ND	64	29	ND	75	ND	87	ND	71.5
Cefuroxima	ND	2	ND	0	ND	ND	2	ND	11	ND	ND	11	5.2
Cefotaxima	19	0	4	0	0	0	2	4	11	26	30	0	8
Ceftazidima	6	0	ND	0	ND	0	2	3	ND	28	ND	0	4.87
Ceftriaxona	21	0	ND	ND	ND	0	ND	ND	2	26	ND	0	8.16
Cefepime	3	ND	ND	0	ND	ND	ND	ND	2	ND	ND	ND	1.6
Aztreonam	5	0	ND	0	ND	0	ND	ND	4	11	30	11	7.62
Amoxicilina	ND	ND	ND	ND	ND	97	ND	ND	ND	ND	ND	13	55
Ampicilina	99	72	99	100	100	100	ND	ND	98	55	91	97	91.1
Piperacilina	ND	16	ND	3	ND	1	11	ND	46	22	ND	3	14.56
Ticarcilina	70	47	87	64	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	56	64.8
Ciprofloxacino	1	0	2	0	0	0	0	0	14	1	0	0	1.5
T-S	41	0	42	19	12	2	18	12	70	14	26	ND	23.27
Tetraciclina	49	ND	14	ND	37	0	ND	16	ND	12	26	21	21.87
Cloranfenicol	ND	ND	2	ND	31	0	ND	1	ND	ND	52	ND	17.2
Estudio (n° cepas)	1 (234)	2 (56)	3 (138)	4 (43)	5 (16)	6 (130)	7 (45)	8 (83)	9 (116)	10 (147)	11 (23)	12 (20)	(1051)
Método	AD	MS	DD	C	DD	AD y DD	DD	DD	DD	DD	DD	MIC/ID	
Origen geográfico	Taiwán	USA	España y Francia	África, América latina y Asia	España	Australia	Taiwán	Brasil	Taiwán	Turquía	Brasil	Turquía	
Origen aislados	Clínicas	Clínicas	Agua de río	Clínicas	Diarrea del viajero	Clínicas	Sangre de bacteriemias	Clínicas y vegetales	Clínicas	Clínicas	Agua de consumo	Aguas consumo	Heces de ganado

T-S: Trimetoprim-Sulfametoxazol (Co-trimoxazole). AD: Difusión en agar, MS: Sistema MicroScan Walkaway 40, DD: Difusión en disco, C: Sistema MicroScan Combo Urine IS, MIC/ID: Sistema Septor Gram negative MIC/ID.

¹Ko y col., 1996; ²Overman y col., 1999; ³Goñi-Urriza y cols., 2000; ⁴Vila y col., 2002; ⁵Vila y col., 2003; ⁶Saccher y col., 2005; ⁷Tsai y col., 2006; ⁸Palú y col., 2006; ⁹Wu y col., 2007; ¹⁰Koksal y col., 2007; ¹¹Scouris y col., 2008; ¹²Ceylan y cols., 2009.

Aunque las *Aeromonas* se habían descrito como microorganismos sensibles a las cefalosporinas de tercera generación se ha visto que la resistencia a los antibióticos β -lactámicos se asocia a la síntesis β -lactamasas inducibles (Ko y cols, 2000) que hidrolizan irreversiblemente el enlace amina del anillo de los β -lactámicos (Sharma y cols., 2008). Las β -lactamasas se clasifican en función de los grupos de antibióticos que hidrolizan como penicilasas, cefalosporinasas y carbapenemasas, y en función de sus secuencias aminoacídicas en cuatro clases: A, B, C y D. Las metallo- β -lactamasas (M β LS) pertenecen a la clase B e inactivan todas las penicilinas. Dentro de esta clase existen tres subclases: B1, B2 y B3. ImiS es una B2M β LS identificada en un aislado clínico de *A. veronii* bv. sobria (Walsh y cols., 1998) que requiere zinc para su catálisis y es muy similar en su secuencia aminoacídica al resto de la subclase B2M β LS (Sharma y cols., 2007). La resistencia a las quinolonas ha sido atribuida a mutaciones en el gen *gyrA*, indicando que la girasa del ADN es la principal diana para estos antibióticos, además la presencia simultánea de una mutación en el gen *parC* (que codifica para la subunidad C de la topoisomerasa IV) aumenta la resistencia tanto a las quinolonas no fluoradas como a las fluoradas, indicando que la segunda diana para estos antibióticos es la topoisomerasa IV (Goñi-Urriza y cols., 2002).

Figura 13. Resistencia frente a agentes antimicrobianos con los datos de los estudios de la Tabla 8 que incluye *Aeromonas* clínicas, (estudios 1, 2, 4-7, 9 y 12, n= 660) y ambientales (estudios 3, 8, 10 y 11, n=391)



El género *Aeromonas* está constituido por bacterias Gram-negativas aisladas frecuentemente en el agua, alimentos, heces de pacientes con cuadros diarreicos e infecciones extraintestinales. Además, algunas de las especies del género también son patógenas de peces. Durante las últimas décadas, el interés en el estudio de las distintas especies de *Aeromonas* como microorganismos patógenos ha ido creciendo gradualmente siendo numerosos los investigadores, en campos muy diversos de la microbiología, que han de enfrentarse a la difícil labor de identificar dichas bacterias.

La mayoría de los laboratorios clínicos utilizan métodos miniaturizados semiautomáticos (API20E, Vitek GNI, BBL Crystal, MicroScan) u otras pruebas bioquímicas descritas en manuales de microbiología poco actualizados para la identificación de las especies de *Aeromonas*. Sin embargo, estos métodos bioquímicos conducen a identificaciones erróneas no sólo de las especies sino también de género. Por tanto, uno de los objetivos de esta tesis consistió en la identificación de aislados de origen clínico y ambiental mediante métodos moleculares. La aplicación de un protocolo de RFLP del ADNr 16S, publicado por nuestro grupo, permite la identificación de 14 de las 17 especies descritas en el género hasta el año 2000. Sin embargo, la aplicación rutinaria de este protocolo reveló que algunas cepas presentan patrones de RFLP atípicos y distintos a los descritos para las cepas tipo de las diferentes especies del género. En estos casos se hace necesaria la secuenciación del gen ARNr 16S y el gen *rpoD*. El primero permite establecer si las secuencias de este gen presentan microheterogeneidades, es decir, si presentan nucleótidos diferentes en una misma posición en las distintas copias del gen existentes en el genoma. Las secuencias del gen *rpoD* permiten una correcta identificación y establecer si se trata o no de una posible nueva especies. En *Aeromonas* se sabe que existen entre 9 y 10 copias del gen ARNr 16S, gracias a los 2 genomas de *Aeromonas* secuenciados en la actualidad (*A. hydrophila* y *A. salmonicida*) y a estudios de polimorfismo de longitud de la región ISR 16S-23S (*A. culicicola*). La existencia de microheterogeneidades en el gen del ARNr 16S se ha demostrado en algunas de las especies del género como *A. popoffii*, *A. media*, *A. molluscorum*, *A. veronii*, *A. bestiarum*, *A. salmonicida* y *A. allosaccharophila*. Sin embargo, la frecuencia, localización y composición de estas posiciones variables así como su impacto en la taxonomía de *Aeromonas* aún no ha sido investigado en profundidad.

Asimismo, otros autores también han publicado, en estos años, otros protocolos de RFLP del ADNr 16S para la identificación de las especies de *Aeromonas* más habituales en clínica. Sin embargo, no se ha evaluado si éstos son realmente específicos para las especies para las que se han propuesto.

En el año 2002 el Comité Internacional de Sistemática de Procariotas (ISCP) propuso que para la definición del taxón especie se realice un estudio polifásico, fenotípico y molecular, donde se incluya, además de las técnicas genéticas clásicas (hibridación ADN-ADN, secuenciación de al menos 1300 pb del gen ARNr 16S), el análisis de las secuencias de 5 genes *housekeeping*. Estos genes poseen una tasa de mutación mayor que el gen ARNr 16S permitiendo así discriminar especies estrechamente relacionadas. Sin embargo, hasta la fecha no existe ninguna descripción de nuevas especies de

Aeromonas que utilice 5 genes *housekeeping*, tal y como recomienda el ISCP. Nuestro grupo de investigación fue pionero en la introducción de los genes *housekeeping* (*gyrB* y *rpoD*) en el análisis filogenético del género *Aeromonas*. Desde entonces otros autores han ido publicando otros estudios utilizando diversos genes (*rpoB*, *dnaJ* y *recA*) que también han demostrado ser útiles para establecer las relaciones filogenéticas en el género. Por tanto, es importante utilizar estos genes a la hora de caracterizar posibles nuevas especies. La definición de nuevas especies debe incluir, como requisito indispensable, el grado de similitud de sus genomas con el de las especies más relacionadas filogenéticamente utilizando la técnica de hibridación ADN-ADN. Algunos de los métodos empleados para la hibridación requieren de aparatos específicos y costosos, siendo escasos los centros de referencia donde se realizan estos ensayos. Sin embargo, existen métodos de hibridación ADN-ADN que se pueden implantar en cualquier laboratorio de microbiología sin grandes inversiones, por lo que nos planteamos poner a punto esta técnica en nuestro laboratorio. Se realizó una estancia de tres semanas en la Universidad de Valencia, donde tenían implementada esta técnica, con el objeto de poder adquirir los conocimientos necesarios para reproducirla en nuestro laboratorio.

El aislamiento de *Aeromonas* asociadas a diversos procesos diarreicos es frecuente pero su papel como agente etiológico de infecciones gastrointestinales, ha sido cuestionado en numerosas ocasiones. Algunas especies del género han sido consideradas el agente causal del síndrome urémico hemolítico (SUH). Las toxinas relacionadas con el SUH son las toxinas Shiga, Verotoxinas o Verocitotoxinas tipo 1 (Stx1) y tipo 2 (Stx2). Hasta la fecha, estas toxinas y los genes que las codifican (*stx₁* y *stx₂*) han estado muy poco estudiados en *Aeromonas*. Existen sólo dos estudios que investigan la presencia de estos genes en *Aeromonas*. En uno de ellos se detectó la presencia del gen *stx₁* en cuatro cepas y se observó que dicha toxina estaba codificada en un plásmido. En el otro se detectó este gen en una cepa aislada de una muestra de agua. No obstante, en ninguno de estos 2 estudios se ha llegado a secuenciar el gen *stx₁* ni se ha logrado detectar el gen *stx₂*. La demostración de la presencia de estos genes en *Aeromonas* podría justificar su asociación con procesos diarreicos así como ratificar su capacidad de producir SUH.

A parte de los procesos diarreicos mencionados, *Aeromonas* es capaz de producir otros procesos infecciosos (septicemia, enfermedad pancreática o hepatobiliar, peritonitis, colangitis e infecciones nosocomiales). En la presente tesis, y en colaboración con los hospitales: Hospital *Clinic* de Barcelona, Royo Vilanova de Zaragoza y Hospital General de Guadalajara, se aporta un caso de colangitis con una posible inducción *in vivo* de resistencia antibiótica al imipenem así como diversos casos de infecciones de herida quirúrgica. Las cepas de *Aeromonas* aisladas en estos casos se han identificado genéticamente y se ha evaluado por PCR la existencia de los genes de diversos factores de virulencia en las mismas.

Con este trabajo se pretende contribuir al esclarecimiento de los aspectos mencionados anteriormente a través de los siguientes objetivos concretos:

1. Identificar genéticamente las cepas ambientales, aisladas en nuestro laboratorio, y las de origen clínico, recibidas de diversos hospitales, caracterizando los patrones de RFLP del gen ARNr 16S. Utilizar el gen *rpoD* para identificar las cepas que presentan un patrón de RFLP atípico y determinar cuales son las especies más prevalentes.
2. Investigar si otros protocolos de RFLP del ADNr 16S propuestos por otros autores permiten la identificación correcta de las especies para las que se han definido.
3. Investigar la microheterogeneidad del gen ARNr 16S en las cepas con patrón atípico y establecer su frecuencia y localización así como su repercusión en la taxonomía de *Aeromonas*.
4. Poner a punto las técnicas de hibridación ADN-ADN en nuestro laboratorio para poder establecer el grado de similitud de las cepas candidatas a pertenecer a nuevas líneas filogenéticas con sus especies más cercanas.
5. Caracterizar las cepas que potencialmente pertenezcan a nuevas especies de *Aeromonas* mediante un estudio polifásico que incluya la hibridación, un amplio análisis fenotípico y filogenético del gen ARNr 16S y de cinco genes *housekeeping* (*gyrB*, *rpoD*, *recA*, *dnaJ* y *gyrA*).
6. Identificar genéticamente una cepa de *Aeromonas* aislada de una paciente con síndrome urémico hemolítico (SUH) y establecer si posee los genes que codifican para factores de virulencia tales como la aerolisina, el Sistema de Secreción Tipo 3 y de la proteína efectora AexT secretada por este sistema.
7. Investigar si los genes *stx*₁ y *stx*₂ que codifican para las toxinas Shiga están presentes en cepas de *Aeromonas* de origen humano y si lo están, establecer su incidencia y similitud con los genes *stx*₁ y *stx*₂ de *E. coli* productoras de toxinas Shiga (STEC).
8. Establecer qué especies de *Aeromonas* se asocian a casos de infección de herida quirúrgica y determinar las características clínicas de estas infecciones.
9. Caracterizar genéticamente 9 aislados de *Aeromonas* de dos muestras de bilis de un paciente con colangitis y determinar las causas que generan la resistencia de algunos de estos aislados al imipenem.

3.1 Origen de las cepas

Todas las cepas identificadas en el presente estudio se detallan en los anexos adjuntos (Anexo1-4).

3.1.1. Cepas clínicas

Las cepas clínicas analizadas (**Anexo 1 y 3**) en la presente tesis doctoral fueron facilitadas por los siguientes hospitales: Hospital Universitario *Sant Joan* de Reus; Hospital Universitario Miguel Servet de Zaragoza, Hospital Royo Vilanova de Zaragoza, Hospital Universitario de Guadalajara, Hospital Universitario Nacional *Cheng Kung* de Tainan (Taiwán) e Instituto Oswaldo Cruz de Río de Janeiro (Brasil). Además, se utilizaron en diversos estudios cepas clínicas de la colección de esta Unidad de Microbiología recibidas previamente del Hospital Universitario *Vall d'Hebrón* y Hospital Universitario *Clínic*, de Barcelona, y cepas del Hospital Universitario *Sant Joan* de Reus.

3.1.2. Cepas animales

Las cepas de origen animal identificadas durante el presente estudio fueron aisladas principalmente de peces y con menor frecuencia de ganado bovino, ovejas, cerdos, grullas, patos, búhos y pitones (**Anexo 2**). Estas cepas fueron proporcionadas por el Dr. Ron A. Miller del *Center for Veterinary Medicine (CVM) of the Food and Drug Administration (FDA)* de USA, por la Dra. M^a Cristina Osiprandi de la *Universita Degli Studi di Parma* (Parma, Italia), por el Dr. Jens P. Teifke del Instituto Friedrich-Loeffler (Insel Riems, Alemania) así como por el Dr. Jesús Romalde de la Universidad de Santiago de Compostela (USC).

3.1.3. Cepas ambientales

Las cepas ambientales que se detallan en el **Anexo 4**, identificadas en el presente trabajo fueron aisladas de aguas procedentes principalmente de balsas de regadío, de la red de distribución de aguas del aeropuerto de Reus y del río Llobregat.

3.1.4. Cepas de colección y de referencia

En el presente estudio se han utilizado también cepas tipo de todas las especies de *Aeromonas* así como cepas de referencia procedentes de diferentes colecciones de cultivo que se especifican en cada estudio (**Anexos 5-9**). Las cepas pertenecientes a otros géneros se detallan en aquellos estudios en los que se han utilizado.

3.1.5. Resiembra y conservación de cepas

Las colonias aisladas a partir del medio selectivo ADA (Agar Dextrosa Ampicilina) así como las cepas recibidas de los diferentes hospitales, se sembraron en agar sangre de carnero (Biomedics) y se incubaron durante 24 h a 30°C, tal como recomiendan Toranzo y cols. (1986).

Conservación a corto plazo. Se sembraron las cepas en agar sangre de carnero, se cultivaron a 30°C durante 24 h y se mantuvieron a 4°C durante un periodo no superior a una semana.

Conservación a largo plazo

Ultra-congelación. Las cepas se inocularon en viales que contenían TSB (Difco) con un 15% de glicerol y se congelaron a -80°C.

Liofilización. Las cepas se inocularon en TSA (Agar Triptona Soja) o agar sangre en siembra masiva y se incubaron durante 24 h a 30°C para asegurar un mínimo de 10⁸ células viables por mililitro. Se recogió todo el cultivo con un asa de siembra y se mezcló en 3 ml de leche desnatada al 10% (crioprotector) previamente esterilizada. Se dispensaron 0.5 ml de la mezcla en viales de vidrio estériles de 1.5 ml y a continuación se congelaron a -45°C durante 1 h dentro del propio liofilizador (Advantage 2.0 Series; Virtis Company Gardiner). La sublimación se consiguió a -45°C, seguido de un vacío de 200 mTorr y el siguiente ciclo de liofilización: 4 h a -30°C, 4 h a -10°C, 5 h a 10°C y finalmente 5 h a 30°C. Una vez finalizado el proceso, se sellaron los viales en condiciones de vacío. El éxito de la liofilización se determinó comprobando la viabilidad del cultivo de varias de las muestras elegidas al azar.

3.2. Caracterización fenotípica

3.2.1. Cepas clínicas humanas y animales

Las cepas clínicas fueron identificadas en los diferentes centros de procedencia mediante los sistemas comercializados como API 20E o Vitek (Biomérieux) o con protocolos bioquímicos establecidos en los centros de origen.

3.2.2. Cepas ambientales

Las cepas de origen ambiental se identificaron como *Aeromonas* en base a pruebas características del género como la formación de colonias amarillas en ADA, el crecimiento al 0 y 3% de cloruro sódico pero no al 6% (en TSB), la respuesta positiva a las pruebas de la oxidasa (Difco) y la catalasa, la reducción de nitratos a nitritos así como la resistencia al factor vibriostático O129 (150 µg de 2,4-Diamino-6,7-di-iso-propilpteridina fosfato por disco, Oxoid).

3.2.3. Cepas pertenecientes a nuevas líneas filogenéticas

En los **estudios 4.1.5.-4.2.9**, una vez se confirmaron las cepas como *Aeromonas* y se identificaron como líneas filogenéticas independientes mediante diversos métodos moleculares (secuenciación de distintos genes *housekeeping*, DDH), se sometieron a un extenso análisis bioquímico. En dicho análisis se incluyeron tanto un control positivo como negativo para cada una de

las pruebas. Estos controles pertenecían a cepas tipo de una especie reconocida de *Aeromonas* y/o de *Vibrio* procedentes de las diversas colecciones de cultivo.

La caracterización bioquímica de los aislados se realizó en base a las siguientes pruebas. La motilidad se evaluó en medio semisólido (sulfuro-indol-motilidad = SIM, Difco) y por observación al microscopio óptico mientras que la presencia de *swarming* se determinó en agar específico (agar swarm). También se evaluaron la producción de ácido sulfhídrico (H₂S) a partir de la cisteína (SIM), la producción de Indol (Difco), la reacción de Voges-Proskauer (caldo RM/VP con reactivos de VP de Barritt), la producción de gas de la glucosa así como la producción de las enzimas arginina-dihidrolasa, ornitina- y lisina-decarboxilasas (en medio Møller), gelatinasa, ureasa, DNAsa, elastasa y β -galactosidasa. Además, se valoró la fermentación/oxidación de la sacarosa, L-arabinosa, celobiosa, m-inositol, lactosa, D-manitol, D-rafinosa, L-ramnosa, salicina, D-sorbitol y glicerol en medio líquido con rojo de metilo como indicador de pH (pH ácido color amarillo, pH básico color rojo). Todos los hidratos de carbono así como el glicerol se prepararon al 1% en el medio final excepto la salicina que se preparó al 0.5% (Borrell y cols., 1998). Todas las pruebas se realizaron por triplicado. La mayoría de estos tests se evaluaron también con los kits comerciales API20E y API20NE (Biomérieux), siguiendo las recomendaciones del fabricante. Con dichos kits se evaluó además, la capacidad de utilización de la D-manosa, D-glucosa, N-acetilglucosamina, D-maltosa, gluconato potásico, ácido málico, L-arabinosa, D-manitol, ácido cáprico, ácido adípico, ácido fenilacético y citrato trisódico como únicas fuentes de carbono y energía. El kit comercial API50CH (Biomérieux) se utilizó para evaluar la producción de ácido del glicerol, D-ribosa, D-galactosa, D-glucosa, D-fructosa, D-manosa, D-lactosa, N-acetilglucosamina, salicina, D-celobiosa, D-maltosa, D-sacarosa, D-trealosa, almidón, glucógeno, gentiobiosa, gluconato potásico, eritritol, L- y D-arabinosa, L- y D-xilosa, D-adonitol, metil- β -D-xilopiranosas, L-sorbosa, L-ramnosa, dulcitol, inositol, D-manitol, D-sorbitol, metil- α -D-manopiranosido, metil- α -D-glucopiranosido, amigdalina, arbutina, esculina, D-melobiosa, inulina, D-melezitosa, D-rafinosa, xilitol, D-turanosa, D-lixosa, D-tagatosa, L- y D-fucosa, L- y D-arabitol, 2-cetogluconato potásico y del 5-cetogluconato potásico. Las pruebas bioquímicas se incubaron a las temperaturas óptimas de crecimiento, generalmente a 30°C en los casos de cepas ambientales, y adicionalmente a 36°C en las cepas de origen clínico. Todas las respuestas se evaluaron cada 24 h durante 7 días. A partir de las respuestas obtenidas se seleccionaron las pruebas características que permitían la diferenciación de cepas representantes de nuevas líneas filogenéticas del resto de las especies descritas en el género, evaluándose también estas pruebas en las cepas tipo de cada una de las especies. Asimismo se valoró la producción de pigmento marrón a temperatura ambiente y a 30°C en TSA (Austin y cols., 1998), realizándose lecturas cada 24 h durante 5 días. El rango de temperatura y temperatura óptima así como el rango de pH y pH óptimo de crecimiento se determinaron en medio líquido (TSB) mediante densidad óptica a 450 nm. Se preparó un cultivo líquido de TSB (1 colonia por 10 ml de TSB) y se realizaron alícuotas de 2 ml por tubo que se colocaron en nevera, a 4°C, y en

estufas a las temperaturas de 10, 15, 20, 25, 30, 37, 40, 45 y 50° C. La evaluación del pH óptimo de crecimiento se realizó añadiendo 0,5 ml del mismo cultivo líquido a 2 ml de TSB a los que se les había ajustado el pH a valores de 5, 6, 6.2, 6.4, 6.6, 6.8, 7.0, 7.2, 7.4, 7.6, 7.8, 8 y 9, y fueron incubados a la temperatura óptima de crecimiento. Las lecturas de absorbancia se realizaron transcurridas 24 y 48 h.

La determinación de la morfología, tamaño celular y presencia de flagelo, se realizó al microscopio electrónico de barrido y al microscopio electrónico de transmisión. La preparación de las muestras y su observación microscópica se realizaron en el Servicio de Microscopía de la Universidad Rovira i Virgili. Para la preparación de estas muestras las cepas fueron sembradas en TSA y se incubaron durante 24 h a 30°C.

Microscopía electrónica de barrido: se recortaron fragmentos de agar que contenía colonias de una placa de TSA y se fijaron con glutaraldehído al 2,5% (v/v) en tampón fosfato 0.1 M a temperatura ambiente durante 2 h y posteriormente con tetróxido de osmio al 1% (v/v) en H₂O destilada durante 4 h. Tras 3 lavados con agua destilada, las muestras se deshidrataron con etanol a concentraciones crecientes (30, 50, 70%) y finalmente con etanol absoluto realizándose a continuación la técnica del punto crítico. Tras el montaje y metalización, las muestras se observaron en un microscopio JEOL JSM 6400.

Microscopía electrónica de transmisión (Tinción negativa): Se tomó una muestra de un cultivo en TSA y se resuspendió en una solución de ácido fosfotúngstico al 2% y pH 6.9. Tras una breve agitación en el vórtex se depositó cuidadosamente una gota de la mezcla sobre una rejilla recubierta con Formvar y carbón. Transcurrido un minuto se eliminó el exceso de muestra de la rejilla y una vez seca la preparación, las células se observaron en un microscopio JEOL 1011.

3.3. Caracterización genética

Todas las cepas, tanto las recibidas de otros centros como las aisladas en nuestro laboratorio, se confirmaron a nivel de género mediante la PCR específica para *Aeromonas* descrita por Chacón y cols. (2002).

3.3.1. Extracción de ADN

El ADN se extrajo con la matriz comercial InstaGene Matrix (BioRad) para la amplificación de los genes del ARNr 16S, *housekeeping* y los que codifican para factores de virulencia. Se tomaba una colonia y se resuspendía en un eppendorf que contenía 1 ml de H₂O_mQ. Tras centrifugar 1 min a 12000 rpm se eliminaba el sobrenadante, seguidamente se añadían 200 µl de la matriz comercial que se incubaban entre 20-25 min a 56°C. A continuación se transferían los tubos eppendorf a un baño a 100°C, donde se mantenían 8 min, y se centrifugaban 5 min a 13000 rpm. Se transferían 100-150 µl del sobrenadante que contiene el ADN, a un tubo limpio y se conservaba a -20°C.

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

Tanto las cepas aisladas en nuestro laboratorio como aquellas recibidas de distintos autores y centros, fueron caracterizadas en base a su patrón de RFLP del gen ARNr 16S utilizando el método desarrollado por Borrell y cols. (1997) y ampliado posteriormente por Figueras y cols. (2000a). La amplificación de 1503 pb del ADNr 16S se realizó utilizando los cebadores y condiciones descritos por Martínez-Murcia y cols. (1992a) y se comprobó cargando 5 µl del producto en geles de agarosa al 1% en todos los estudios en los que se ha secuenciado o digerido este gen.

En el primer paso de este protocolo (Figura 14) y tras la digestión de los 1503 pb del gen ARNr 16S con las endonucleasas *AluI* y *MboI*, se generaban patrones especie-específico para 10 de las especies del género (Borrell y cols., 1987; Figueras y cols., 2000a). Las especies *A. salmonicida*, *A. bestiarum*, *A. encheleia*, *A. popoffii* eran identificadas mediante digestiones con diversos enzimas de restricción siguiendo el protocolo de Figueras y cols. (2000a). Los patrones atípicos, diferentes a los esperados para especies conocidas del género *Aeromonas*, se analizaron cuidadosamente, en especial en los estudios 4.1.3, 4.1.4 y 4.1.6-4.1.9.

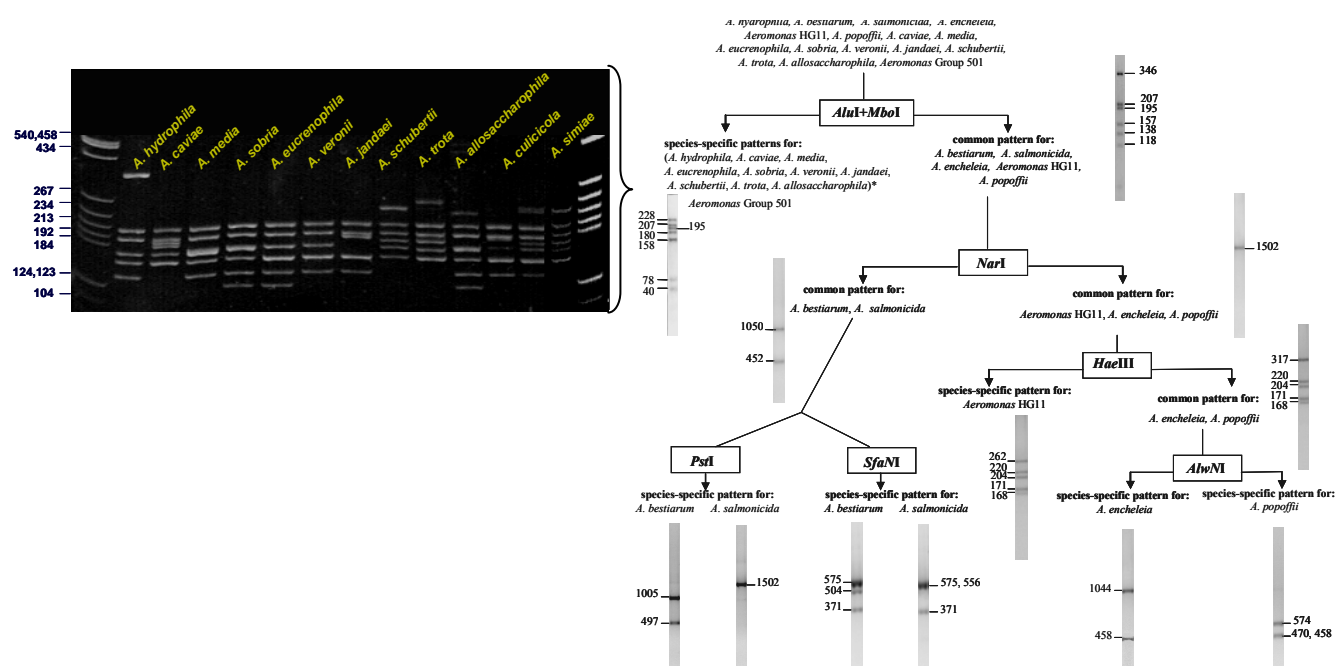


Figura 14. Patrones de RFLP del ADNr 16S obtenidos siguiendo el protocolo de Figueras y cols., 2000a para las 14 especies del género *Aeromonas*. Modificado de Borrell y cols. (1997) y Figueras y cols. (2000a).

3.3.3. Secuenciación

La reacción de secuenciación se realizó para todos los genes en un volumen final de 10 µl que contenían 100-200 ng (2 µl) del correspondiente producto de PCR purificado, 1 µl (3.2 pmol) del cebador y 7 µl de la mezcla constituida por BigDye: 4 µl, Sequencing Buffer: 2 µl y H₂O: 8 µl, de ABI PRISM® BigDye™ Terminators vers. 2.0 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems). Las condiciones para cada ciclo de reacción programada fueron: 94°C, 5 min (desnaturalización); seguida de 25 ciclos de 96°C, 10 s (desnaturalización); 50°C, 5 s (hibridación); 60°C, 4 min (extensión). El producto de cada reacción fue precipitado con etanol y analizado en un secuenciador automático ABI PRISM® 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) de acuerdo con las recomendaciones del fabricante.

3.3.3.1. Gen ARN ribosómico 16S

Se secuenció el gen del ARNr 16S, 1503 pb, en las cepas que mostraron un patrón de RFLP atípico así como en las cepas representantes de potenciales nuevas líneas filogenéticas de *Aeromonas*. Una vez comprobada la amplificación del gen, el resto del producto se purificó para la secuenciación con un kit comercial, GFX™ PCR DNA - Gel Band Purification Kit (Amersham Pharmacia Biotech), siguiendo las instrucciones del fabricante. Para la secuenciación se utilizaron 10 cebadores diferentes (**Tabla 9**) con el fin de obtener suficientes cromatogramas solapados de las regiones sospechosas de poseer microheterogeneidades y poder así comprobar la dualidad de la señal en cada uno de ellos.

Tabla 9. Cebadores utilizados en la amplificación y secuenciación del ADNr 16S de *Aeromonas*.

Cebador	Secuencia	Posición ¹
Anti 1	5' AGA GTT TGA TCA TGG CTC AG 3'	8-27
16SseqF1	5' AGC TGG TCT GAG AGG ATG AT 3'	288-308
16SseqF2	5' ACG CAG GCG GTT GGA TAA GT 3'	578-598
16SseqF3	5' TGG GGA GTA CGG CCG CAA GG 3'	884-904
16SseqF4	5' GGT GAT AAA CCG GAG GAA GG 3'	1164-1182
S	5' GGT TAC CTT GTT ACG ACT T 3'	1509-1491
seqR1	5' TTG CAG CCC TCT GTA CGC GC 3'	1262-1242
seqR2	5' TCC AGA CAT GTC AAG GCC AG 3'	1005-985
seqR3	5' ATC CTG TTT GCT CCC CAC GC 3'	782-762
seqR4	5' ATT CCC CAC TGC TGC CTC CC 3'	366-346

¹Localización según su posición en *Escherichia coli* (Brosius, 1978)

La detección y marcaje de las microheterogeneidades se realizó visualmete mediante el análisis cuidadoso de los electroferogramas y utilizando el código de la IUPAC para marcar y revelar tanto la mutación como la posición correspondiente en la secuencia consenso generada (**Figura 15**).

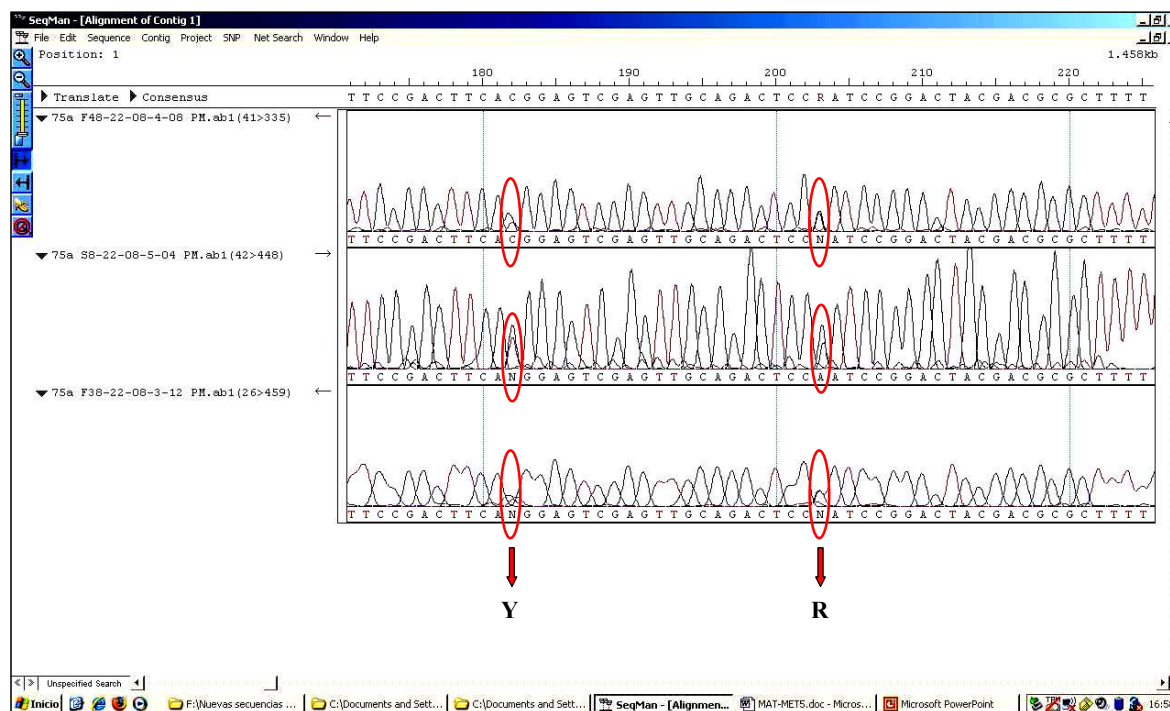


Figura 15. Detección y marcaje del polimorfismo interoperónico del ADNr 16S en *Aeromonas*.

3.3.3.2. Gen *rpoD*

La amplificación para la secuenciación de 820 pb del gen *rpoD* (factor sigma de la polimerasa de ARN) se realizó con los cebadores y condiciones descritos previamente por nuestro grupo (Soler y cols., 2004) mediante la técnica del *Touch Down PCR* combinada con la técnica del *Hot Start PCR*. Se obtuvieron secuencias del gen *rpoD* en los estudios 4.1.3-4.1.9, 4.2.1 y 4.2.4.

3.3.3.3. Genes *gyrB*, *gyrA* y *dnaJ*

Se secuenciaron los genes *housekeeping* *gyrB*, *gyrA* y *dnaJ* en los estudios de descripción de nuevas especies de *Aeromonas*, estudios 4.1.5-4.1.9, cuyas secuencias se concatenaron con las de los genes *rpoD* y *recA* en un estudio de *Multi-Locus-Phylogenetic-Analysis* (3684 pb) llevado a cabo en el *Molecular Diagnostic Center* (Martínez-Murcia y cols., en revisión). La secuenciación del gen *gyrB* (subunidad β de la girasa de ADN) se realizó siguiendo el protocolo descrito por Yáñez y cols. (2003), también en el *Molecular Diagnostic Center* y fue asimismo utilizada en el estudio 4.2.1.

3.3.3.4. Gen *recA*

Las secuencias del gen *recA* se realizaron en los estudios polifásicos de descripción de nuevas especies de *Aeromonas* (4.1.6-4.1.9), tal y como se ha mencionado. Aunque en la actualidad existe un protocolo para la secuenciación de 272 pb del gen *recA* en *Aeromonas* (Sepe y cols., 2008), nuestro grupo trabaja en el desarrollo del MLPA desde el año 2003 (Yáñez y cols., 2003). Uno de los genes del MLPA es el gen *recA* que codifica una proteína requerida en la reparación del ADN por recombinación homóloga. El estudio de este gen comenzó en nuestro laboratorio en el año 2004 a partir de la única secuencia pública disponible en aquella época, U8368, de 1212 pb perteneciente a *A. salmonicida* A449 (Umelo y cols., 1996). A partir de esta secuencia se diseñaron los cebadores *recAF* y *recAR*, que amplificaban 720 pb e incluían una región de la que se había demostrado su utilidad en la taxonomía del género *Vibrio* (Thompson y cols., 2004). La amplificación del gen *recA* se realizó en un volumen final de 50 µl que contenía 1 µg de ADN genómico, 1X tampón (20 mM Tris-HCl pH8.4, 50 mM KCl), 1 µM de cebador *recAF* (5'-VCTVGGTCARATTGAAAAGC-3'), 1 µM del cebador *recAR* (5'-VTCGCCGTTATAGCTGTACC-3'), 3 mM MgCl₂, 0.3 mM dNTP's y 2.5 U *Taq* polimerasa (Invitrogen; Barcelona, España). Las condiciones para cada ciclo de reacción programada fueron 94°C, 5 min de desnaturalización seguida de 35 ciclos de 94°C, 1 min (desnaturalización), 55°C, 1 min (hibridación); 72°C, 1 min (extensión); y finalmente una extensión a 72°C 5 min. La amplificación se realizó en un termociclador 2710 o 2720 Thermal Cycler (Applied Biosystems). Se comprobaba que el fragmento amplificado correspondía con el esperado, de unos 720 pb, mediante electroforesis en geles de agarosa al 1% de 5 µl del volumen de PCR. El resto del producto de PCR fue purificado para su secuenciación mediante el GFXTM PCR DNA - Gel Band Purification Kit (Amersham Pharmacia Biotech), siguiendo las instrucciones del fabricante. En el proceso de secuenciación se utilizaron 4 cebadores: 2 cebadores externos, los diseñados para el proceso de la amplificación, y 2 cebadores internos (*recAseqF1*: 5'-GAAATCGAAGGSGAGATG^{3'}; *recAseqR1*: 5'-GACATCAGACGRGCCTGC^{3'}), tal y como se ha detallado al comienzo del apartado 3.3.3.

3.3.4. Análisis de las secuencias y construcción de los árboles filogenéticos

Las secuencias obtenidas fueron ensambladas con el programa informático AutoAssembler vers. 1.40 (Applied Biosystems) o DNASTAR SeqMan (Lasergene) y alineadas mediante el programa informático CLUSTAL W (Thompson y cols., 1994). Los dendogramas se construyeron a partir de las secuencias alineadas utilizando el programa informático Mega (Molecular Evolutionary Genetics Análisis) vers. 3 (Kumar y cols., 2004) y vers. 4 (Tamura y cols., 2007). El análisis filogenético se realizó con el método de Neighbor-Joining (Saitou y Nei, 1987), y el método de Máxima-Parsimonia en los estudios 4.1.6-4.1.9, utilizando el modelo de Kimura- 2 parámetros (Kimura, 1980). La consistencia del análisis se evaluó con el test de *bootstrap* con 1000 repeticiones (Felsenstein, 1985).

3.3.5. Hibridación ADN-ADN

La hibridación ADN-ADN (DDH) fue la técnica empleada para determinar la similitud entre los genomas de 2 microorganismos en los estudios de descripción de nuevas especies de *Aeromonas* (4.1.6-4.1.9) utilizando el método descrito por Lind y Ursing (1986), con las modificaciones propuestas por Ziemke y cols. (1998) y Bouchotroch y cols. (2001). El proceso se desarrolló en 6 pasos:

- Extracción del ADN
- Marcaje del ADN
- Reacción de hibridación
- Separación de cadenas sencillas y dobles
- Detección del ADN marcado
- Análisis de los datos y cálculo de resultados

Extracción del ADN

Para la extracción del ADN se utilizó el método descrito por Marmur (1961) con algunas modificaciones que se indican a continuación. Las cepas a estudiar se inocularon en TSA en siembra masiva por triplicado y se dejaron crecer 24-48 h. El primer día del proceso de extracción del ADN, se transfería la biomasa a un tubo de 50 ml que contenía 10 ml de tampón Salino-EDTA. Las células se resuspendían en esta solución, se añadía lisozima (10 mg) y se incubaba 10 min a 37°C. Seguidamente, se añadían 1.5 ml de una solución de SDS al 25% y 3 ml de NaCl 5 M, se agitaba suavemente y se adicionaban 10 µl de proteinasa K (Sigma) (10 mg/ml). La mezcla se incubaba 1 h a 60°C. Transcurrido este tiempo, se añadían 10 ml de una mezcla 24:1 de cloroformo (9.6 ml): alcohol isoamílico (0.4 ml) y se mezclaba por inversión para obtener una suspensión homogénea. El volumen total se distribuía equitativamente en tubos eppendorf de 2 ml y se centrifugaba durante 20 min a 8000 rpm. El sobrenadante generado en cada eppendorf se transfería a un único tubo de 50 ml con cuidado de no arrastrar la interfase. El ADN se precipitaba añadiendo 0,56 partes del volumen transferido de isopropanol (que se almacenaba a -20°C) y 1/9 partes de ese mismo volumen de acetato de sodio 3 M frío (4°C) (Tabla 10), dejándolos resbalar suavemente por la pared del tubo.

Tabla 10. Volúmenes de ADN, isopropanol y acetato de sodio utilizados en la precipitación del ADN. Tabla elaborada a partir de los datos del protocolo de Marmur (1961).

Vol. de ADN transferido (ml)	15	7	2
Vol. Isopropanol (ml)	8,4	3,92	1,12
Vol. de Acetato de sodio (ml)	1,6	0,77	0,213

El ADN precipitado se enrollaba en la punta de una pipeta Pasteur de vidrio estéril (**Figura 16**) y así se transfería a un tubo de 50 ml donde se lavaba este ADN, aún enrollado en la varilla, con concentraciones crecientes de etanol: dos lavados con etanol de 70% y un lavado final con etanol 100%. El alcohol se eliminaba por decantación y se dejaba secar el ADN a temperatura ambiente o en un termobloque a 40°C. Finalmente la varilla se transfería a un tubo que contenía 2 ml de SSC 0,1X y se almacenaba a 4°C hasta que el ADN se resuspendía totalmente, generalmente transcurrían entre 24 o 72 h.



Una vez resuspendido el ADN, se adicionaban 220 µl de SSC 10X y 20 µl RNasa (Sigma) (10 mg/ml) a los 2 ml de SSC 0,1X. La mezcla se incubaba 1 h a 37 °C. Seguidamente se añadían 1.5 ml de SDS al 25% y 3 ml de NaCl 5 M, se agitaban suavemente y se mantenían 10 min a 60°C. A partir de este punto se continuaba igual que este mismo paso del primer día pero una vez se había secado el ADN, éste se resuspendía en agua miliQ estéril y no en SSC 0,1X.

Figura 16. ADN recogido con una varilla durante el proceso de extracción.

Marcaje del ADN

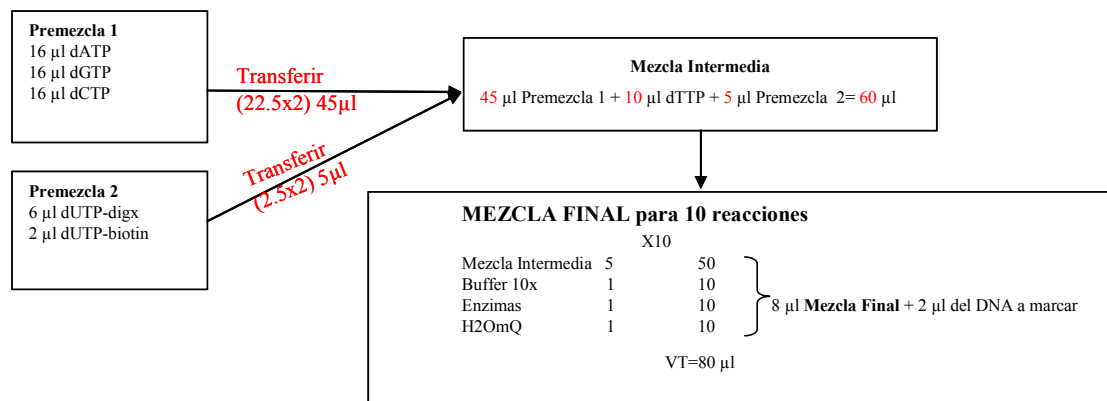
Para el marcaje del ADN se utilizó un kit comercial, Kit Nick Translation (Roche). A partir de los nucleótidos independientes proporcionados por el kit (dATP, dCTP, dGTP) se preparó una mezcla con igual concentración de todos ellos excepto de dTTP, cuya proporción era inferior (**Tabla 11**). La diferencia se compensó adicionando uracilo marcado con digoxigenina (Dig-11-dUTP, Roche) y biotina (Biotin-11-dUTP, Roche), responsables en sí del marcaje. La mezcla se preparaban siguiendo las instrucciones del fabricante según se ilustra en la **Tabla 11** y **Figura 17**.

Tabla 11. Preparación de las mezclas de marcaje del ADN en función del número de ADNs a marcar.

Nº ADNs a marcar	µl dATP:dCTP:dGTP (1:1:1) Premezcla 1 (P1)		µl dTTP a añadir a la MI	µl dUTP-digx:dUTP.biotin (0.75:0.25) Premezcla 2 (P2)		Volumen final Mezcla Intermedia (MI)
	Mezclar	Volumen de la P1 a añadir a la MI		Mezclar	Volumen de la P2 a añadir a la MI	
1	3:3:3	9	2	0.75:0.25	1	12
2	3:3:3	9	2	0.75:0.25	1	12
3	5:5:5	13.5	3	1.5:0.5	1.5	18
4	6:6:6	18	4	1.5:0.5	2	24
5	8:8:8	22.5	5	3:1	2.5	30
6	8:8:8	22.5	5	3:1	2.5	30

MI: Mezcla Intermedia

Figura 17. Esquema del marcaje del ADN con el kit comercial *Nick Translation*.



Ejemplo de la mezcla intermedia y final para 4 muestras de ADN por duplicado más el control positivo (n=9). Para conocer los volúmenes que debe incluir la mezcla intermedia que se calcula para 10 reacciones, se utilizan el doble de los volúmenes establecidos en la Tabla 10 para 5 ADNs a marcar.

Una vez preparada la mezcla final, se añadían 8 µl de ésta a 2 µl (0.5 µg) del ADN a marcar. La mezcla se incubaba 90 min a 15°C (en un termociclador) y seguidamente se realizaba la precipitación del ADN mediante la adición a la mezcla de 40 µl de acetato de sodio 3 M (frío), 890 µl de etanol (a -20°C) y 390 µl de agua miliQ (frío). Esta mezcla se mantenía a 4 °C durante 15 min o bien a -20°C toda la noche. Seguidamente, se centrifugaba a 13000 rpm durante 10 min, se eliminaba el sobrenadante por decantación y una vez seco el ADN precipitado, se resuspendía en 100 µl de agua miliQ. Un microlitro de esta solución se utilizaba para comprobar la eficiencia del marcaje siguiendo el protocolo de detección del ADN marcado que se describe más adelante.

Reacción de hibridación

Para realizar la hibridación ADN-ADN se enfrentan el ADN marcado de la cepa a estudiar frente al ADN sin marcar de aquellas cepas con las que se quiere conocer el grado de similitud así como su propio ADN. Para ello se mezclaron, en un eppendorf, entre 6-12 µl de ADN marcado (en función de la calidad del marcaje obtenido) con 15 µg del ADN sin marcar ajustando el volumen hasta 72 µl con agua miliQ estéril. Seguidamente las mezclas de ADNs se desnaturalizaron físicamente (10 min a 95°C seguidos de 5 min a 0°C) y se añadieron a las mezclas 28 µl de tampón fosfato (PB) 1 M obteniendo una concentración final del mismo de 0.28 M. Finalmente las mezclas de ADNs se recubrieron con 100 µl de aceite mineral estéril para evitar la evaporación de las mismas y se incubaron durante 16 h a una temperatura óptima de renaturalización o reasociación (T_{OR}) de 70°C. Esta T_{OR} se calculó utilizando el valor medio del 60% de G+C del género *Aeromonas* (Martin-Carnahan y Joseph, 2005) y aplicando las siguientes fórmulas, tal y como se describe en la introducción (Urdiain y cols., 2008):

$$T_m = ([G+C] + 182.2)/2.44$$

$$T_{OR} = T_m - 30^{\circ}\text{C}$$

Separación de cadenas sencillas y dobles

Para la separación de las cadenas sencillas (ADNmc) de las cadenas dobles (ADNbc) se utilizó una matriz de hidroxiapatita (tipo I, Sigma) según el protocolo de Brenner y cols. (1969). Previamente a la separación de las cadenas sencillas y dobles de ADN, la hidroxiapatita se equilibró añadiendo 10 ml de agua miliQ por gramo de hidroxiapatita, y después con PB 0.14 M al 0.2% de SDS a igual concentración (p/v). Tras centrifugar (1 min a 13000 rpm) la mezcla hidratada de hidroxiapatita se eliminó el sobrenadante y se resuspendió, con un agitador, totalmente el pellet en 1 ml de tampón fosfato 0.14 M. El lavado con tampón fosfato se repitió tres veces y finalmente se hicieron alícuotas de 200 μl que se centrifugaron y se eliminó el sobrenadante de cada tubo para quedarnos con los precipitados de hidroxiapatita equilibrada. Paralelamente, y transcurrido el periodo de reasociación (16 h), se extrajeron las mezclas ADNs de hibridación del fondo de los eppendorf y se transfirieron a un tubo nuevo. A cada tubo, se le añadió exactamente el mismo volumen de agua miliQ, obteniendo así una concentración final de 0.14 M de tampón fosfato. Se añadieron 50 μl de esta solución a las alícuotas que contenían el precipitado de hidroxiapatita equilibrada, se homogeneizaron con agitador y se incubaron a un temperatura 5°C por debajo de la T_{OR} , i.e. 65°C, durante 15 min. Seguidamente se centrifugaron las mezclas (2 min a 13000 rpm) y los sobrenadantes que contiene el ADN monocatenario (ADNmc) se transfirieron a tubos estériles. Este paso se repitió 2 veces adicionando a los tubos volúmenes de 450 μl y 500 μl de PB 0.14 M con incubaciones de 5 min a 65°C en cada una de ellas. Tras estos 3 lavados, y de modo similar, se efectuaron otros 2 lavados para liberar las cadenas de ADN bicatenario (ADNbc) pero utilizando en este caso 200 μl de PB 0.4 M y sin realizar ninguna incubación. Finalmente obteníamos el ADNmc en 1000 μl de PB 0.14 M y ADNbc en 400 μl en PB 0.4 M.

Detección del ADN marcado

La detección del ADN marcado, tanto tras la hibridación como para la comprobación del marcaje, se realizó en microplacas (StreptaWell, Roche) que llevan unida estreptavidina, ésta posee una gran afinidad con la biotina (**Figura 18**). A cada pocillo se le adicionaron 2 μl de albúmina bovina al 10%, con el fin de evitar uniones inespecíficas, y 200 μl de las alícuotas de ADNmc y ADNbc, este último previamente desnaturalizado, y se incubaba durante 1 h 30 min a 28°C en agitación.

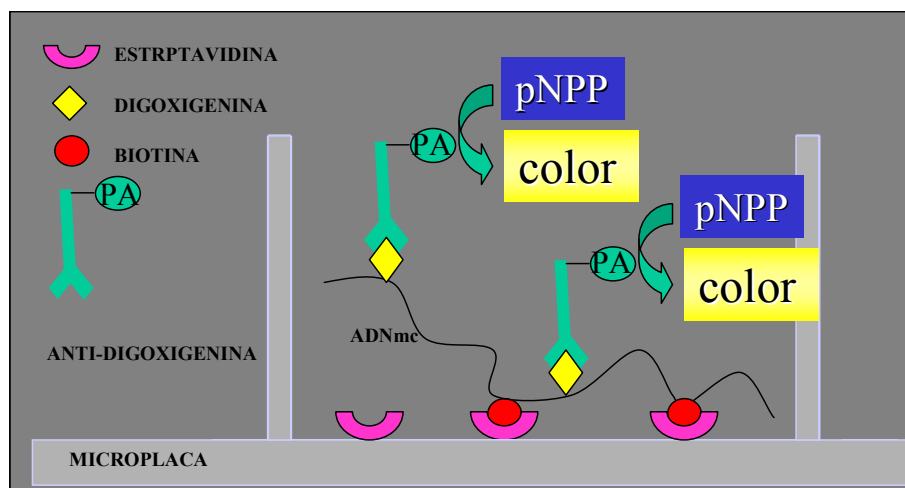


Figura 18. Esquema de la detección del ADN marcado en microplaca con estreptavidina.

Una vez unido el ADN marcado, con la digoxigenina y biotina, a la placa por la unión específica de la biotina con la estreptavidina (**Figura 18**), se procedió al lavado de los pocillos con tampón fosfato salino (PBS), 3 veces, con el fin de eliminar los restos del ADN no unidos a la placa. Seguidamente se añadieron 200 μ l por pocillo de una solución de PBS (5 ml) con anticuerpo (1 μ l) anti-digoxigenina (Roche) y se incubaron las microplacas durante 1 h 30 min a 28°C con agitación. El anticuerpo anti-digoxigenina lleva unida una fosfatasa alcalina (PA). Transcurrida la incubación se realizaron otros 3 lavados con PBS y finalmente un lavado con 200 μ l de *coating buffer* (Na_2CO_3 7.5 mM, NaHCO_3 15.5 mM, MgCl_2 1 mM). Finalmente se añadieron a cada pocillo 250 μ l de la solución de detección constituida por una pastilla de p-nitrofenilfosfato (pNPP, Sigma, sustrato de la fosfatasa alcalina) disuelta en 5 ml de *coating buffer*. La microplaca se incubó a 37°C sin agitación hasta que se desarrolló totalmente el color amarillo del producto de la fosfatasa. La lectura de la microplaca se realizó en un lector de ELISA (Kinetic-QCL) a una longitud de onda de 405 nm. Los valores de absorbancia obtenidos se transformaban entonces en valores del *grado de reasociación* (BR) tal y como se describe a continuación. Las mediciones se prolongaron durante 24 h hasta obtener 3 veces consecutivas un valor del *grado de reasociación relativo* (RBR) constante.

Análisis de datos y cálculo de resultados

La similitud ADN-ADN se obtuvo teniendo en cuenta tanto la reasociación del ADN homólogo (el que hibrida consigo mismo) como el heterólogo o híbrido (el ADN marcado con el ADN con el que queremos conocer el grado de similitud). Concretamente, el *grado de reasociación* (BR) se obtuvo como el porcentaje de ADN marcado obtenido a partir del ADN_{bc} respecto al ADN total $[\text{ADN}_{bc} / (\text{ADN}_{mc} + \text{ADN}_{bc})]$. Asimismo, el *grado de reasociación relativo* (RBR) del ADN heterólogo se expresó como porcentaje del homólogo [*grado de reasociación* del ADN

heterólogo/grado de reasociación del ADN homólogo) x 100]. Los experimentos de hibridación se realizaron por duplicado y se repitieron tres veces de manera directa (A*x B) y tres veces de manera recíproca (B*x A) obteniendo una media que fue considerada el resultado final.

Un *grado de reasociación relativo* por debajo del 70%, en condiciones de renaturalización óptimas, indica que los dos genomas pertenecen a especies diferentes (Rosselló-Móra, 2006).

3.3.6. Técnicas de tipado molecular

Las técnicas de tipado se emplearon principalmente en los **estudios 4.1.1, 4.2.1 y 4.2.5**.

3.3.6.1. ERIC - PCR

La técnica del ERIC-PCR se realizó siguiendo las condiciones descritas por Soler y cols. (2003). La amplificación se realizó a partir de 100 ng de ADN total en un volumen final de 50 μ l. La reacción de PCR contenía tampón 1X (20 mM Tris-HCl pH 8.4, 50 mM KCl), 1 μ M de cebador ERIC-1 (5' ATG TAA GCT CCT GGG GAT TCA C3'), 1 μ M de cebador ERIC-2 (5' AAG TAA GTG ACT GGG GGT3') (Vila y cols., 1996), 3 mM MgCl₂, 0.3 mM dNTP's y 2.5 U *Taq* polimerasa. Las condiciones para cada ciclo de reacción programada fueron: 94°C, 1 min (desnaturalización); 52°C, 1 min (hibridación); 65°C, 8 min (extensión); estas condiciones se repitieron en 30 ciclos y al finalizar se efectuó una última polimerización durante 16 min a 65°C.

Los productos de amplificación fueron sometidos a electroforesis en geles de poliacrilamida al 10% incluyendo en ambos extremos el marcador de peso molecular AmpliSize™ de 50 a 2000 pb (Bio-Rad Laboratories). El revelado del gel se realizó durante 20 minutos en 500 ml de una solución de tampón TBE 1X que contenía 25 μ l de una solución de bromuro de etidio (10 mg/ml) (Sambrook y cols., 1989).

3.3.6.2. RAPD-PCR

La amplificación aleatoria de ADN polimórfico se llevó a cabo en el *Molecular Diagnostic Center* (Orihuela). Los cebadores empleados fueron A8 y OPA20, recomendados en la bibliografía (Martínez-Murcia y cols., 1995).

3.3.6.3. PFGE

La electroforesis en campo pulsante fue realizada en el Hospital *Clínic* de Barcelona siguiendo las condiciones descritas en la literatura (Gautom 1997; Talon y cols., 1996; Giraud y cols., 2004). Las cepas se sembraron en caldo cerebro-corazón (Brain Heart Infusion, BHI) y se incubaron durante 24 h a 30°C. Se tomaron 1.5 ml del cultivo y se precipitaron las células por centrifugación (13000 rpm, 2 min). El precipitado se lavó con 500 μ l de tampón TE-1 (Tris 100 mM - EDTA 100 mM) y se resuspendió en 300 μ l de este mismo tampón. De esta suspensión se tomaron 100 μ l a los que se añadió lisozima (1 mg/ml) y se incubó durante 15-20 min a 37°C. Se preparó agarosa (Incert Agarose,

Cambrex), a una concentración 1.8%, en tampón TE-1 que se estabilizó a 55°C. A los 100 µl de la solución celular con lisozima se añadieron 120 µl de agarosa a 55°C, consiguiendo una mezcla homogénea con la que se rellenaron los moldes. Estos se dejaron enfriar a 4°C durante 5-10 min para que se solidificaran. Seguidamente, los bloques de agarosa se incubaron 2 h a 55°C en 2.5 ml de una solución de EDTA 0.5 M y Sodio-Lauril sarcosina (1%) con proteinasa K (1 mg/ml). A continuación se realizaron varios lavados, el primero de 10 min con agua y 4 lavados más de 15 min cada uno con TE-2 (Tris 10 mM -EDTA 1 mM). Para la digestión del ADN se equilibraron los bloques de agarosa con el tampón de la endonucleasa (1X) durante 15-20 min. La endonucleasa utilizada para la digestión del genoma completo fue la *SpeI*. Se añadieron a cada bloque una solución de 150 µl que contenía del tampón 1X de la enzima y 40 U de *SpeI*. Los productos de restricción fueron separados en geles de agarosa (Certified Megabase Agarose, Bio-Rad Laboratories Inc) al 1% con el marcador de peso molecular Lambda PFG Marker (BioLabs Laboratories Inc) y las siguientes condiciones de electroforesis: temperatura de electroforesis de 12°C, tiempo inicial de reorientación de 2 min, tiempo final de reorientación 20 min, ángulo de reorientación de 120° y un gradiente de 6 V/cm utilizando un CHEF-DR III (Bio-Rad Laboratories Inc). La electroforesis se prologó durante 24 h. El revelado del gel se realizó durante 20 min en una solución de tampón TBE 0.5X (200 ml) que contenía 30 µl de bromuro de etidio (10 mg/ml).

3.4. Detección de factores de virulencia

Se evaluó la presencia de diversos factores de virulencia (**estudios 4.2.1, 4.2.2 y 4.2.4**) en base a la detección de sus genes mediante la amplificación por PCR de un fragmento de los mismos utilizando los cebadores y condiciones descritos en la bibliografía que se referencia en la **Tabla 12**.

Tabla 12. Genes de factores virulencia, cebadores y condiciones de PCR utilizados para su determinación.

Genes	Cebadores	Condiciones			Producto (pb)
		Temperatura (°C)	Tiempo (min)	Ciclo	
<i>aer-hemo</i> ¹	aer-F: 5'-CCTATGGCCTGAGCGAGAAG-3' aer-R: 5'-CCAGTTCAGTCCCACCACT-3'	95	3	35	431
		95	1		
		56	1		
		72	1		
		72	5		
<i>acr</i> ²	AHC1: 5'-GAGAAGGTGACCACCAAGAACA-3' AHC1: 5'-AACTGACATCGGCCTTGAAGTC-3'	95	10	25	232
		95	0.15		
		66	0.30		
		72	0.30		
		72	10		
<i>alt</i> ³	alt-F: 5'-AAAGCGTCTGACAGCGAAGT-3'	95	3		320

	alt-R: 5'-AGCGCATAGCGTTCTCTT-3'	94	1	35			
		50	1				
		72	1				
		72	5				
<i>ast</i> ³	ast-F: 5'-ATCGTCAGCGACAGCTTCTT-3' ast-R: 5'-CTCATCCCTTGGCTTGTTGT-3'	95	3	35	504		
		94	1				
		50	1				
		72	1				
		72	5				
<i>GCAT</i> ¹	GCAT-F: 5'-CTCCTGGAATCCCAAGTATCAG-3' GCAT-R: 5'-GGCAGGTTGAACAGCAGTATCT-3'	95	3	35	237		
		94	1				
		56	1				
		72	1				
		72	5				
<i>serina</i> ¹	Serine F: 5'-CACCGAAGTATTGGGTCAGG-3' Serine-R: 5'-GGCTCATGCGTAACTCTGGT-3'	95	3	35	350		
		94	1				
		60	1				
		72	1				
		72	5				
<i>lipasa</i> ¹	lip-F: 5'-CA(C/T)CTGGT(T/G)CCGCTCAAG-3' lip-R: 5'-GT(A/G)CCGAACCAGTCGGAGAA-3'	95	3	35	247		
		94	1				
		56	1				
		72	1				
		72	5				
<i>DNasa</i> ¹	Exu-F: 5'-(A/G)GACATGCACAACCTCTTCC-3' Exu-R: 5'-GATTGGTATTGCC(C/T)TGCAA(C/G)-3'	95	3	35	323		
		94	1				
		54	1				
		72	1				
		72	5				
<i>laf</i> ³	lip-F: 5'-CA(C/T)CTGGT(T/G)CCGCTCAAG-3' lip-R: 5'-GT(A/G)CCGAACCAGTCGGAGAA-3'	95	3	35	737-743		
		94	1				
		50	1				
		72	1				
		72	5				
<i>ascV</i> ⁴	ascV-F: 5'-ATGGACGGCGCCATGAAGTT-3' ascV-R: 5'-TATTCGCTTCACCCATCCC-3'	95	5	36	710		
		94	1				
		50	1				
		72	1				
		72	7				
<i>ascF-G</i> ⁴	ascF-G-F: 5'-ATGAGGTCATCTGCTCGCGC-3' ascF-G-R: 5'-GGAGCACAACCATGGCTGAT-3'	95	5	36	900		
		94	1				
		50	1				
		72	1				
		72	7				
<i>aexT</i> ⁵	RASEXOS-L: 5'-GGCGCTTGGGCTCTACAC-3' RASEXOS-R: 5'-GAGCCCGCATCTTACAG-3'	95	3	35	535		
		94	1				
		60	1				
		72	1				
		72	5				

¹Soler y cols., 2002; ²Kingombe y cols., 1999; ³Aguilera-Arreola y cols., 2005; ⁴Chacón y cols., 2004; ⁵Braun y cols., 2002.

3.4.1. Detección y secuenciación de los genes que codifican para las toxinas Shiga *stx*₁ y *stx*₂

Para la detección por PCR de los genes *stx*₁ y *stx*₂, que codifican las toxinas Shiga 1 y 2 (estudio 4.2.3), se utilizaron los mismos cebadores empleados por Haque y cols. (1996). Para la detección del gen *stx*₁ se utilizaron también los diseñados por Pass y cols. (2000) y empleados previamente para la detección de estos genes en *Aeromonas* (Haque y cols., 1996; Snowden y cols., 2006). La amplificación de los genes *stx*₁ y *stx*₂ se realizó utilizando los cebadores y condiciones un kit comercial, Primer set EVT-1, EVT-2 para *stx*₁ y Primer set EVS-1, EVS-2 para *stx*₂, siguiendo las recomendaciones del fabricante (TaKaRa). El volumen final de la reacción de PCR, 50 µl, contenía tampón 1X proporcionado por la casa comercial, 0.19 pmol de cada cebador, 0.2 mM dNTP's y 1.25 U *Taq* polimerasa. Las condiciones para cada ciclo de reacción programada fueron: 94°C, 1 min (desnaturalización); 55°C, 1 min (hibridación); 72°C, 8 min (extensión); condiciones que se repitieron en 35 ciclos y realizándose una última polimerización durante 10 min a 72°C. En la amplificación de gen *stx*₁ con los cebadores diseñados por Pass y cols. (2000) se siguieron las condiciones descritas por estos autores. En ambos casos se tomaron muestras de 25 µl del volumen del producto de la PCR para la electroforesis en un gel de agarosa al 1%, con el fin de comprobar las amplificaciones de los fragmentos esperados, de unos 350 pb para el gen *stx*₁ y de 406 pb para el *stx*₂ con las condiciones de Haque y cols. (1996) y con las condiciones de Pass y cols. (2000) unos 121 pb para el gen *stx*₁. Para la secuenciación de los fragmentos se utilizaron los mismos cebadores de la amplificación y se realizó tal como se ha detallado en el apartado 3.3.3. Las secuencias obtenidas se compararon con las depositadas en las bases de datos públicas (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=nucleotide&cmd=search&term>) utilizando las herramientas informáticas descritas en el apartado 3.3.4.

3.4.2. Detección de la producción de toxinas Shiga 1 y 2

Para evaluar la producción de toxinas Shiga o verotoxinas (estudio 4.2.3) se utilizó el test rápido inmunocromatográfico Duopath® Verotoxina (Merk), cuyo límite de detección de Stx1 y Stx2 es 25 ng/ml y 62.5 ng/ml, respectivamente. Se utilizó el medio de cultivo CAYE, el suplemento C (10 µg/ml de inductor de verotoxina) y la Polimixina B o Suplemento selectivo de *Bacillus cereus* tal como recomienda el fabricante (Merk). Se sembraron las 19 cepas a analizar (Anexo 8) en TSA (Difco) y se incubaron durante 24 h a 30°C. El contenido de un vial de Suplemento C se resuspendió en 1 ml de H₂O_mQ que se añadió a 200 ml de caldo CAYE. Esta mezcla se dispensó a razón de 1 ml por tubo en los cuales se resuspendieron 10 colonias de cada cepa y se incubaron durante 6 h a 37 °C. De este cultivo líquido se pasaron 180 µl a un eppendorf nuevo y se le añadieron 20 µl de la solución

de Polimixina B (5 mg/ml), se mezclaron e incubaron durante 10 min a 35-37°C. Seguidamente se agitaron y se tomaron 150 µl de la mezcla que se depositaron en la ventana de carga del Duopath Verotoxin (**Figura 19**).

Tras una incubación de 20 min a temperatura ambiente (20-25°C) se realizó la lectura siguiendo las instrucciones del fabricante. Se considera un resultado positivo cuando en las zonas de lectura VT1 (Stx1) y/o VT2 (Stx2) aparecen líneas rojas mientras la aparición de líneas oscuras (negras) en la zona o el no desarrollo de color se consideran resultados negativos.



Figura 19. Kit *Duopath verotoxins* para la detección de verotoxinas mostrando un resultado positivo de Stx1 y Stx2.

3.4.3. Extracción de plásmidos

El aislamiento de plásmidos (**estudio 4.2.3**) se realizó con el kit comercial UltraClean™ 6 Minute Mini Plasmid Prep (MoBio, USA), siguiendo las recomendaciones del fabricante. Para ello se realizaron cultivos líquidos en TSB de las cepas 885c y 535c que se ajustaron por densidad óptica a una absorbancia de valor 2 con una longitud de onda de 600 nm. Se tomaron 5 ml de la suspensión bacteriana y se centrifugaron durante 1 min a 15000 rpm, se eliminó totalmente el medio de cultivo, repitiendo el proceso hasta conseguir un precipitado seco. A este precipitado se añadieron 50 µl de un tampón de lisis (solución 1) que contiene RNAsa y se resuspendió en agitación durante 1 min hasta conseguir una suspensión celular homogénea a la que se añadieron 100 µl de una solución alcalina (solución 2). Se mezcló por inversión sólo una vez y se añadieron 325 µl de una solución neutralizante (solución 3). La mezcla se volvió a homogenizar por inversión una única vez y se centrifugó a 15000 rpm durante un 1 min Se recogió el sobrenadante que se transfirió a una columna de filtrado. Seguidamente se centrifugó 30 s a 15000 rpm. Se eliminó el filtrado y se añadió sobre el filtro de la columna una solución de lavado (solución 4). Seguidamente se volvió a centrifugar 30 s a 15000 rpm. La columna se transfirió entonces a un tubo eppendorf limpio y se añadieron sobre el filtro 50 µl del tampón de elución (solución 5). Finalmente se centrifugó durante 30 s a 15000rpm recuperando el filtrado que contenía el ADN plasmídico.

3.5. Sensibilidad a agentes antimicrobianos

Se ensayó la sensibilidad frente diferentes agentes antimicrobianos (**Tabla 13**) tanto en la descripción de nuevas especies de *Aeromonas* (**estudios 4.1.6-4.1.8**) como en el estudio de los

primeros aislamientos de *A. aquariorum* (**estudio 4.2.1**). Estos ensayos se realizaron en el Departamento de Ciencias Veterinarias de la CECAV-Universidad de *Trás-os-Montes y Alto Douro*, Portugal. La sensibilidad se evaluó tras una incubación de 24 h a 35°C, utilizando el método de discos de Kirby-Bauer en placas de Mueller-Hinton (Oxoid) e inóculos a una densidad óptica equivalente a 0.5 de la escala McFarland, siguiendo las recomendaciones del CLSI (*Clinical Laboratory Standards Institute*) recogidas en el documento M54-A (CLSI, 2006). Las cepas fueron clasificadas con respecto a cada antibiótico como sensibles (S), intermedias (I) o resistentes (R) conforme a lo establecido en el año 2006 por el CLSI.

Tabla 13. Agentes antimicrobianos evaluados en *Aeromonas*

Grupo	Antibiótico
Aminoglucósidos	Amikacina (AK)
	Gentamicina (CN)
	Kanamicina (K)
	Estreptomina (S)
	Trobamicina (TOB)
Carbapenem	Imipenem (IMP)
Cefalosporinas	Cefalotina (KF)
	Cefoxitina (FOX)
	Cefoperazona (CFP)
	Cefotaxima (CTX)
	Ceftazidima (CAZ)
	Ceftriaxona (CRO)
	Cefepime (FEP)
Macrólidos	Eritromicina (E)
Monobactámicos	Aztreonam (ATM)
Penicilinas	Amoxicilina (AML)
	Piperacilina (PRL)
	Ticarcilina (TIC)
Quinolonas	Ácido nalidixico (NA)
	Ciprofloxacino (CIP)
Sulfoamidas	Trimetoprim-sulfametoxazol (SxT)
Tetraciclinas	Tetraciclina (TE)
Otros	Cloranfenicol (C)
	Fosfomicina (FOS)
Combinaciones	Piperacilina con tazobactama (TZP)
	Amoxicilina con ácido clavulánico (AMC)
	Ticarcilina con ácido clavulánico (TIM)
	Ácido clavulánico
	Tazobactam

Durante la presente tesis doctoral se han identificado a nivel de especie un total de 682 cepas de *Aeromonas* (**Figura 20**), 377 (55.3%) de origen clínico, 189 (27.7%) aisladas de animales y 116 (17%) de origen ambiental. Se ha secuenciado el gen *rpoD* de 149 cepas de las 682 (21.8%) para llegar a la correcta asignación o confirmación de especie.

De todas las cepas analizadas, el 29.3% se identificaron como *A. caviae*, el 18.5% como *A. veronii* y el 13.8% como *A. salmonicida*, mientras que sólo el 8.8% pertenecían a *A. hydrophila*.

La distribución de especies por orígenes indica que las especies con mayor relevancia en clínica fueron *A. caviae* (50.3%), *A. veronii* (23.6%), *A. hydrophila* (10.8%), la recientemente descrita *A. aquariorum* (7%) y *A. media* (5%). Mientras que *A. salmonicida* (32%), seguida por *A. veronii* (14%) y *A. bestiarum* (12.5%) han sido las de mayor relevancia entre las especies ambientales. Así mismo, se ha detectado que de las especies *A. encheleia*, *A. sobria* y *A. bestiarum* no se ha aislado ninguna cepa clínica. Pese a su reciente descripción también se ha identificado una cepa de *A. tecta* pero no se han identificado aislados de *A. popoffii*, *A. simiae*, *A. molluscorum* o *A. bivalvium*.

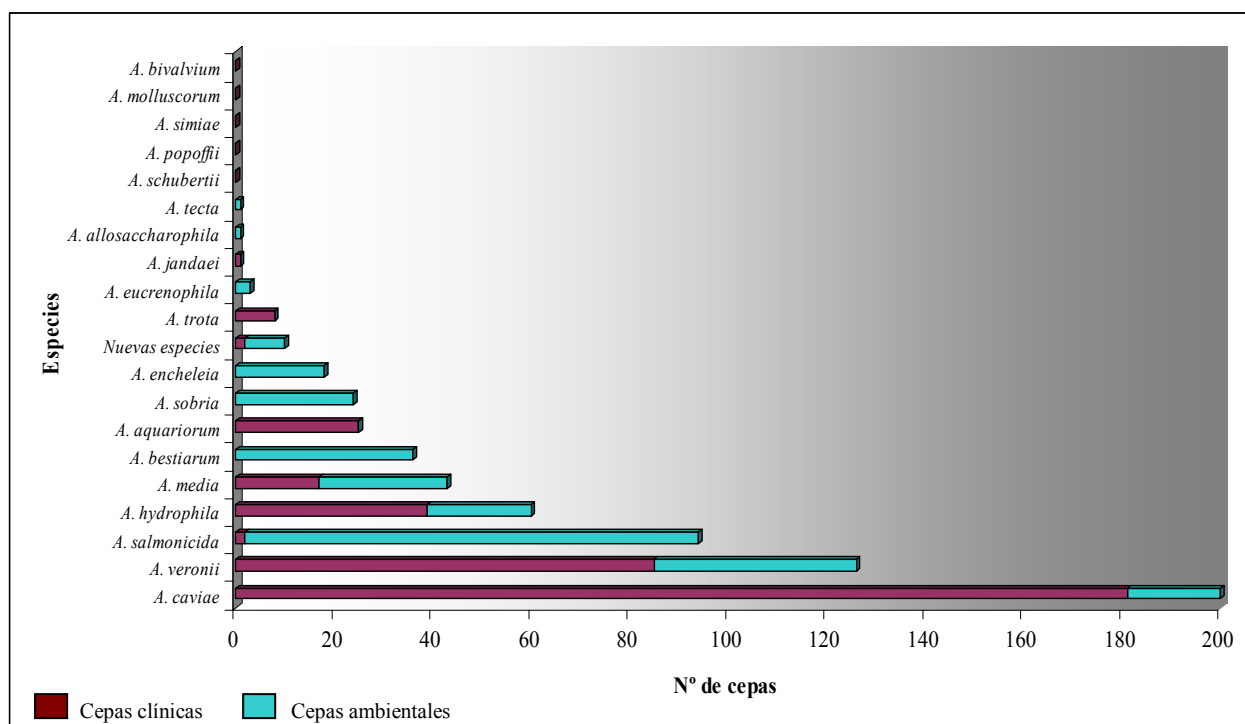


Figura 20. Distribución por origen y especie de las cepas de *Aeromonas* identificadas en la presente tesis doctoral.

4.1. Taxonomía del género *Aeromonas*

Carta al Editor:

4.1.1. MJ Figueras, A Alperi, J Guarro, AJ Martínez-Murcia. Genotyping of isolates included in the description of a novel species should be mandatory. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 2006. 56: 1183-1184.

Resumen

El Comité Internacional para la Sistemática de Procariotas (ICSP) recomienda incluir en las descripciones de nuevas especies bacterianas un análisis de genotipado en los casos en los que la nueva especie incluya más de una cepa. El presente trabajo pone en evidencia, mediante tres técnicas de genotipado (ERIC-PCR, RAPD y PFGE), la inclusión de cepas duplicadas en las publicaciones donde se describen las especies *A. culicicola* y *A. simiae*, mientras que no se han detectado duplicados entre los cinco aislados incluidos en la descripción de *A. molluscorum*. Nuestros resultados confirmaron los resultados obtenidos con AFLP incluidos en la descripción de esta especie. En este trabajo proponemos que el genotipado de los aislados incluidos en la descripción de nuevas especies sea un requisito obligado y no una recomendación como establece el ICSP.

Carta al Editor:

4.1.2. MJ Figueras, A Alperi, J Guarro. On the identification of clinical *Aeromonas* by a new restriction fragment length polymorphism of 16S rDNA method. *Letters in Applied Microbiology*. 2007. 45: 692-693.

Resumen

En el año 2007, Ghatak y cols. publican un protocolo basado en el polimorfismo de longitud de los fragmentos de restricción del gen ARN ribosómico 16S (RFLP del ADNr 16S) para la identificación de especies de *Aeromonas* indicando que este nuevo protocolo proporciona patrones de RFLP de más fácil interpretación que los obtenidos con el protocolo publicado por nuestro grupo (Borrell y cols., 1997; Figueras y cols., 2000a) y utilizado para la identificación de las cepas incluidas en esta tesis doctoral. Asimismo, Ghatak y cols. (2007) indicaban que los dos biovares descritos para la especie *A. veronii* (bv sobria y bv veronii) podían diferenciarse con su protocolo. Con la finalidad de evaluar si estas aseveraciones eran ciertas se realizó la simulación informática de las digestiones incluidas en el protocolo de Ghatak y cols. (2007), con las cepas tipo de todas las especies y con cepas de referencia de ambos biovares de *A. veronii*. Nuestros resultados mostraban que las especies *A. popoffii*, *A. bivalvium*, *A. bestiarum*, *A. salmonicida* y *A. jandaei* mostraban el mismo patrón. Asimismo, el patrón de las dos biovariedades de *A. veronii* era común e idéntico al de *A. sobria* y *A. allosaccharophila*. Estos resultados demostraban que los patrones definidos por estos autores no eran especie-específicos y por tanto, el nuevo protocolo que proponían no permitía la identificación inequívoca de las especies de *Aeromonas* spp. ni tampoco la separación de los dos biovares de *A. veronii*.

Artículo:

- 4.1.3. A Alperi, MJ Figueras, I Inza, AJ Martínez-Murcia. Analysis 16S rRNA gene mutations in a subset of *Aeromonas* strains and their impact in species delineation. *International Microbiology*. 2008. 11: 185-194.**

Resumen

La caracterización de 999 cepas de *Aeromonas* utilizando un método, previamente descrito, basado en el polimorfismo de longitud de los fragmentos de restricción del gen ARN ribosómico 16S (RFLP del ADNr 16S), reveló que el 8% (81) de las cepas no podían ser identificadas ya que generaban patrones de restricción atípicos (diferentes a los esperados para las especies conocidas). Se secuenció el gen ARNr 16S de 27 de estas cepas, representativas de los 12 tipos de patrones de RFLP atípicos identificados, y se constató que estos patrones atípicos eran debidos a la presencia de polimorfismos (también denominados microheterogeneidades) en las copias de los operones del gen ARNr 16S. Dichos polimorfismos se reflejaban como dobles picos en los electroferogramas de las secuencias obtenidas. Se evidenció que aún cuando el número de microheterogeneidades es muy bajo (0.6%), estas conducen a una identificación errónea de los aislados o a un resultado poco concluyente en el 70-74% de las cepas estudiadas. Las cepas que presentaron patrones atípicos pudieron ser identificadas inequívocamente utilizando las secuencias del gen *rpoD* como pertenecientes a *A. caviae*, *A. media* y *A. veronii*, especies que se encuentran comúnmente asociadas a infecciones humanas. La existencia de microheterogeneidad fue significativamente superior ($P < 0.01$) en cepas de origen clínico que en las de origen ambiental. La secuenciación directa tras PCR del gen ARNr 16S es una técnica cada vez más utilizada para la identificación de las especies asociadas a infecciones humanas. Por tanto, este artículo pretende alertar sobre las limitaciones que presenta este gen en la identificación correcta de las especies de *Aeromonas* y propone como alternativa la secuenciación del gen *rpoD*.

4.1.4. Análisis de las secuencias de los operones del gen ARNr 16S

Recientemente se han publicado las secuencias completas de los genomas de *A. hydrophila* (Seshadri y cols., 2006) y *A. salmonicida* (Reith y cols., 2008) que mostraron poseer 10 y 9 copias de los genes ribosomales, respectivamente. Así mismo se detectaron 10 copias de estos genes mediante el análisis del espaciador intergénico 16S-23S en *A. culicicola* (Pidiyar y cols., 2003), en la actualidad considerada sinónimo de *A. veronii*, y recientemente se han detectado la existencia de al menos 5 copias en *A. veronii* (LMG13695) y 6 en *A. media* mediante subclonación de las copias del gen ARNr 16S (Morandi y cols., 2005). Por lo general, como se comentó en la introducción, se consideraba que todas las copias de este gen en un microorganismo eran idénticas o casi idénticas en su secuencia nucleotídica sin embargo, en varios géneros bacterianos se han descrito diferencias nucleotídicas entre las copias del gen ARNr 16S que en general afectan a menos del 1% de las posiciones (Coenye y Vandamme, 2003). En el estudio de Morandi y cols. (2005) se determinó un valor máximo de posiciones polimórficas en *Aeromonas* del 1.5%, 21 posiciones variables, en *A. veronii* LMG13695. Sin embargo, se han detectado solamente 2 bases diferentes, 0.13%, entre las 10 copias del ADNr 16S de *A. hydrophila* (Seshadri *et al.*, 2006) y 8 posiciones, 0.53%, muestran diferente composición en nucleótidos entre las 9 copias de *A. salmonicida* (Reith y cols., 2008).

Se construyó un árbol filogenético con las secuencias, accesibles en el GenBank, de las copias independientes de los operones del gen ARNr 16S de *A. veronii* LMG13695 (Morandi *et al.* 2005) (Nº de acceso al GenBank. AF418209-13), *A. hydrophila* ATCC7966^T (Seshadri *et al.*, 2006) (Nº de acceso al GenBank CP000462) y *A. salmonicida* A449 (Reith *et al.*, 2008) (Nº de acceso al GenBank. CP000644) junto con las secuencias consenso de este gen de las cepas tipo de todas las especies definidas hasta entonces, con el fin de evaluar si el polimorfismo detectado afecta a la posición filogenética de las copias independientes. Además, se secuenció el ADNr 16S de la cepa de *A. veronii* LMG13695, en la que se había descrito que existían 21 posiciones polimórficas (Morandi y cols., 2005) y de la que no existían ninguna secuencia consenso de este gen ni de otros genes en el GenBank que confirmara su identidad como *A. veronii*. Por ello se secuenciaron tanto el gen ARNr 16S como el gen *rpoD* confirmándose el aislado como *A. veronii*. La secuencia obtenida del gen ARNr 16S, reflejando en las posiciones polimórficas la base correspondiente al pico predominante del cromatograma, fue depositada en el GenBank bajo el número EU488698 así como la secuencia del gen *rpoD* bajo el número EU488651.

Todas las copias de la cepa tipo de *A. hydrophila* se localizaron en la misma rama que la secuencia consenso de esta misma cepa, depositada por Martínez-Murcia y cols. (1992), así mismo, 8 de las 9 copias de *A. salmonicida* A449, se agruparon con la secuencia consenso de la cepa tipo de esta especie, sin embargo una copia (1-A499) se agrupaba con *A. bestiarum* (**Figura 21**). La presencia de copias del gen ARNr 16S con la secuencia definida para *A. bestiarum* en el genoma de *A. salmonicida* y viceversa, había sido propuesto anteriormente por Martínez-Murcia y col. (2005) a partir de los

patrones mixtos de RFLP-ADNr 16S observados para cepas de estas especies utilizando el protocolo de Borrell y cols. (1997) y Figueras y cols. (2000) y mediante el reconocimiento de polimorfismos en las posiciones diana de las endonucleasas (1011 y 1018) mediante secuenciación del ARNr 16S.

Contrariamente a lo observado para las copias de los genomas completos, las secuencias de 4 de las 5 copias del ADNr 16S de *A. veronii* LMG 13695 obtenidas mediante subclonación por Morandi y cols. (2005) se localizaron dispersas entre otras especies de *Aeromonas* y sólo el clon 2 se agrupó con la secuencia de la cepa tipo (**Figura 21**), con la que mostró 1 nucleótido diferente. La localización de los clones 5 y 3 era la esperada para cepas de *A. veronii* con microheterogeneidades en el gen ARNr 16S de acuerdo con los resultados obtenidos por Alperi y cols. (2008; estudio 4.1.3) que observaron que todas las cepas de esta especie con microheterogeneidades se habían localizado en la “rama Schubertii”, a la pertenece *A. veronii*. Sin embargo, llama la atención la localización de los clones 1 y 4, puesto que se localizaban fuera de esta rama. También fue sorprendente el hecho de que Morandi y cols. (2005) encontraran polimorfismo en la región variable (RV) 2, ya que esta región posee los tripletes signatura (posiciones 154-156 y 165-167) que separan la “rama de Schubertii” (TAC y GTA), i.e. *A. jandaei*, *A. veronii*, *A. simiae*, *Aeromonas* Grupo 501 y *A. schubertii*, del resto de especies del género (AGT y ACT) (Martínez-Murcia y cols., 1992) y ninguna de las cepas de *A. veronii* evaluadas mostró variabilidad en esta región (Alperi y cols., 2008). Hasta donde sabemos, nunca antes se había descrito en ninguna otra especie microheterogeneidad en la RV2 pero la recientemente descrita *A. tecta* posee los tripletes característicos de la “rama Schubertii” y se localiza fuera de la misma (Demarta y cols., 2008). La secuencia consenso del ARNr 16S realizada en 2 laboratorios independientes (URV y *Molecular Diagnostic Center*) confirmó el polimorfismo en una posición de la RV2: 167: A/G (**Tabla 14**). La secuencia del clon 5 muestra así mismo una G en dicha posición mientras que los clones 3 y 2 poseen una A y los clones 1 y 4, los localizados fuera de la rama poseen una T. La existencia de la transición A/G (R) en la posición 167 no es tan rara si se tiene en cuenta que *A. simiae* (Harf-Monteil y cols., 2004), localizada dentro de la “rama Schubertii”, posee una G en dicha posición, a parte de lo mencionado para *A. tecta*.

Así mismo, la secuenciación del gen ARNr 16S reveló la existencia de polimorfismo en la cepa LMG 13695 pero sólo en 8 (0.53% de las 1503 posiciones secuenciadas) de las 21 posiciones descritas por Morandi y cols. (2005).

Tabla 14. Posiciones con polimorfismo detectadas en la cepa de *A. veronii* LMG13695 expresadas con el código de la IUPAC.

Posiciones ¹		167	457	458	469	474	475	1011	1018
Polimorfismo	Morandi y cols. (2005)	W	Y	R	W	Y	R	Y	R
	Este estudio	R	Y	R	W	Y	R	Y	R

¹En referencia a la secuencia de *E. coli* (Brosius 1978). W: T o A; Y: T o C; R: A o G.

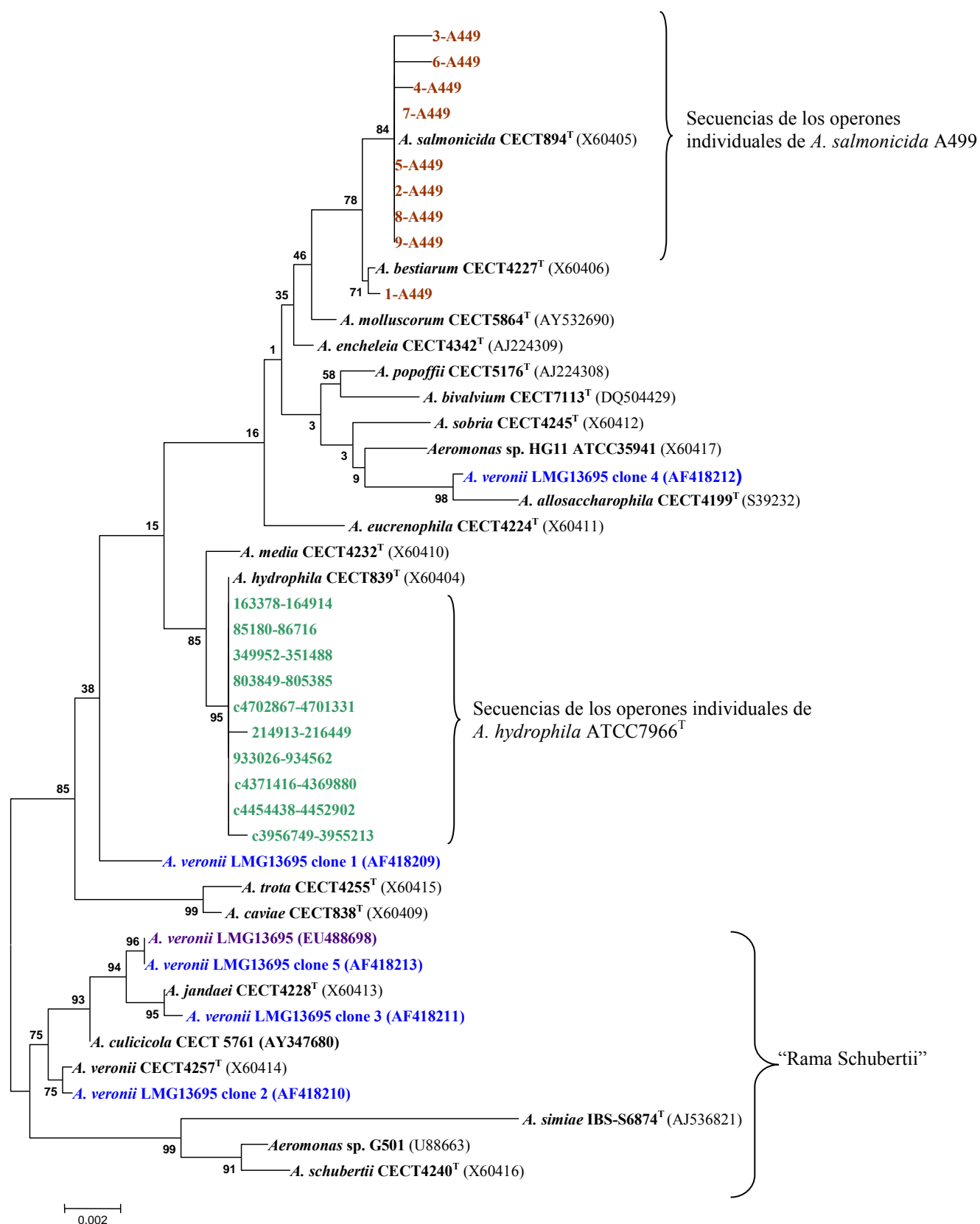


Figura 21. Árbol filogenético del gen ARNr 16S construido a partir de las secuencias de los 10 operones de la cepa tipo de *A. hydrophila*, ATCC7966^T (CP000462, el número junto al operón indica la posición en el genoma), los 9 de *A. salmonicida* A449 (CP000644), de los 5 clones de *A. veronii* LMG13695 (AF418209-13) junto con la secuencia consenso de esta cepa y de las cepas tipo del resto de especies de *Aeromonas* spp. Los números de los nodos indican el valor del bootstrap (porcentaje de 1000 repeticiones).

Artículo:

- 4.1.5. AJ Martínez-Murcia, A Monera, A Alperi, MJ Figueras, MJ Saavedra. Phylogenetic evidence indicated that *Aeromonas hydrophila* subsp. *dhakensis* Huys *et al.*, 2002 is a synonym of *Aeromonas aquariorum* sp. nov. *Current Microbiology*. 2009. 58: 76-80.**

Resumen

Tres cepas de *Aeromonas hydrophila* subsp. *dhakensis* se sometieron a un análisis filogenético por secuenciación de los genes *gyrB*, *rpoD* y el gen ARNr 16S. Los árboles filogenéticos de los genes *gyrB* y *rpoD*, contruidos con cepas de todas las especies aceptadas del género, revelaron que las cepas de *A. hydrophila* subsp. *dhakensis* se agrupaban con las de la especie de reciente descripción *A. aquariorum*. Asimismo, no se detectaron diferencias entre las secuencias del ADNr 16S de *A. hydrophila* subsp. *dhakensis* y la cepa tipo de *A. aquariorum*. Este resultado indica que en la descripción de la subespecie *A. hydrophila* subsp. *dhakensis* que incluía un estudio polifásico con hibridación ADN-ADN, dichos aislados fueron erróneamente identificados como *A. hydrophila*. En conclusión, *A. aquariorum* y *A. hydrophila* subsp. *dhakensis* deberían considerarse nombres sinónimos de un único taxón.

Artículo:

4.1.6. A Alperi, AJ Martínez-Murcia, A Monera, MJ Saavedra, MJ Figueras. *Aeromonas fluvialis* sp. nov., isolated from Spanish river. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. En prensa.

Resumen

Un bacilo Gram negativo y anaerobio facultativo (cepa 717), aislado en el río Muga, en Cataluña, presentó un patrón de RFLP del ADNr 16S atípico. El análisis preliminar de la secuencia del gen ARNr 16S mostró que pertenecía al género *Aeromonas* siendo la especie más cercana, con un 99.5% de similitud (7 nucleótidos diferentes), *A. veronii*. Sin embargo, la secuencia del gen *rpoD* indicaba que podía tratarse de una potencial nueva línea de filogenética. Un estudio polifásico, basado en un análisis filogenético multilocus con 5 genes *housekeeping* (*gyrB*, *rpoD*, *recA*, *dnaJ* y *gyrA*; 3684 pb), corroboró que el aislado 717 representaba una nueva línea filogenética dentro del género, siendo en este caso *Aeromonas sobria*, *Aeromonas veronii* y *Aeromonas allosaccharophila*, las especies más cercanas. Los experimentos de reasociación ADN-ADN así como el análisis fenotípico confirmaron a la cepa 717 como una nueva especie de *Aeromonas* para la cual se ha propuesto el nombre de *Aeromonas fluvialis* con la cepa 717 (=CECT 7401^T = LMG 24681^T) como cepa tipo.

***Aeromonas fluvialis* sp. nov., isolated from Spanish river**

Anabel Alperi¹, Antonio J. Martínez-Murcia², Arturo Monera², Maria J. Saavedra^{2,3}, Maria J. Figueras^{1*}

¹Unit of Microbiology, Rovira i Virgili University, IISPV, Sant Llorenç 21, 43201, Reus, Spain. ²Molecular Diagnostics Center (MDC), Biomolecular Technologies S.L., and Miguel Hernández University, Orihuela E-03300, Alicante, Spain. ³Department of Veterinary Sciences, CECAV-University of Trás-os-Montes e Alto Douro, Vila Real, Portugal.

*corresponding author: Maria J. Figueras, mariajose.figueras@urv.cat,

Tlf:+34-977759321, Fax: +34-977759322

SUMMARY

A Gram-negative, facultatively anaerobic bacterial strain designated 717 was isolated from a water sample collected from the Muga river, Girona, north-east Spain. Preliminary analysis of the 16S rRNA gene sequence showed that this strain belonged to the genus *Aeromonas*, the nearest species being *A. veronii* (99.5% similarity, with 7 different nucleotides). A polyphasic study based on a Multilocus Phylogenetic Analysis of 5 housekeeping genes (*gyrB*, *rpoD*, *recA*, *dnaJ* and *gyrA*; 3684 bp) showed isolate 717 to be an independent phylogenetic line with *Aeromonas sobria*, *Aeromonas veronii* and *Aeromonas allosaccharophila* as the closest neighbour species. DNA-DNA reassociation experiments and phenotypic analysis recognized strain 717 as a novel species, for which the name *Aeromonas fluvialis* sp. nov. is proposed, with the type strain 717 (=CECT 7401^T=LMG 24681^T).

Running title: *Aeromonas fluvialis* sp. nov

The GenBank accession numbers for the 16S rRNA, *rpoD*, *recA*, *gyrB*, *dnaJ* and *gyrA* genes sequence of strain 717 are FJ230078, FJ603453, FJ603457, FJ603455, FJ603454 and FJ603456 respectively.

The genus *Aeromonas* belongs to the class *Gammaproteobacteria* and to the family *Aeromonadaceae*, and includes facultative anaerobic Gram-negative, non-spore-forming motile bacilli or cocobacilli that are oxidase and catalase positive and able to reduce nitrate to nitrite and are generally resistant to the vibriostatic agent O/129 (Abbott *et al.*, 2003; Martin-Carnahan & Joseph, 2005). *Aeromonas* are primarily inhabitants of aquatic environments often associated with fish and human diseases (Martin-Carnahan & Joseph, 2005; Figueras 2005). The genus includes 19 species: *A. hydrophila*, *A. bestiarum*, *A. salmonicida*, *A. caviae*, *A. media*, *A. eucrenophila*, *A. sobria*, *A. veronii*, *A. jandaei*, *A. schubertii*, *A. trota*, *A. allosaccharophila*, *A. encheleia*, *A. popoffii*, *A. simiae*, *A. molluscorum*, *A. bivalvium*, the recently described *A. aquariorum* and *A. tecta* and one unnamed DNA homology group, *Aeromonas* Group 501 (Harf-Monteil *et al.*, 2004; Miñana-Galbis *et al.*, 2004; Martin-Carnahan & Joseph 2005; Miñana-Galbis *et al.*, 2007; Martínez-Murcia *et al.*, 2008, Demarta *et al.*, 2008). Furthermore, there is considerable evidence that the species *Aeromonas sharmana* (Saha & Chakrabarti, 2006) may not belong to the genus *Aeromonas* (Martínez-Murcia *et al.*, 2007) while *A. culicicola* (Pidiyar *et al.*, 2002) and *A. hydrophila* subsp. *dhakensis* (Huys *et al.*, 2002) are potentially considered synonyms of *A. veronii* (Huys *et al.*, 2005) and *A. aquariorum* (Martínez-Murcia *et al.*, 2009) respectively.

The taxonomy of this genus is complex due to the high inter-species similarity of the 16S rRNA gene, which ranges from 96.7 to 100% (Martínez-Murcia *et al.*, 2007), the overlap of biochemical profiles and a poor correlation between genotypic and phenotypic identification (Soler *et al.*, 2003; Figueras 2005; Ormen *et al.*, 2005). Furthermore, the existence of microheterogeneities in the 16S rRNA gene could generate misidentifications (Alperi *et al.*, 2008; Morandi *et al.*, 2005). This has recently been shown to occur between *A. media* and *A. hydrophila*, *A. caviae* and *A. trota* and *A. veronii* and *A. jandaei* (Alperi *et al.*, 2008). Analysis based on the sequences of one or two housekeeping genes have proven to be a useful tool for inferring the taxonomy of *Aeromonas* (Yañez *et al.*, 2003; Soler *et al.*, 2004; Küpfer *et al.*, 2006; Nhung *et al.*, 2007; Sepe *et al.*, 2008). Recently a comprehensive Multi Locus Phylogenetic Analysis (MLPA) based on 7 housekeeping genes (*gyrB*, *gyrA*, *rpoD*, *dnaJ*, *dnaX*, *recA* and *atpD*), including several strains of the 19 described species, have shown a robust phylogenetic frame that can be used for taxonomy with a clear differentiation among closely related *Aeromonas* species whose positions had previously been questioned (Martínez-Murcia *et al.*, submitted).

The present investigation was initiated to determine the taxonomic position of strain 717 *Aeromonas* sp. that presented a new 16S rDNA RFLP pattern when using a RFLP protocol design to differentiate all *Aeromonas* species described up to 2000 (Figueras *et al.*, 2000). Furthermore strain 717 appeared as an independent phylogenetic line after analysis of the *rpoD* gene. In the present study, a polyphasic approach based on an MLPA of five genes (*gyrB*, *gyrA*, *rpoD*, *dnaJ* and *recA*), DNA-DNA reassociation experiments and phenotypic analysis was performed to establish the

taxonomic allocation of strain 717. Results shows that it belongs to a new *Aeromonas* species, for which the name *Aeromonas fluvialis* sp. nov. is proposed.

Strain 717 was isolated from a water sample of the Muga river, Girona, north-east Spain, using the membrane filtration technique and ampicillin dextrin agar as described previously (Borrell *et al.*, 1998). The strain was genetically confirmed as *Aeromonas* using the genus probe described by Chacon *et al.* (2002) and showed a new pattern with the 16S rDNA-RFLP identification method (Figueras *et al.*, 2000).

The following phenotypic tests used for characterization of strain 717 were selected from Abbott *et al.*, (2003) i.e., catalase and oxidase activity, nitrate reduction, hydrogen sulphide production from cysteine, indole production, susceptibility to vibriostatic agent O/129 (150µg), growth in nutrient broth at 0% and at 6% NaCl; production of: brown diffusible pigment (on TSA) and gas from D-glucose, Voges-Proskauer (VP) test; β-galactosidase activity (ONPG), growth on MacConkey agar; hydrolysis of: elastin, gelatin, DNA and urea, and presence of: arginine dihydrolase (ADH), lysine decarboxylase (LDC) and ornithine decarboxylase (ODC) by the Moeller's method; acid production from carbohydrates was determined in nutrient broth at a final concentration of 1% (w/v), except for salicin, which was at 0.5% (w/v), supplemented with phenol red and one of the following substrates: sucrose, L-arabinose, cellobiose, lactose, raffinose, L-rhamnose, *m*-inositol, D-mannitol, D-sorbitol, N-acetyl glucosamine and salicin (Borrell *et al.*, 1998). These tests were performed at least twice and some of them (production of indole, hydrogen sulphide, VP test, β-galactosidase activity, presence of ADH, LDC and ODC, hydrolysis of gelatin, urea, acid production from D-mannitol, D-sorbitol, L-rhamnose, *m*-inositol, sucrose and L-arabinose) were performed in parallel using conventional methods and commercial identification kits (API20NE and API20E, BioMerieux). Finally, forty-nine carbohydrates for substrate fermentation/oxidation were tested by using API50CH (BioMerieux) following the manufacturer's instructions. Appropriate positive and negative controls were included. All tests were evaluated for 7 days and performed at 30°C with the exception of *A. salmonicida*, which was tested at room temperature (± 25°C). Type strains belonging to all *Aeromonas* species were evaluated under identical conditions than strain 717 for all tests included in the Table 1.

Isolate 717 was biochemically different from the rest of the *Aeromonas* species by its ability to produced acid from lactose and sucrose but not from L-arabinose or D-mannitol together with the negative production of ADH, LDC and ODC (Table 1). Acid production from D-lactose was negative with API50CH but positive in MacConkey agar and nutrient broth.

Cell size, morphology and the presence of flagella were determined with Electron Microscopy (Figs. S1A and S1B) following procedures described in a previous paper (Collado *et al.*, in press).

The susceptibility of strain 717 against 27 antibiotics was tested as described earlier (Martínez-Murcia *et al.*, 2008) and classified as susceptible, intermediate, or resistant according to CLSI standards

(CLSI, 2005). The following antibiotic-containing disks were obtained from Oxoid: piperacillin (PRL100), piperacillin plus tazobactam (TZP110), amoxicillin (AML10), amoxicillin plus clavulanic acid (AMC30), ticarcillin (TIC75), ticarcillin plus clavulanic acid (TIM85), cephalothin (KF30), cefoxitine (FOX), cefotaxime (CTX30), cefoperazone (CFP30), ceftazidime (CAZ30), ceftriaxone (CRO30), cefepime (FEP30), aztreonam (ATM30), imipenem (IMP10), gentamicin (CN10), kanamycin (K30), tobramycin (TOB10), amikacin (AK30), streptomycin (S), tetracycline (TE30), ciprofloxacin (CIP5), nalidixic acid (NA), fosfomicin (FOS), erythromycin (E15), trimethoprim-sulfamethoxazole (SxT25) and chloramphenicol (C30).

To perform the phylogenetic study of the 16S rRNA and *rpoD* genes, strain 717 was cultured on blood agar at 30°C. DNA was extracted from a single colony by using InstaGeneTM Matrix (Bio-Rad Laboratories) following the manufacturer's instructions. Primers and conditions for the amplification and sequencing of the 16S rRNA (1503 bp) and *rpoD* (820 bp) have been described previously (Martínez-Murcia *et al.*, 1992; Soler *et al.*, 2004). PCR products were purified using GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit (Amersham Bioscience) and prepared for sequencing employing a BigDye Terminator v.1.1 cycle sequencing kit (Applied Biosystems). The amplified genes were sequenced with an ABI PRISM 310 genetic analyzer (Applied Biosystems). Using CLUSTAL W program, version 1.83 (Thompson *et al.*, 1994) the sequences obtained were independently aligned with the sequences of the type and reference strains of all the members of the genus *Aeromonas* that were available in the GenBank. Genetic distances and clustering were obtained using Kimura's 2-parameter model (Kimura 1980) and evolutionary trees were constructed by the neighbour-joining (for the 16S rRNA and *rpoD* genes) and maximum-parsimony methods (for the 16S rRNA gene) (Saitou & Nei, 1987) using the MEGA4 program (Tamura *et al.*, 2007). Stability of the relationships was assessed by the bootstrap method (1000 replicates).

The MLPA was performed on the basis of *gyrB* (923 bp), *rpoD* (652 bp), *recA* (600 bp), *dnaJ* (800 bp) and *gyrA* (709 bp) genes, in the Molecular Diagnostic Center (MDC), Orihuela, Spain, as has been described previously (Martínez-Murcia *et al.*, submitted).

Sequence analysis of the 16S rRNA gene of strain 717 showed the existence of polymorphism (Table S1) in 7 positions (0.46%), all of them within the V3 region. This may hamper proper identification with the nearest species *A. veronii* (Alperi *et al.*, 2008). The 16S rRNA gene phylogenetic trees (Fig. 1 and Fig. S2) showed this strain as an independent phylogenetic line within the genus *Aeromonas*. The 16S rRNA gene sequence similarity between strain 717 (GenBank accession number FJ230078) and other *Aeromonas* species ranged from 97.6% to 99.5%, corresponding to 36-7 bp, values within the range (96.7%-100%) described for the genus *Aeromonas* (Saavedra *et al.*, 2006; Martínez-Murcia *et al.*, 2007). The most similar *Aeromonas* species on the basis of this gene showed to be *A. veronii* (99.5%) with 7 bp differences, *A. allosaccharophila*

(99.4%) with 9 bp differences followed by *A. jandaei* (99.1%) with 13 bp differences. This high similarity is very common in *Aeromonas*, in fact only one species (*A. simiae*) of the 19 presently accepted in the genus shows 16S rDNA similarities below 97%.

The *rpoD* phylogenetic tree showed strain 717 (*rpoD* sequence GenBank accession number FJ472926) as an independent phylogenetic line, *A. veronii* and *A. allosaccharophila* being the phylogenetically closest neighbours (94.6% and 94.3% similarity that corresponds with 43 bp and 47 bp differences respectively). These values were under the intra-species similarities value of 97% obtained from *rpoD* phylogeny in *Aeromonas* (Soler *et al.*, 2004; Alperi *et al.*, 2008). The alignment of the *rpoD* sequences of strain 717 showed a deletion of a single triplet in the same position as that described for *A. trota* CECT4255^T (GenBank accession number AY169344) (Soler *et al.*, 2004).

The MLPA tree showed strain 717 within the cluster of *A. veronii*, *A. allosaccharophila* and *A. sobria*, representing an independent branch (Fig. 2). In contrast to what was observed with the other genes (16S rRNA and *rpoD*), the MLPA tree reveals strain 717 to be more distant from *A. veronii* or *A. allosaccharophila*, *A. sobria* being the phylogenetically closest neighbour.

DNA hybridization studies were performed between strain 717 and the type strains of the closest phylogenetic species: *A. sobria*, *A. allosaccharophila*, *A. veronii* and *A. jandaei*, as well as with the unrelated species *A. molluscorum*. DNA was extracted using the method described by Marmur (1961) and DNA-DNA hybridization was conducted using the method described by Ziemke *et al.* (1998) and Urdiain *et al.* (2008). Renaturalization was performed under optimal conditions at 70°C, single and double-strand DNAs were separated by the use of hidroxyapatite and colour development was measured at 405 nm using a Bio Whittaker Kinetic-QCL Microplate Reader. Values of DNA-DNA reassociation were determined at least three times for both direct and reciprocal reactions (e.g. A x B and B x A) for any given strain pair.

Average DNA binding levels of strain 717 with the type strains of *A. sobria* CECT4245^T, *A. allosaccharophila* CECT4199^T, *A. veronii* CECT4257^T and *A. jandaei* CECT4228^T were 54%, 61%, 66% and 40% respectively (Table S2). All of them under the 70% limit (Wayne *et al.*, 1987, Stackebrandt & Goebel, 1994) but some above 60% in concordance with other *Aeromonas* species (Huys *et al.*, 1997; Nhung *et al.*, 2007). Despite DNA-DNA reassociation being considered to give information on the DNA similarity between the entire bacterial genome, it has been criticized because of its high number of experimental errors associated with its lack of reproducibility and its failure to generate collective databases (Rosselló-Mora, 2006). Moreover, DNA-DNA reassociation values do not provide any information concerning phylogenetic relationships (Harayama & Kasai, 2006) in contraposition to the phylogenetic reconstruction with the MLPA performed for *Aeromonas* (Martínez-Murcia *et al.*, submitted) and applied in the present study. The polyphasic approach, using the 16S rRNA gene, the MLPA, DNA-DNA reassociation results and phenotypic characterization all clearly differentiated strain 717 from the rest of the *Aeromonas* species.

Description of *Aeromonas fluvialis* sp. nov

Aeromonas fluvialis (flu. vi. alis. L. adj. fluvialis belonging to a river).

Cells are straight Gram-negative, non-spore forming, rods non-encapsulated, mobile by single polar flagella and are 0.6-0.7 μm wide and 3-3.5 μm long, oxidase and catalase positive, reduce nitrate to nitrite and resistant to vibriostatic agent O/129.

Colonies on TSA are 4-5 mm in diameter, opaque, circular and beige in colour after 48 h at 30°C. No brown diffusible pigment is produced on TSA at room temperature or 30°C. Optimal growth temperature occurs at 30°C after 24 h in TSB. Growth was observed at 37°C but not at 4°C or 40°C on TSA. No haemolysis was observed on sheep blood agar at 30°C. Strain 717 was able to grow on MacConkey agar and at 0% of NaCl on TSB but not at 6%. Optimal growth occurs at pH 9 after 24 h on TSB but it does not grow at pH 4.5. Strain 717 produces indole from tryptophan and gas from glucose, is positive for the ONPG test and is able to use citrate. However, it is negative for the production of hydrogen sulphide from cysteine, VP test, hydrolysis of esculin, elastin, gelatinase, DNAase, urease, L-tryptophane deaminase and for the production ADH, LDC and ODC. Strain 717 is able to use D-mannose, D-glucose, N-acetyl-glucosamine, D-maltose, potassium gluconate and malic acid as sole carbon and energy source but not L-arabinose, D-mannitol, capric acid, adipic acid, phenylacetic acid or trisodium citrate. Acid is produced from glycerol, D-ribose, D-galactose, D-glucose, D-fructose, D-mannose, D-lactose, N-acetylglucosamine, salicin, D-cellobiose, D-maltose, D-saccharose, D-trehalose, amidon, glycogen, gentiobiose and potassium gluconate, but not from erythritol, L- or D-arabinose, L- or D-xylose, D-adonitol, methyl- β D-xylopiranoside, L-sorbose, L-rhamnose, dulcitol, inositol, D-mannitol, D-sorbitol, methyl- α D-mannopyranoside, methyl- α D-glucopyranoside, amygdalin, arbutin, aesculin, D-melobiose, inulin, D-melezitose, D-raffinose, xylitol, D-turanose, D-lyxose, D-tagatose, L- or D-fucose, L- or D-arabitol, potassium 2-ketogluconate or from potassium 5-ketogluconate. The API20E and API20NE profiles obtained for strain 717 were 1240024 and 7062744 respectively. Strain 717 showed resistance to amoxicillin, amoxicillin plus clavulanic acid and ticarcillin, it was intermediate to ticarcillin plus clavulanic and susceptible to the rest of the antimicrobials tested.

Isolated from water of the Muga river, Girona, north-east Spain. Type strain is 717 (=CECT 7401^T=LMG 24681^T).

Acknowledgements

We are grateful to M^a Jesús Pujalte and to Javier Pascual for their help with the DNA-DNA hybridization, to M^a Isabel Inza for her help with the phenotypic characterization and to Catalina Nuñez for her excellent technical assistance. We are also grateful to the Pharmacology Unit of the Rovira i Virgili University for let us to use the Bio Whittaker Kinetic-QCL Microplate Reader.

Fig. 1. Unrooted phylogenetic tree derived from the 16S rRNA gene sequences showing relationships of the strain 717 to all other *Aeromonas* species described with the neighbour-joining method. Numbers at nodes indicate bootstrap values (percentage of 1000 replicates).

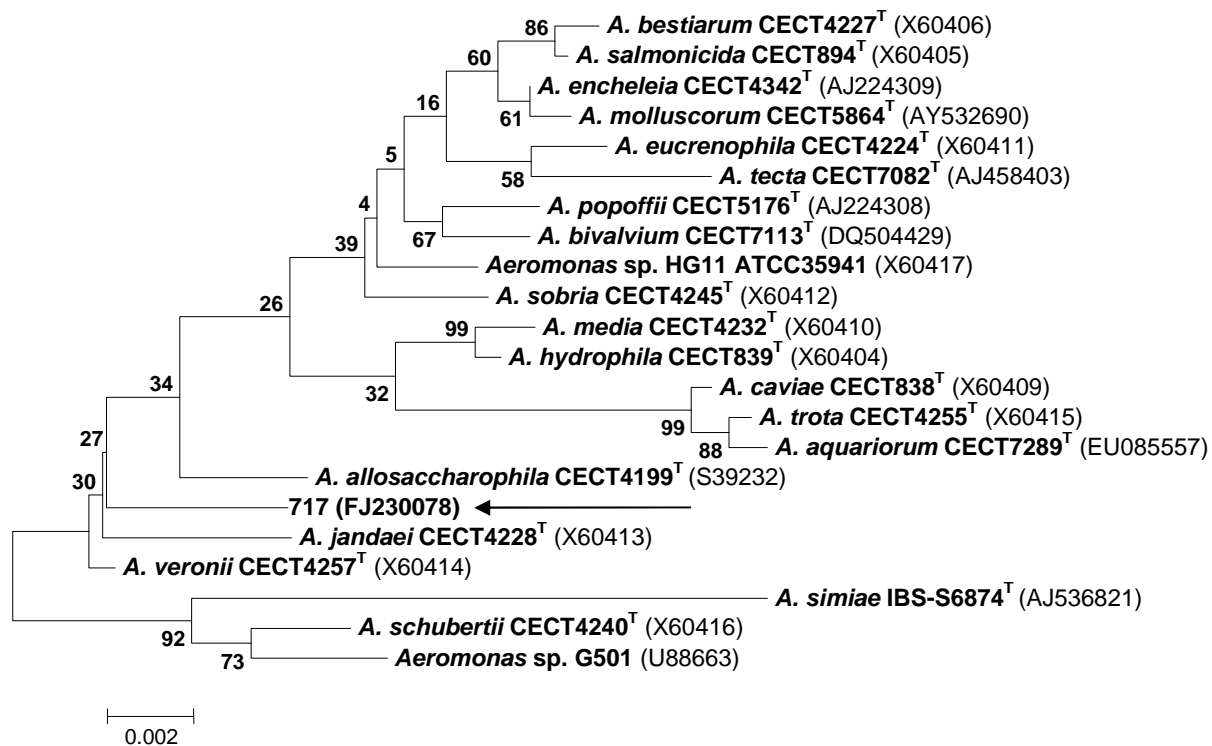


Fig. 2. Unrooted phylogenetic tree derived from the MLPA showing the corresponding relationships of strain 717 to all other *Aeromonas* species described with the neighbour-joining methods. Numbers at nodes indicate bootstrap values (percentage of 1000 replicates).

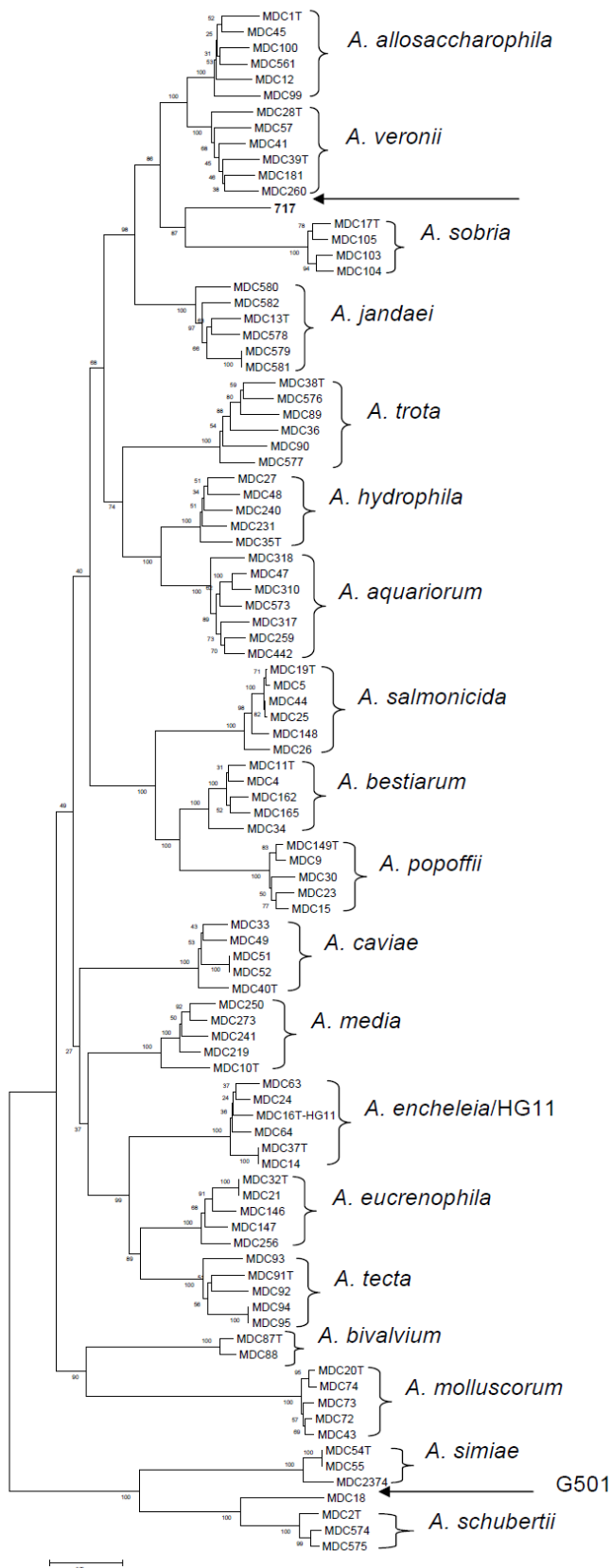


Table 1. Key tests for phenotypic differentiation of strain 717 from other *Aeromonas* species.

Taxa are identified as: 1, *A. hydrophila*; 2, *A. bestiarum*; 3, *A. salmonicida*; 4, *A. caviae*; 5, *A. media*; 6, *A. eucrenophila*; 7, *A. sobria*; 8, *A. veronii* biovar *sobria*; 9, *A. jandaei*; 10, *A. veronii* biovar *veronii*; 11, *A. schubertii*; 12, *A. trota*; 13, *A. encheleia*; 14, *A. allosaccharophila*; 15, *A. popoffii*; 16, *A. simiae*; 17, *A. molluscorum*; 18 *A. bivalvium*; 19 *A. aquariorum*; 20 *A. tecta*. All tests have been performed for strain 717 and type strains of the different species at 30°C and evaluated for 7 days. +, 100-85% of strains positive; V, 84-16% of strains positive; -, 15-0% of strains positive; ND, no data from these authors.

Characteristic	717	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16 ^A	17 ^o	18 [†]	19 [‡]	20 [§]
ADH	-	+(+)	+(+)	V(+)	+(+)	V(+)	V(+)	-(+)	+(+)	+(+)	-(-)	+(+)	+(+)	V(+)	V(+)	+(+)	+(+)	+(+)	-(+)	+(+)	+(+)
LDC	-	+(+)	V(+)	V(+)	-(-)	-(-)	-(-)	+(+)	+(+)	+(+)	+(+)	V(+)	+(+)	-(-)	+(+)	-(-)	+(+)	-(-)	+(+)	+(+)	V(+)
Gelatin	-	+(+)	V(+)	+(+)	+(+)	V(-)	+(+)	-(-)	+(+)	+(+)	+(+)	+(+)	+(+)	-(-)	+(+)	+(+)	ND(-)	ND(-)	+(+)	+(+)	ND(-)
Acid from																					
D-saccharose	+	+(+)	+(+)	+(+)	+(+)	+(+)	V(+)	+(+)	+(+)	-(+)	+(+)	-(-)	V(-)	V(+)	+(+)	-(+)	+(+)	+(+)	+(+)	+(+)	-(-)
Lactose	+	V(-)	-(-)	+(-)	V(-)	V(+)	-(+)	-(-)	-(-)	-(-)	V(-)	-(-)	-(+)	-(-)	-(-)	-(-)	ND(-)	-(-)	-(-)	-(-)	-(-)
D-mannitol	-	+(+)	+(+)	+(+)	+(+)	+(+)	+(+)	+(+)	+(+)	+(+)	+(+)	-(-)	V(+)	+(+)	+(+)	+(+)	-(-)	+(+)	+(+)	+(+)	ND(+)
L-arabinose	-	V(+)	+(+)	+(+)	+(+)	+(+)	V(+)	-(-)	V(+)	-(-)	-(-)	-(-)	-(-)	-(-)	V(+)	V(+)	-(-)	+(+)	+(+)	-(-)	-(-)
Salicin	+	V(-)	V(+)	V(-)	V(+)	V(+)	V(+)	-(-)	-(-)	-(-)	+(+)	-(-)	-(-)	-(+)	-(+)	-(+)	-(-)	ND(+)	+(+)	+(+)	V(+)

Data from species 1 to 15 were obtained from Abbott *et al.* (2003) who performed tests at 35°C with the exception of *A. popoffii* and *A. sobria* which were at 25°C, as did ^oMiñana-Galbis *et al.* (2004); ^AHarf-Monteil *et al.* (2004), [‡]Martínez-Murcia *et al.* (2008) and [§]Demarta *et al.* (2008) performed tests at 30°C; [†]Miñana-Galbis *et al.* (2007) performed test at 25-30°C. Type strains results are expressed in the table in brackets as (+) or (-).

Supplementary Table S1. Base differences in the 16S rRNA gene sequence between strain 717 and the type strains of *A. veronii* and *A. allosaccharophila*.

Strain	GenBank accession no.	Position*						
		460	461	462	464	468	469	472
717	FJ230078	T/C	A/G	C/G	T/G	A/C	C/G	C/T
<i>A. veronii</i> CECT4257 ^T	X60414	T	A	G	T	A	A	G
<i>A. allosaccharophila</i> CECT4199 ^T	S39232	T	A	G	G	A	A	G

*Following the *Escherichia coli* nomenclature (Brosius *et al.*, 1978).

Supplementary Table 2. DNA-DNA relatedness between strain 717 and *A. veronii*, *A. allosaccharophila*, *A. sobria*, *A. jandaei* and *A. molluscorum* type strains. Results are percentages and are expressed as the mean of three determinations.

Strain	Labelled DNA			
	717	CECT4257 ^T	CECT4119 ^T	CECT4245 ^T
717	100	66.5	63.2	57.3
<i>A. veronii</i> CECT4257 ^T	67.1	100	-	-
<i>A. allosaccharophila</i> CECT4119 ^T	58.8	-	100	-
<i>A. sobria</i> CECT4245 ^T	51.9	-	-	100
<i>A. jandaei</i> CECT4228 ^T	40.3	-	-	-
<i>A. molluscorum</i> CECT5864 ^T	52.9	-	-	-

Fig. S1A

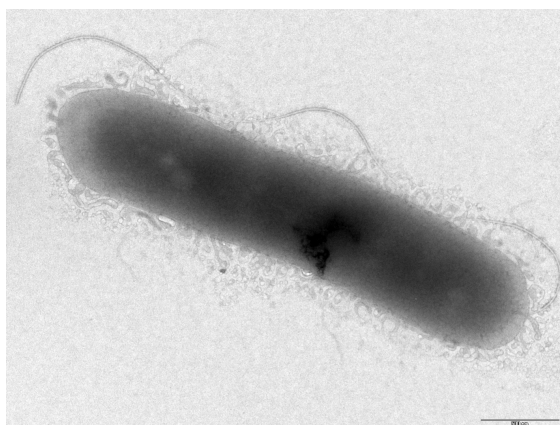
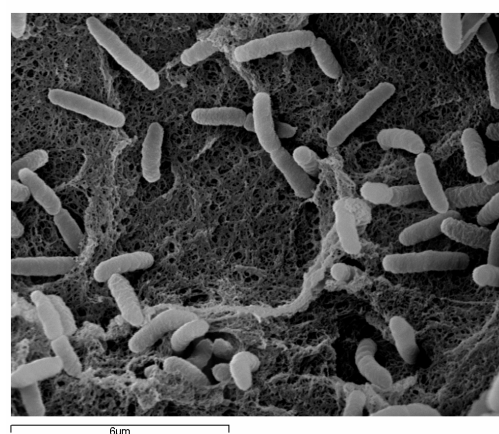
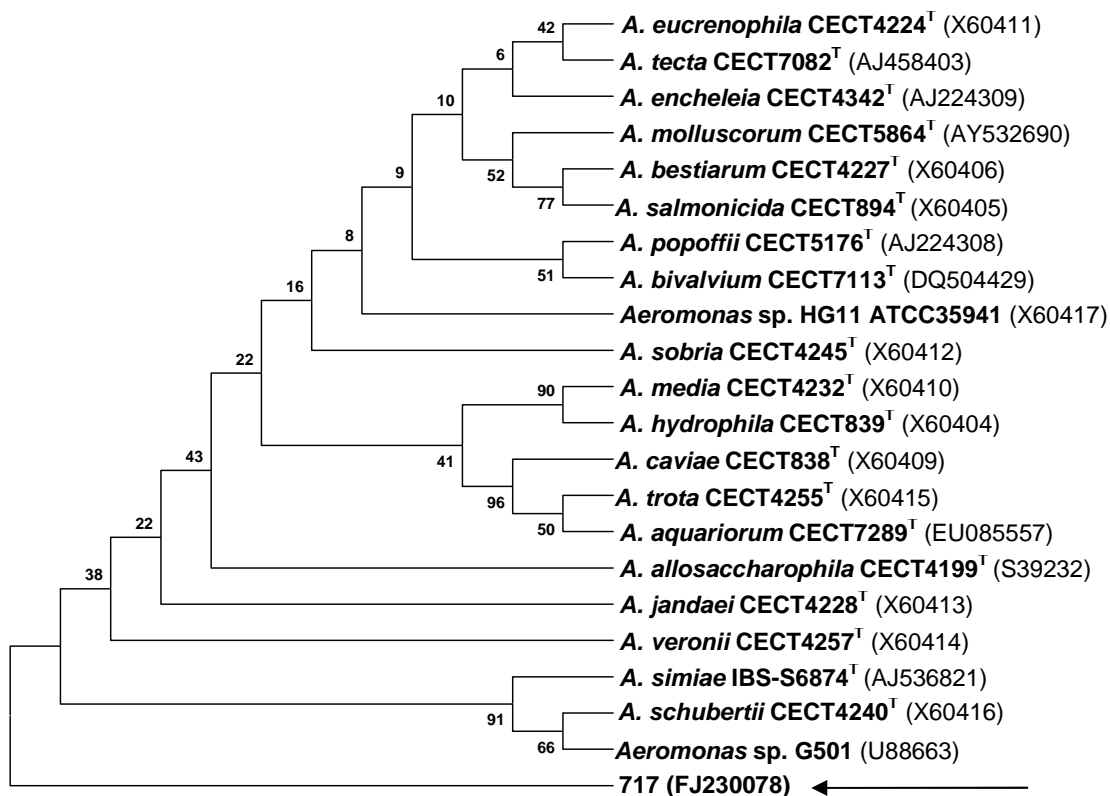


Fig. S1B



Supplementary Fig. S1. A-B. Electron microscopy images of strain 717. A. Transmission electron microscope, negative stain Bar, 0.5 μ m. B. Scanning electron microscope, Bar 6 μ m.



Supplementary Fig. S2. Unrooted phylogenetic tree derived from the 16S rRNA gene sequences showing relationships of the strain 717 to all other *Aeromonas* species described with the maximum-parsimony method. Numbers at nodes indicate bootstrap values (percentage of 1000 replicates).

REFERENCES

- Abbott, S. L., Cheung, W. K. & Janda, J. M. (2003).** The genus *Aeromonas*: biochemical characteristics, atypical reactions, and phenotypic identification schemes. *J Clin Microbiol* **41**, 2348-2357.
- 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.
- Borrell, N., Figueras, M. J. & Guarro, J. (1998).** Phenotypic identification of *Aeromonas* genomospecies from clinical and environmental sources. *Can J Microbiol* **44**, 103-108.
- Brosius, J., Palmer, M. L., Kennedy, P. J. & Noller, H. F. (1978).** Complete nucleotide sequence of a 16S ribosomal RNA gene from *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci USA* **75**, 4801-4805.
- Chacón, M. R., Castro-Escarpulli, G., Soler, L., Guarro, J. & Figueras, M. J. (2002).** A DNA probe specific for *Aeromonas* colonies. *Diagn Microbiol Infect Dis* **44**, 221-225.
- CLSI (2005).** Methods for antimicrobial dilution and disk susceptibility testing of infrequently isolated or fastidious bacteria; approved guideline M45-A. Wayne PA: Clinical and laboratory standard institute.
- Collado, L., Cleenwerck, I., Van Trappen, S., De Vos, P. & Figueras M. J. (in press).** *Arcobacter mytili* sp. nov., an indoxyl acetate hydrolysis-negative bacterium isolated from mussels. *Int J Syst Evol Microbiol*.
- Demarta, A., Küpfer, M., Riegel, P., Harf-Monteil, C., Tonolla, M., Peduzzi, R., Monera, A., Saavedra, M. J. & Martínez-Murcia, A. J. (2008).** *Aeromonas tecta* sp. nov., isolated from clinical and environmental sources. *Syst Appl Microbiol* **46**, 439-444.
- Figueras, M. J. (2005).** Clinical relevance of *Aeromonas*. *Rev Med Microbiol* **16**, 145-153.
- 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.
- Harayama, S. & Kasai, H. (2006).** Bacterial phylogeny reconstruction from molecular sequences. In Molecular identification, systematics, and population structure of Prokaryotes. p.105. Edited by E. Stackebrandt. Springer-Verlag Berlin Heidelberg.

Harf-Monteil, C., Fleche, A. L., Riegel, P., Prevost, 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.

Huys, G., Cnockaert, M. & Swings, J. (2005). *Aeromonas culicicola* Pidiyar *et al.* 2002 is a later subjective synonym of *Aeromonas veronii* Hickman-Brenner *et al.* 1987. *Syst Appl Microbiol* **28**, 604-609.

Huys, G., Kämpfer, P., Albert, M. J., Kuhn, I., Denys, R. & Swings, J. (2002). *Aeromonas hydrophila* subsp. *dhakensis* subsp. nov., isolated from children with diarrhoea in Bangladesh, and extended description of *Aeromonas hydrophila* subsp. *hydrophila* (Chester 1901) Stanier 1943 (approved lists 1980). *Int J Syst Evol Microbiol* **52**, 705-712.

Huys, G., Kämpfer, P., Altwegg, M., Kersters, I., Lamb, A., Coopman, R., Lüthy-Hottenstein, J., Vancanneyt, M., Janssen, P. & Kersters, K. (1997). *Aeromonas popoffii* sp. nov., a mesophilic bacterium isolated from drinking water production plants and reservoirs. *Int J Syst Bacteriol* **47**, 1165-1171.

Kimura, M. (1980). A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *J Mol Evol* **16**, 111-120.

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

Marmur, J. (1961). A procedure for the isolation of deoxyribonucleic acid from micro-organisms. *J Mol Biol* **3**, 208-218.

Martin-Carnahan, A. & Joseph, S. W. (2005). Order XII. *Aeromonadales* ord. nov. In Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, 2nd edn, vol. 2, part B, p. 556. Edited by D. J. Brenner, N. R. Krieg, J. T. Staley & G. M. Garrity. New York: Springer.

Martínez-Murcia, A. J., Benlloch, S. & Collins, M. D. (1992). Phylogenetic interrelationships of members of the genera *Aeromonas* and *Plesiomonas* as determined by 16S ribosomal DNA sequencing: lack of congruence with results of DNA-DNA hybridizations. *Int J Syst Bacteriol* **42**, 412-421.

Martínez-Murcia, A. J., Figueras, M. J., Saavedra, M. J. & Stackebrandt, E. (2007). The recently proposed species *Aeromonas sharmana* sp. nov., isolate GPTSA-6T, is not a member of the genus *Aeromonas*. *Int Microbiol* **10**, 61-64.

Martínez-Murcia, A. J., Monera, A., Alperi, A., Figueras, M. J. & Saavedra, M. J. (2009). Phylogenetic evidence suggests that strains of *Aeromonas hydrophila* subsp. *dhakensis* belong to the species *Aeromonas aquariorum* sp. nov. *Curr Microbiol* **58**, 76-80.

Martínez-Murcia, A. 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 Evol Microbiol* **58**, 1169-1175.

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.

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.

Morandi, A., Zhaxybayeva, O., Gogarten, J. P. & Graf, J. (2005). Evolutionary and diagnostic implications of intragenomic heterogeneity in the 16S rRNA gene in *Aeromonas* strains. *J Bacteriol* **187**: 6561-6564.

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.

Ormen, O., Granum, P. E., Lassen, J. & Figueras, M. J. (2005). Lack of agreement between biochemical and genetic identification of *Aeromonas* spp. *APMIS* **113**, 203-207.

Pidiyar, V., Kaznowski, A., Narayan, N. B., Patole, M. & Shouche, Y. S. (2002). *Aeromonas culicicola* sp. nov., from the midgut of *Culex quinquefasciatus*. *Int J Syst Evol Microbiol* **52**, 1723-1728.

Rosselló-Mora, R. (2006). DNA-DNA reassociation applied to microbial taxonomy and their critical evaluation. In molecular identification, systematics, and population structure of prokaryotes. p.105. Edited by E. Stackebrandt. Spriger-Verlag Berlin Heidelberg.

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.

Saha, P. & Chakrabarti, T. (2006). *Aeromonas sharmana* sp. nov., isolated from a warm spring. *Int J Syst Evol Microbiol* **56**, 1905-1909.

Saitou, N. & Nei, M. (1987). The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol* **4**, 406-425.

Sepe, A., Barbieri, P., Peduzzi, R. & Demarta, A. (2008). Evaluation of *recA* sequencing for the classification of *Aeromonas* strains at the genotype level. *Lett Appl Microbiol* **46**, 439-444.

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**, 5732-5734.

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.

Stackebrandt, E. & Goebel, B. M. (1994). Taxonomic note: a place for DNA-DNA reassociation and 16S rRNA sequences analysis in the present species definition. *Int J Syst Bacteriol* **44**, 846-849.

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.

Thompson, J. D., Higgins, D. G. & Gibson, T. J. (1994). CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res* **22**, 4673-4680.

Urdiain, M., López-López, A., Gonzalo, C., Busse, H. J., Langer, S., Kämpfer, P. & Rosselló-Móra, R. (2008). Reclassification of *Rhodobium marinum* and *Rhodobium pfennigii* as *Afifella marina* gen. nov. comb. nov. and *Afifella pfennigii* comb. nov., a new genus of photoheterotrophic *Alphaproteobacteria* and emended descriptions of *Rhodobium*, *Rhodobium orientis* and *Rhodobium gokarnense*. *Syst Appl Microbiol* **31**, 339-351.

Wayne, L. G., Brenner, D. J., Colwell, R. R. & 9 other authors (1987). International committee on systematic bacteriology. Report of the ad hoc committee on reconciliation of approaches to bacterial systematics. *Int J Syst Bacteriol* **37**, 463-464.

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

Ziemke, F., Hofle, M. G., Lalucat, J. & Rosselló-Mora, R. (1998). Reclassification of *Shewanella putrefaciens* Owen's genomic group II as *Shewanella baltica* sp. nov. *Int J Syst Bacteriol* **48**, 179-186.

Artículo:

- 4.1.7. A Alperi, AJ Martínez-Murcia, WC Ko, A Monera, MJ Saavedra, MJ Figueras. *Aeromonas taiwanensis* sp. nov. and *Aeromonas sanarellii* sp. nov., two new clinical species from Taiwan. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. En revisión.

Resumen

Dos cepas clínicas de *Aeromonas*, aisladas de heridas de pacientes en Taiwán y recibidas en nuestro laboratorio para su identificación, no se pudieron asignar a ninguna especie conocida del género ya que presentaban patrones de RFLP del ADNr 16S atípicos. Tampoco las secuencias del gen ARNr 16S permitieron su identificación inequívoca. El análisis preliminar de estas secuencias mostró que las especies más similares en ambos casos (entre el 99.6 y el 99.8% de similitud) eran *Aeromonas caviae*, *Aeromonas trota* y *Aeromonas aquariorum*. Las secuencias obtenidas del gen *rpoD* mostraron, sin embargo, a estas dos cepas como dos líneas filogenéticas de *Aeromonas* independientes. El análisis filogenético multilocus con 5 genes *housekeeping* (*gyrB*, *rpoD*, *recA*, *dnaJ* y *gyrA*; 3684 pb) confirmó ambas cepas como líneas independientes dentro del género. Estos datos, junto con los resultados de reasociación ADN-ADN y la caracterización fenotípica, corroboran que estas dos cepas representan nuevas especies del género *Aeromonas* para las cuales se han propuesto los nombres de *Aeromonas taiwanensis*, cuya cepa tipo es A2-50 (CECT 7403^T= LMG 24683^T) y *Aeromonas sanarellii*, con la cepa tipo A2-67 (CECT 7402^T= LMG 24682^T).

***Aeromonas taiwanensis* sp. nov. and *Aeromonas sanarellii* sp. nov., two new clinical species from Taiwan**

Anabel Alperi¹, Antonio J. Martínez-Murcia², Wen-Chien Ko³, Arturo Monera², Maria J. Saavedra^{2,4} & Maria J. Figueras^{1*}

¹Unit of Microbiology, Rovira i Virgili University, IISPV, Sant Llorenç 21, 43201, Reus, Spain. ²Molecular Diagnostics Center (MDC), Biomolecular Technologies S.L., and Miguel Hernández University, Orihuela E-03300, Alicante, Spain. ³Department of Medicine, National Cheng Kung University, Tainan, Taiwan. ⁴Department of Veterinary Sciences, CECAV-University of Trás-os-Montes e Alto Douro, Vila Real, Portugal.

*corresponding author: M^a José Figueras, mariajose.figueras@urv.cat

Tel: +34-977759321; Fax: +34-977759322.

SUMMARY

Two clinical *Aeromonas* sp. strains (A2-50 and A2-67) recovered from the wounds of two patients in Taiwan could not be assigned to any known species of this genus based on the sequences of the 16S rDNA gene that showed similarities with *A. caviae*, *A. trota* and *A. aquariorum* ranging from 99.6% to 99.8%. The *rpoD* phylogenetic tree allocated these two strains to two new and independent phylogenetic lines, the neighbouring species being *A. caviae* showing 93.2% similarity (56 bp differences) with strain A2-50 and 92.2% (63 bp differences) with strain A2-67. A multi-locus phylogenetic analysis of 5 housekeeping genes (*gyrB*, *rpoD*, *recA*, *dnaJ* and *gyrA*; 3684 bp) confirmed both strains as independent phylogenetic lineages within the genus. This data together with the phenotypic characterization and DNA-DNA reassociation results revealed that these two strains are novel *Aeromonas* species, for which the names *Aeromonas taiwanensis* sp. nov., with the type strain A2-50 (=CECT 7403^T=LMG 24683^T) and *Aeromonas sanarellii* sp. nov., with the type strain A2-67 (=CECT 7402^T=LMG 24682^T) are proposed.

Running title: Two new *Aeromonas* clinical species from Taiwan.

The GenBank accession number for the 16S rRNA, *gyrB*, *rpoD*, *recA*, *dnaJ* and *gyrA* genes sequences of A2-50 and A2-67 are FJ230077 and FJ230076, FJ807272 and FJ807277, FJ807271 and FJ807275, FJ807273 and FJ807278, FJ807270 and FJ807279, FJ807274 and FJ807276, respectively.

The genus *Aeromonas* includes facultative anaerobic Gram-negative, non-spore-forming generally motile bacilli or cocobacilli, usually oxidase and catalase positive, able to reduce nitrate to nitrite and generally resistant to the vibriostatic agent O/129 (2,4-diamino-6,7-diisopropylpteridine) (Abbott *et al.*, 2003; Martin-Carnahan & Joseph, 2005). The genus belongs to the family *Aeromonadaceae*, order *Aeromonadales* into the class of the *Gammaproteobacteria* (Martin-Carnahan & Joseph, 2005). Today, the genus *Aeromonas* includes 20 recognized species: *A. hydrophila*, *A. bestiarum*, *A. salmonicida*, *A. caviae*, *A. media*, *A. eucrenophila*, *A. sobria*, *A. veronii*, *A. jandaei*, *A. schubertii*, *A. trota*, *A. allosaccharophila*, *A. encheleia*, *A. popoffii*, *A. simiae*, *A. molluscorum*, *A. bivalvium* and the lately described *A. aquariorum* and *A. tecta* (Harf-Monteil *et al.*, 2004; Martin-Carnahan & Joseph, 2005; Miñana-Galbis *et al.*, 2004, 2007; Martínez-Murcia *et al.*, 2008; Demarta *et al.*, 2008). Recently two new species, *A. fluvialis* isolated from river water and *A. piscicola* isolated from diseased fish, have been proposed by our group (Alperi *et al.*, in press; Beaz-Hidalgo *et al.*, submitted) as well as some reclassifications (Martínez-Murcia *et al.*, 2007, 2009). The taxonomy of this genus is complex because despite each species apparently having specific phenotypic characteristics, biochemical identification is laborious and very imprecise showing a poor correlation with genotypic identification (Borrell *et al.*, 1998; Soler *et al.*, 2003; Figueras, 2005; Ormen *et al.*, 2005). The 16S rRNA sequence similarity among the species of the genus is very high, ranging from 96.7% to 100% (Martínez-Murcia *et al.*, 1992, 2007; Saavedra *et al.*, 2006). In fact 19 of the 20 accepted species have similarities >97% (Alperi *et al.*, in press) and furthermore, this gene presents microheterogeneities (Figueras *et al.*, 2005; Martínez-Murcia *et al.*, 2005; Morandi *et al.*, 2005; Alperi *et al.*, 2008) all of which hamper the usefulness of these genes for identification (Alperi *et al.*, 2008), such is the case with *A. culicicola* (Figueras *et al.*, 2005; Alperi *et al.*, 2008) now considered a synonym of *A. veronii* (Huys *et al.*, 2005). However, several housekeeping genes have proven to have a high discriminatory power for differentiating neighbouring species and have been used to clarify the phylogeny of *Aeromonas* (Yañez *et al.*, 2003; Soler *et al.*, 2004; Küpfer *et al.*, 2006; Nhung *et al.*, 2007; Sepe *et al.*, 2008). Recently, a complete Multi Locus Phylogenetic Analysis (MLPA) based on 7 housekeeping genes (*gyrB*, *gyrA*, *rpoD*, *dnaJ*, *dnaX*, *recA* and *atpD*), which included several strains of each of the 19 species, has been developed (Martínez-Murcia *et al.*, submitted).

Aeromonas are primarily inhabitants of aquatic environments often associated with fish and human diseases (Figueras, 2005; Martin-Carnahan & Joseph, 2005). The most common clinical presentation of *Aeromonas* is diarrhoea followed by localized soft-tissue infections and bacteraemia, being the prevailing associated species *A. veronii*, *A. caviae* and *A. hydrophila* (Figueras, 2005). Over recent years numerous cases of *Aeromonas* infections have been described in Taiwan (Wu *et al.*, 2007).

The present investigation was initiated to genetically identify a group of *Aeromonas* extraintestinal strains isolated in the National Cheng Kung University Hospital in Tainan, Taiwan, using a previously described 16S rDNA-RFLP method (Figueras *et al.*, 2000). Two of these strains,

A2-50 and A2-67, received as *A. hydrophila* and *A. caviae* respectively, both showed an atypical RFLP pattern similar to patterns observed for *A. caviae* strains that presented microheterogeneities in the 16S rRNA gene (Alperi *et al.*, 2008). However, the *rpoD* sequences showed that these strains might constitute two novel and independent *Aeromonas* phylogenetic lines. In the present study, a polyphasic approach, based on the sequences of the 16S rRNA gene, MLPA of five genes (*gyrB*, *rpoD*, *recA*, *dnaJ* and *gyrA*), DNA-DNA reassociation experiments and a phenotypic analysis, were performed to establish the taxonomic position of the two clinical isolates, A2-50 and A2-67.

Strain A2-50 together with *Enterobacter cloacae* and *Enterococcus* sp was isolated on the 10th day of hospitalization from the burn wound of a 40-year-old male with flame burn involving 52% of body surface area. The patient also development a concurrent *Aeromonas* and *Enterococcus* bacteraemia, but unfortunately the *Aeromonas* blood isolate was lost. Both, the burn wound infection and the bacteraemia were considered nosocomial. Strain A2-67 was isolated from a 70-year-old female with non-insulin-dependent diabetes mellitus. She experienced trauma and had abrasion wounds over her right elbow and a right humeral fracture. On admission, a wound culture from her right elbow grew *Aeromonas*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Bacillus* species. No bacteraemia was noted.

To perform the phylogenetic study strains A2-50 and A2-67 were cultured on sheep blood agar at 30°C, DNA was extracted from single colonies using InstaGene™ Matrix (Bio-Rad Laboratories) following the manufacturer's instructions in order to sequence the 16S rDNA (1503 pb) and *rpoD* (820 pb) genes. Primers and conditions for the amplification and sequencing of those genes have been described previously (Martínez-Murcia *et al.*, 1992; Soler *et al.*, 2004). The 16S rDNA and *rpoD* sequences obtained were independently aligned with the sequences of the type and references strains of all the members of the genus *Aeromonas* that were available in the GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=nucleotide>) by CLUSTAL W program, version 1.83 (Thompson *et al.*, 1994). Genetic distances and clustering were obtained using Kimura's 2-parameter model (Kimura, 1980), evolutionary trees were constructed by the neighbour-joining (and maximum-parsimony for 16S rRNA gene) method (Saitou & Nei, 1987) using the MEGA4 program (Tamura *et al.*, 2007). Stability of the relationships was assessed by bootstrapping (1000 replicates). The MLPA was performed on the basis of *gyrB* (923 bp), *rpoD* (652 bp), *recA* (600 bp), *dnaJ* (800 bp) and *gyrA* (709 bp) genes, in the Molecular Diagnostic Center (MDC), Orihuela, Spain, as described previously (Martínez-Murcia *et al.*, submitted).

The 16S rRNA gene phylogenetic trees (Fig. 1 and Fig. S1) showed strains A2-50 and A2-67 as independent phylogenetic lines within the genus *Aeromonas*. Those strains clustered in the 16S rDNA phylogenetic trees with *A. caviae*, *A. trota* and *A. aquariorum*, with a 99% robust bootstrap value when the phylogeny was inferred with the neighbour-joining algorithm (Fig. 1) and 96% with maximum-parsimony algorithm (Fig. S1). The two strains were highly related to each other, just 3 bp

differences (99.8%) between their 16S rDNA sequences. The nearest species to these two strains (A2-50 and A2-67) on the basis of this gene were *A. trota* (99.7% and 99.6% similarity, 4 and 5 bp differences respectively), *A. caviae* (99.6% and 99.7% similarity, 5 and 4 bp differences respectively) and the recently described *A. aquariorum* (99.8% and 99.6% similarity, 2 and 5 bp differences respectively). Chromatogram analysis of the 16S rDNA sequences (1503 bp) of strains A2-50 and A2-67 revealed the existence of microheterogeneities in 8 and 3 positions respectively (Table S1), representing a variability of 0.53% and 0.2% respectively. Microheterogeneities were located within the V3 and V6 regions, the ones containing the signature nucleotides that enable the identification of most *Aeromonas* species (Martínez-Murcia *et al.*, 1992; Saavedra *et al.*, 2006), therefore hampering proper identification (Alperi *et al.*, 2008). Strains A2-50 and A2-67 showed a 99% similarity with *A. caviae*, *A. trota* and *A. aquariorum* using BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). This high similarity is in agreement with the general behaviour of the species within this genus. In fact, two species, *A. salmonicida* and *A. bestiarum*, possess an identical 16S rDNA sequence (Martínez-Murcia *et al.*, 1992, 2005) and the others possess similarity values that range from 96.8% (48 bp differences between *A. simiae* and *A. bestiarum* type strain) to 99.8% (3 bp differences between *A. molluscorum* and *A. encheleia*, and between *A. hydrophila* and *A. media* type strains). Consequently, in *Aeromonas* the 16S rDNA similarity cut value of 97% proposed for species differentiation (Stackebrandt & Goebel, 1994; Stackebrandt *et al.*, 2002) cannot be applied, nor can the new proposed value of 98.7-99% (Stackebrandt & Ebers, 2006). This statement agrees with conclusions derived from an early 16S rRNA phylogeny published by Martínez-Murcia *et al.* (1992), where absolute values for species delineation in bacteria were not recommended because of different rates of sequence divergence.

The *rpoD* phylogenetic tree showed strains A2-50 and A2-67 as two independent phylogenetic lines within *Aeromonas* (data not shown), showing a 92.7% similarity, 59 bp differences between their sequences. The nearest species on the basis of the *rpoD* gene was *A. caviae*, showing sequence similarities of 93.2% (56 bp differences) to A2-50 and 92.2% (63 bp differences) to A2-67. These values are below the mean intra-species similarity of 97% previously established for the *rpoD* gene in the genus *Aeromonas* (Soler *et al.*, 2004; Alperi *et al.*, 2008).

The MLPA tree showed, in concordance with the *rpoD* phylogeny (data not shown) and in contrast with the 16S rRNA gene, that strains A2-50 and A2-67 were not phylogenetically related to *A. trota* or *A. aquariorum* (Fig. 2), but appeared in the same cluster that included *A. media* and *A. caviae*, forming independent branches. Species delineation based on the analysis of five housekeeping genes have been recommended (Stackebrandt *et al.*, 2002), although only the recently described *A. fluvialis* (Alperi *et al.*, in press) and the two species described in this study comply with this recommendation in the genus *Aeromonas*.

To establish DNA-DNA reassociation values, DNA was extracted using the Marmur's method (Marmur, 1961). The reassociation experiments were conducted using the methodology of Ziemke *et al.* (1998) and Urdaín *et al.* (2008). Renaturalization was performed under optimal conditions at 70°C,

reassociation values were determined at least three times (direct and reciprocal reactions, e.g. A x B and B x A) for any given strain pair and results expressed as the mean, as described earlier (Alperi *et al.*, in press). The DNA-DNA reassociation values between A2-50 and A2-67 with *A. caviae* type strain (CECT838^T), the most closely phylogenetic species on the basis of the MLPA, were 60% and 65% respectively, while both strains showed a 64% similarity (Table S2), all below the 70% established for species delineation (Wayne *et al.*, 1987; Stackebrandt & Goebel, 1994; Stackebrandt *et al.*, 2002; Rosselló-Móra, 2006). Although DNA-DNA hybridization values >60% may be considered borderline, these values are quite common for different *Aeromonas* species (Nhung *et al.*, 2007; Alperi *et al.*, in press). This also happens among species of the neighbour genus *Vibrio* (Gómez-Gil *et al.*, 2003, Thompson *et al.*, 2003).

In order to determine colony characteristics i.e., size, colour, production of brown diffusible pigment, strains A2-50 and A2-67 were grown at 30°C for 24h on TSA, and on blood agar to determine the existence of haemolysis. Optimal growth temperature and pH were determined on TSB after 24h by optical density. Twenty-eight phenotypic tests, selected from Abbott *et al.* (2003) and listed in a previous study (Alperi *et al.*, in press), were used for the characterization of strains A2-50 and A2-67. These tests were performed three times and were incubated at 30°C and also at 36°C, due to the clinical origin of the strains. Some tests were further confirmed in parallel using commercial identification kits (API20NE and API20E, BioMerieux). Additional tests from the latter kits together with the fermentation and oxidation of 49 carbohydrates using API50CH (BioMerieux), were also considered. Type strains belonging to all *Aeromonas* species were evaluated, under identical conditions as those used for A2-50 and A2-67, for all differential tests included in Table 1.

Strains A2-50 and A2-67 showed relatively similar biochemical profiles, but they could be differentiated from each other because A2-50 is able to use citrate and to produce acid from D-raffinose but not A2-67. In addition, the latter is able to growth at 45°C in sheep blood agar but not A2-50 (Table 1). Strains A2-50 and A2-67 also showed distinctive characters that separated them from other species (*A. hydrophila*, *A. veronii* bv. *sobria* and *A. caviae*) commonly encountered in clinical samples (Table 1). Interestingly, both strains were able to produce acid from amygdalin, a characteristic only so far described in nine *Aeromonas* strains within a study performed by Abbott *et al.* (2003) who evaluated the atypical phenotypic properties of the genus. In that study, they encountered four *A. caviae* strains that produced acid from amygdalin and from D-raffinose, which coincides with the profile of A2-50 (Table 1). Other traits that differentiated A2-50 and A2-67 from other species were their capacity to produce acid from L-arabinose, glycerol and salicin as well as to hydrolyze aesculin, and their negative results for the VP test, LDC and production of gas from glucose and acid from D-cellobiose and D-mannose (Table 1). Interestingly, strain A2-67 displayed two colony types of the same size (4-5 mm in diameter). One was opaque, circular and beige in colour while the other was translucent on TSA after 48h at 30°C. These two morphologies were also observed

on blood agar. Both colony types produced the same biochemical responses and showed identical ERIC-PCR profiles (data not shown).

Cell sizes, morphologies and the presence of flagella were determined with Electron Microscopy (Fig. S2) following procedures described in a previous study (Collado *et al.*, in press).

The susceptibilities of strains A2-50 and A2-67 against 27 antibiotics (Table S3) were tested, at the University of Trás-os-Montes e Alto Douro in Portugal as described earlier (Alperi *et al.*, in press). Both strains showed resistance to amoxicillin, amoxicillin plus clavulanic acid, ticarcillin, ticarcillin plus clavulanic, cephalothin and erythromycin; A2-50 was intermediate to streptomycin, while A2-67 was resistance to ceftiofene. Both strains were susceptible to the other antimicrobials tested.

The 16S rDNA sequences, MLPA, phenotypic characterization, and DNA-DNA reassociation results all clearly separated strain A2-50 from A2-67 and both strains from the other *Aeromonas* species.

***Aeromonas taiwanensis* sp. nov**

Aeromonas taiwanensis (tai.wan.en'sis. N.L. fem. adj. *taiwanensis* of Taiwan, where the strain was isolated).

Cells are straight Gram-negative, non-spore forming, rods, non-encapsulated, motile and are 0.8-1 μm wide and 1.8-2.5 μm long, oxidase and catalase positive, reduce nitrate to nitrite and resistant to vibriostatic agent O/129.

Colonies on TSA are 2-5 mm in diameter, opaque, circular and beige in colour after 48h at 30°C. No brown diffusible pigment is produced on TSA. Optimal growth temperature occurs at 30°C. Growth was observed at 36°C but not at 40°C or 4°C after 24h on sheep blood agar. No β -haemolysis was observed on sheep blood agar at 30°C or 36°C. A2-50 is able to grow on MacConkey agar and at 0% of NaCl but not at 6% after 24h on TSB. Optimal growth pH occurs at pH 8.5-9.5 after 24h on TSB but does not grow at pH 4.5. Strain A2-50 produces indole from tryptophan, ADH, is positive for the ONPG test, hydrolysis of aesculin, gelatin, DNA and L-tryptophane and is able to use citrate. However, is negative for VP test, hydrolysis of elastin and urea and for the production of hydrogen sulphide from cysteine, gas from glucose, swarming, LDC and ODC. Strain A2-50 is able to use D-glucose, L-arabinose, D-mannitol, D-maltose, N-acetyl-glucosamine, potassium gluconate, capric acid and malic acid as sole carbon and energy sources but not D-mannose, adipic acid, phenylacetic acid or trisodium citrate. Acid is produced from D-glucose, D-saccharose, L-arabinose, D-raffinose, D-ribose, amygdalin, salicin, D-galactose, D-fructose, D-mannitol, glycerol, N-acetyl glucosamine, arbutin, aesculin, D-maltose, D-trehalose, amidon, glycogen and potassium gluconate but not from D-

cellobiose, D-arabinose, L-rhamnose, *m*-inositol, erythritol, L- or D- xylose, D-adonitol, methyl- β D-xylopiranoside, D-mannose, L-sorbose, L-rhamnose, dulcitol, inositol, D-sorbitol, methyl- α D-mannopyranoside, methyl- α D-glucopyranoside, D-lactose, D-melobiose, inulin, D-melezitose, xylitol, gentiobiose, D-turanose, D-lyxose, D-tagatose, L- or D-fucose, L- or D-arabitol, potassium 2-ketogluconate or potassium 5-ketogluconate.

The API20E and API20NE codes for strain A2-50 were: 3266127 and 7575754, respectively. Isolated from Tainan, Taiwan. Type strains is A2-50 (=CECT 7403^T=LMG 24683^T).

***Aeromonas sanarellii* sp. nov**

Aeromonas sanarellii (sa.na.re.lli.i. M.L. adj. *sanarellii* in honour of Sanarelli, for his contribution to our knowledge of *Aeromonas* describing the first *Aeromonas* as *Bacillus hydrophilus fuscus* in 1891 (Martin-Carnahan & Joseph, 2005)).

Cells are straight, non-spore forming, non-encapsulated, motile and are 0.7 μ m wide and 2.5 μ m long. Gram-negative, oxidase and catalase positive, reduce nitrate to nitrite and showed to be resistant to vibriostatic agent O/129.

Aeromonas strain A2-67 displayed two colony types in TSA and blood agar. Colonies on TSA are 4-5 mm in diameter, one of them opaque, circular and beige in colour while the other is translucent, after 48h at 30°C. No brown diffusible pigment is produced on TSA. Optimal growth temperature occurs at 30°C, growth was observed up to 45°C but not at 50°C after 48h and at 4°C after 7 days on sheep blood agar. No β -haemolysis was observed on sheep blood agar at 30°C or 36°C. Strain A2-67 is able to grow on MacConkey and at 0% of NaCl but not at 6% on TSB. Optimal growth pH occurs at pH 9 after 24h on TSB but does not grow at pH 4.5. Strain A2-67 produces indole from tryptophan, ADH, is positive for the ONPG test, hydrolyzes aesculin, gelatin, DNA and L-tryptophane. However, it is negative for VP test, utilization of citrate, hydrolysis of elastin and urea and for the production of hydrogen sulphide from cysteine, gas from glucose, swarming, LDC and ODC. Strain A2-67 is able to use D-glucose, L-arabinose, D-mannitol, D-maltose, N-acetylglucosamine, potassium gluconate, capric acid and malic acid as sole carbon and energy sources but not D-mannose, adipic acid, phenylacetic acid or trisodium citrate. Acid is produced from D-glucose, D-saccharose, L-arabinose, D-ribose, amygdalin, salicin, D-galactose, D-fructose, D-mannitol, glycerol, N-acetyl glucosamine, arbutin, aesculin, D-maltose, D-trehalose, amidon, glycogen and potassium gluconate but not from D-cellobiose, D-raffinose, D-arabinose, L-rhamnose, *m*-inositol, erythritol, L- or D- xylose, D-adonitol, methyl- β D-xylopiranoside, D-mannose, L-sorbose, L-rhamnose, dulcitol, inositol, D-sorbitol, methyl- α D-mannopyranoside, methyl- α D-glucopyranoside, D-lactose, D-melobiose, inulin, D-melezitose, xylitol, gentiobiose, D-turanose, D-lyxose, D-tagatose, L- or D-fucose, L- or D- arabitol, potassium 2-ketogluconate or potassium 5-ketogluconate.

The API20E and API20NE codes for strain A2-67 were 3066127 and 7575754, respectively.

Isolated from Tainan, Taiwan. Type strain is A2-67 (=CECT 7402^T=LMG 24682^T).

Acknowledgements

We are grateful to M^a Isabel Inza for her help in the phenotypic characterization and to Catalina Nuñez for her excellent technical assistance. We are also grateful to the Pharmacology Unit of the Rovira i Virgili University for the use of their Bio Whittaker Kinetic-QCL Microplate Reader.

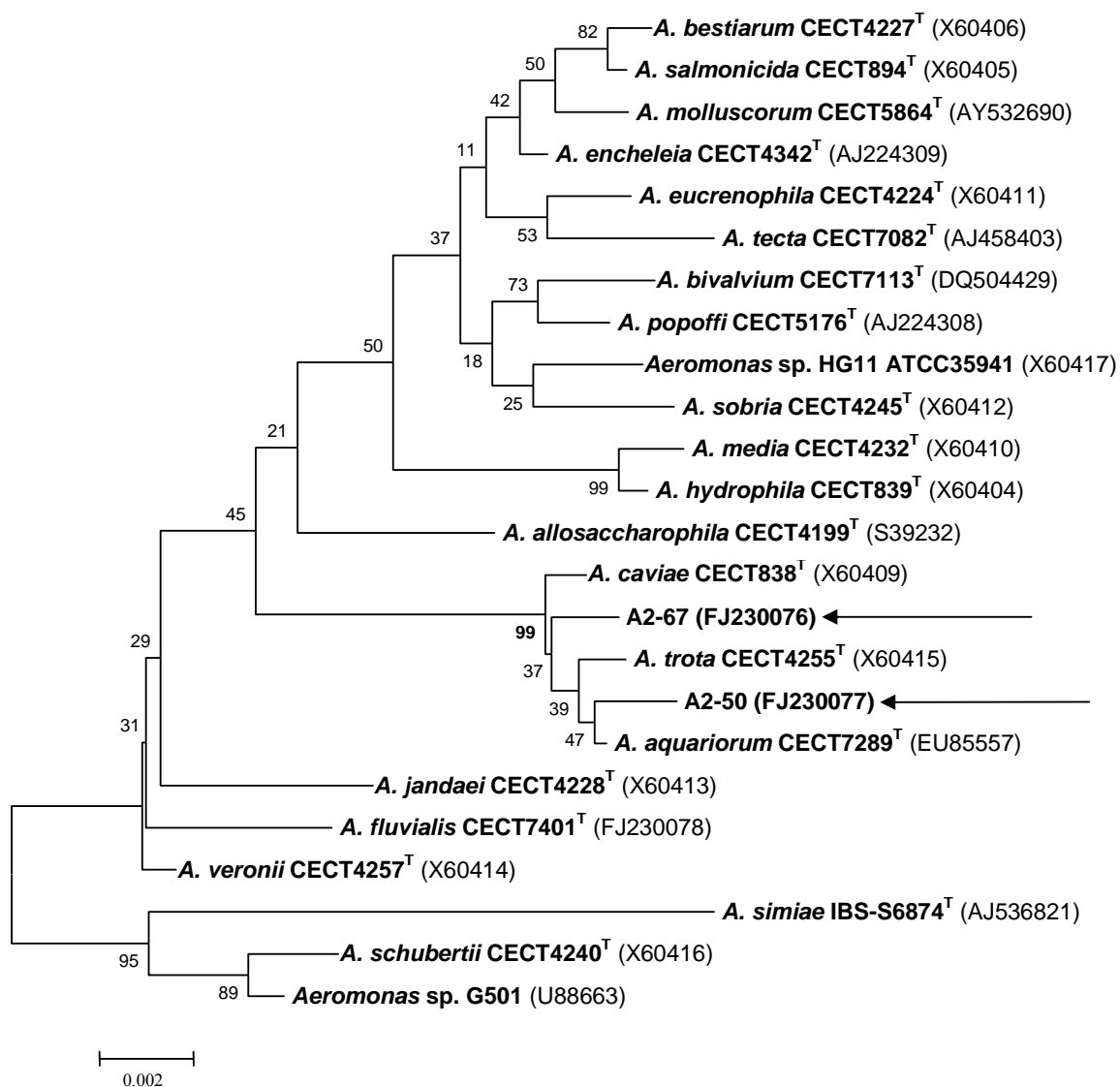


Fig. 1. Unrooted phylogenetic tree derived from the 16S rRNA gene sequences shows the relationships of strains A2-50 and A2-67 and all other *Aeromonas* species by the neighbour-joining method. Numbers at nodes indicate bootstrap values (percentage of 1000 replicates).

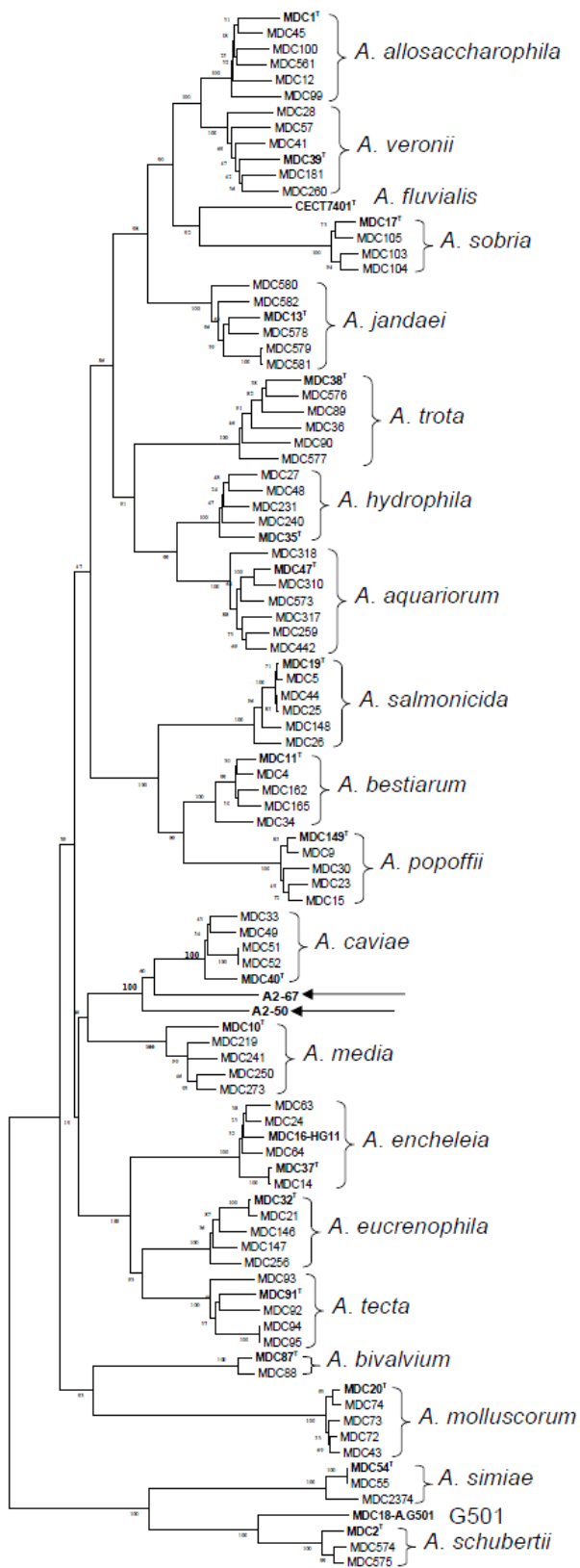


Fig. 2. Unrooted phylogenetic tree derived from the MLSA shows the corresponding relationships of strains A2-50 and A2-67 to all other *Aeromonas* species by with the neighbour-joining method. Numbers at nodes indicate bootstrap values (percentage of 1000 replicates)

Table 1. Key tests for phenotypic differentiation of strains A2-50 and A2-67 from other *Aeromonas* species

Taxa are identified as: 1, *A. hydrophila*; 2, *A. bestiarum*; 3, *A. salmonicida*; 4, *A. caviae*; 5, *A. media*; 6, *A. eucrenophila*; 7, *A. sobria*; 8, *A. veronii* bv *sobria*; 9, *A. jandaei*; 10, *A. veronii* bv *veronii*; 11, *A. schubertii*; 12, *A. trola*; 13, *A. encheleia*; 14, *A. allosaccharophila*; 15, *A. popoffii*; 16, *A. simiae*; 17, *A. molluscorum*; 18 *A. bivalvium*; 19 *A. aquariorum*; 20 *A. tecta*, 21 *A. fluvialis*. Tests for the type strains of species 1-15 were performed at 36°C while for the other species at 30°C, tests of strains A2-50 and A2-67 were performed at those two temperatures. All were evaluated for 7 days. +, 100-85% of the strains positive; v, 84-16% of the strains positive; -, 15-0% of the strains positive; ND, no data from these authors

Characteristic	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16 ^A	17 ^o	18 [†]	19 [‡]	20 [§]	21 [#]		
VP	-	-	+(+)	v(-)	v(+)	-(-)	-(-)	-(-)	-(-)	+(+)	+(+)	v(-)	v(-)	(-)	-(-)	+(+)	+(+)	-(-)	-(-)	-(-)	v(-)	-(-)	
LDC	-	-	+(+)	v(-)	v(-)	-(-)	-(-)	-(-)	+(+)	+(+)	+(+)	+(+)	v(-)	(+)	-(-)	+(+)	-(-)	+(+)	+(+)	+(+)	v(-)	-(-)	
Glucose (gas)	-	-	+(+)	v(+)	v(-)	-(-)	-(-)	v(+)	v(-)	+(+)	+(+)	+(+)	-(-)	v(+)	v(+)	+(+)	+(+)	-(-)	-(-)	-(-)	+(+)	+(+)	+(+)
Hydrolysis of aesculin	+	+	+(+)	v(+)	v(+)	v(+)	v(-)	v(+)	-(-)	-(-)	-(-)	+(+)	-(-)	-(-)	v(+)	v(+)	-(-)	v(-)	+(+)	+(+)	+(+)	v(-)	-(-)
Citrate utilization	+	-	+(+)	-(-)	+(-)	+(+)	v(+)	-(-)	+(+)	v(-)	+(+)	+(+)	v(+)	+(+)	-(-)	v(-)	+(+)	ND(-)	+(+)	+(+)	v(+)	ND(-)	+(+)
Grow at 45°C on sheep blood agar	-	+	+(+)	-(-)	-(-)	+(+)	-(-)	-(-)	-(-)	+(+)	+(+)	+(+)	+(+)	-(-)	-(-)	-(-)	-(-)	+(+)	-(-)	+(+)	-(-)	-(-)	-(-)
Acid from																							
Amygdalin	+	+	-(-)	-(-)	-(-)	-(-)	-(-)	-(-)	-(-)	-(-)	-(-)	-(-)	-(-)	-(-)	-(-)	-(-)	-(-)	-(-)	ND(-)	ND(-)	-(-)	-(-)	-(-)
D-cellobiose	-	-	-(-)	v(-)	v(-)	+(+)	+(+)	v(+)	+(+)	v(-)	-(-)	v(+)	-(-)	+(+)	-(-)	+(+)	+(+)	ND(-)	-(-)	-(-)	-(-)	+(+)	
D-raffinose	+	-	-(-)	-(-)	-(-)	-(-)	-(-)	-(-)	-(-)	-(-)	-(-)	-(-)	-(-)	-(-)	-(-)	v(-)	-(-)	-(-)	-(-)	-(-)	ND(-)	-(-)	
L-arabinose	+	+	V(+)	+(+)	+(-)	+(+)	+(+)	v(+)	-(-)	-(+)	-(-)	-(-)	-(-)	-(-)	-(-)	v(+)	v(+)	-(-)	+(+)	+(+)	-(-)	-(-)	-(-)
Glycerol	+	+	+(+)	+(+)	+(-)	v(-)	v(+)	-(-)	+(+)	+(+)	-(+)	+(+)	-(-)	v(+)	+(+)	+(+)	+(+)	+(+)	+(+)	+(+)	+(+)	+(+)	+(+)
Mannose	-	-	+(+)	+(+)	+(-)	v(-)	+(+)	+(+)	+(+)	+(+)	-(+)	+(+)	+(+)	+(+)	+(+)	+(+)	+(+)	-(+)	+(+)	-(-)	+(+)	ND(+)	+(+)
Salicin	+	+	V(-)	v(-)	v(-)	v(+)	v(-)	v(-)	-(-)	-(-)	-(-)	+(+)	-(-)	-(-)	-(-)	-(-)	-(-)	ND(-)	-(-)	+(+)	-(-)	+(+)	

A: A2-50, B: A2-67. Data from species 1 to 15 were obtained from Abbott *et al.* (2003) who performed tests at 35°C with the exception of *A. popoffii* and *A. sobria* which were at 25°C, as did ^oMiñana-Galbis *et al.* (2007); ^AHarf-

Monteil *et al.* (2004), [‡]Martínez-Murcia *et al.* (2008), [§]Demarta *et al.* (2008) and [#]Alperi *et al.* (in press) performed tests at 30°C; [†]Miñana-Galbis *et al.* (2004) performed tests at 25-30°C. Type strains results are expressed in the table in brackets as (+) or (-).

Supplementary Table S1. Base differences in the 16S rRNA gene sequences among strains A2-50, A2-67 and the type strains of *A. caviae*, *A. trota* and *A. aquariorum*.

Strain	GenBank accession no.	Position*												
		457	458	469	471	472	474	475	476	649	1011	1018	1350	1362
A2-50	FJ230077	C/T	A/G	T	T/C	G/A	T/C	G/A	A	A	C/T	G/A	G	C
A2-67	FJ230076	C	A	C	T	G	T	G	G	A/G	C/T	A/G	G	C
<i>A. caviae</i> CECT838 ^T	X60409	C	A	T	T	G	T	G	G	A	T	A	A	T
<i>A. trota</i> CECT4255 ^T	X60415	C	A	T	T	G	T	G	G	G	C	G	A	T
<i>A. aquariorum</i> CECT7289 ^T	EU085557	C	A	T	T	G	T	G	A	A	C	G	A	T

*Following the *Escherichia coli* nomenclature (Brosius *et al.*, 1978).

Supplementary Table S2. DNA–DNA relatedness between strains A2-50 and A2-67 and *A. caviae* type strain.

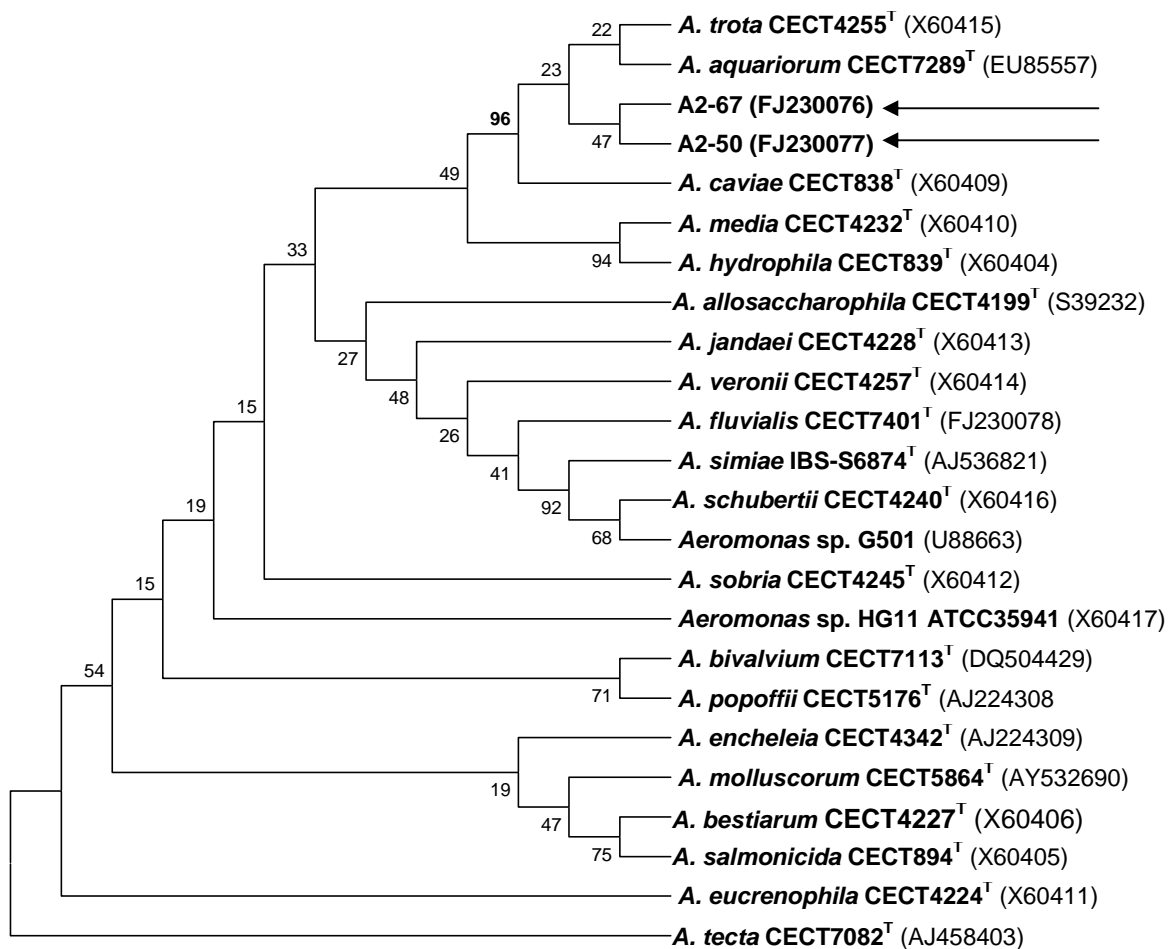
Results are expressed as the mean of three replicates.

Strain	Labelled DNA		
	<i>A. caviae</i>	A2-50	A2-67
<i>A. caviae</i> CECT838 [†]	100	51.4	62.1
A2-50	68.4	100	66.3
A2-67	67.3	61.4	100

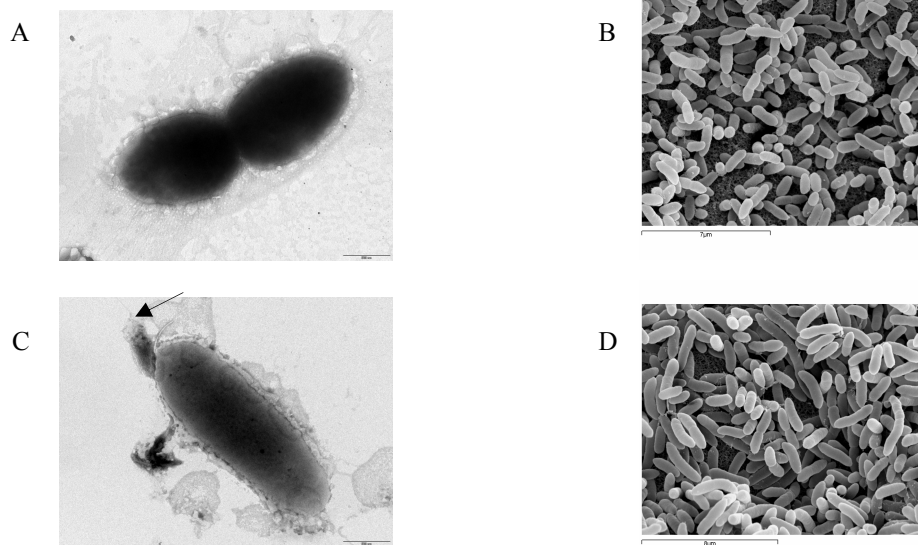
Supplementary Table S3. Antibiotic resistance of A2-50 and A2-67 against 27 antibiotics tested in this study.

Antibiotic	A2-50	A2-67
Piperacillin	S	S
Piperacillin plus tazobactam	S	S
Amoxicillin	R	R
Amoxicillin plus clavulanic acid	R	R
Ticarcillin	R	R
Ticarcillin plus clavulanic acid	R	R
Cephalothin	R	R
Cefoxitine	S	R
Cefotaxime	S	S
Cefoperazone	S	S
Ceftazidime	S	S
Ceftriaxone	S	S
Cefepime	S	S
Aztreonam	S	S
Imipenem	S	S
Gentamicin	S	S
Kanamycin	S	S
Tobramycin	S	S
Amikacin	S	S
Streptomycin	I	S
Tetracycline	S	S
Ciprofloxacin	S	S
Nalidixic acid	S	S
Fosfomicin	S	S
Erythromycin	R	R
Trimethoprim-sulfamethoxazole	S	S
Chloramphenicol	S	S

The presumptive new species were classified as (S) susceptible, (I) intermediate, or (R) resistant.



Supplementary Fig. S1. Unrooted phylogenetic tree derived from the 16S rRNA gene sequences shows the relationships of strains A2-50 and A2-67 to all other *Aeromonas* species by the maximum-parsimony method. Numbers at nodes indicate bootstrap values (percentage of 1000 replicates).



Supplementary Fig. S2. A-B. Electron microscopy images of strain A2-50. A. Transmission electron microscope, negative stain. Bar: 0,5 μ m. B. Scanning electron microscope. Bar: 7 μ m. **C-D.** Electron microscopy images of strain A2-67. C. Transmission electron microscope, negative stain. Bar: 0,5 μ m. Arrow indicates the presence of polar flagella. D. Scanning electron microscope Bar: 8 μ m.

REFERENCES

- Abbott, S. L., Cheung, W. K. & Janda, J. M. (2003).** The genus *Aeromonas*: biochemical characteristics, atypical reactions, and phenotypic identification schemes. *J Clin Microbiol* **41**, 2348-2357.
- Alperi, A., Martínez-Murcia, A. J., Monera, A., Saavedra, M. J. & Figueras, M. J. (in press).** *Aeromonas fluvialis* sp. nov., isolated from Spanish river. *Int J Syst Evol*.
- 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.
- Borrell, N., Figueras, M. J. & Guarro, J. (1998).** Phenotypic identification of *Aeromonas* genomospecies from clinical and environmental sources. *Can J Microbiol* **44**, 103-108.
- Brosius, J., Palmer, M. L., Kennedy, P. J. & Noller, H. F. (1978).** Complete nucleotide sequence of a 16S ribosomal RNA gene from *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci USA* **75**, 4801-4805.
- Collado, L., Cleenwerck, I., Van Trappen, S., De Vos, P. & Figueras M. J. (in press).** *Arcobacter mytili* sp. nov., an indoxyl acetate hydrolysis-negative bacterium isolated from mussels. *Int J Syst Evol Microbiol*.
- Demarta, A., K pfer, M., Riegel, P., Harf-Monteil, C., Tonolla, M., Peduzzi, R., Monera, A., Saavedra, M. J. & Martínez-Murcia, A. J. (2008).** *Aeromonas tecta* sp. nov., isolated from clinical and environmental sources. *Syst Appl Microbiol* **46**, 439-444.
- Figueras, M. J. (2005).** Clinical relevance of *Aeromonas*. *Rev Med Microbiol* **16**, 145-153.
- 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.
- Figueras, M. J., Suarez-Franquet, A., Chacón, M. R., Soler, L., Navarro, M., Alejandro, C., Grasa, B., Martínez-Murcia, A. J. & Guarro, J. (2005).** First record of the rare species *Aeromonas culicicola* from a drinking water supply. *Appl Environ Microbiol* **71**, 538-541.
- Gómez-Gil, B., Thompson, F. L., Thompson, C. C. & Swings, J. (2003).** *Vibrio rotiferianus* sp. nov., isolated from cultures of the rotifer *Brachionus plicatilis*. *Int J Syst Evol Microbiol* **53**, 239-243.

Harf-Monteil, C., Fleche, A. L., Riegel, P., Prevost, 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.

Huang, H. C., Yu, W. L., Huan K. H., Cheng K. C. & Chuang Y. C. (2007). *Aeromonas sobria* prostatitis and septic shock in a healthy man with chronic alcoholic consumption. *Jpn J Infect Dis* **60**, 400-401.

Huys, G., Cnockaert, M. & Swings, J. (2005). *Aeromonas culicicola* Pidiyar *et al.* 2002 is a later subjective synonym of *Aeromonas veronii* Hickman-Brenner *et al.* 1987. *Syst Appl Microbiol* **28**, 604-609.

Kimura, M. (1980). A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *J Mol Evol* **16**, 111-120.

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

Marmur, J. (1961). A procedure for the isolation of deoxyribonucleic acid from micro-organisms. *J Mol Biol* **3**, 208-218.

Martin-Carnahan, A. & Joseph, S. W. (2005). Order XII. *Aeromonadales* ord. nov. In Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, 2nd edn, vol. 2, part B, p. 556. Edited by D. J. Brenner, N. R. Krieg, J. T. Staley & G. M. Garrity. New York: Springer.

Martínez-Murcia, A. J., Benlloch, S. & Collins, M. D. (1992). Phylogenetic interrelationships of members of the genera *Aeromonas* and *Plesiomonas* as determined by 16S ribosomal DNA sequencing: lack of congruence with results of DNA-DNA hybridizations. *Int J Syst Bacteriol* **42**, 412-421.

Martínez-Murcia, A. J., Figueras, M. J., Saavedra, M. J. & Stackebrandt, E. (2007). The recently proposed species *Aeromonas sharmana* sp. nov., isolate GPTSA-6T, is not a member of the genus *Aeromonas*. *Int Microbiol* **10**, 61-64.

Martínez-Murcia, A. J., Monera, A., Alperi, A., Figueras, M. J. & Saavedra, M. J. (2009). Phylogenetic evidence suggests that strains of *Aeromonas hydrophila* subsp. *dhakensis* belong to the species *Aeromonas aquariorum* sp. nov. *Curr Microbiol* **58**, 76-80.

Martínez-Murcia, A. 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 Evol Microbiol* **58**, 1169-1175.

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.

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.

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.

Morandi, A., Zhaxybayeva, O., Gogarten, J. P. & Graf, J. (2005). Evolutionary and diagnostic implications of intragenomic heterogeneity in the 16S rRNA gene in *Aeromonas* strains. *J Bacteriol* **187**, 6561-6564.

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.

Ormen, O., Granum, P. E., Lassen, J. & Figueras, M. J. (2005). Lack of agreement between biochemical and genetic identification of *Aeromonas* spp. *APMIS* **113**, 203-207.

Rosselló-Móra, R. (2006). DNA-DNA reassociation applied to microbial taxonomy and their critical evaluation. In molecular identification, systematics, and population structure of prokaryotes. p.105. Edited by E. Stackebrandt. Springer-Verlag Berlin Heidelberg.

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.

Saitou, N. & Nei, M. (1987). The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol* **4**, 406-425.

Sepe, A., Barbieri, P., Peduzzi, R. & Demarta, A. (2008). Evaluation of *recA* sequencing for the classification of *Aeromonas* strains at the genotype level. *Lett Appl Microbiol* **46**, 439-444.

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**, 5732-5734.

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.

Stackebrandt, E., Frederiksen, W., Garrity, G. M. et al. (2002). Report of the ad hoc committee for the re-evaluation of the species definition in bacteriology. *Int J Syst Evol Microbiol* **52**, 1043-1047.

Stackebrandt, E. & Goebel, B. M. (1994). Taxonomic note: a place for DNA-DNA reassociation and 16S rRNA sequences analysis in the present species definition. *Int J Syst Bacteriol* **44**, 846-849.

Stackebrandt, E. & Ebers, J. (2006). Taxonomic parameters revisited: tarnished gold standards. *Microbiol Today* **33**, 152-155.

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.

Thompson, F. L., Thompson, C. C., Li, Y., Gómez-Gil, B., Vandenberghe, J., Hoste, B. & Swings J. (2003). *Vibrio kanaloae* sp. nov., *Vibrio pomeroyi* sp. nov. and *Vibrio chagasii* sp. nov., from sea water and marine animals. *Int J Syst Evol Microbiol* **53**, 753-759.

Thompson, J. D., Higgins, D. G. & Gibson, T. J. (1994). CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res* **22**, 4673-4680.

Urdiain, M., López-López, A., Gonzalo, C., Busse, H. J., Langer, S., Kämpfer, P. & Rosselló-Móra, R. (2008). Reclassification of *Rhodobium marinum* and *Rhodobium pfennigii* as *Afifella marina* gen. nov. comb. nov. and *Afifella pfennigii* comb. nov., a new genus of photoheterotrophic *Alphaproteobacteria* and emended descriptions of *Rhodobium*, *Rhodobium orientis* and *Rhodobium gokarnense*. *Syst Appl Microbiol* **31**, 339-351.

Wayne, L. G., Brenner, D. J., Colwell, R. R. & 9 other authors (1987). International committee on systematic bacteriology. Report of the ad hoc committee on reconciliation of approaches to bacterial systematics. *Int J Syst Bacteriol* **37**, 463-464.

Wu, C. J., Wu, J. J., Yan, J. J., Lee, H. C., Lee, N. Y., Chang, C. M., Shih, H. I., Wu, H. M., Wang, L. R. & Ko, W.C. (2007). Clinical significance and distribution of putative virulence markers of 116 consecutive clinical *Aeromonas* isolates in southern Taiwan. *J Infect* **54**, 151-158.

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

Ziemke, F., Hofle, M. G., Lalucat, J. & Rosselló-Móra, R. (1998). Reclassification of *Shewanella putrefaciens* Owen's genomic group II as *Shewanella baltica* sp. nov. *Int J Syst Bacteriol* **48**, 179-186.

Artículo:

4.1.8. R Beaz-Hidalgo, A Alperi, MJ Figueras, J Romalde. *Aeromonas piscicola* sp. nov., isolated from diseased fish. *Systematic and Applied Microbiology*. En prensa.

Resumen

Cuatro cepas de *Aeromonas* (S1.2, EO-0505, TC1 y TI 1.1) aisladas de peces moribundos, mostraron un patrón de RFLP-ADNr 16S similar al generado por cepas de *Aeromonas salmonicida* y *Aeromonas bestiarum*, sin embargo, las secuencias del gen *rpoD* indicaban que podía tratarse de una nueva línea filogenética. El análisis filogenético multilocus con 5 genes (ARNr 16S, *gyrB*, *rpoD*, *recA* y *dnaJ*; 4321 pb) mostró que estos aislados constituían un grupo independiente dentro del género siendo *A. salmonicida*, *A. bestiarum* y *Aeromonas popoffii* las especies filogenéticamente más cercanas. Además, una cepa (AH-3) bioquímicamente identificada como *Aeromonas hydrophila* y que mostraba un patrón de RFLP del ADNr 16S de *A. bestiarum* también se agrupaba dentro de esta nueva rama en el análisis multilocus. Los genes *rpoD* y *gyrB* fueron los mejores marcadores filogenéticos para diferenciar estos aislados de las especies filogenéticas más cercanas. Estas cepas presentaban características bioquímicas que permitían diferenciarlas de cepas pertenecientes a las especies más cercanas como la producción de ácido a partir del glicerol y salicina, la producción de elastasa así como su incapacidad para crecer con L-lactato como única fuente de carbono. El estudio polifásico, realizado en base al análisis del gen ARNr 16S (1503 pb), de 4 genes *housekeeping*, la reasociación ADN-ADN y el análisis fenotípico, que incluye además los perfiles de proteínas totales con MALDI-TOF-MS; confirmó estas 5 cepas como representantes de una nueva especie de *Aeromonas* para la cual se propone el nombre de *Aeromonas piscicola* con el aislado S1.2 (CECT 7443^T = LMG 24783^T) como cepa tipo.

***Aeromonas piscicola* sp. nov. , isolated from diseased fish.**

R. Beaz-Hidalgo ¹, A. Alperi ², M. J. Figueras ² & J. L. Romalde ¹

¹Departamento de Microbiología y Parasitología. Facultad de Biología. Universidad de Santiago de Compostela. Santiago de Compostela, Spain. ²Departamento de Ciencias Médicas Básicas. Universidad de Rovira i Virgili, Reus, Spain.

* Corresponding author:

Phone: +34-981563100 # 1

Fax: +34-981596904

E-mail: jesus.romalde@usc.es

Four *Aeromonas* strains (S1.2, EO-0505, TC1 and TI 1.1) isolated from moribund fish in Spain showed a restriction fragment length polymorphism (RFLP) pattern related to strains of *A. salmonicida* and *A. bestiarum* but their specific taxonomic position was unclear. Multilocus sequence analysis (MLSA) of housekeeping genes *rpoD*, *gyrB*, *recA* and *dnaJ* confirmed the allocation of these isolates in an unknown genetic lineage within the genus *Aeromonas* with *A. salmonicida*, *A. bestiarum* and *A. popoffii* as the phylogenetically nearest neighbours. Furthermore, a strain biochemically labelled as *A. hydrophila* (AH-3), showing a pattern of *A. bestiarum* in basis to 16S rDNA-RFLP, also clustered with the unknown genetic lineage. The genes *rpoD* and *gyrB* proved to be the best phylogenetic markers to differentiate these isolates from their neighbour species. Useful phenotypic features for differentiating the novel species from other known *Aeromonas* species include their ability to hydrolyze elastin, produce acid from L-arabinose and salicine, and their inability to produce acid from lactose and use L-lactate as a sole carbon source. A polyphasic approach using phenotypic characterization, phylogenetic analysis of the 16S rRNA gene and of 4 housekeeping genes including, DNA-DNA hybridization studies and an analysis of the protein profiles by MALDI-TOF-MS showed that these strains represented a novel species for which the name *Aeromonas piscicola* sp. nov. is proposed with isolate S1.2^T (=CECT 7443^T= LMG 24783^T) as the type strain.

Keywords: *Aeromonas piscicola* sp. nov., DNA-DNA hybridizations, 16S rDNA, housekeeping genes, MALDI-TOF-MS.

Running title: *Aeromonas piscicola* sp. nov.

INTRODUCTION

Several approaches have been attempted to clarify the phylogenetic relationships among the species of the genus *Aeromonas* but the taxonomy remains complex and appears to be continuously changing due to the addition of new described species. At present the genus comprises of 19 species: *A. hydrophila*, *A. bestiarum*, *A. salmonicida*, *A. caviae* (synonym is *A. punctata*) *A. media*, *A. eucrenophila*, *A. sobria*, *A. veronii* (synonyms are *A. ichthiosmia* and *A. culicicola*), *A. jandaei*, *A. schubertii*, *A. trota* (synonym is *A. enteropelogenes*), *A. allosaccharophila*, *A. encheleia*, *A. popoffii*, *A. simiae*, *A. molluscorum*, *A. bivalvium*, *A. aquariorum*, *A. tecta*, and two DNA homology groups, *Aeromonas* sp. HG11 (proposed to be the synonym of *A. encheleia* [10]) and HG13 (Enteric group 501), without a species name [6, 7, 9, 12, 13, 20, 25, 27, 28, 32]. Right after the species *A. aquariorum* was defined [24], it was recognized that *A. hydrophila* subsp. *dhakensis* [14] was maybe wrongly classified as *A. hydrophila* since, on the basis of the *rpoD* and *gyrB* genes, it clustered phylogenetically within the group of *A. aquariorum*. Therefore, these two taxa should be considered synonyms pending a more extensive re-evaluation [23].

One of the most evident problems is the delineation of the species of the *A. hydrophila* complex which includes *A. hydrophila*, *A. bestiarum*, *A. salmonicida* and *A. popoffii* [24]. Particularly difficult is the separation between *A. bestiarum* and *A. salmonicida*. The gene 16S rRNA has been found to be highly conserved and unable to differentiate members of the latter species [22, 24]. Moreover, *A. salmonicida* is divided into four psychrophilic subspecies isolated from fish *A. salmonicida* subsp. *salmonicida*, *A. salmonicida* subsp. *achromogenes*, *A. salmonicida* subsp. *masoucida* and *A. salmonicida* subsp. *smithia*, and one mesophilic subspecies *A. salmonicida* subsp. *pectinolytica* isolated from water [20, 31]. Other motile *A. salmonicida* mesophilic strains have been described and can be misidentified as *A. bestiarum* or *A. hydrophila* [3, 16, 24]. A number of articles have described atypical *A. salmonicida* strains that cannot be included in any of the described subspecies due to the presence of atypical phenotypic or genetic characteristics [2, 10, 18, 42].

A previously described molecular method based on 16S rDNA RFLP analysis has provided species specific profiles enabling the identification of most species of *Aeromonas* [8]. The five fish strains analyzed in this study displayed mixed patterns between *A. salmonicida* and *A. bestiarum* when RFLP analysis was performed. In previous studies, strains with such behaviour could be assigned to either one of these two species using *gyrB* and *rpoD* genes [24]. Recently, other studies have contributed to the clarification of controversial relationships in the genus *Aeromonas* and have demonstrated that the genes *dnaJ* and *recA* can also be powerful tools for interspecies differentiation [29, 35].

In the present study, the five *Aeromonas* isolates were subjected to a polyphasic approach including phylogenetic analysis derived from 16S rRNA and 4 housekeeping genes (*gyrB*, *rpoD*, *dnaJ*, and *recA*), DNA-DNA hybridization, MALDI-TOF-MS analysis, and extensive biochemical tests in

order to determine their taxonomic positions. Based on the reported findings, we describe a novel species within the genus *Aeromonas*.

MATERIALS AND METHODS

Bacterial strains and phenotypic tests

The strains used in this study had been previously classified as belonging to the genus *Aeromonas* based on phenotypic features. Four strains S1.2^T (=CECT 7443^T, =LMG 24783^T), EO-0505, TC1 (=CECT 7444, =LMG 24784) and TI 1.1 were isolated from diseased fish; strains S1.2^T and EO-0505 from salmon (*Salmo salar*) in 2005 and strains TC1 and TI 1.1 from trout (*Oncorhynchus mykiss*) in 2007, all belonging to the Collection of the University of Santiago de Compostela. Strain AH-3, originally identified as *A. hydrophila* and isolated from gold fish (*Carassius auratus*) [26], was kindly supplied by Dr. Tomás (Universidad de Barcelona, Spain). The isolates were grown in Trypticase Soy Agar (TSA) (Pronadisa) and incubated at 25±2°C for 24h. Stock cultures were maintained frozen at -80°C in tryptone soy broth (TSB) with 15% (v/v) glycerol.

Physiological and biochemical characterization of the five isolates was performed by standard techniques, following the methodologies described in previous studies [17, 19, 41]. Incubation was performed at 25±2°C. The following tests were performed: Gram-staining, motility, cytochrome oxidase, catalase activity, nitrate reduction, susceptibility to the vibriostatic agent (150µg), glucose oxidation-fermentation test, production of a brown diffusible pigment, gas production from D-glucose, methyl red (MR) and Voges-Proskauer (VP) reactions, arginine dihydrolase (ADH), lysine and ornithine decarboxylases (LDC, ODC) activity (Moeller's method), indole production, hydrolysis of gelatin, starch, esculin, Tween 80, elastin and DNA and β-hemolysis on Columbia sheep blood agar (CBA, Oxoid). Growth temperatures were assayed in TSA and on TSB after 24h at 4, 25, 30, 37 and 44°C. Optimal growth temperature was determined by measuring the optical density of the TSB liquid cultures. Salt tolerance was determined in nutrient broth agar containing 0, 0.5, 3, and 6% (w/v) NaCl. Utilization of the following substrates as carbon sources were assayed: L-arabinose, sucrose, cellobiose, L-rhamnose, D-mannitol, D-sorbitol, m-inositol, L-lactate, raffinose and salicine. The test β-galactosidase (ONPG) was performed using API 20E (BioMérieux) following the instructions of the manufacturer, with the exception of using saline solution (0.85%) for the preparation of the inocule and incubation was performed at 25±2°C. Hydrogen production from cysteine was performed in the *A. hydrophila* medium [15]. Fermentation of forty-nine carbohydrate substrates were tested by using API 50CH (BioMérieux) at 25±2°C for 24h, following the manufacturer's instructions. In addition, API 20E, API 50CH, as well as some test useful for the species differentiation we also performed at 30 and 35°C.

Antibiotic susceptibility tests were undertaken by the disc method on Müller-Hinton agar plates (Oxoid, UK). After 24h of incubation at $25\pm 2^{\circ}\text{C}$, organisms were classified as susceptible (S), intermediate (I) or resistant (R) according to the guidelines of the Clinical and Laboratory Standards Institute [5]. The antibiotic containing discs ($\mu\text{g ml}^{-1}$) were the following: ampicillin (AMP_{10}), amoxicillin (AML_{25}), amoxicillin + clavulanic acid (AMC_{30}), ticarcillin (TIC_{75}), cephalotin (KF_{30}), gentamicin (CN_{10}), norfloxacin (NOR_{10}), erythromycin (E_5), trimethoprin-sulfamethoxazole (SXT_{25}), chloramphenicol (C_{30}), streptomycin (S_{10}), penicillin (P_{10}), tetracycline (TE_{30}) and nalidixic acid (NA_{30}).

Electron microscopy

Flagellar arrangement and cellular size were determined by transmission electron microscopy (TEM). Cells were stained with phosphotungstic acid (2%) and processed samples were visualized by an electron microscope Philips CM-12.

16S rRNA and housekeeping analyses

Genomic DNA extraction was prepared using the InstaGene Matrix (Bio-Rad) according to the instructions of the manufacturer. 16S rDNA sequencing was performed using primers and conditions as previously described [22, 30]. Amplification and sequencing reactions of the housekeeping genes *gyrB*, *rpoD*, *dnaJ*, and *recA* were carried out by the methods previously described [29, 36, 39, 43]. PCR products were purified using the QIAquick PCR Purification Kit (Quiagen). Sequencing reactions were performed using the kit GenomeLab DTCS-Quick Start Kit (Beckman Coulter). Sequences were analyzed in an Automatic DNA Sequencer (model 373A, Applied Biosystems). Sequencing was also performed for 3 strains of *A. bestiarum* (116p, 117p and J4N 98) for the genes 16S rRNA, *recA* and *dnaJ*, and for 3 strains of *A. popoffii* (LMG 17543, LMG 17545 and LMG 17546) the genes 16S rRNA (except strain LMG 17543), *recA* and *dnaJ* in order to have more related sequences to compare with the fish strain sequences. Additional sequencing was performed for type strains absent in the NCIMB database: *A. salmonicida* subsp. *achromogenes* CECT 895^T, *A. salmonicida* subsp. *masoucida* CECT 896^T and *A. salmonicida* subsp. *petinolytica* 34mel^T for the gene *recA*, *A. bivalvium* CECT 7113^T, *A. aquariourum* CECT 7289^T and *A. tecta* CECT 7082^T for the genes *dnaJ* and *recA*; and the gene *rpoD* for the latter species.

Sequence corrections and analysis were performed with DNASTar Seqman program (Lasergene) and AutoAssembler 1.40 (Applied Biosystems). Alignments using the above mentioned sequences and those already available were used to construct the phylogenetic trees by neighbour-joining (NJ) with the program Mega version 4.0. [38] and maximum likelihood (ML) (jModelTest, <http://darwin.uvigo.es/>, [33], FigTree 191 v1.1.2, <http://tree.bio.ed.ac.uk>).

DNA-DNA hybridization

Genomic DNA for DNA-DNA hybridizations was prepared using the Easy DNA (Invitrogen) kit. DNA-DNA hybridization experiments were done by the hydroxiapatite/microtitre plate method [44] with a hybridization temperature of 60°C. Reciprocal reactions (eg. A x B and B x A) were performed and the DNA homology percentage reported are the means of a minimum of 3 hybridizations.

MALDI-TOF-MS

The protein analysis by MALDI-TOF-MS was performed in the mass spectrometry unit of the RIAIDT (University of Santiago de Compostela). Protein extraction was performed with ethanol, formic acid and acetonitrile (AN). Processed samples were placed in a 384 well plate, allowed to dry and covered with a matrix solution (α -cyano-4-hydroxycinnamic acid; HCCA). Mass spectra were obtained using a MALDI-TOF Autoflex mass spectrometer (Bruker Daltonik GmbH, Germany). The measured mass range of spectra was 2.000-20.000 Da. Peak comparison was done with the data-base of Bruker Daltonik GmbH. *Escherichia coli* strain CECT 433, with well established profile, was included in the analysis as control. In order to determine significant differences in the profiles, reproducibility of the results were assessed by repetition of at least 10 independent assays and reciprocal data was considered.

RESULTS AND DISCUSSION

Optimum growth temperatures for the strains within novel species were in the range 25-30°C. The novel mesophilic species showed several differentiating features in relation to other *Aeromonas* species (Table 1). Our isolates were readily distinguished from typical psychrophilic *A. salmonicida* by its motility, inability to produce brown pigment and growth at 37°C [31]. The fish isolates could be differentiated from mesophilic *A. salmonicida* strains by their inability to produce acid from lactose and L-arabinose, from *A. hydrophila* by their inability to use L-lactate as a sole carbon source, and from *A. bestiarum* strains by the ability to produce acid from L-arabinose. The novel strains were β -hemolytic in CBA, positive for LDC, hydrolysis of elastin and esculin unlike *A. popoffii*. Three or more tests allowed differentiation from all known *Aeromonas* species. Useful phenotypic tests to differentiate this group of strains from all *Aeromonas* taxa described up to date were hydrolysis of elastin and acid production of salicin (Table 1). Salicin and arbutin were positive when tested with the API 50CH system at 25 \pm 2°C but not at 35 \pm 2°C after 24h. However, acid was produced from salicin at the latter temperature when tested in nutrient broth (Difco) at a final concentration of 1% w/v. The isolates studied were phenotypically homogeneous except for 3 variable traits, i.e. strain S1.2^T used cellobiose as a carbon source, strains AH-3 and EO-0505 produced acid from L-rhamnose and strain AH-3 produced acid from D-sorbitol. In addition strain EO-0505 produced acid from L-rhamnose at

25±2°C but not at 35±2°C in the API 50CH method. Strain AH-3 has been proven to bare an important determinant of virulence in several studies [4, 26, 40]. Is important to consider that antibiotic susceptibility tests showed that the strains analysed were susceptible dose dependent to streptomycin (10µg) and sensitive to gentamicin (10µg), norfloxacin (10µg), trimethoprim + sulfamethoxazole (25µg) and chloramphenicol (10µg).

Previous phylogenetic analyses of *A. bestiarum* and *A. salmonicida* strains demonstrated that the gene 16S rRNA is not sufficiently discriminative to clearly differentiate some strains of both species [21]. The type strain of *A. bestiarum* is identical to that of *A. salmonicida* subsp *achromogenes* and *A. salmonicida* subsp. *masoucida* and only shows two nucleotide differences (positions 1011 and 1018) from that of *A. salmonicida* subsp. *salmonicida* [24]. Similar results were obtained for the strains analyzed in this study. Strains S1.2^T, TC1, TI 1.1 and AH-3 clustered with the type strain of *A. bestiarum* (CECT 5227^T), *A. salmonicida* subsp. *masoucida* (CECT 896^T) and *A. salmonicida* subsp. *achromogenes* (CECT 895^T), but strain EO-0505 clustered with the type strain of *A. salmonicida* subsp. *salmonicida* (CECT 894^T) (Fig. 1 and S1). Phylogenetic analysis of the isolates examined in this study based on the genes *rpoD* and *gyrB* showed that, although genetically related to *A. bestiarum* and *A. salmonicida*, they formed a clear separated cluster (supported by a 100% bootstrap value) with considerable phylogenetic divergence (Fig. S2). Phylogenetic trees based on *recA* and *dnaJ* sequences also differentiated this new *Aeromonas* cluster, although less phylogenetic divergence was appreciated with the closest neighbour *A. bestiarum* (Fig. S3). It has already been proved that *gyrB* and *rpoD* genes are excellent molecular markers for assessing the phylogeny of *A. bestiarum* / *A. salmonicida* [24]. The results obtained here with these genes support this statement. Multilocus sequence analysis (MLSA) on the four concatenated genes reinforced the above results (Fig. 2 and S4).

The inter-species percentage similarities of the genes obtained in this study showed that the closest phylogenetic relative to all fish strains was *A. bestiarum* (Table 2). Rates of nucleotide substitutions at the inter-species level have been described to be 3% or higher for the gene *rpoD* and 1.8-4.3% for *gyrB* [36]; the five strains examined were within these proposed limits. For the *dnaJ* and *recA* genes the divergences found between the fish strains and *A. bestiarum* were lower than the inter-species limits described in previous studies (5.2% and 7-8% respectively) [29, 35]. Is important to consider that only sequences from type strains were used in the study proposing the limits for the *dnaJ* gene [29], whereas for the *recA* gene the sequence fragment examined was 272 bp [35] in comparison with 559 bp used in the present work.

Levels of DNA-DNA relatedness determined between the strain S1.2^T of the presumptive novel species and type strains of *A. salmonicida*, *A. popoffii*, and *A. bestiarum* were 49.9%, 60.6% and 65.4% respectively, below the suggested level (i.e. 70%) for species delineation [37].

MALDI-TOF-MS mass spectra of cell extracts confirmed the differentiation of strain S1.2^T from the type strains of the phylogenetically closest species *A. bestiarum*, *A. salmonicida* and *A. popoffii* (see Supplementary Fig. S5). As a control, a correct identification of *E. coli* CECT 433 was obtained with profiles always above log score 2.400. Strain S1.2^T with its own profile had a mean log score of 2.744. Mean log scores with *A. popoffii*, *A. salmonicida*, and *A. bestiarum* were 2.348, 2.324 and 2.234 respectively.

Based on the results of the phylogenetic analyses using *gyrB*, *rpoD*, *recA* and *dnaJ* genes, DNA-DNA hybridization, MALDI-TOF-MS analysis and phenotypic characterization, it is evident that the strains isolated from diseased fish represent a single novel species of the genus *Aeromonas*, for which the name *A. piscicola* sp. nov. is proposed with the strain S1.2^T (=CECT 7443^T=LMG 24783^T) as the type strain.

Description of *Aeromonas piscicola* sp. nov.

Aeromonas piscicola (pi.sci'co.la L.n. piscis fish; L. suff.- cola dweller; N. L. n. piscicola, fish dweller).

Cells are Gram-negative, motile rods with a polar flagellum, 1.5-2.0 µm long and 0.6-1.0 µm wide. Growth occurs at 4-37°C and at 0-3% NaCl (w/v). Optimum growth temperature is 25-30°C. Strains are oxidase and catalase positive, reduce nitrates to nitrites and are resistant to the vibriostatic agent O/129 (150 µg). No brown diffusible pigment is produced. Chemo-organotrophic, with both oxidative and fermentative metabolism. Positive for ADH, LDC, indol, VP and β-galactosidase test. All strains hydrolyse gelatin, elastin, esculin, starch, Tween 80 and DNA. Produce gas from D-glucose, H₂S from cysteine and are β-hemolytic in sheep blood agar. Negative for ODC and MR tests. All strains utilize sucrose and mannitol as an energy source but not m-inositol, L-lactate or raffinose. Acid is produced from glycerol, D-ribose, D-galactose, D-glucose, D-fructose, D-mannose, D-mannitol, methyl-αD-glucopyranoside, N-acetylglucosamine, aesculin, arbutin (at 25±1°C), salicin, D-maltose, D-sucrose, D-trehalose, starch, glycogen and potassium gluconate. Does not produce acid from erythritol, D-arabinose, L-arabinose, D-xylose, L-xylose, D-adonitol, methyl-βD-xylopyranoside, L-sorbose, dulcitol, inositol, methyl-αD-mannopyranoside, amygdalin, D-cellobiose, D-lactose, D-melibiose, inulin, D-melezitose, D-raffinose, xylitol, gentiobiose, D-turanose, D-lyxose, D-tagatose, D-fucose, L-fucose, D-arabitol, L-arabitol, potassium 2-ketogluconate and potassium 5-ketogluconate. Type strain utilizes D-cellobiose and does not produce acid from L-rhamnose. All strains are resistant to ampicillin (10µg), amoxicillin (25µg), amoxicilin + clavulanic acid (30µg), tricarcillin (75µg), cephalotin (30µg), erythromycin (5µg) and penicillin (10µg). All strains show susceptibility dose dependent to streptomycin (10µg) and sensitive to gentamicin (10µg), norfloxacin (10µg), trimethoprim + sulfamethoxazole (25µg) and chloramphenicol (10µg).

The type strain is S1.2^T (=CECT 7443^T= LMG 24783^T) was isolated in 2005 from wild diseased salmon, (*Salmo salar*) in Galicia (Spain).

The GenBank accession numbers for the 16S rRNA gene sequences of *Aeromonas piscicola* strains S1.2^T, EO-0505, TC1 and TI 1.1 are FM999971, FM999970, FM999972 and FM999973. The GenBank accession numbers for the *rpoD*, *gyrB*, *dnaJ* and *recA* gene sequences of strains S1.2^T, EO-0505, TC1 and TI 1.1 are FM999069, FM999963, FM999949, FM999941, FM998645, FM999962, FM999948, FM999939, FM999068, FM999964, FM999950, FM999940, FM999070, FM999965, FM999951, FM999942 respectively. (GenBank accession numbers for the rest of species sequenced in the study are in Fig. 1, S1, S2 and S3 available on line).

Acknowledgements

This work was supported in part by a grant AGL2006-13208-C02-01, from the Ministerio de Ciencia y Tecnología (Spain). R. B. H. acknowledges the Ministerio de Ciencia y Tecnología (Spain) for research fellowship. The authors thank E. Guitián from the RIAIDT (USC) for the mass spectrometry analysis and Bruker Daltonk GmbH for the data-base availability.

Table 1. Key tests for the phenotypic differentiation of *A. piscicola* from other *Aeromonas* species.

Character	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17 ^a	18 ^b	19 ^c	20 ^d	21 ^e
B-Haemolysis	+	V	+	+	V	V	+	-	+	+	+	V	V	V	V	-	-	V	-	ND	+
Brown pigment	-	V	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Motility	+	V	+	+	+	V	+	V	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Indol	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-	+	+	-
VP	+	V	V	+	-	-	-	-	+	+	+	V	-	-	-	V	-	-	-	+	V
ODC	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	V	-	-	-	-	-	-	-
LDC	+	V	+	+	-	-	-	+	+	+	+	V	+	+	-	-	+	-	+	+	V
Glucose (gas)	+	V	+	+	-	-	+	V	+	+	+	-	V	+	V	+	-	-	-	+	+
<u>Hydrolysis of</u>																					
Elastin	+	V	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	ND	-	-	ND	ND
Aesculin	+	+	+	+	+	+	V	-	-	-	+	-	-	V	V	-	V	+	+	+	V
<u>Acid from</u>																					
Glycerol ^f	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+	ND	ND	+
Sucrose ^f	+	+	+	+	+	+	V	+	+	-	+	-	V	+	V	-	+	+	+	+	-
L-arabinose ^f	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	V	-	V	-	+	+	-	-
D- cellobiose ^f	-	V	V	-	+	+	+	+	V	-	V	-	+	+	-	-	+	V	ND	-	-
Salicin ^f	+	V	V	+	+	V	V	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	V
D-sorbitol ^f	V	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Lactose ^f	-	+	-	V	V	V	-	-	-	-	V	-	-	-	-	-	ND	-	-	-	-
<u>Utilization of</u>																					
L- lactate ^f	-	-	-	+	V	+	-	-	-	-	-	+	+	V	-	+	ND	V	+	-	ND

Taxa are identified as: 1, *A. piscicola* (data from this study); 2, *A. salmonicida*; 3, *A. bestiarum*; 4, *A. hydrophila*; 5, *A. caviae*; 6, *A. media*; 7, *A. eucrenophila*; 8, *A. sobria*; 9, *A. veronii* biovar *sobria*; 10, *A. jandaei*; 11, *A. veronii* biovar. *veronii*; 12, *A. schubertii*; 13, *A. trota*; 14, *A. allosaccharophila*; 15, *A. encheleia*; 16, *A. popoffii*; 17, *A. simiae*; 18, *A. molluscorum*; 19, *A. bivalvium*; 20, *A. aquariorum*; 21, *A. tecta*. Abbreviations: +, 85-100% of strains positive; -, 0-15% of strains positive; V, 16-84% of strains positive; ND, no data available. Data from species 2 to 16 obtained from [1], performed tests at 35°C with the exceptions of *A. popoffii* and *A. sobria* which were at 25°C; ^b[27], performed tests at 25°C. Data from ^a[9], ^d[25], ^e[7] performed tests at 30°C and ^c[28] performed tests at 25-30°C. ^fTests for *A. piscicola* strains were performed at 25±2°C (illustrated in the table) and at 35±2°C (salicine was negative at 35±2°C with the API 50CH). Only the strain AH-3 was positive for D- sorbitol.

Table 2. Range of percentage similarities (16S rRNA, *rpoD*, *gyrB*, *dnaJ* and *recA*) of all *A. piscicola* strains with phylogenetically related *Aeromonas* species.

	16S rRNA	<i>rpoD</i>	<i>gyrB</i>	<i>dnaJ</i>	<i>recA</i>
<i>A. salmonicida</i> subsp. <i>salmonicida</i> CECT 894 ^T	99.9-100.0	92.2-92.3	96.7-97.3	95.0-95.3	93.7-94.8
<i>A. salmonicida</i> subsp. <i>achromogenes</i> CECT 895 ^T	99.9-100.0	92.3-92.4	96.6-97.2	95.1-95.4	93.7-94.8
<i>A. salmonicida</i> subsp. <i>smithia</i> NCIMB 13210 ^T	99.6-99.7	92.3-92.4	96.9-97.4	95.4-95.6	ND*
<i>A. salmonicida</i> subsp. <i>masoucida</i> CECT 896 ^T	99.9-100.0	92.3-92.4	96.9-97.4	95.3-95.5	93.7-94.8
<i>A. salmonicida</i> subsp. <i>pectinolytica</i> 34mel ^T	99.8-99.9	92.0-92.2	96.9-97.4	93.8-94.1	93.9-95.0
<i>A. bestiarum</i> CECT 4227 ^T	99.9-100.0	95.4-96.3	97.2-97.5	98.2-98.6	97.3-98.2
<i>A. popoffii</i> CECT 5176 ^T	99.2-99.3	94.5-94.9	95.3-95.6	94.2-94.4	93.6-94.4
<i>A. hydrophila</i> CECT 839 ^T	99.8-99.9	89.2-89.5	91.6-91.9	90.6-90.9	93.0-93.7

* ND, no data available.

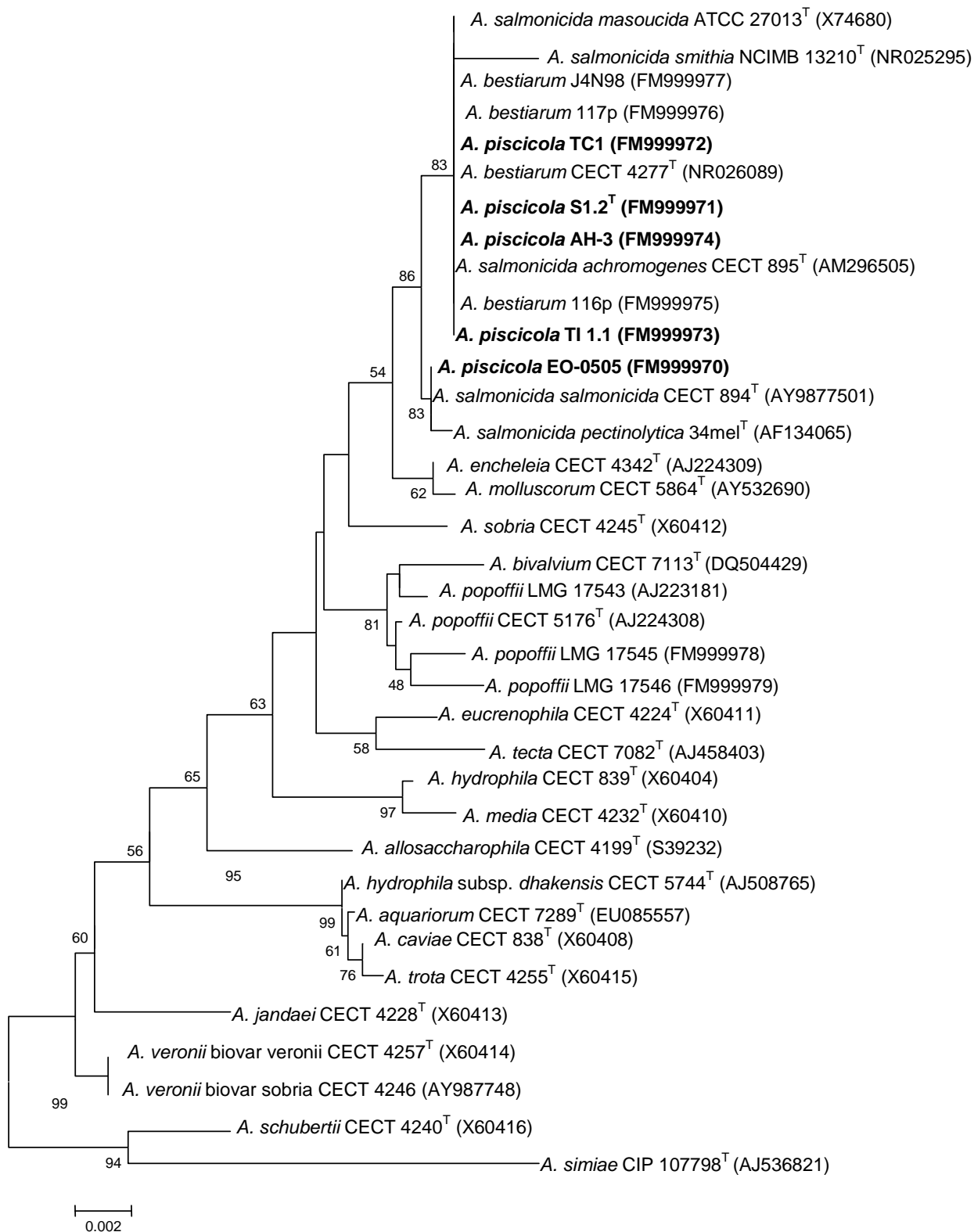


Fig.1. Unrooted neighbour-joining phylogenetic tree derived from partial 16S rRNA gene sequences showing the corresponding relationships of *Aeromonas piscicola* sp. nov. to known species of *Aeromonas*. The phylogenetic tree was constructed by using 1338 nt. Numbers shown next to each node indicate bootstrap values (percentages of 1000 replicates).

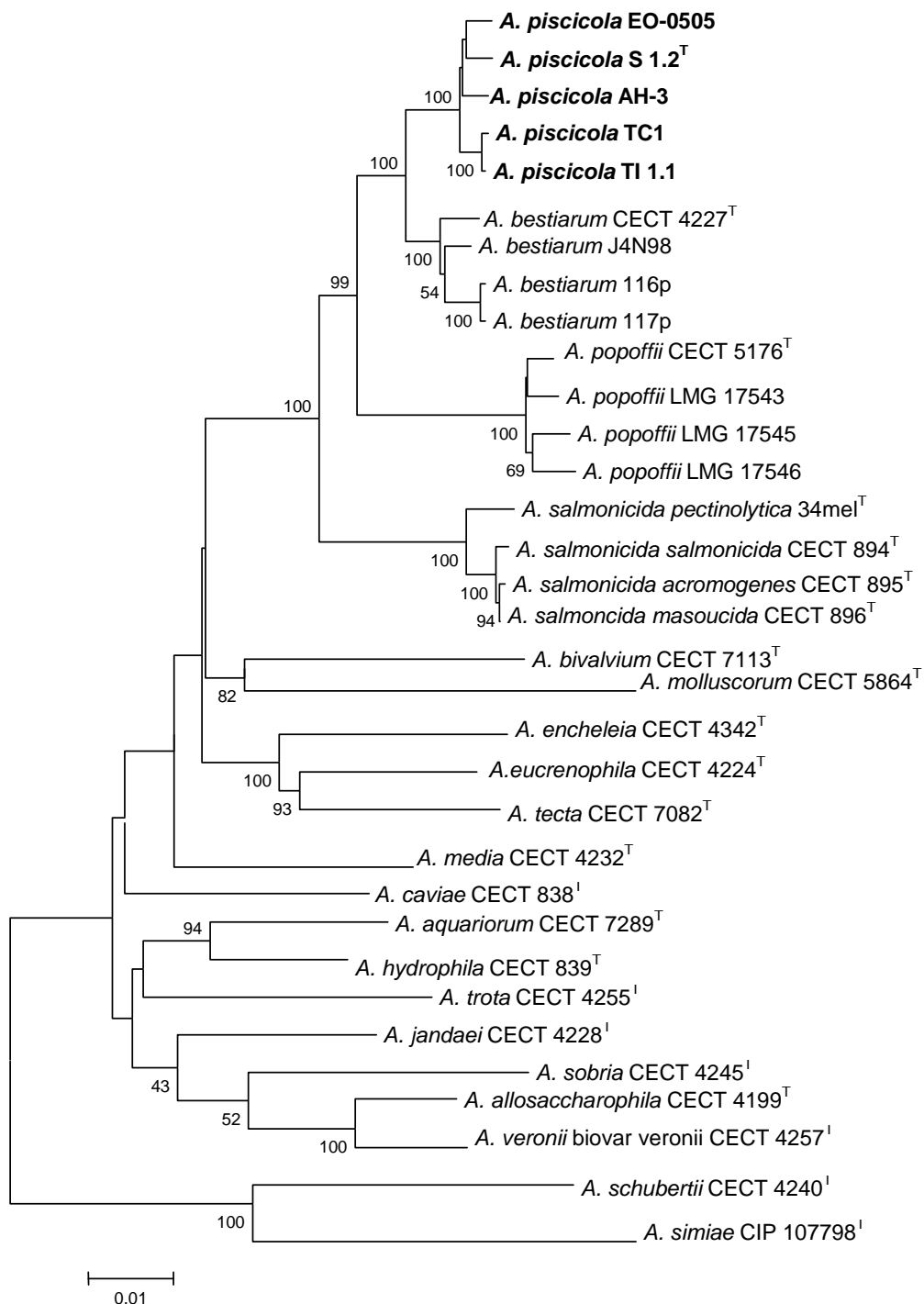


Fig.2. Unrooted neighbour-joining phylogenetic tree derived from MLSA (16S rRNA, *rpoD*, *gyrB*, *dnaJ* and *recA* genes) showing the corresponding relationships of *Aeromonas piscicola* sp. nov. to all other *Aeromonas* species described. The phylogenetic tree was constructed by using 4321 nt. Numbers shown next to each node indicate bootstrap values (percentages of 1000 replicates).

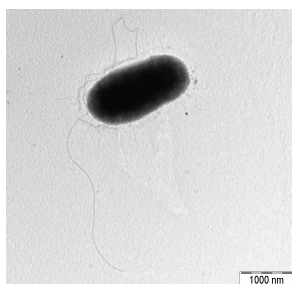


Fig.3. Transmission electron micrograph of *Aeromonas piscicola* sp. nov strain.

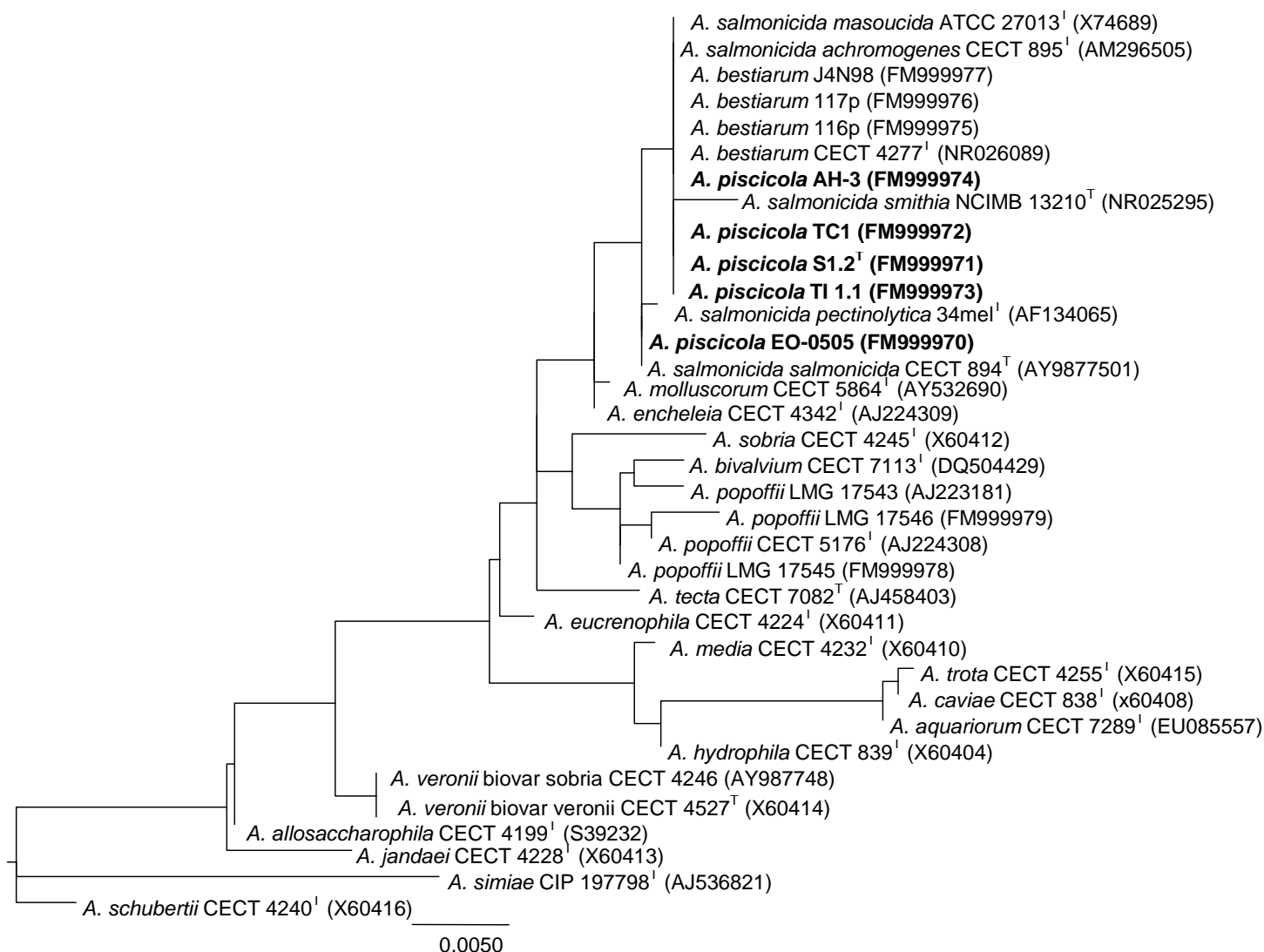


Fig.S1. Unrooted maximum likelihood phylogenetic tree derived from partial 16S rRNA gene sequences showing the corresponding relationships of *Aeromonas piscicola* sp. nov. to known species of *Aeromonas*. The phylogenetic tree was constructed by using 1338 nt.

Fig.S2. Unrooted neighbour-joining phylogenetic tree derived from *rpoD* (A) and *gyrB* (B) gene sequences showing the corresponding relationships of *Aeromonas piscicola* sp. nov. to known species of *Aeromonas*. The phylogenetic tree was constructed by using 743 nt and 894 nt respectively. Numbers shown next to each node indicate bootstrap values (percentages of 1000 replicates).

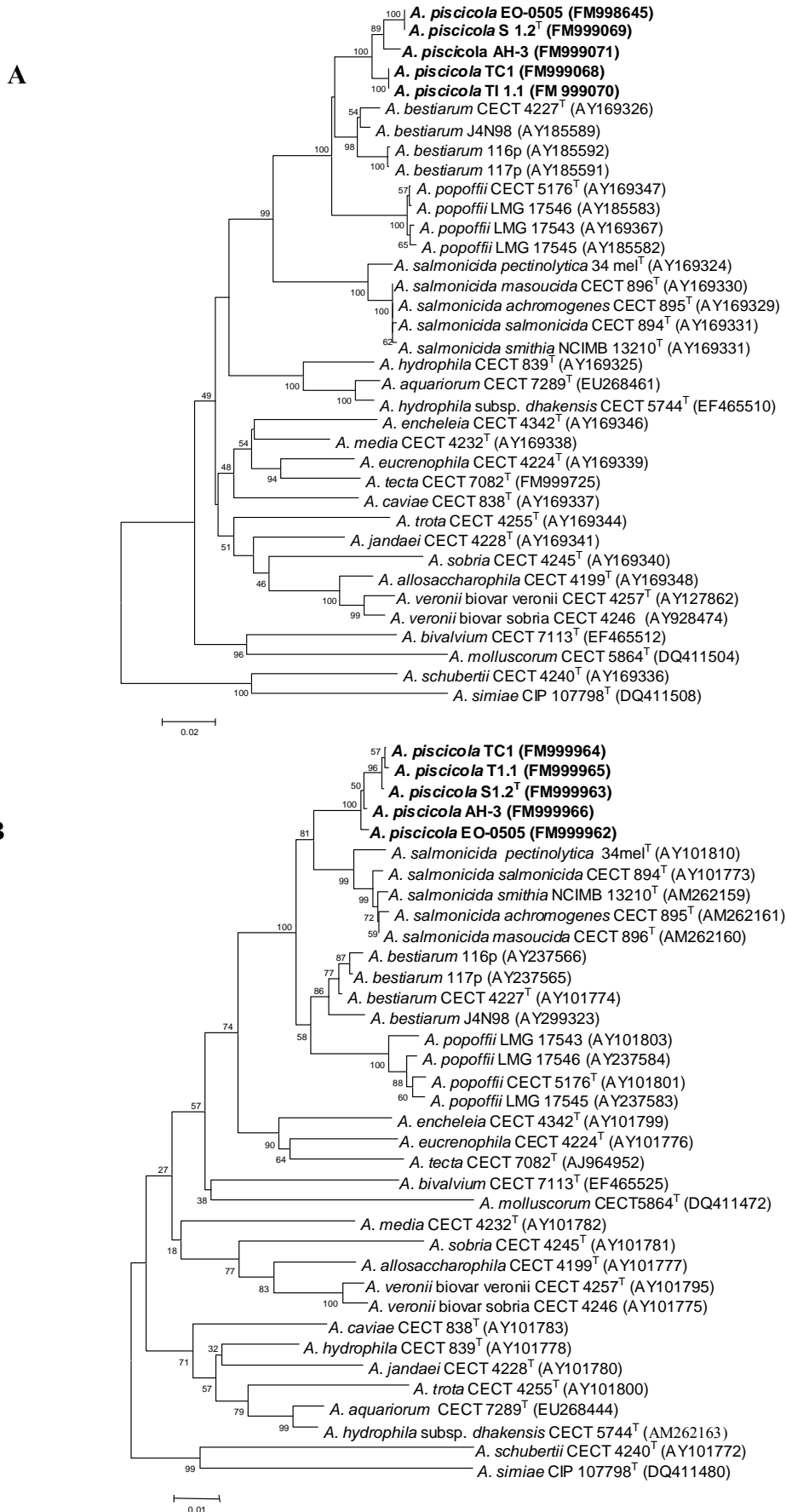


Fig.S3. Unrooted neighbour-joining phylogenetic tree derived from *dnaJ* (A) and *recA* (B) gene sequences showing the corresponding relationships of *Aeromonas piscicola* sp. nov. to known species of *Aeromonas*. The phylogenetic tree was constructed by using 781 nt and 559 nt respectively. Numbers shown next to each node indicate bootstrap values (percentages of 1000 replicates).

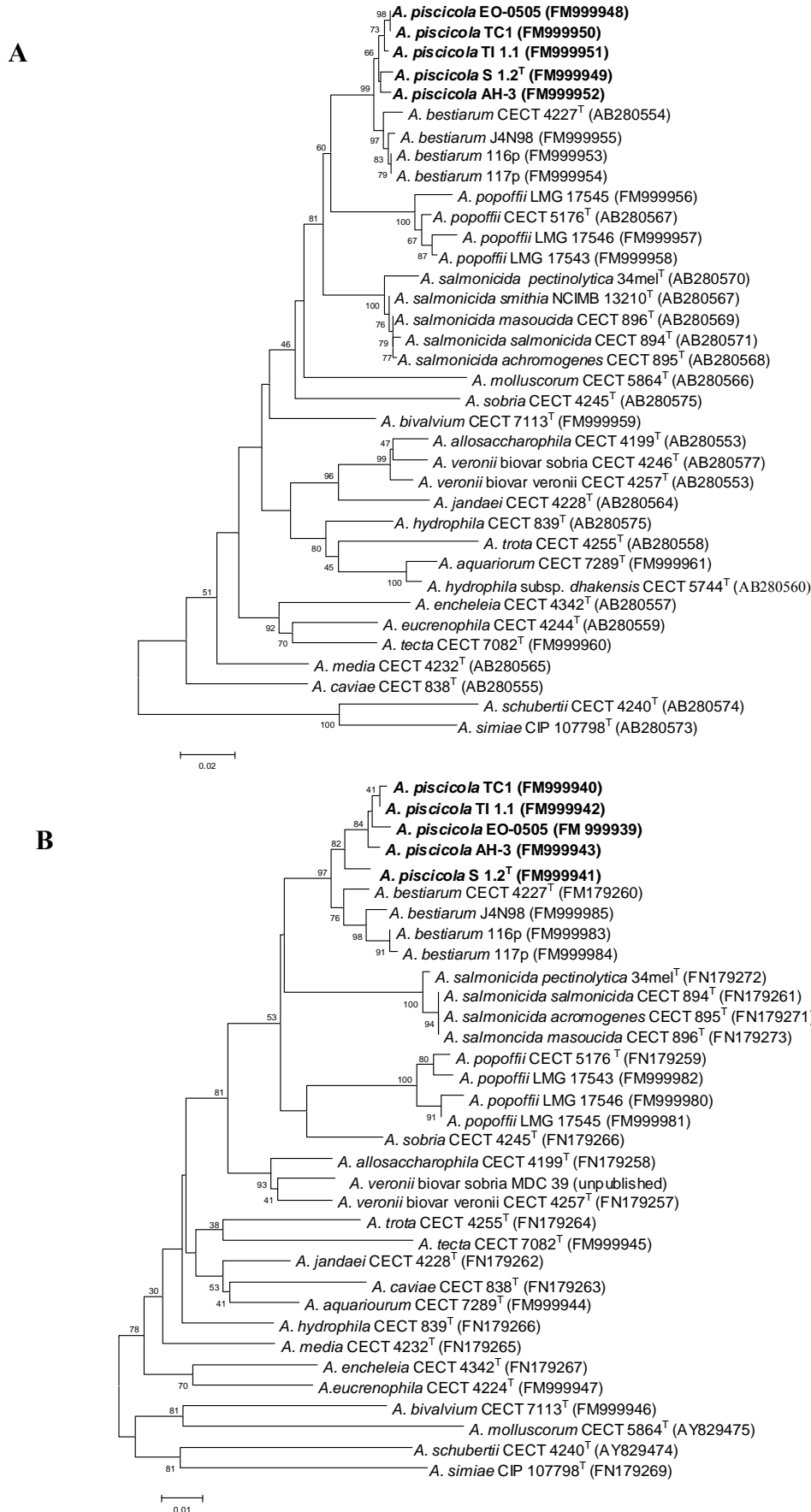


Fig.S4. Unrooted maximum likelihood phylogenetic tree derived from concatenated sequences of the 16S rRNA, *rpoD*, *gyrB*, *dnaJ* and *recA* genes. The phylogenetic tree was constructed by using 4321 nt.

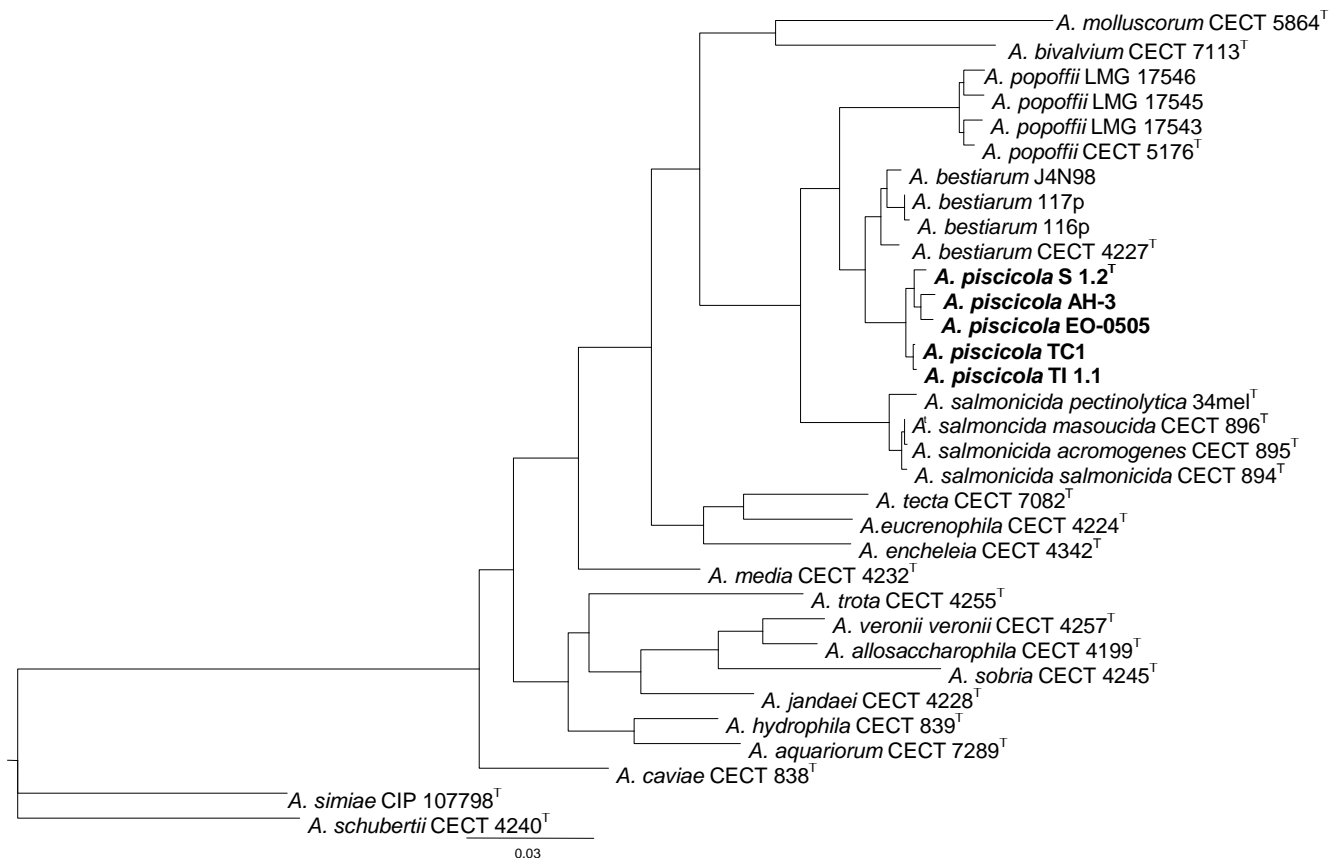
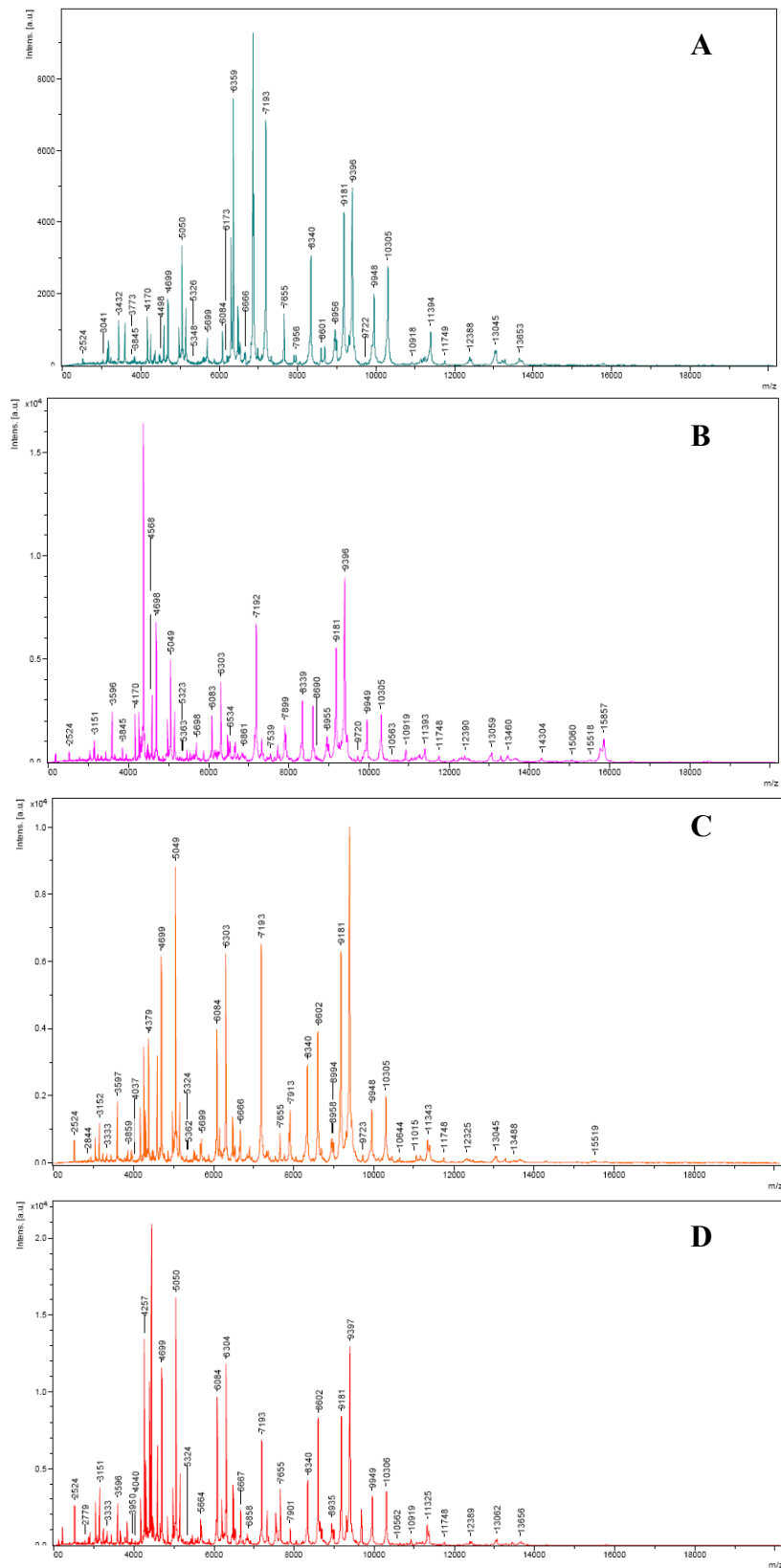


Fig. S5. MALDI-TOF-MS spectra of (a) *A. piscicola* S1.2^T, (b) *A. bestiarum* CECT 6277^T, (c) *A. salmonicida* CECT 894^T, (d) *A. popoffii* CECT 5176^T in the mass range 2.000-20.000 Da.



REFERENCES

- [1] S. Abbot, W. K. W. Cheung, M. Janda, The genus *Aeromonas*: Biochemical characteristics, atypical reactions, and phenotypic identification schemes. *J. Clin. Microbiol.* 41 (2003) 2348-2357.
- [2] B. Austin, D. A. Austin, I. Daalsgard, B. K. Gudmundsdóttir, S. Hoie, J. M. Thornton, J. L. Larsem, B. O'Hici, R. Powell, Characterization of atypical *Aeromonas salmonicida* by different methods. *Syst. Appl. Microbiol.* 21 (1998) 50-64.
- [3] G. Castro-Escarpulli, M. J. Figueras, G. Aguiler-Arreola, L. Soler, E. Fernández-Rendón, G. O. Aparicio, J. Guarro, M. R. Chacón, Characterization of *Aeromonas* spp. isolated from frozen fish intended for human consumption in Mexico. *Int. J. Food Microbiol.* 84 (2003) 41-49.
- [4] M. R. Chacón, L. Soler, E. A. Groisman, J. Guarro, M. J. Figueras, Type III secretion system genes in clinical *Aeromonas* isolates. *J. Clin. Microbiol.* 42 (2004) 1285-1287.
- [5] Clinical and Laboratory Standards Institute. Methods for antimicrobial dilution and disk susceptibility testing of infrequently isolated or fastidious bacteria. Approved standard M45-A. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2006.
- [6] M. D. Collins, A. J. Martínez-Murcia, J. Cai, *Aeromonas enteropelogenes* and *Aeromonas ichthiosmia* are identical to *Aeromonas trota* and *Aeromonas veronii*, respectively, as revealed by small-subunit rRNA sequence analysis. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 43 (1993) 855-856.
- [7] A. Demarta, M. Küpfer, P. Riegel, C. Harf-Monteil, M. Tonolla, R. Peduzzi, A. Monera, M. J. Saavedra, A. Martínez-Murcia, *Aeromonas tecta* sp. nov., isolated from clinical and environmental sources. *Syst. Appl. Microbiol.* 31 (2008) 278-286.
- [8] M. J. Figueras, L. Soler, M. R. Chacón, J. Guarro, A. J. Martínez-Murcia, Extended method for discrimination of *Aeromonas* spp. by 16S rDNA-RFLP analysis. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 50 (2000) 2069-2073.
- [9] C. Harf-Monteil, A. L. Flèche, P. Riegel, G. Prévost, D. P. Bermond, A. D. Grimont, H. Monteil, *Aeromonas simiae* sp. nov., isolated from monkey faeces. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 54 (2004) 481-485.
- [10] S. Høie, I. Dalsgaard, I. L. Aase, M., Heum J. M. Thornton, R. Powell, Polymerase chain reaction (PCR)-based typing analysis of atypical isolates of the fish pathogen *Aeromonas salmonicida*. *Syst. Appl. Microbiol.* 22 (1999) 403-411.
- [11] G. Huys, P. Kämpfer, M. Altwegg, R. Coopman, P. Janssen, M. Gillis, K. Kersters, Inclusion of *Aeromonas* DNA hybridization group 11 in *Aeromonas encheleia* and extended descriptions of the species *Aeromonas eucrenophila* and *Aeromonas encheleia*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 47 (1997) 1157-1164.

- [12] G. Huys, M. Cnockaert, J. Swings, *Aeromonas culicicola* Pidiyar *et al.* 2002 is a later subjective synonym of *Aeromonas veronii* Hickman-Brenner *et al.* 1987. *Syst. Appl. Microbiol.* 28 (2005) 604-609.
- [13] G. Huys, P. Kämpfer, J. Swings, 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.* 24 (2001) 1969-1972.
- [14] G. Huys, P. Kämpfer, M. J. Albert, I. Khün, R. Denys, J. Swings, *Aeromonas hydrophila* subsp. *dhakensis* subsp. nov., isolated from children with diarrhoeae in Bangladesh, and extended description of *Aeromonas hydrophila* subsp. *hydrophila* (Chester 1901), Stainer 1943 (Approved lists 1980). *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 52 (2002) 705-712.
- [15] J. Kaper, R. J. Seidler, H. Lockman, R. R. Colwell, Medium for the presumptive identification of *Aeromonas hydrophila* and *Enterobacteriaceae*. *Appl. Environ. Microbiol.* 38 (1979) 1023-1026.
- [16] A. Kozinska, Dominant pathogenic species of mesophilic aeromonads isolated from diseased and healthy fish cultured in Poland. *J. Fish Dis.* 30 (2007) 293-301.
- [17] M. L. Lemos, A. E. Toranzo, J. L. Barja, Modified medium for the oxidation-fermentation test in the identification of marine bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 49 (1985) 1541-1543.
- [18] V. Lund, L. M. Jenssen, M. S. Wesmajervi, Assessment of genetic variability and relatedness among atypical *Aeromonas salmonicida* from marine fishes, using AFLP fingerprinting. *Dis. Aquat. Organ.* 50 (2002) 119-126.
- [19] J. F. Mac Faddin, Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia clínica. (1993). The William & Wilkins Company. Baltimore. Translation by Médica Panamericana S.A.
- [20] A. Martin-Carnahan, S. W. Joseph, Order XII. *Aeromonadales* ord. nov., in: D. J. Brenner, N. R. Krieg, J. T. Staley, G. M. Garrity (Eds). *Bergey's 2nd edn*, vol. 2, part B, New York: Springer, 2005, pp. 556-578.
- [21] A. J. Martínez-Murcia, Phylogenetic positions of *Aeromonas encheleia*, *Aeromonas popoffii*, *Aeromonas* DNA hybridization Group 11 and *Aeromonas* Group 501. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 49 (1999) 1403-1408.
- [22] A. J. Martínez-Murcia, S. Benlloch, M. D. Collins, 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 Microbiol* 42 (1992) 412-421.
- [23] A. J. Martínez-Murcia, A. Morena, A. Alperi, M. J. Figueras, M. J. Saavedra, Phylogenetic evidence suggests that strains of *Aeromonas hydrophila* subsp. *dhakensis* belong to the species *Aeromonas aquariorum* sp. nov. *Curr. Microbiol.* 58 (2009) 76-80.

-
- [24] A. J. Martínez-Murcia, L. Soler, M. J. Saavedra, M. R. Chacón, J. Guarro, E. Stackerbrandt, M. J. Figueras, Phenotypic, genotypic, and phylogenetic discrepancies to differentiate *Aeromonas salmonicida* from *Aeromonas bestiarum*. *Int. Microbiol.* 8 (2005) 259-269.
- [25] A. J. Martínez-Murcia, M. J. Saavedra, V. R. Mota, T. Maier, E. Stackerbrandt, S. Cousin, *Aeromonas aquariorum* sp. nov., isolated from aquaria of ornamental fish. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 58 (2008) 1169-1175.
- [26] S. Merino, J. Tomás, Characterization of an *Aeromonas hydrophila* strain isolated on a septicemic out-break in a fish-farm of Spain. *Microbiologia.* 4 (1988) 181-184.
- [27] D. Miñana-Galbis, M. Farfan, M. C. Fuste, J. G. Loren, *Aeromonas molluscorum* sp. nov., isolated from bivalve molluscs. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 57 (2004) 582-587.
- [28] D. Miñana-Galbis, M. Farfan, M. C. Fuste, J. G. Loren, *Aeromonas bivalvium* sp. nov., isolated from bivalve molluscs. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 57 (2007) 582-587.
- [29] P. H. Nhung, H. Hata, K. Ohkusu, M. Noda, M. Monir Shah, K. Goto, T. Ezaki, Use of the novel phylogenetic marker *dnaJ* and DNA-DNA hybridization to clarify interrelationships within the genus *Aeromonas*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 57 (2007) 1232-1237.
- [30] C. R. Osorio, M. D. Collins, A. E. Toranzo, J. L. Romalde, 16S rRNA gene sequence analysis of *Photobacterium damsela* and Nested-PCR method for rapid detection of fish pasteurellosis. *Appl. Environ. Microbiol.* 65 (1999) 2942-2946.
- [31] M. E. Pavan, S. L. Abbott, J. Zorzópolos, J. M. Janda, *Aeromonas salmonicida* subsp. *pectinolytica* subsp. nov., a new pectinase-positive subspecies isolated from a heavy polluted river. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 50 (2000) 1119-1124.
- [32] V. Pidiyar, A. Kaznowski, N. B. Narayan, M. Patole, Y. S. Schouche, *Aeromonas culicicola* sp. nov., from the midgut of *Culex quinquefasciatus*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 52 (2002) 1723-1728.
- [33] D. Posada, jModelTest: phylogenetic model averaging, *Mol. Biol. Evol.* 25 (2008) 1243-1256.
- [34] M. J. Saavedra, M. J. Figueras, A. J. Martínez-Murcia, Updated phylogeny of the genus *Aeromonas*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 56 (2006) 2481-2487.
- [35] A. Sepe, P. Barbieri, R. Peduzzi, A. Demarta, Evaluation of *recA* sequencing for the classification of *Aeromonas* strains at the genotype level. *Lett. Appl. Microbiol.* 46 (2008) 439-444.
- [36] L. Soler, M. A. Yañez, M. R. Chacon, M. G. Aguilera-Arreola, V. Catalán, M. J. Figueras, A. J. Martínez-Murcia, Phylogenetic analysis of the genus *Aeromonas* based on two housekeeping genes. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 54 (2004) 1511-1519.
- [37] E. Stackebrandt, W. Frederiksen, G. M. Garrity, A. D. Grimont, P. Kämpfer, M. C. J. Maiden, X. Nesme, R. Roselló-Mora, J. Swings, H. G. Trüper, L. Vauterin, A. Ward, W. B. Whitman, Report of the ad hoc committee for the re-evaluation of the species definition in bacteriology. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 52 (2002) 1043-1047.

- [38] K. Tamura, J. Dudley, M. Nei, S. Kumar, Mega 4: Molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol. Biol. Evol.* 24 (2007) 1596-1599.
- [39] C.C. Thompson, F. L. Thompson, K. Vandemeulebroecke, B. Hoste, P. Dawyndt, J. Swings, Use of *recA* as an alternative phylogenetic marker in the family *Vibrionaceae*. *Int. J. Syst. Evl. Microbiol.* 54 (2004) 919-929.
- [40] S. Vilches, C. Urgell, S. Merino, M. Chacón, L. Soler, G. Castro-Escarpulli, M. J. Figueras, J. M. Tomás, Complete type III secretion system of a mesophilic *Aeromonas hydrophila* strain. *Appl. Environ. Microbiol.* 70 (2004) 6914-6919.
- [41] P. A. West, P. R. Brayton, T. N. Bryant, R. R. Colwell, Numerical taxonomy of vibrios isolated from aquatic environments. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 36 (1986) 531-543.
- [42] T. Wiklund, I. Dalsgaard, Occurrence and significance of atypical *Aeromonas salmonicida* in non-salmonid and salmonid fish species: a review. *Dis. Aquat. Organ.* 32 (1998) 49-69.
- [43] M. A. Yáñez, V. Catalán, D. Apráiz, M. J. Figueras, A. J. Martínez-Murcia, Phylogenetic analysis of members of the genus *Aeromonas* based on *gyrB* gene sequences. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 53 (2003) 875-883.
- [44] F. Ziemke, M. G. Hofle, J. Lalucat, R. Roselló-Mora, Reclassification of *Shewanella putrefaciens* Owen's genomic group II as *Shewanella balthica* sp. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 48 (1998) 179-186.

Artículo:

- 4.1.9. MJ Figueras, A Alperi, R Beaz-Hidalgo, E Stackebrandt, E Brambilla, A Monera, AJ Martínez-Murcia. *Aeromonas rivuli* sp. nov. isolated from the upstream region of a karst water rivulet in Germany. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. En revisión.**

Resumen

Dos cepas aisladas del agua de un riachuelo en Alemania (WB4.1-19^T y WB4.4-101) y recibidas en nuestro laboratorio para su identificación, mostraron una similitud del 99.9% entre sus secuencias del gen ARNr 16S, siendo la especie más similar a ellas, en base a este gen, *Aeromonas sobria* (99.7% similitud; 6 pb diferentes). La reconstrucción filogenética en base a las secuencias concatenadas de 5 genes *housekeeping* (*gyrB*, *rpoD*, *recA*, *dnaJ* y *gyrA*; 3684 pb) mostró que dichos aislados representaban cepas distintas y que constituían una línea filogenética independiente, siendo las ramas de las especies *Aeromonas molluscorum* y *Aeromonas bivalvium* las más cercanas. Los valores de reasociación ADN-ADN entre las dos cepas fue del 83% y de entre el 47 y 66% con las cepas tipo de las especies más cercanas. Las características fenotípicas de estas dos cepas permitió diferenciarlas del resto de especies definidas en el género. Los datos obtenidos muestran que estas dos cepas representan una nueva especie de *Aeromonas* para la cual se propone el nombre de *Aeromonas rivuli* con la cepa WB4.1-19^T (=CECT 7518^T=DSM 22539^T) como cepa tipo.

***Aeromonas rivuli* sp. nov. isolated from the upstream region of a karst water rivulet in
Germany**

**Figueras MJ¹, Alperi A¹, Beaz-Hidalgo R¹, Stackebrandt E², Brambilla, E², Monera, A³,
Martínez-Murcia AJ³.**

¹Unitat de Microbiologia, Departament de Ciències Mèdiques Bàsiques, Facultat de Medicina i Ciències de la Salut, Reus, Spain. ²DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Braunschweig, Germany. ³Molecular Diagnostics Center and Universidad Miguel Hernández, Orihuela, España.

*corresponding author: M^a José Figueras, mariajose.figueras@urv.cat

Tel: +34-977759321; Fax: +34-977759322.

SUMMARY

Two freshwater isolates (WB4.1-19^T and WB4.4-101), sharing 99.9% 16S rRNA gene sequence similarity among each other, were highly related to members of *Aeromonas sobria* (99.7% similarity; 6 bp differences). A phylogenetic tree derived from the Multi-Locus-Phylogenetic-Analysis (MLPA) of concatenated sequences of 5 housekeeping genes (*gyrB*, *rpoD*, *recA*, *dnaJ* and *gyrA*; 3684 bp) clustered both strains as an independent phylogenetic line next to members of the species *A. molluscorum* and *A. bivalvium*. The DNA-DNA reassociation value obtained for these two isolates was 89.3%, while those for the two isolates and type strains of *A. sobria*, *A. molluscorum* and *A. bivalvium* ranged between 50 and 59.6%. The phenotypic characterization differentiated these two strains from all other *Aeromonas* type strains. These data indicated that both strains belong to a novel *Aeromonas* species, for which the name *Aeromonas rivuli* sp. nov. is proposed, with the type strain WB4.1-19^T (=CECT7518^T=DSM22539^T).

Running title: *Aeromonas rivuli*

The GenBank accession number of strains WB4.1-19^T and WB4.4-101 for the 16S rRNA, *gyrB*, *rpoD*, *recA*, *dnaJ* and *gyrA* genes sequences are FJ976900 and FJ976899, FJ969434 and FJ969439, FJ969433 and FJ969437, FJ969435 and FJ969440, FJ969432 and FJ969441, FJ969436 and FJ969430, respectively.

The genus *Aeromonas* (family *Aeromonadaceae*, class *Gammaproteobacteria*), include bacteria which are considered autochthonous of aquatic environments and often associated with fish and humans diseases (Martin-Carnahan & Joseph, 2005; Figueras 2005). At present the genus includes more than 19 species and four new proposed species are in the process of being published (Alperi *et al.* a in press, b submitted; Beaz-Hidalgo *et al.*, in press). The taxonomy of *Aeromonas* is considered complex using either classical identification tools such as phenotypic characters or the 16S rRNA gene (Ormen *et al.*, 2005; Martínez-Murcia *et al.*, 2005). Though 16S rRNA gene sequences are considered a robust taxonomic tool, widely used in bacterial taxonomy, in *Aeromonas* this gene shows a very high inter-species similarity ranging from 96.7% to 100% (Martínez-Murcia *et al.*, 1992; 2007) and furthermore presents mutations which hamper its utility in this genus (Alperi *et al.*, 2008). A threshold value similarity of about 97% had been proposed for the latter gene, below which strains exhibit sufficiently low DNA-DNA reassociation values (i.e., <70%) that could be considered individual species (Stackebrandt *et al.*, 2002). Recently, based on a broader data set, the threshold value had been increased to 98.7–99.0% in order to facilitate taxonomic studies without sacrificing the quality and precision of a ‘species’ description (Stackebrandt & Ebbers, 2006).

The use of housekeeping genes in the polyphasic approach to classification had been recommended to genomically circumscribe species and to differentiate this taxon from neighboring species detected by; for example, 16S rRNA gene sequences (Stackebrandt *et al.*, 2002). We introduced sequence analyses of housekeeping genes (*gyrB* and *rpoB*) for studies on the phylogenetic relationships among *Aeromonas* species (Yáñez *et al.*, 2003; Soler *et al.*, 2004) which turned out to constitute a turning point in the taxonomy of aeromonads because these genes, as others recently investigated (*rpoB*, *dnaJ* and *recA*) by other authors (Küpfer *et al.*, 2006; Nhung *et al.*, 2007; Sepe *et al.*, 2008), show a much higher resolution than 16S rRNA gene sequences. Housekeeping genes not only led to some reclassification proposals (Martínez-Murcia *et al.*, 2007; 2009) but enabled the recognition of new *Aeromonas* species, e.g., *A. aquariorum* and *A. tecta* (Martínez-Murcia *et al.*, 2008; Demarta *et al.*, 2008) and more recently *A. fluvialis*, *A. piscicola*, *A. taiwanensis* and *A. sanarellii* (Alperi *et al.*, a in press, Alperi *et al.*, b submitted; Beaz-Hidalgo *et al.*, in press).

In a recent environmental study, the taxonomic diversity of aerobic bacteria (n=681) in a karst water rivulet in northern Germany (Westerhöfer Bach) was evaluated and 40 different genera and about 60 novel phylospecies were identified (Cousin *et al.*, 2008). Fifteen of the recovered isolates belonging to *Aeromonas* on the basis of 16S rDNA partial sequences (432 bp) were sent to our laboratory for further molecular characterization. The present communications described the polyphasic approach to the classification of a novel *Aeromonas* species.

All 15 isolates were cultured on sheep blood agar at 30°C and DNA was extracted from single colonies using InstaGene™ Matrix (Bio-Rad Laboratories). The conditions for *rpoD* (820 bp) and 16S

rRNA gene (1503 bp) sequences analysis, including primers, amplification conditions and sequencing, was done as previously described (Martinez-Murcia *et al.*, 1992; Soler *et al.*, 2004). The *rpoD* sequences obtained were independently aligned with the sequences of the type and reference strains of all the members of the genus *Aeromonas* that were available in the GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=nucleotide>) by CLUSTAL W program, version 1.83 (Thompson *et al.*, 1994). Genetic distances and clustering were obtained using Kimura's 2-parameter model (Kimura 1980), evolutionary trees were constructed by the neighbor-joining (and maximum-parsimony for 16S rRNA gene) method (Saitou & Nei 1987) using the MEGA4 program (Tamura *et al.*, 2007). Stability of the relationships was assessed by bootstrapping (1000 replicates).

The *rpoD* phylogenetic analysis revealed that 13 of the 15 strains belonged to known *Aeromonas* species while two strains (WB4.1-19^T and WB4.4-101) grouped as an individual lineage within the *A. molluscorum* / *A. bivalvium* cluster (data not shown). Both WB isolates showed 97.7% similarity of the *rpoD* gene (20 bp differences between their sequences) while similarity with the nearest species *A. molluscorum* was 94.3% for WB4.1-19^T and 94.5% for WB4.1-101. These values are below the minimum intra-species similarity of 97% previously established for the *rpoD* gene in the genus *Aeromonas* (Soler *et al.*, 2004; Alperi *et al.*, 2008).

The almost complete 16S rRNA gene (1503 bp) was sequenced from both strains (WB4.1-19^T and WB4.4-101) using primers and conditions previously described (Martinez-Murcia *et al.*, 1992). The two strains were highly related to each other (99.9%; 2 bp differences) sharing 99.7% similarity with *A. sobria* CECT 4245^T. These results were in agreement with those obtained at the DSMZ laboratory using partial sequences (432 bp) of the 16S rRNA gene. Within the 16S rDNA phylogenetic trees the two isolates cluster next to *A. sobria* CECT 4245^T, however with low bootstrap values no matter when phylogeny was inferred with either the neighbor-joining algorithm (Fig. 1) or maximum-parsimony algorithm (Supplement Figure S1). Chromatogram analysis of the 16S rDNA sequences of both strains showed microheterogeneities in two positions (1011 and 1018) for strain WB4.1-19^T and in 4 positions (258, 469, 1355, 1357) for strain WB4.4-101 (Supplement Table S1). Microheterogeneities have been described in other *Aeromonas* species (Alperi *et al.*, 2008; Alperi *et al.*, a in press, b submitted).

The Multi-Locus Sequence Analysis (MLPA), performed on the basis of *gyrB* (923 bp), *rpoD* (652 bp), *recA* (600 bp), *dnaJ* (800 bp) and *gyrA* (709 bp) genes, was done in the Molecular Diagnostic Center (MDC), Orihuela, Spain, as it has been previously described (Martínez-Murcia *et al.*, submitted).

The MLPA tree showed, in concordance with all five single-gene phylogenies and in contrast with the 16S rRNA gene, that strains WB4.1-19^T and WB4.4-101 were not phylogenetically related to

A. sobria (Fig. 2), but appeared as an independent branch in a cluster that included members of *A. molluscorum* and *A. bivalvium*. Species delineation based on the analysis of five housekeeping genes, had been recommended by an Ad-hoc Committee (Stackebrandt *et al.*, 2002), but only the recently described species *A. fluvialis* (Alperi *et al.*, a in press) and two species *A. taiwanensis* and *A. sanarellii*, described from clinical isolates (Alperi *et al.*, b submitted) complies with this recommendation.

DNA-DNA reassociation experiments were performed between the two isolates and the type strains of *A. sobria*, *A. molluscorum* and *A. bivalvium*. DNA extraction and reassociation experiments were conducted as previously described (Alperi *et al.*, a in press).

The DNA-DNA reassociation values between strains WB4.1-19^T and WB4.4-101 was 89.5%, while they were 52.5% with *A. sobria* CECT4245^T, 59.6% with *A. molluscorum* CECT5864^T and 50% with *A. bivalvium* CECT7113^T (Table S2), all below the 70% threshold established for species delineation (Stackebrandt *et al.*, 2002).

Optimal growth temperature and pH were determined in tryptic soy broth (TSB, Difco) after 24h by optical density. Cell sizes, morphologies and the presence of flagella were determined by electron microscopy using described methods (Collado *et al.*, in press). Both strains were straight, non-spore forming, non-encapsulated rods and motile by polar flagella (Supplement Figure S2).

Cultural characteristics of strains WB4.1-19^T and WB4.4-101, i.e., size and color of colonies and production brown diffusible pigment, were determined on tryptic soy agar (TSA, Difco) at 30°C for 24h. Sheep blood agar (Biomedics) was used to evaluate haemolysis under the same conditions. Twenty eight phenotypic tests selected from Abbott *et al.*, (2003) and also determined in a previous study (Alperi *et al.*, in press) were used for the characterization of strains WB4.1-19^T and WB4.4-101. These tests were performed in triplicate at 30°C. Some tests were further confirmed using commercial identification kits (API20NE and API20E, BioMérieux). Additional tests included in the latter kits together with the fermentation/oxidation reactions of 49 carbohydrates using API50CH (BioMérieux) were also considered. Phenotypic characteristics that differentiate both isolates from the other of *Aeromonas* spp. are presented in Table 1. Though not especially tested in this study, all *Aeromonas* type strains, including the recent described ones, were evaluated for most of the differential tests (Table 1) under identical conditions that those used for strains WB4.1-19^T and WB4.4-101.

Interestingly the two isolates show phenotypic similarity with *A. molluscorum* as they are the only taxa negative for indole, Voges-Proskauer (VP) and lysine decarboxylase (LDC) test. The major characteristics that differentiate the two isolates from *A. molluscorum* are their ability to produce acid from salicin and L-arabinose. *Aeromonas* species with similar phenotypic profiles such as *A. bivalvium*, *A. caviae* and *A. media*, can be differentiated by the production of indol and acid

production from L-arabinose. Other species such as *A. fluvialis* and *A. tecta* differ in the production of gas from D-glucose, and from *A. simiae* by test lysine decarboxylase (LDC) or acid production from salicin. Four or more phenotypic tests allowed differentiation from the other currently known *Aeromonas* species (Table 1). Useful phenotypic tests to differentiate this group of strains from all *Aeromonas* taxa described up to date were their inability to produce indol, gas from D-glucose, LDC and β -haemolysis from sheep blood agar. Strain WB4.4-101 was positive for LDC, ODC and urease with the API 20E system, however, both amino acids were negative when tested by the Moeller's method.

Based on molecular and phenotypic evidence we conclude that strains WB4.1-19^T and WB4.4-101 represent a new *Aeromonas* species, for which the name *Aeromonas rivuli* sp. nov is proposed.

Description of *Aeromonas rivuli* sp. nov.

Aeromonas rivuli (ri'vu.li. L. gen. masc. n. rivuli of/from a rivulet, a small creek).

Cells are Gram-negative, non spore forming motile rods with a polar flagellum and are 2.0-2.5 μm long and 0.5-0.7 μm wide. Oxidase and catalase positive, reduce nitrates to nitrites and are resistant to the vibriostatic agent O/129 (150 μg). Chemo-organotrophic, with both oxidative and fermentative metabolism. Colonies on TSA are opaque, beige in colour and 2.0-2.5 mm in diameter after 48h at 30°C, and 1.0-2.0 mm at 37°C. No brown diffusible pigment is produced on TSA at 25°C and 30°C. No haemolysis is observed on sheep blood agar at 30°C. Growth occurs at 7-37°C and at 0-3% NaCl (w/v). Optimal growth temperature occurs at 30°C and at pH 8.7-9.0 after 24h on TSB. Both strains are positive for the β -galactosidase test, ADH, hydrolysis of esculin, gelatin, starch and tween 80. However, they are negative for LDC, ODC, VP, production of indol from tryptophan, gas from glucose and hydrogen sulphide from cysteine, and hydrolysis of elastin and DNA. Utilization of citrate is variable. Both strains are able to use D-sucrose, D-mannitol, L-lactate and salicin as sole carbon energy source but not L-arabinose, cellobiose, inositol, L-rhamnose, D-sorbitol and raffinose. Acid is produced from glycerol, D-ribose, D-galactose, D-glucose, D-fructose, D-mannose, D-mannitol, N-acetylglucosamine, arbutin, aesculin, salicin, D-cellobiose, D-maltose, D-saccharose, D-trehalose, starch and glycogen. The strains do not produce acid from erythritol, D-arabinose, L-arabinose, D-xylose, L-xylose, D-adonitol, methyl- β -D-xylopiranoside, L-sorbose, L-rhamnose, dulcitol, inositol, D-sorbitol, methyl- α -D-mannopyranoside, methyl- α -D-glucopyranoside, amygdalin, D-lactose, D-melibiose, inulin, D-melezitose, D-raffinose, xylitol, gentiobiose, D-turanose, D-lyxose, D-tagatose, D-fucose, L-fucose, D-arabitol, L-arabitol, potassium gluconate, potassium 2-ketogluconate and potassium 5-ketogluconate. The API20NE profiles for both strains were 5576354. The API 20E profile for strain WB4.1-19^T was 3006125 and for strain WB4.4-101 was 7116125.

The strains were isolated from a karst hardwater creek Westerhöfer Bach located at the northwester slope of the Harz Mountain, Lower Saxony, Germany. The isolation site was 350 m downstream the discharge site.

The type strain is WB4.1-19^T (=CECT7518^T =DSM22539^T).

Acknowledgements

We are grateful to M^a Isabel Inza for her help in the phenotypic characterization and to Catalina Nuñez for her excellent technical assistance. We are also grateful to the Pharmacology Unit of the Rovira i Virgili University for the use of their Bio Whittaker Kinetic-QCL Microplate Reader.

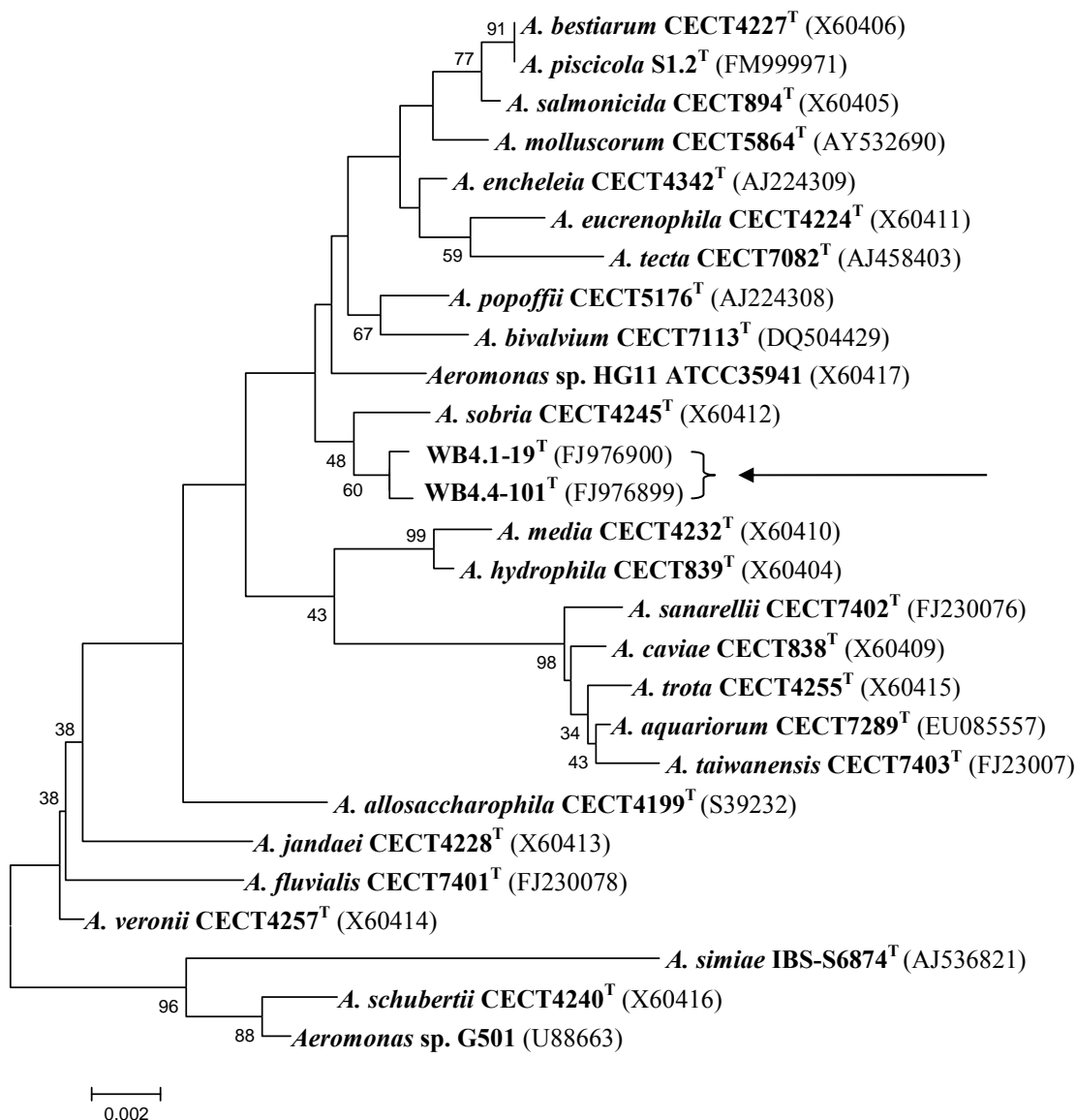


Fig. 1. Unrooted phylogenetic tree derived from the 16S rRNA gene sequences showing relationships of strains WB4.1-19^T and WB4.4-101 to all other *Aeromonas* species described with the neighbour-joining method. Numbers at nodes indicate bootstrap values (percentage of 1000 replicates).

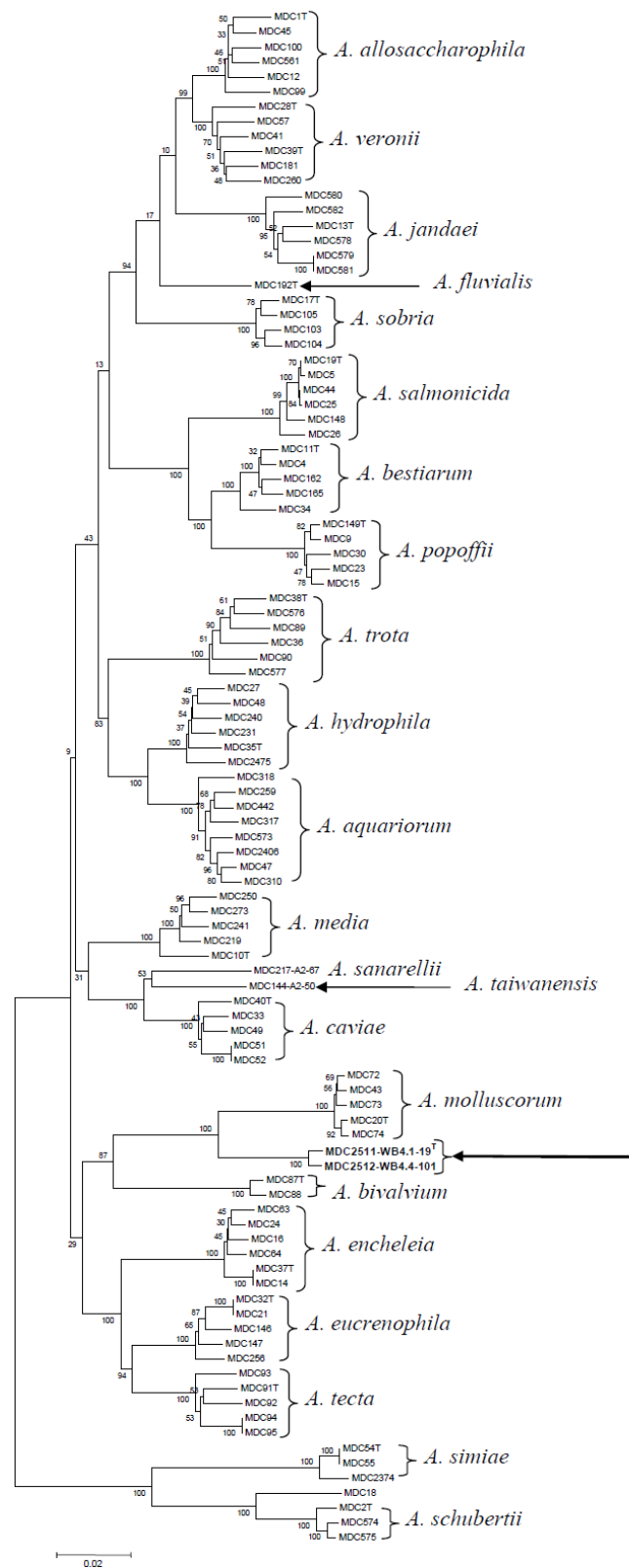
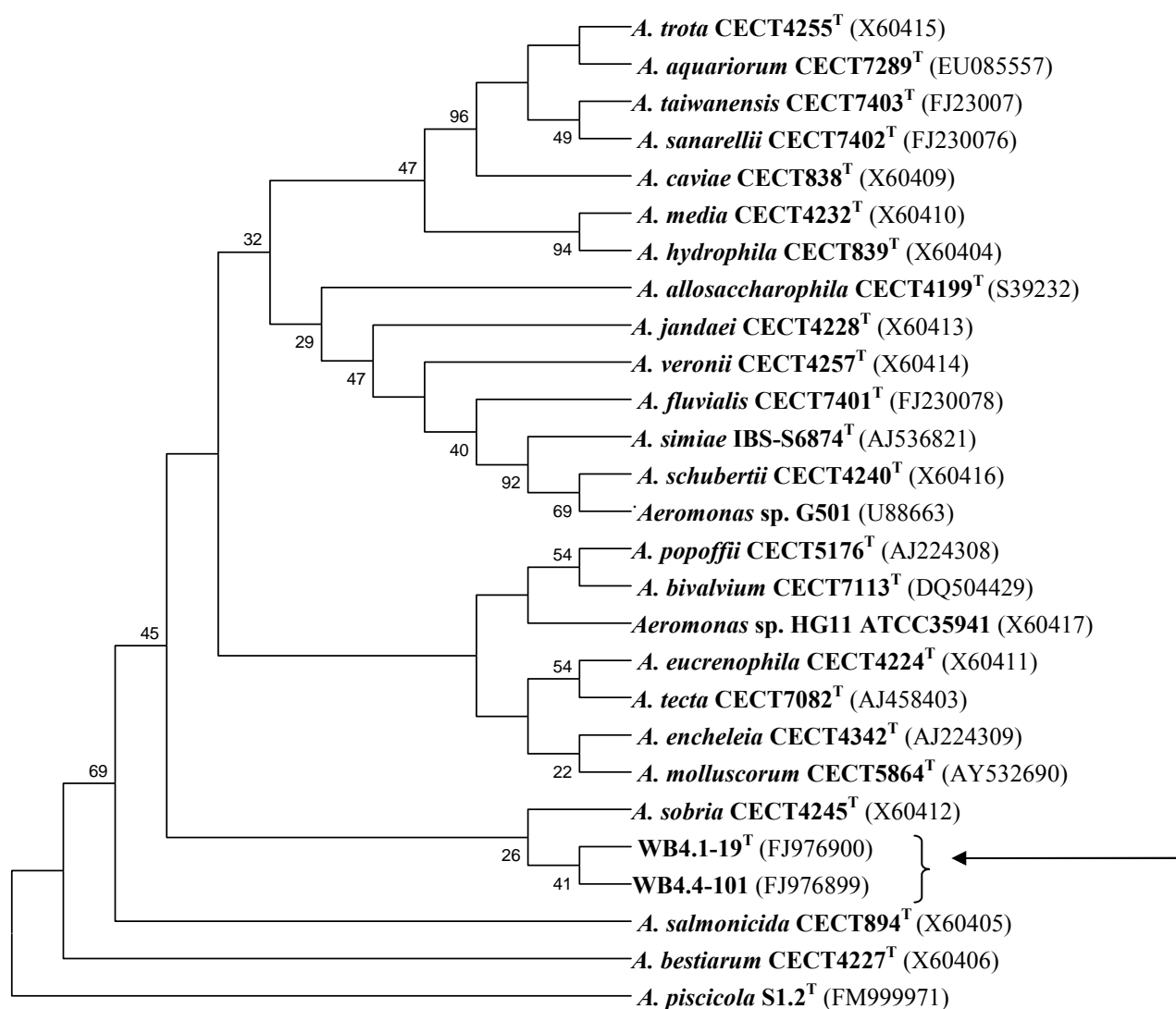


Fig. 2. Unrooted phylogenetic tree derived from the MLPA showing the corresponding relationships of strains WB4.1-19^T and WB4.4-101 to all other *Aeromonas* species described with the neighbour-joining methods. Numbers at nodes indicate bootstrap values (percentage of 1000 replicates).

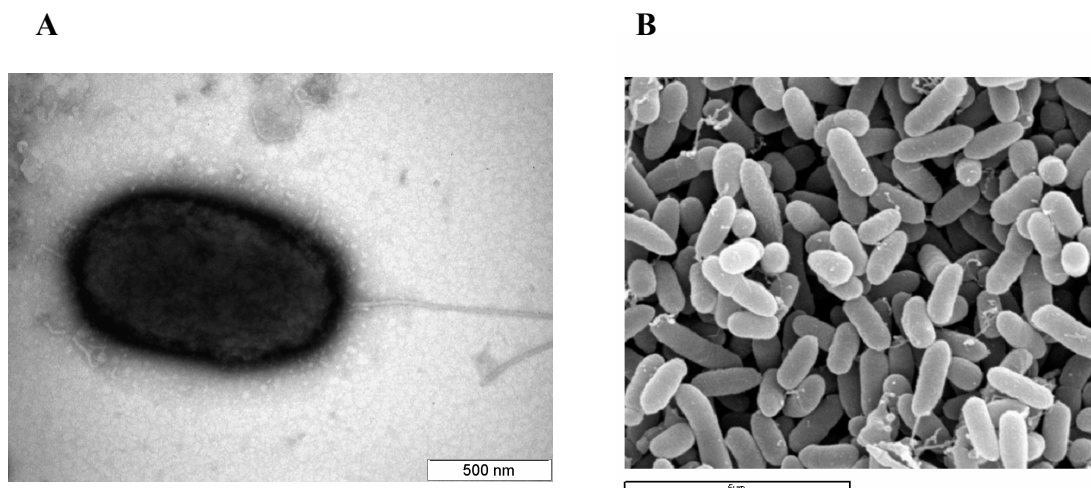
Table 1. Key tests for the phenotypic differentiation of *Aeromonas rivuli* from other *Aeromonas* species.

Character	1	2 ^a	3 ^a	4 ^a	5 ^a	6 ^a	7 ^a	8 ^a	9 ^a	10 ^a	11 ^a	12 ^a	13 ^a	14 ^a	15 ^a	16 ^a	17 ^b	18 ^c	19 ^d	20 ^e	21 ^f	22 ^g	23 ^h	24 ⁱ	25 ⁱ		
β-haemolysis	-	+	+	V	V	V	+	-	+	+	+	V	V	V	V	-	-	V	-	ND	+	-	+	+	+		
Indol	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-	+	+	-	+	+	+	+		
VP	-	+	V(-)	V(+)	-	-	-	-	+	+	V(-)	V(-)	-	-	-	+	+	-	-	+	V(-)	-	+	-	-		
ODC	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	V	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
LDC	-	+	V(-)	V(-)	-	-	-	+	+	+	+	V(-)	+	-	+	-	+	-	+	+	V(-)	-	-	-	+		
Glucose (gas)	-	+	+	V(-)	-	-	V(+)	V(-)	+	+	+	-	V(+)	V(+)	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	-		
<u>Hydrolysis of</u>																											
Aesculin	+	+	+	V(+)	V(+)	V(-)	V(+)	-	-	-	+	-	-	V(+)	V(+)	-	V(-)	+	+	+	V(-)	-	+	+	+		
<u>Acid from</u>																											
Glycerol	+	+	+	-	V(-)	V(+)	-	+	+	+	+	-	V(+)	+	+	+	+	+	+	(-)	+	+	+	+	+		
D-saccharose	+	+	+	+	+	+	V(+)	+	+	-	+	-	V(-)	V(+)	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+		
L-arabinose	-	V(+)	+	+	+	+	V(+)	-	-	-	-	-	-	-	V(+)	V(+)	-	+	+	-	-	-	-	+	+		
Salicin	+	V(-)	V(-)	V(-)	V(+)	V(-)	V(-)	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	(-)	-	+	V(-)	+	+	+	+		
Lactose	-	V(-)	-	+	V(-)	V(+)	+	-	-	-	V(-)	-	-	-	-	-	(+)	-	-	-	-	+	-	-	-		
<u>Utilization of</u>																											
L-lactate	+	+	-	-	V	+	-	-	-	-	-	+	+	-	V	+	ND	V	+	-	ND	ND	-	ND	ND		

Taxa are identified as: 1, *A. rivuli* (data from this study at 30°C); 2, *A. hydrophila*; 3, *A. bestiarum*; 4, *A. salmonicida*; 5, *A. caviae*; 6, *A. media*; 7, *A. eucrenophila*; 8, *A. sobria*; 9, *A. veronii* biovar *sobria*; 10, *A. jandaei*; 11, *A. veronii* biovar. *veronii*; 12, *A. schubertii*; 13, *A. trota*; 14, *A. encheleia*; 15, *A. allosaccharophila*; 16, *A. popoffii*; 17, *A. simiae*; 18, *A. molluscorum*; 19, *A. bivalvium*; 20, *A. aquariorum*; 21, *A. tecta*; 22, *A. fluvialis*; 23, *A. piscicola*; 24, *A. taiwanensis*; 25, *A. sanarelli*. Abbreviations: +, 85-100% of strains positive; -, 0-15% of strains positive; V, 16-84% of strains positive; ND, no data available. Data from species obtained from: ^aAbbott *et al.*, (2003) who performed tests at 35°C with the exceptions of *A. popoffii* and *A. sobria* which were at 25°C, as did ^eMiñana-Galbis *et al.*, (2004); ^bHarf-Monteil *et al.*, (2004); ^cMartínez Murcia *et al.*, (2008), ^dDemarta *et al.*, (2008), ^gAlperi *et al.*, (a, in press), ^hBeaz-Hidalgo *et al.*, (in press), ⁱAlperi *et al.*, (b, submitted) performed tests at 30°C; ^eMiñana-Galbis *et al.*, (2007) performed tests at 25-30°C; and ^jEsteve *et al.*, (1995) and ^kHuys *et al.*, (1997) performed tests at 28°C. Type strain results are expressed in brackets for variable responses or when no data was available.



Supplementary Fig. S1. Unrooted phylogenetic tree derived from the 16S rRNA gene sequences showing relationships of strains WB4.1-19^T and WB4.4-101 to all other *Aeromonas* species described with the maximum-parsimony method. Numbers at nodes indicate bootstrap values (percentage of 1000 replicates).



Supplementary Fig. S2. A-B. Electron microscopy images of strain WB4.1-19^T. A. Transmission electron microscope, negative stain Bar, 500 nm. B. Scanning electron microscope, Bar 5 μm.

Supplementary Table S1. Base differences in the 16S rRNA gene sequence between strain WB4.1-19^T and WB4.4-101 and the type strains of *A. sobria*, *A. molluscorum* and *A. bivalvium*.

Strain	GenBank accession n°.	Position*															
		258	456	459	460	462	469	470	471	472	476	677	1011	1018	1355	1357	
WB4.1-19 ^T	FJ976900	A	T	G	C	G	T	C	T	T	A	C	T/C	A/G	G	C	
WB4.4-101	FJ976899	A/G	T	G	C	G	T/C	C	T	T	A	C	C	G	G/A	C/T	
<i>A. sobria</i> CECT 4245 ^T	X60412	G	T	G	C	G	T	C	T	T	G	T	C	A	A	T	
<i>A. molluscorum</i> CECT 5864 ^T	AY532690	A	T	A	T	C	C	G	T	A	A	C	T	A	G	C	
<i>A. bivalvium</i> CECT 7113 ^T	DQ504429	N	A	C	T	G	T	C	C	A	T	C	T	A	A	T	

*Following the *Escherichia coli* nomenclature (Brosius *et al.*, 1978).

Supplementary Table S2. DNA-DNA relatedness (%) between strain WB4.1-19^T and WB4.4-101, *A. molluscorum*, *A. bivalvium* and *A. sobria* type strains. Results are percentages and are expressed as the mean ± standard deviation of three duplicate determinations.

Strains	% DNA-DNA relatedness with <i>A. rivuli</i> (WB4.1-19 ^T)
WB4.4-101	89.3±6.5
<i>A. molluscorum</i> CECT5864 ^T	59.6±6.5
<i>A. bivalvium</i> CECT7113 ^T	50.0±3.0
<i>A. sobria</i> CECT4245 ^T	52.5±2.51

REFERENCES

- Abbott, S. L., Cheung, W. K. & Janda, J. M. (2003).** The genus *Aeromonas*: biochemical characteristics, atypical reactions, and phenotypic identification schemes. *J Clin Microbiol* **41**, 2348-2357.
- 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.
- Alperi, A., Martínez-Murcia, A. J., Monera, A., Maria J. Saavedra & Figueras, M. J. (2009a).** *Aeromonas fluvialis* sp. nov., isolated from Spanish river. *Int J Syst Evol Microbiol* (In press).
- Beaz-Hidalgo, R., Alperi, A., Figueras, M. J. & Romalde, J. L. (2009).** *Aeromonas piscicola* sp. nov., isolated from diseased fish. *Int J Syst Evol Microbiol* (In press).
- Brosius, J., Palmer, M. L., Kennedy, P. J. & Noller, H. F. (1978).** Complete nucleotide sequence of a 16S ribosomal RNA gene from *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci USA* **75**, 4801-4805.
- 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* (In press). DOI: 10.1099/ijms.003749-D.
- Cousin, S., Brambilla, E., Yang, J. & Stackebrandt, E. (2008).** Culturable aerobic bacteria from the upstream region of a karst water rivulet. *Int Microbiol* **11**, 91-100.
- Demarta, A., Küpfer, M., Riegel, P., Harf-Monteil, C., Tonolla, M., Peduzzi, R., Monera, A., Saavedra, M. J. & Martínez-Murcia, A. J. (2008).** *Aeromonas tecta* sp. nov., isolated from clinical and environmental sources. *Syst Appl Microbiol* **46**, 439-444.
- Esteve, C., Gutierrez, M. C. & Ventosa, A. (1995).** *Aeromonas encheleia* sp. nov., isolated from European eels. *Int J Syst Bacteriol* **45**, 462-466.
- Figueras, M. J. (2005).** Clinical relevance of *Aeromonas*. *Rev Med Microbiol* **16**, 145-153.
- Harf-Monteil, C., Fleche, A. L., Riegel, P., Prevost, 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.

Huys, G., Kämpfer, P., Altwegg, M., Coopman, R., Janssen, P., Gillis, M. & Kersters, K. (1997). Inclusion of *Aeromonas* DNA hybridization group 11 in *Aeromonas encheleia* and extended descriptions of the species *Aeromonas eucrenophila* and *A. encheleia*. *Int J Syst Bacteriol* **47**, 1157-1164.

Kimura, M. (1980). A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *J Mol Evol* **16**, 111-120.

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

Martin-Carnahan, A. & Joseph, S.W. (2005). Order XII. *Aeromonadales* ord. nov. In Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, 2nd edn, vol. 2, part B, p. 556. Edited by D. J. Brenner, N. R. Krieg, J. T. Staley & G. M. Garrity. New York: Springer.

Martínez-Murcia, A. J., Benlloch, S. & Collins, M. D. (1992). Phylogenetic interrelationships of members of the genera *Aeromonas* and *Plesiomonas* as determined by 16S ribosomal DNA sequencing: lack of congruence with results of DNA-DNA hybridizations. *Int J Syst Bacteriol* **42**, 412-421.

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.

Martínez-Murcia, A. J., Figueras, M. J., Saavedra, M. J. & Stackebrandt, E. (2007). The recently proposed species *Aeromonas sharmana* sp. nov., isolate GPTSA-6T, is not a member of the genus *Aeromonas*. *Int Microbiol* **10**, 61-64.

Martínez-Murcia, 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 Evol Microbiol* **58**, 1169-1175.

Martínez-Murcia, A. J., Monera, A., Alperi, A., Figueras, M. J. & Saavedra, M. J. (2009). Phylogenetic evidence suggests that strains of *Aeromonas hydrophila* subsp. *dhakensis* belong to the species *Aeromonas aquariorum* sp. nov. *Curr Microbiol* **58**, 76-80.

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.

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.

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.

Ormen, O., Granum, P. E., Lassen, J. & Figueras, M. J. (2005). Lack of agreement between biochemical and genetic identification of *Aeromonas* spp. *APMIS* **113**, 203-207.

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.

Saitou, N. & Nei, M. (1987). The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol* **4**, 406-425.

Sepe, A., Barbieri, P., Peduzzi, R. & Demarta, A. (2008). Evaluation of *recA* sequencing for the classification of *Aeromonas* strains at the genotype level. *Lett Appl Microbiol* **46**, 439-444.

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.

Stackebrandt, E. & Ebbers, J. (2006). Taxonomic parameters revisited: tarnished gold standards. *Microbiology Today* **33**, 152-155.

Stackebrandt, E., Frederiksen, W., Garrity, G. M., Grimont A. D, Kämpfer P., Maiden M. C. J., Nesme X., Roselló- Mora R., Swings J., Trüper H. G., Vauterin L., Ward A. & Whitman W. B. (2002). Report of the ad hoc committee for the re-evaluation of the species definition in bacteriology. *Int J Syst Evol Microbiol* **52**, 1043-1047.

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.

Thompson, J. D., Higgins, D. G. & Gibson, T. J. (1994). CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res* **22**, 4673-4680.

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

4.2. Epidemiología del género *Aeromonas*

Artículo:

4.2.1. MJ Figueras, A Alperi, MJ Saavedra, WC Ko, N Gonzalo, M Navarro, AJ Martínez-Murcia. Clinical relevance of the recently described *Aeromonas aquariorum*. *Journal of Clinical Microbiology*. En revisión.

Resumen

Ciento cincuenta cepas de origen extraintestinal aisladas en el Hospital Universitario Nacional Cheng Kung de Tainan (Taiwán) se recibieron en nuestro laboratorio para su identificación genética. Sorprendentemente, 22 cepas (el 50% de ellas aisladas de sangre) resultaron pertenecer a la especie *Aeromonas aquariorum* de la cual también habíamos reconocido 3 cepas de pacientes con diarrea aisladas en el Hospital Comarcal Vega Baja de Orihuela. Esta es una especie de reciente descripción definida a partir de cepas aisladas de peces ornamentales y agua de acuario y por tanto se desconocía en el ámbito clínico. Con el ánimo de alertar a los clínicos de la posible importancia de esta nueva especie, realizamos un estudio para caracterizar el potencial virulento y la resistencia a los agentes antimicrobianos de estas 25 cepas de *A. aquariorum*, además de proporcionarles las herramientas necesarias para diferenciar esta especie del resto de especies con importancia clínica. Todas las cepas mostraron ser resistentes a la amoxicilina, cefalotina y cefoxitina, siendo el 96% resistente a la eritromicina mientras que el 4% lo fueron frente al cloranfenicol e imipenem. Todas las cepas poseían los genes para la aerolisina/hemolisina y las de origen intestinal poseían además los genes *act* y *ast*, cuyas toxinas generan un efecto sinérgico en la severidad de la diarrea (Khün y cols., 1997), así como los genes del Sistema de Secreción tipo 3 (T3SS o TTSS) y de la proteína efectora AexT. Los genes del T3SS también se detectaron en más de la mitad de las cepas procedentes de sangre y heridas. Aunque *A. aquariorum* se ha confundido bioquímicamente con *A. hydrophila*, se diferencia de ésta por la incapacidad de utilizar el L-lactato. A pesar de la similitud entre *A. caviae* y *A. aquariorum* en sus secuencias del gen ARNr 16S, ambas especies se pueden diferenciar por su capacidad de producir gas de la glucosa, H₂S de la cisteína y ácido de la salicina, entre otros.

Clinical relevance of the recently described *Aeromonas aquariorum*

M^a José Figueras¹, Anabel Alperi¹, M^a José Saavedra², Wen-Chien Ko³, Nieves Gonzalo⁴, Maria Navarro⁴ and Antonio J. Martínez- Murcia⁵

¹Unidad de Microbiología. Facultad de Medicina y Ciencias de la Salud. Universitat Rovira i Virgili, Sant Llorenç 21, 43201, Reus. Spain. ²Department of Veterinary Sciences, CECAV-University of Trás-os-Montes e Alto Douro, Vila Real, Portugal. ³National Cheng Kung University Hospital, Tainan, Taiwan. ⁴Servicio de Microbiología, Hospital Comarcal Vega Baja, Orihuela, Alicante, Spain. ⁵Molecular Diagnostics Center (MDC), Biomolecular Technologies S.L., and Universidad Miguel Hernández, Orihuela, Alicante, Spain.

Twenty-two human extraintestinal (11 from blood) strains of *Aeromonas aquariorum*, a species known only from ornamental fish, and three isolates recovered from patients with diarrhoea had been genetically characterized. The strains showed to bear an important number of virulence genes and to be all resistant to amoxicillin, cephalotin, cefoxitin.

Members of the genus *Aeromonas* are responsible for producing intestinal and extra intestinal infections worldwide (1, 11). The most common *Aeromonas* clinical presentation is diarrhoea followed by bacteraemia and localised soft-tissue infections. Bacteraemia mainly occurs in patients with underlying diseases i.e. hepatobiliary disorders, cancer and diabetes. In patients with hepatobiliary and pancreatic disease, and especially in those with cirrhosis, they can produce cholangitis, spontaneous peritonitis, empyema, osteomyelitis and necrotizing fasciitis (1, 11), the latter presentation can be fatal, despite surgical intervention and antibiotic therapy.

Pathogenicity of *Aeromonas* has been associated to numerous virulence factors including the aerolysin/hemolysin group of genes, the cytotoxic enterotoxins Ast and Alt (4, 9, 24), the cytotoxin encoded by the *act* gene (32), and a type III secretion system (TTSS) (8, 30). The TTSS is virulence mechanism that directly delivers toxins (AexT among others) into the host cell inducing apoptosis (8, 30, 31). Furthermore a correlation has been found between the presence of both TTSS and *act* genes and lactone production associated with quorum sensing (25).

The most recent update included 16 species in the genus (23), but since then it had been enlarged with the addition of *Aeromonas bivalvium* (21), and very recently with *Aeromonas tecta* (10) and *Aeromonas aquariorum*, the latter isolated from water and skin of ornamental fish (19). Furthermore it has been recognized that *A. hydrophila* subsp. *dakhensis*, defined from 10 haemolytic and cytotoxic strains isolated from children with diarrhoea in Bangladesh (16) and *A. aquariorum* should be considered synonyms (18).

The most prevailing species associated with human infections when using extended biochemical protocols or molecular identification methods are *A. veronii*, *A. caviae* and *A. hydrophila*. Despite that, the later is the most referred species at the clinical literature being this an erroneous by product of the imprecision of biochemical identification methods (11, 17, 27).

Among a set of extraintestinal strains received from Taiwan for genetic identification in our laboratory, we have recognized that 22 belonged to *A. aquariorum*, as did 3 clinical strains isolated from patients with diarrhoea in Spain. Described here is the molecular characterization, antibiotic susceptibility and the virulence potential of those strains providing tools for clinicians to differentiate *A. aquariorum* from other commonly encountered clinical species.

Strains and molecular identification. A total of 150 biochemically identified extraintestinal clinical isolates were received in our laboratory from Dr. Wen-Chien Ko from the Cheng Kung University Hospital in Tainan, Taiwan, for genetic identification using a previously described 16S rDNA-RFLP method (6, 12). In brief the method consists of an initial digestion of 1503 bp of the amplified 16S rRNA gene with enzymes *AluI* and *MboI*, that enables recognition based on the different obtained patterns of 10 *Aeromonas* species including *A. hydrophila*, *A. caviae*, and *A. veronii*. Of the Taiwan strains, 22 (14.6%) showed a similar RFLP pattern (with some extra bands) to that described for *A. caviae* (Fig. 1), 19 of them arrived identified as *A. hydrophila* and 3 as *Aeromonas* sp based on biochemical methods. To confirm the identity of all these strains the *rpoD* and *gyrB* genes were sequenced using primers and conditions previously described (28, 33). The 3 Spanish strains (MDC562, MDC573, and MDC671) were isolated in the Hospital Comarcal Vega Baja, (Orihuela, Spain) and were recognized with *gyrB* gene to belong to *A. aquariorum*, and the *rpoD* of these strains was also sequenced. The phylogenetic tree constructed with the individual genes (data not shown) or the concatenated *rpoD* and *gyrB* sequences grouped these 25 strains with the newly described species *A. aquariorum* (Fig 2).

Antimicrobial susceptibility. The susceptibility of the twenty-five strains against a panel of 27 antimicrobial agents was evaluated using agents and conditions described earlier (19). All the strains were susceptible to aztreonam, ciprofloxacin, amikacin, gentamicin, tobramycin, fosfomicin and cefepime, but showed varying resistance to 20 other antimicrobial agents (Table 1). All the isolates were resistant to amoxicillin, cephalotin, cefoxitin and all but one strain, isolated from an infected wound, to erythromycin, 68% of the isolates were resistant to amoxicillin clavulanic acid (AMC), 48% to ticarcillin and 28% to tetracycline. These responses were similar to those obtained for the environmental strain of this species (19) with the exception of the 100% resistance to AMC that contrasted with 32% encountered in the environmental strains.

Detection of virulence genes. The strains were also screened for the presence of several virulence genes (aerolysin/hemolysin, *ast*, *alt*, *act*, TTSS and *aexT*), using primers and conditions described earlier (2,7,8,13). The genes that encode the pore forming toxin aerolysin/hemolysin were present in all the strains (Table 2). The two cytotoxic enterotoxin genes, the heat-stable *ast* and the heat-labile *alt*, were present in 84% and 28% of the strains respectively, the prevalence of *ast* being much higher than found in previous studies (2). Interestingly all 3 strains isolated from faeces of patients with diarrhoea and an important number of the strains from wounds (66.6%) and blood strains (63.3%) possessed the *ascF-G* genes which are part of the TTSS of *Aeromonas*. The *aexT* gene which encodes one of the better characterized toxins secreted by this system (30) was present in all stool strains and in ca. 30% of the blood and wound strains (Table 2). Interestingly, 8 of the strains simultaneously possessed the *act* and the TTSS genes, reflecting the probable synergistic role of those genes in quorum sensing, demonstrated by Sha et al. (25).

Differentiation of *A. aquariorum* from other species. A re-examination of the 16S rDNA-RFLP patterns of the Taiwan *A. aquariorum* strains and the evaluation of the method on the type strain of this species (MSM18362^T) and on strains previously considered *A. hydrophila* subsp. *dakhensis* (LMG19559, LMG15962 and LMG19564 (now synonymized with *A. aquariorum* (18))), showed that all these strains produced either the pattern of *A. caviae* or an slightly similar pattern with an extra band (Fig. 1). This result led us to suspect the possibility that some other clinical strains identified by the 16S rDNA-RFLP method at our laboratory as *A. caviae* could in reality belong to *A. aquariorum*. To evaluate this we screened 65 strains of our collection that showed the *A. caviae* RFLP pattern (originally biochemically identified as *A. hydrophila* at different Spanish hospitals), for the production of acid from D-cellobiose (positive (>85%) for *A. caviae*, negative (<15%) for *A. aquariorum* (19)). Only 6 of those strains, recovered from faeces of patients with diarrhoea, were presumptively *A. aquariorum* based on their negative production of acid from D-cellobiose. However, the *rpoD* gene sequences of these strains (data not shown) confirmed only 2 strains (33%) as belonging to *A. aquariorum* while the remaining 3 belonged to *A. caviae*. These results confirmed that some *A. caviae* strains did not produce acid from D-cellobiose (1) and furthermore that *A. aquariorum* is in fact more frequent than previously thought because it can be uncovered under biochemically characterised strains of *A. hydrophila*, or under genetically identified *A. caviae* strains using the 16S rDNA-RFLP method. Biochemical differentiation of *A. aquariorum* from *A. caviae* can be further confirmed by its positive production of: gas from D-glucose, H₂S from cysteine and acid from salicin, while differentiation from *A. hydrophila* can be achieved by the lack of utilization of L-lactate by the new species (19). Strains with such characteristics should be suspected to belong to these new species *A. aquariorum*.

The sequences of 16S rRNA gene was considered a reliable and straight forward tool for the characterization of *Aeromonas* spp. (11) and had increasingly been used in the medical literature for

characterizing clinical *Aeromonas* strains (3, 14, 22, 29). However, the high similarity between the sequences of different species together with the intragenomic heterogeneity reported for this gene (20) that can account for 8% of the strains and the fact that it is more prevalent in clinical strains of *A. caviae* and *A. veronii* (5) makes this gene unreliable for identification below the genus level. In fact, there are only 3 base differences between the 16S rDNA sequence of *A. aquariorum* and *A. caviae* type strains (19) and in these three positions the existence of heterogeneities in *A. caviae* strains have been described (5). This limitation had been superseded by the use of housekeeping genes, such as *rpoD* and *gyrB* (3, 19, 20, 28, 33) employed in this study.

Epidemiological related strains. Three *A. aquariorum* strains (A2-126, A2-131 and A2-96) showed identical *gyrB* and *rpoD* sequences (Fig. 2), indicating that they could be derived from the same clone. Genotyping with ERIC-PCR using primers and conditions described previously (26) showed an identical ERIC pattern (data not shown) confirming that they belonged to the same genotype. Furthermore, these strains bear the same virulence genes and showed resistance to amoxicillin, amoxicillin clavulanic acid, cephalotin, cefoxitin, erythromycin and tetracycline. A retrospective search on the origin of those strains was performed. Two of the three strains (A2-126 and A2-131) were isolated from a 69-year-old patient with acute cholangitis one strain from a bile sample obtained from endoscopic nasobiliary drainage and the other from a surgical wound of the abdominal wall after a cholecystectomy was performed 14 days later. The third strain (A2-96) was isolated from an ascites culture 7 months earlier from a 70-year-old patient that presented acute appendicitis complicated with peritonitis. This suggests a probable common source of infection, but the epidemiological relationship of the patients could not be established. Cholangitis is the most common *Aeromonas* infection of the hepatobiliary systems with an incidence of isolation from bile samples ranging from 1.3 to 2.9% (11). Cases of secondary *Aeromonas* peritonitis due to appendix perforation have also been described (11, 15).

Conclusions. This could be considered the first formal description of the implication of the new species *A. aquariorum* in clinical cases. However, we have to take into account that since *A. hydrophila* subsp. *dhakensis* (now a synonym of *A. aquariorum* (18)) was isolated from patients with diarrhoea in Bangladesh (16) this was in reality the first record. The present study shows that the clinical strains of *A. aquariorum* possess many virulence genes that can potentially play an important role in the development of the infection. Clinicians should be aware of this new relevant *Aeromonas* species, which can be associated with diarrhoea, bacteraemia (11 of the 22 strains from Taiwan) and with several extraintestinal infections, as can be seen from the diversity of clinical samples in which it was recovered (Table 1). The original description of *A. hydrophila* subsp. *dhakensis* (16) and *A. aquariorum* (19), together with the present results from Taiwan, linked this species to Oriental countries. However, the clinical diarrhoeal isolates from different Spanish hospitals provides

evidences that the new species *A. aquariorum* could be distributed globally, probably unrecognized under *A. hydrophila* or *A. caviae*.

MDC work has been supported by Grant IMIDTA/2007/68 from IMPIVA, Generalitat Valenciana, Spain. M.J. Saavedra was the recipient of a grant (SFRH/BSAB/774/2008) from the Fundação para a Ciência e Tecnologia. Part of this work was also supported by funds from the European Commission for the HEALTHY WATER Project (FOOD-CT-2006-036306). However, the authors are solely responsible for the content of this publication and it does not represent the opinion of the European Commission. The European Commission is not responsible for any use that might be made of data appearing therein.

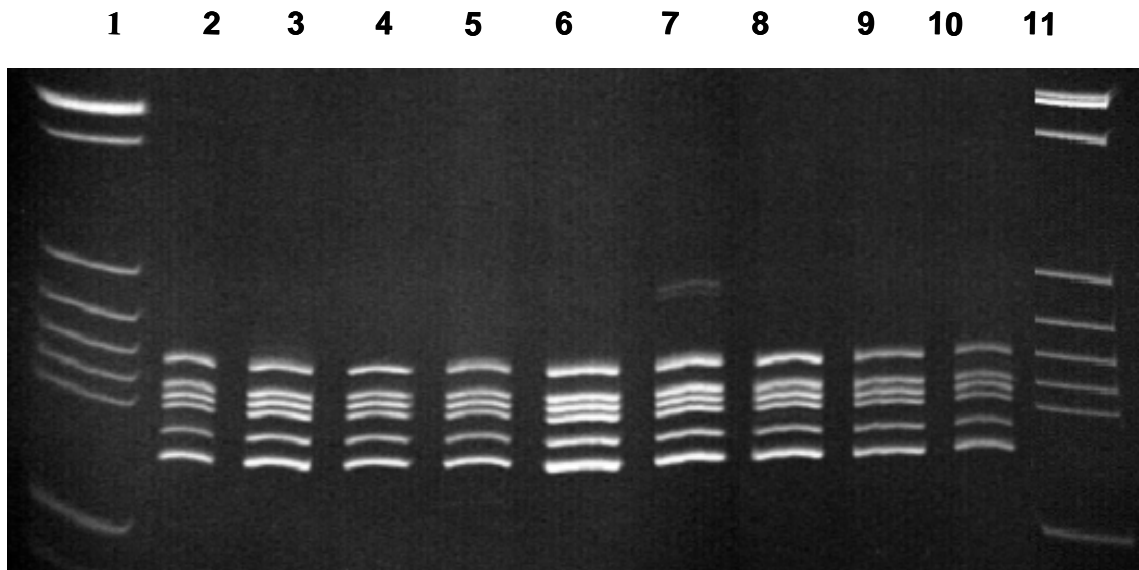


Fig 1. Polyacrylamide gel showing the same RFLP patterns, obtained by using endonucleases *AluI* and *MboI*, of 16S rRNA genes amplified by PCR of a representative number of *A. aquariorm*, *A. hydrophila* subsp *dhakensis* and *A. caviae*. Lanes: 1 and 11, pBR322 DNA/BsuRI (*HaeIII*) Marker 5 ; 2, *A. hydrophila* subsp. *dhakensis* LMG19559; 3, *A. hydrophila* subsp. *dhakensis* LMG 19562; 4, *A. hydrophila* subsp. *dhakensis* LMG19564; 5, *A. caviae* CECT838¹; 6, *A.aquariorum* MDC562; 7, *A. aquariorum* MDC573; 8, *A. aquariorum* MDC671; 9, *A. aquariorum* A2-4; 10, *A. aquariorum* A2-96.

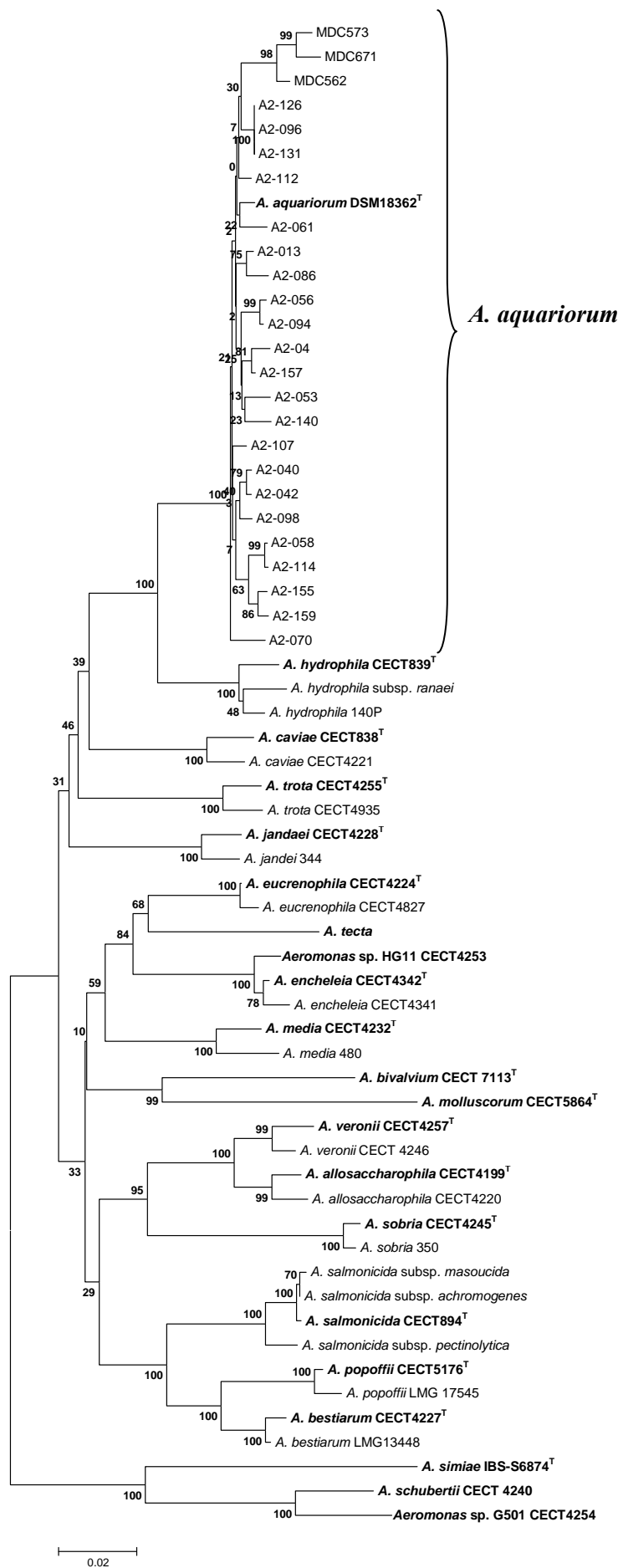


Fig 2. Phylogenetic tree based on the combined stretch of *gyrB* (450bp)-*rpoD* (790bp) gene sequences showing the relationship within the genus *Aeromonas* of 25 clinical *A. aquariorum* strains. Type strains are in bold. Numbers at nodes indicate bootstrap values (1000 replicates).

Table 1. Antibimicrobial resistance found in 25 clinical *Aeromonas aquariorum* strains

Antimicrobial agent	% R strains
Amoxicillin	100
Cephalothin	100
Cefoxitin	100
Erythromycin	96
Amixicillin/clavulanic acid	68
Ticarcillin	48
Tetracycline	28
Ticarcillin/clavulanic acid	20
Nalidixic acid	16
Streptomycin	12
Piperacillin	12
Piperacillin/Tazobactam	12
Ceftriaxone	12
Cefoperazone	12
Ceftazidime	8
Cefotaxime	8
Kanamycin	8
Trimethoprim/sulfamethozazole	4
Chloramphenicol	4
Imipenem	4

Table 2. Distribution of virulence genes among 25 clinical strains of *Aeromonas aquariorum*

Origin	N° of strains	N° of strains with presence of (%)					
		<i>aer/hemo</i> ^a	<i>act</i> ^b	<i>alt</i> ^c	<i>ast</i> ^c	<i>aexT</i> ^d	<i>ascF-G</i> ^d
Blood	11	11 (100)	4 (36,6)	3 (27,2)	8 (72,7)	4 (36,3)	7 (63,6)
Wound	6	6 (100)	4 (66,6)	1 (16,6)	5 (83,3)	2 (33,3)	4 (66,6)
Feces	3	3 (100)	0	3 (100)	3 (100)	3 (100)	3 (100)
Bilis	2	2(100)	1 (50,0)	0	2 (100)	0	0
Joint fluid	1	1 (100)	1 (100)	0	1 (100)	0	1 (100)
Sputum	1	1(100)	0	0	1 (100)	0	0
Ascitis	1	1 (100)	1 (100)	0	1 (100)	0	1 (100)
Total	25	25 (100)	11 (44)	7 (28)	21 (84)	9 (36)	16 (64)

Primers and conditions were those described by ^aChacón et al.(7); ^bFigueras et al. (13) ; ^cAguilera-Arreola et al.(2); ^dChacón et al. (8).

REFERENCES

1. **Abbott, S. L., W. K. Cheung, and J. M. Janda.** 2003. The genus *Aeromonas*: biochemical characteristics, atypical reactions, and phenotypic identification schemes. *J. Clin. Microbiol.* **41**:2348-2357.
2. **Aguilera-Arreola, M. G., C. Hernández-Rodríguez, G. Zúñiga, M. J. Figueras, R. A. Garduño, and G. Castro-Escarpulli.** 2007. Virulence potential and genetic diversity of *Aeromonas caviae*, *Aeromonas veronii*, and *Aeromonas hydrophila* clinical isolates from Mexico and Spain: a comparative study. *Can. J. Microbiol.* **53**:877-887.
3. **Al-Benwan, K., S. Abbott, G. Huys and M. J. Albert.** 2007. Cystitis caused by *Aeromonas caviae*. *J. Clin. Microbiol.* **45**:2348-2350.
4. **Albert, M. J., M. Ansaruzzaman, K. A. Talukder, A. K. Chopra, I. Kuhn, M. Rahman, A. S. Faruque, M. S. Islam, R. B. Sack, and R. Mollby.** 2000. Prevalence of enterotoxin genes in *Aeromonas* spp. isolated from children with diarrhea, healthy controls, and the environment. *J. Clin. Microbiol.* **38**:3785-3790.
5. **Alperi, A., M. J. Figueras, I. Inza, and A. J. Martínez-Murcia.** 2008. Analysis of 16S rRNA gene mutations in a subset of *Aeromonas* strains and their impact in species delineation. *Int. Microbiol.* (in press).
6. **Borrell, N., S. G. Acinas, M. J. Figueras, and A. J. Martínez-Murcia.** 1997. Identification of *Aeromonas* clinical isolates by restriction fragment length polymorphism of PCR-amplified 16S rRNA genes. *J. Clin. Microbiol.* **35**:1671-1674.
7. **Chacón, M. R., M. J. Figueras, G. Castro-Escarpulli, L. Soler, and J. Guarro.** 2003. Distribution of virulence genes in clinical and environmental isolates of *Aeromonas* spp. *Antonie Van Leeuwenhoek.* **84**:269-278.
8. **Chacón, M. R., L. Soler, E. A. Groisman, J. Guarro, and M. J. Figueras.** 2004. Type III secretion system genes in clinical *Aeromonas* isolates. *J. Clin. Microbiol.* **42**:1285-1287.
9. **Chopra, A. K., J. W. Peterson, X. J. Xu, D. H. Coppenhaver, and C. W. Houston.** 1996. Molecular and biochemical characterization of a heat-labile cytotoxic enterotoxin from *Aeromonas hydrophila*. *Microb. Pathog.* **21**:357-377.

10. **Demarta A, M. Küpfer, P. Riegel, C. Harf-Monteil, M. Tonolla, R. Peduzzi, A. Monera, M. J. Saavedra, and A. Martínez-Murcia.** 2008. *Aeromonas tecta* sp. nov., isolated from clinical and environmental sources. *Syst. Appl. Microbiol.* **31**:278-286.
11. **Figueras, M. J.** 2005. Clinical relevance of *Aeromonas*. *Rev. Med. Microbiol.* **16**:145-153.
12. **Figueras, M. J., L. Soler, M. R. Chacon, J. Guarro, and A. J. Martínez-Murcia.** 2000. Extended method for discrimination of *Aeromonas* spp. by 16S rDNA RFLP analysis. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **50**: 2069-2073.
13. **Figueras, M. J., A. Suarez-Franquet, M. R. Chacón, L. Soler, M. Navarro, C. Alejandro, B. Grasa, A. J. Martínez-Murcia, and J. Guarro.** 2004. First record of the rare species *Aeromonas culicicola* from a drinking water supply. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**:538-541.
14. **Hua, H. T., C. Bollet, S. Tercian, M. Drancourt, and D. Raoult.** 2004. *Aeromonas popoffii* urinary tract infection. *J. Clin. Microbiol.* **42**:5427-5428.
15. **Huang, L. J., H. P. Chen, T. L. Chen, L. K. Siu, C. P. Fung, F. Y. Lee, and C. Y. Liu.** 2006. Secondary *Aeromonas* peritonitis is associated with polymicrobial ascites culture and absence of liver cirrhosis compared to primary *Aeromonas* peritonitis. *APMIS.* **114**:772-778.
16. **Huys, G, P. Kämpfer, M. J. Albert, I. Kühn, R. Denys, and J. Swings.** 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.
17. **Kuijper, E. J., A. G. Steigerwalt, B. S. Schoenmakers, M. F. Peeters, H. C. Zanen, and D. J. Brenner.** 1989. Phenotypic characterization and DNA relatedness in human fecal isolates of *Aeromonas* spp. *J. Clin. Microbiol.* **27**:132-138.
18. **Martínez-Murcia, A., A. Monera, A. Alperi, M. J. Figueras, and M. J. Saavedra.** 2008. Phylogenetic evidence indicated that *Aeromonas hydrophila* subsp. *dhakensis* Huys et al. 2002 is a synonym of *Aeromonas aquariorum* sp. nov. Martínez-Murcia et al. 2008. *Curr. Microbiol.* (in press).

19. **Martínez-Murcia, A. J., M. J. Saavedra, V. R. Mota, T. Maier, E. Stackebrandt, and S. Cousin.** 2008. *Aeromonas aquariorum* sp. nov., isolated from aquaria of ornamental fish. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **58**:1169-1175.
20. **Martínez-Murcia, A. J., L. Soler, M. J. Saavedra, M. R. Chacón, J. Guarro, E. Stackebrandt, and M. J. Figueras.** 2005. Phenotypic, genotypic, and phylogenetic discrepancies to differentiate *Aeromonas salmonicida* from *Aeromonas bestiarum*. *Int. Microbiol.* **8**:259-269.
21. **Miñana-Galbis, D., M. Farfán, M. C. Fusté, and J. G. Lorén.** 2007 *Aeromonas bivalvium* sp. nov., isolated from bivalve molluscs. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **57**:582-587.
22. **Roberts, M. T., D. A. Enoch, K. A. Harris, and J. A. Karas.** 2006 *Aeromonas veronii* biovar sobria bacteraemia with septic arthritis confirmed by 16S rDNA PCR in an immunocompetent adult. *J. Med. Microbiol.* **55**:241-243.
23. **Saavedra, M. J., M. J. Figueras, and A. J. Martínez-Murcia.** 2006. Updated phylogeny of the genus *Aeromonas*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **56**:2481-2487.
24. **Sha, J., E. V. Kozlova, and A. K. Chopra.** 2002. Role of various enterotoxins in *Aeromonas hydrophila*-induced gastroenteritis: generation of enterotoxin gene-deficient mutants and evaluation of their enterotoxic activity. *Infect. Immun.* **70**:1924-1935.
25. **Sha, J., L. Pillai, A. A. Fadl, C. L. Galindo, T. E. Erova, and A. K. Chopra.** 2005. The type III secretion system and cytotoxic enterotoxin alter the virulence of *Aeromonas hydrophila*. *Infect. Immun.* **73**:6446-6457.
26. **Soler, L., M. J. Figueras, M. R. Chacón, J. Guarro, and A. J. Martínez-Murcia.** 2003. Comparison of three molecular methods for typing *Aeromonas popoffii* isolates. *Antonie van Leeuwenhoek* **83**:341-349.
27. **Soler, L., F. Marco, J. Vila, M. R. Chacón, J. Guarro, and M. J. Figueras.** 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.* **12**:5732-5734.

28. **Soler, L., M. A. Yañez, M. R. Chacón, M. G. Aguilera-Arreola, V. Catalan, M. J. Figueras, and A. J. Martínez-Murcia.** 2004. Phylogenetic analysis of the genus *Aeromonas* based on two housekeeping genes. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **54**:1511-1519.

29. **Steinfeld, S., C. Rossi, N. Bourgeois, I. Mansoor, J. P. Thys, and T. Appelboom.** 1998. Septic arthritis due to *Aeromonas veronii* biotype *sobria*. *Clin. Infect. Dis.* 1998. **27**:402-403.

30. **Vilches, S, C. Urgell, S. Merino, M. Chacón, L. Soler, G. Castro-Escarpulli, M. J. Figueras, and J. M. Tomás.** 2004. Complete type III secretion system of a mesophilic *Aeromonas hydrophila* strain. *Appl. Environ. Microbiol.* **70**:6914–6919.

31. **Vilches, S., M. Wilhelms, H. B. Yu, K. Y. Leung, J. M. Tomás, and S. Merino.** 2008. *Aeromonas hydrophila* AH-3 AexT is an ADP-ribosylating toxin secreted through the type III secretion system. *Microb. Pathog.* **44**:1-12.

32. **Xu, X. J., M. R. Ferguson, V. L. Popov, C. W. Houston, J. W. Peterson, and A. K. Chopra.** 1998. Role of a cytotoxic enterotoxin in *Aeromonas*-mediated infections: development of transposon and isogenic mutants. *Infect. Immun.* **66**:3501-3509.

33. **Yañez, M. A., V. Catalán, D. Apraiz, M. J. Figueras, and A. J. Martínez-Murcia.** 2003. Phylogenetic analysis of members of the genus *Aeromonas* based on *gyrB* gene sequences. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **53**:875-883.

Artículo:

4.2.3. A Alperi, MJ Figueras. Human isolates of *Aeromonas* possess Shiga toxin genes (*stx*₁ and *stx*₂) highly similar to the most virulent gene variants of *E. coli*. *Clinical Microbiology and Infection*. En revisión.

Resumen

Las cepas productoras de las toxinas Shiga (codificadas por los genes *stx*₁ y *stx*₂) pueden causar diarrea, colitis hemorrágica y el síndrome urémico hemolítico (SUH) y pertenecen principalmente a *E. coli* productoras de toxinas Shiga (STEC). Generalmente, estas toxinas se encuentran codificadas en bacteriófagos y sujetos, por tanto, a la transmisión horizontal. Las *Aeromonas* son agentes causales de diarreas y del SUH. Dos estudios previos habían demostrado la existencia del gen *stx*₁ en *Aeromonas* y uno de ellos demostró, además, la producción de Stx1. Sin embargo, hasta la fecha, nunca se ha podido detectar la presencia del gen *stx*₂ en este género. Con el ánimo de esclarecer la incidencia de estos genes en *Aeromonas* se investigó por PCR la presencia de los genes *stx*₁ y *stx*₂ en 80 cepas clínicas. Nuestros resultados mostraron la presencia de *stx*₁ en 19 cepas, presentando sólo una ellas, además, el gen de la toxina Shiga tipo 2 (*stx*₂). Las secuencias obtenidas, de los fragmentos amplificados de estos genes, mostraron una gran similitud con las secuencias de las variantes más virulentas para humanos de STEC.

Human isolates of *Aeromonas* possess Shiga toxin genes (*stx*₁ and *stx*₂) highly similar to the most virulent gene variants of *E. coli*

Anabel Alperi and Maria 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.

Corresponding author and reprint request: M. J. Figueras, Unitat de Microbiologia. Departament de Ciències Mèdiques Bàsiques, Facultat de Medicina i Ciències de la Salut, Universitat Rovira i Virgili, Sant Llorenç 21; 43201 Reus, Spain. Phone: +34977759321. Fax: +34977759322. E-mail: mariajose.figueras@urv.cat

Abstract

Strains producing Shiga toxins, encoded by *stx*₁ and *stx*₂ genes, can cause diarrhoea, haemorrhagic colitis and haemolytic uremic syndrome (HUS). After screening both genes by PCR, 19 of the 80 clinical *Aeromonas* strains were *stx*₁-positive and only one was positive for both *stx*₁ and *stx*₂. PCR bands could be very faint and negative results were obtained after subculturing. *Aeromonas stx*₁ and *stx*₂ sequences were highly similar to those of the most virulent *stx* gene variants of Shiga toxin-producing *E. coli*. These results may lead to a better understanding of the pathogenicity potential and virulence mechanisms of *Aeromonas* in cases of diarrhoea and HUS.

Keywords: *Aeromonas*, *stx*₁, *stx*₂, HUS, diarrhoea

Shiga toxins (Stx1 and Stx2) are important virulence factors in the pathogenesis of gastroenteritis, in hemorrhagic colitis and especially in the development of haemolytic-uremic syndrome (HUS) [1-3]. They are usually encoded in the genome of bacteriophages, which are considered highly mobile elements that play a role in Stx expression and in horizontal gene transfer, leading to the emergence of new *stx*-variants or *stx*-producing pathogens [4]. Several variants of *stx*₁ and *stx*₂ genes have been recognized [2, 3], *stx*₂ (the prototype) and *stx*_{2c} being considered the most important in terms of human pathogenicity because are commonly associated with HUS [2, 3].

Despite Shiga toxins being typical of *Shigella dysenteriae* and Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC), they have also been described in *Vibrio cholerae* and *V. parahaemolyticus* [5], *Citrobacter freundii* [6], *Enterobacter cloacae* [7], *Acinetobacter haemolyticus* [8] and *Aeromonas* [9, 10]. The *stx* genes show instability in vivo and in vitro [1, 6, 7, 11], which may be caused by the mobility of *stx*-phages [4, 11] and the loss of *stx* genes has been observed after subculturing [4, 6, 7, 11] and infection [1].

The presence of *stx*₁ in *Aeromonas* was detected by Haque *et al.* [9] in only four strains and more recently by Snowden *et al.* [10] in one additional strain using different primers, while *stx*₂ has never been detected, despite having been screened in both studies [9, 10]. So far in *Aeromonas* the *stx*₁ has never been sequenced and it is not known if they have the *stx*₂. Despite that, several cases of HUS associated with *Aeromonas* have been reported and a new case produced by a verotoxigenic strain of *A. veronii* bv sobria with a review of the literature has recently been published by our group [12]. In an attempt to characterize the *stx* genes (*stx*₁ and *stx*₂) by sequencing, 80 human *Aeromonas* strains of different species, including the strain associated with HUS [12] were screened by PCR in the present study.

The investigated strains (33 from extra intestinal infections and 47 from diarrhoea) were genetically identified [13]. The strain of *A. veronii* bv sobria associated with a case of HUS [12] was also tested. Frozen stocks of the strains were streaked onto sheep blood agar and cultivated for 24 h at 30°C and DNA was extracted from single colonies using InstaGene™ Matrix (Bio-Rad Laboratories). PCR primers and conditions for the detection of *stx*₁ (350 bp) and *stx*₂ (406 bp) were those of TaKaRa Biomedicals [9]. The *stx*₁ and *stx*₂ genes were sequenced with the TaKaRa primers (3.2 pmol/μl) using instruments and phylogenetic analysis techniques described previously [13].

Nineteen of the 80 *Aeromonas* strains produced a band of the expected size (350 bp) for the *stx*₁ and one of them also the band (406 bp) of *stx*₂ (Fig 1a). However, in 15 of the 19 strains the *stx*₁ bands were faint as was also the *stx*₂ band. The strain of *A. veronii* bv sobria associated with a case of HUS [12] did not even show faint bands. In order to verify the results, the same DNA of the 19 *stx*₁-positive strains was evaluated again under identical conditions and only 4 (875c, 883c, 885c and 887c) strains were positive for the *stx*₁. Negative results corresponded with strains showing faint bands in the first analysis. The 19 *Aeromonas* strains were grown again from the glycerol stock and *stx*₁ was amplified from a new

DNA extraction. Results reproduced the initial finding with the appearance of the same 15 strains with faint *stx*₁ bands and four with intense bands. The PCR for the *stx*₂-positive strain (819c) was performed 5 times from 4 different DNA extractions from the same frozen stock and the expected band (406 bp) was only observed on 2 of the 5 (40%) occasions as a faint band (Fig 1b). The faint bands observed can be explained by the number of copies of *stx* genes in the template DNA, as described for *stx*₂ in *C. freundii* [6]. Furthermore, the loss of the faint bands after subculturing is in agreement with previous findings [4, 6, 7, 11]. This could justify the non-detection of these genes in previous studies [9, 10] and explain the lack of amplification in the *A. veronii* bv *sobria* associated in a case of HUS [12] that we tested. Loss of *stx* genes during the course of infection has been observed in patients with HUS produced by *E. coli* O157:H7 [1].

In a previous study, Snowden *et al.* [10] detected *stx*₁ in only 1 environmental strain of *A. veronii* using the primers developed by Pass *et al.* [14]. We evaluated these primers in the 19 *stx*₁-positive strains, however, in none of these strains could the expected 121 bp of *stx*₁ be amplified and this should be taken into consideration in future studies.

The 23.75% (19 of 80) *stx*₁-positive *Aeromonas* strains found in this study is higher than the 10.25% (4 of 39) observed by Haque *et al.* [9] in strains isolated from faeces and from wastewater [9]. It is also higher than the 9.1% (1 of 11) found by Snowden *et al.* [10] when investigating strains recovered from river water in Australia [10].

The strains that were *stx*₁-positive in the present study belonged predominantly to *A. caviae* (42.1%), *A. hydrophila* (31.6%) and *A. veronii* (10.5%). All of them have been commonly associated with gastroenteritis and even with dysenteric-like syndrome and HUS [12, 16, 17]. The only *stx*₁-*stx*₂-positive strain (819c) belonged to *A. caviae* and was isolated from a urine sample.

The sequences of *stx*₁ from 4 strains with intense bands and the sequence of *stx*₂ of strain 819c were highly similar to those found in other enterobacterias as can be observed in the constructed evolutionary trees (Fig 2a, b). *Aeromonas stx*₁ sequences branched within the cluster that contained *stx*₁ sequences from *S. dysenteriae*, *S. sonnei*, *E. coli* O157:H7 and other STEC human isolates (Fig 2a). The *stx*₂ sequence from *A. caviae* (819c) cluster (Fig 2a) with the sequences of the most virulent human variants (*stx*₂ prototype and *stx*_{2c}) commonly associated with HUS [2, 3] suggesting an equal potential role of both genes in *Aeromonas*. This could further indicate that horizontal gene transfer [4] may have occurred among those microorganisms, which is not surprising if we consider that they may coexist in the same environments (gut, faeces or faecally contaminated water and food products).

In order to find out if *stx*₁ instability detection could be due to its plasmid location, plasmid DNA of strains 535c representative of strains with a faint band, and 887c, with a strong band was extracted using UltraClean 6 Minute Mini Plasmid Prep Kit (Mo Bio). A single band of plasmid DNA of c.a. 3.2

kbp could be observed in the agarose gel from both strains. This DNA was used as a template for *stx*₁-PCR amplification [9] and a band of the *stx*₁ expected size (350 bp) as intense as the positive control (*E. coli* O157:H7) was only observed from strain 535c (Fig 1c). This indicates that at least in strain 535c and in the four strains reported by Haque *et al.* [9], the *stx*₁ is not chromosomally encoded. The results of the present study corroborate the mobility of the *stx*-phages that can be lost by subculturing [4].

To determine the production of Stx1 and Stx2 toxins by the PCR positive strains, a rapid immunochromatographic test (Duopath Verotoxin test, Merck) was used. Only strains 885c (that showed an intense *stx*₁ band by PCR) and 535c (plasmid encoded-*stx*₁ and faint band by PCR) showed a weak Stx1 signal but none of the strains showed a Stx2 positive reaction. In conclusion, 10.25% (2/19) of the *Aeromonas* strains that possessed *stx*₁ produced the Stx1 toxin. Similar values (using the Duopath Verotoxin test) have been reported from STEC strains from human wastewater where 6.7% produced Stx1 and 6-7% produced Stx2 [15]. However, our results could be influenced by the fact that this test is designed for the detection of these toxins by STEC. Despite not being able to detect Stx2 production, it is clear that *stx*₂ may have been expressed in *Aeromonas* due to the number cases of HUS in which this organism was identified as the causative agent [12 and references therein].

To our knowledge, this is the first report that provides *Aeromonas stx*₁ and *stx*₂ sequences and establishes their high similarity with those of STEC. This is of particular importance because these genes had been poorly studied in *Aeromonas* and may have an important role in inducing diarrhoea and HUS. More studies will be needed to determine the allocation of *stx*₂ gene and to improve the molecular detection methods.

Acknowledgments

We thank Drs. R Bartolomé, G Prats, J Vila, I Pujol, F Ballester, J Reina and E Hofer for providing clinical strains. We are grateful to Dra. Maite Muniesa, University of Barcelona, and to Dr. Javier Pastor, University Rovira i Virgili, for their valuable suggestions.

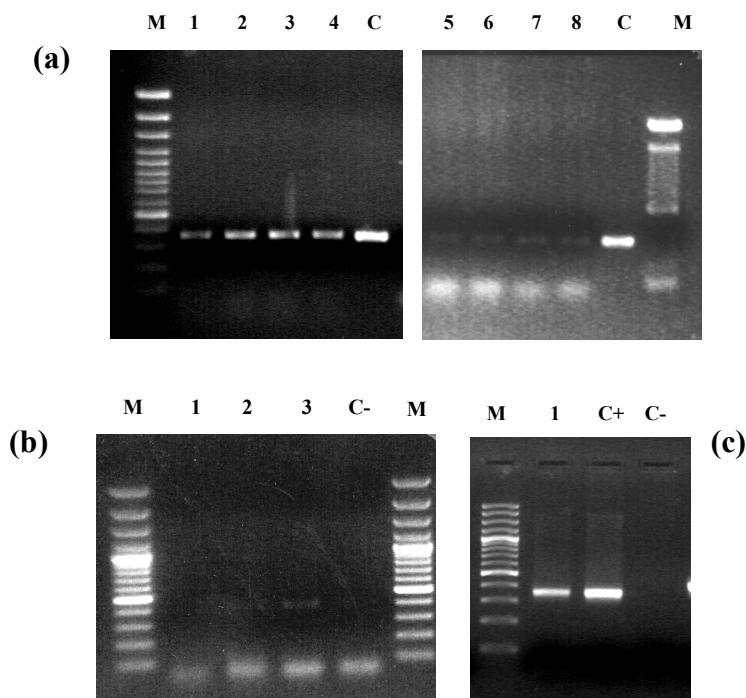


Fig. 1. Examples of PCR amplifications demonstrating the presence of *stx* genes in *Aeromonas* strains. PCR results electrophoresed in 1% agarose gel. **(a)** *stx*₁ strong and faint bands. Lanes: 1, 875c; 2, 883c; 3, 885c; 4, 887c; 5, 194c; 6, 361c; 7, 191c; 8, 24c. **(b)** *stx*₂ faint bands. Lanes: 1, 875c; 2, 819c; 3, 819c; (duplicate PCR product). **(c)** *stx*₁ amplified from plasmid DNA. Lane: 1, 535c. Lane C+, positive control *E. coli* O157:H (CECT 4076). Lane C-, negative control (miliQ water as template DNA). Lane M, Ladder 100 bp. *A. caviae* strains: 535c, 819c, 875c, 883c and 885c; *A. hydrophila* strains: 24c, 191c, 194c and 887c; *A. salmonicida* strain 361c.

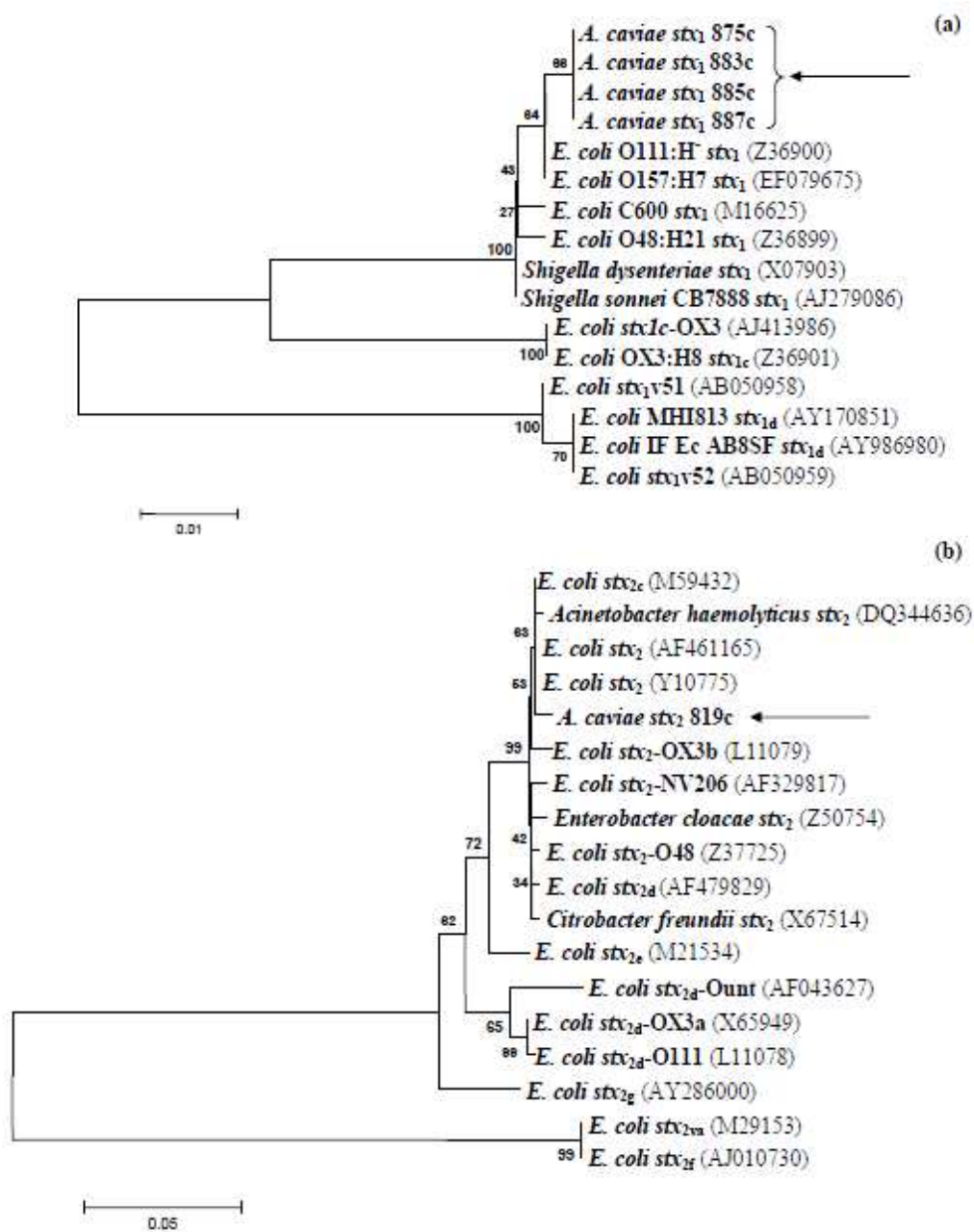


Fig. 2. Phylogenetic analysis of nucleotide sequences of the 350-bp fragments of *stx1* genes (a) and 406-bp fragments of *stx2* genes (b) of *Aeromonas* and other enterobacteria. Phylogenetic trees were constructed with the neighbour-joining method using Kimura's two-parameter model. Numbers at nodes indicate bootstrap values (percentage of 1000 replicates). The scale bar indicates the estimated number of substitutions per 100 and 20 bases, respectively. All numbers and accession numbers are given as cited in the GenBank database.

REFERENCES

1. Friedrich AW, Zhang WL, Bielaszewska M *et al.* Prevalence, virulence profiles and clinical significance of Shiga toxin-negative variants of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157 infection in humans. *Clin Infect Dis* 2007; 45: 39-45.
2. Lee JE, Reed J, Shields MS, Spiegel KM, Farrell LD, Sheridan PP. Phylogenetic analysis of Shiga toxin 1 and Shiga toxin 2 genes associated with disease outbreaks. *BMC Microbiol* 2007; 7: 109.
3. Orth D, Grif K, Khan AB, Naim A, Dierich MP, Wurzner R. The Shiga toxin genotype rather than the amount of Shiga toxin or the cytotoxicity of Shiga toxin in vitro correlates with the appearance of the hemolytic uremic syndrome. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2007; 59: 235-242.
4. Herold S, Karch K, Schmidt H. Shiga-toxin-converting bacteriophages. Genomes in motion. *Int J Med Microbiol* 2004; 294: 115-121.
5. O'Brien AD, Chen ME, Holmes RK, Kaper J, Levine MM. Environmental and human isolates of *Vibrio cholerae* and *Vibrio parahaemolyticus* produce a *Shigella dysenteriae* 1 (Shiga)-like cytotoxin. *Lancet* 1984; 1: 77-78.
6. Schmidt H, Montag M, Bockemuhl J, Heesemann J, Karch H. Shiga-like toxin II-related cytotoxins in *Citrobacter freundii* strains from humans and beef samples. *Infect Immun* 1993; 61: 534-543.
7. Paton JC, Paton AW. Instability of a Shiga toxin type 2 gene in *Enterobacter cloacae*. *J Clin Microbiol* 1997; 35:1917.
8. Grotiuz G, Sirok A, Gadea P, Varela G, Schelotto F. Shiga toxin 2-producing *Acinetobacter haemolyticus* associated with a case of bloody diarrhea. *J Clin Microbiol* 2006; 44: 3838-3841.
9. Haque QM, Sugiyama A, Iwade Y, Midorikawa Y, Yamauchi T. Diarrheal and environmental isolates of *Aeromonas* spp. produce a toxin similar to Shiga-like toxin 1. *Curr Microbiol* 1996; 32: 239-245.

10. Snowden L, Wernbacher L, Stenzel D *et al.* Prevalence of environmental *Aeromonas* in South East Queensland, Australia: a study of their interactions with human monolayer Caco-2 cells. *J Appl Microbiol* 2006; 101: 964-975.
11. Karch H, Meyer T, Russmann H, Heesemann J. Frequent loss of Shiga-like toxin genes in clinical isolates of *Escherichia coli* upon subcultivation. *Infect Immun* 1992; 60: 3464-3467.
12. Figueras MJ, Aldea MJ, Fernandez N, Aspiroz C, Alperi A, Guarro J. *Aeromonas* hemolytic uremic syndrome. A case and a review of the literature. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2007; 58: 231-234.
13. 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.
14. Pass MA, Odera R, Batt RM. Multiplex PCRs for identification of *Escherichia coli* virulence genes. *J Clin Microbiol* 2000; 38: 2001-2004.
15. García-Aljaro C, Muniesa M, Blanco JE, *et al.* Characterization of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolated from aquatic environments. *FEMS Microbiol Lett* 2005; 246: 55-65.
16. Figueras MJ. Clinical relevance of *Aeromonas*. *Rev Med Microbiol* 2005; 16: 145-153.
17. 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.

Artículo:

4.2.4. D Tena, C Aspíroz, MJ Figueras, A González-Praetorius, MJ Aldea, A Alperi, J Bisquert. Surgical site infection due to *Aeromonas* species: Report of nine cases and literature review. *Scandinavian Journal of Infectious Diseases*. 2009. 41: 164-170.

Resumen

Las infecciones de heridas son las infecciones más comúnmente asociadas a *Aeromonas* después de la gastroenteritis. Las infecciones de herida quirúrgica (*Surgical Site Infection*, SSI) debidas a estos microorganismos no son muy frecuentes y por tanto son poco conocidas. Se han estudiado las características clínicas y microbiológicas de 9 casos aparecidos en 2 hospitales españoles así como de 15 casos, publicados anteriormente, asociados a *Aeromonas*. Todos los pacientes, incluidos nuestros casos, tenían enfermedades gastrointestinales o del tracto hepatobiliar. Veintiuno de los pacientes desarrollaron SSI tras una cirugía abdominal o de la región pélvica. El tiempo medio transcurrido desde la cirugía y el inicio de la infección fue de 2 días en nuestros 9 pacientes. La infección fue polimicrobiana en 17 pacientes y en 19 de ellos nosocomial. La identificación bioquímica mostró que en 18 casos estaba implicada *A. hydrophila*, frente a 4 casos en los que se aisló *A. veronii* bv sobria. Sin embargo, de cinco cepas que se identificaron bioquímicamente, 4 *A. hydrophila* y 1 *A. veronii*, se confirmaron por RFLP del ADNr 16S 3 cepas de *A. hydrophila* y 1 de *A. veronii* mientras que la cuarta *A. hydrophila* pertenecía también a *A. veronii*. Todas ellas portaban genes para la serina proteasa, implicada en la activación de la aerolisina, y para la DNasa; 4 de ellas poseían el gen de la enterotoxina citotóxica termoestable Ast y 3 el gen para la enterotoxina citónica Act, las mismas que portaban el gen de la aerolisina/hemolisina.

Tras el tratamiento antimicrobiano la mayoría de los casos tuvieron una buena evolución clínica. En dos pacientes la infección remitió realizándose, únicamente, un drenaje quirúrgico. En conclusión, las infecciones de herida quirúrgica asociadas a *Aeromonas* tienen un desarrollo más rápido que las asociadas con otros microorganismos y seguramente tienen un origen endógeno tras la cirugía abdominal o pélvica, siendo el tratamiento con antibióticos eficaz en la mayoría de los casos.

El Comité Internacional para la Sistemática de Procariotas (ICSP) recomienda que la descripción de una nueva especie bacteriana esté basada en más de un aislado y que se realice un tipado molecular de los mismos (Stackebrandt y cols., 2002). Sin embargo, esta última recomendación no se ha tenido siempre en cuenta en la descripción de nuevas especies de *Aeromonas*, como es el caso de *A. culicicola*, definida en base a 3 aislados (Pidiyar y cols., 2002) y *A. simiae*, definida en base a 2 aislados (Harf-Monteil y cols., 2004). En un estudio realizado en nuestro laboratorio se observó que 2 de los 3 aislados de *A. culicicola* parecían ser idénticos (Figueras y cols., 2005). Esta observación nos motivó a iniciar un estudio de tipado molecular, en el cual se investigaron todos los aislados incluidos en las descripciones de las últimas 3 especies definidas en el género en aquella fecha, *A. culicicola* (Pidiyar y cols., 2002), *A. simiae* (Harf-Monteil y cols., 2004) y *A. molluscorum* (Miñana-Galbis y cols., 2004) utilizando 3 métodos distintos, i.e. ERIC-PCR, RAPD y PFGE (**estudio 4.1.1**). Los resultados obtenidos demostraron que 2 de los 3 aislados de *A. culicicola* y los 2 de *A. simiae*, para los que no se habían realizado técnicas de genotipado en la descripción (Pidiyar y cols., 2002; Harf-Monteil y cols., 2004), eran idénticos. Sin embargo, los tres métodos mostraron que los 5 aislados incluidos en la descripción de *A. molluscorum* pertenecían a cepas distintas, corroborando así los resultados incluidos en la descripción de la especie en base a la técnica de AFLP (Miñana-Galbis y cols., 2004). En conclusión este **estudio 4.1.1** proponía que el tipado molecular de los aislados fuera obligatorio y no una recomendación, en la definición de nuevas especies para así evitar incluir duplicados tal y como se ha demostrado (**Figueras y cols., 2006**).

Desde el año 2004 y hasta la fecha se han descrito 3 nuevas especies en el género, *A. bivalvium* con 2 cepas (Miñana-Galbis y cols., 2007), *A. tecta* con 5 cepas (Demarta y cols., 2008) y *A. aquariorum* con 19 cepas (Martínez-Murcia y cols., 2008). En la descripción de *A. bivalvium* se incluyó un análisis de AFLP (Miñana-Galbis y cols., 2007) mientras que en las 2 descripciones más recientes se ha realizado un análisis de genes *housekeeping* (Demarta y cols., 2008; Martínez-Murcia y cols., 2008), tal como recomienda también el ICSP. En la descripción de *A. tecta*, las 5 cepas mostraron idénticas secuencias del gen ARNr 16S, dos de ellas (MDC94 y MDC95) tenían también idénticas secuencias del gen *gyrB*, mientras que en el gen *rpoD* era distintas aunque sólo en unos pocos pares de bases. En estudios previos se había demostrado, con FAFLP y ribotipado, que las 5 cepas eran diferentes (Demarta y cols., 2008). En el caso de *A. aquariorum* las 13 cepa analizadas en base al gen *gyrB* resultaron tener secuencias distintas al igual que ocurría con las 6 en las que también se secuenció el gen *rpoD* (Martínez-Murcia y cols., 2008). Esto demuestra que los genes *rpoD* y *gyrB* son muy útiles, además de en la taxonomía (Saavedra y cols., 2006), en el análisis de la diversidad genética intraespecie y para el reconocimiento de clones. Podríamos, por tanto, decir que en los casos en que las secuencias de los genes *rpoD* y *gyrB* sean idénticas, como ocurría con las cepas depositadas en la CECT de *A. media* (CECT4234 y CECT4232^T), *A. allosaccharophila* (CECT4200 y CECT4199^T), *A. encheleia* (CECT4341 y CECT4342^T) y *A. eucrenophila* (CECT4827 y CECT4224^T)

en el estudio realizado por Soler y cols. (2004), no es necesario incluir otro método de tipado, ya que esto indica que se trata de aislados idénticos. Sin embargo, si sólo algunas de las secuencias de estos genes son idénticas o se estudia un sólo gen housekeeping, es importante completar el estudio con las técnicas de tipado molecular mencionadas. Esto permitirá asimismo reconocer posibles errores de secuenciación, tal y como se ha descrito previamente (Soler y cols., 2004).

La presencia de microheterogeneidades en el gen ARNr 16S, tal y como se comentó en la introducción, se había descrito en diversas especies del género *Aeromonas* pero aún no se había estudiado en profundidad su distribución, frecuencia ni su impacto en la taxonomía del género. La localización de estas microheterogeneidades en las dianas de las endonucleasas utilizadas con el método de identificación de RFLP del ADNr 16S (Figueras y cols., 2000a), generaba la aparición de patrones de RFLP atípicos que no permitían asignar el 8.1% de las cepas a una especie concreta (**estudio 4.1.3**). La secuenciación del gen ARNr 16S demostró que en las cepas estudiadas existían más posiciones variables (x 3.4) en las regiones del gen que no presentaban dianas para las endonucleasas utilizadas que en las regiones diana. En total se detectaron entre 1 (0.06%) y 10 (0.6%) posiciones variables por cepa, lo que concuerda con el rango descrito (entre 1 y 11 posiciones) en otras *Gammaproteobacterias* (Case y cols., 2007). Asimismo, en el análisis que realizamos de los estudios en los que se había reconocido la existencia de microheterogeneidades en las especies *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), *A. culicicola* (Figueras y cols., 2005), *A. bestiarum* y *A. salmonicida* (Martínez-Murcia y cols., 2005) y *A. allosaccharophila* (Saavedra y cols., 2006), se constató que las microheterogeneidades involucraban entre 1 (0.06%) y 8 (0.52%) posiciones. Esto coincidía con los datos obtenidos en nuestro estudio pero contrastaban con el 1.4% y 1.5% descrito por Morandi y cols. (2005).

La prevalencia de cepas de *Aeromonas* con microheterogeneidad (8.1%) contrasta con el 21% descrito por Morandi y cols. (2005) a partir de 82 aislados de *Aeromonas*. En su estudio Morandi y cols. (2005) utilizan también un método de RFLP aunque en este caso no se secuenciaron un número representativo de aislados para confirmar esta estimación. Además, en este estudio obtienen un 1.5% de posiciones variables (21 posiciones) en una cepa de *A. veronii* (LMG 13695), valor muy superior al obtenido en nuestro estudio (**Alperi y cols., 2008**). Morandi y cols. (2005) describieron que esta cepa presentaba microheterogeneidad en la en la RV2 (posiciones 154, 155, 156, 165, 166, 167), donde nunca antes se había descrito variabilidad en ninguna otra especie de *Aeromonas*. La secuenciación del ADNr 16S de esta cepa en nuestro laboratorio y en el MDC (*Molecular Diagnostic Center*), **estudio 4.1.4**, sólo confirmó una transición (A/G) en la posición 167 de la RV2. Asimismo, sólo en 8 de las 21 posiciones descritas por Morandi y cols. (2005) se constató la existencia de variabilidad, siendo este resultado más acorde con lo observado en otras especies de *Aeromonas* (**Alperi y cols., 2008**) y en otras *Gammaproteobacterias* (Case y cols., 2007). Las posiciones variables en el gen ARNr 16S de

Aeromonas observadas en nuestro estudio se localizaban principalmente en las regiones variables (RV) 3 y 6 (Alperi y cols., 2008), que son las regiones de mayor variabilidad interespecie (Martínez-Murcia y cols., 1992a). También pusimos de manifiesto por primera vez la existencia de 2 posiciones en la RV6 (posiciones 1011 y 1018) que mostraban microheterogeneidad en todas las especies del género analizadas, con excepción de la cepa tipo de *A. hydrophila* [al consultar el genoma completo de esta especie (Seshadri y cols., 2006)], por lo que estas se pueden definir como posiciones hipervariables del gen ARNr 16S en el género *Aeromonas*.

Con respecto al impacto de las microheterogeneidades en la taxonomía, vimos que el 70% de las 27 cepas estudiadas mostraban una localización ambigua en el árbol filogenético del gen ARNr 16S construido a partir de las secuencias (1503 pb) que mostraban en las posiciones polimórficas la base correspondiente al pico predominante en el cromatograma de secuenciación. Asimismo, el 74% de las cepas tenían una localización ambigua cuando el árbol era construido con las secuencias que representaban el polimorfismo con el código de la IUPAC (*International Union of Pure and Applied Chemistry*). Este incremento de cepas con posiciones ambiguas que no permitían su identificación está relacionado con el hecho de que la información del código IUPAC no se valora en los alineamientos y reconstrucciones filogenéticas (Pettersen y cols., 1998). Todas las cepas con polimorfismo en el gen ARNr 16S pudieron identificarse inequívocamente con el gen *rpoD* como pertenecientes a las especies *A. caviae*, *A. veronii* y *A. media*. Las especies *A. caviae* y *A. media* se diferencian en 3 nucleótidos en el gen ARNr 16S de las especies más cercanas filogenéticamente, *A. trota* y *A. hydrophila* (Martínez-Murcia y cols., 1992), por lo que cualquier polimorfismo que afectara a estas posiciones tenía repercusión en la correcta separación de estas especies de sus vecinas. Lo mismo ocurría con 2 cepas de las 8 de *A. veronii* que mostraron polimorfismo, una de ellas en cada una de las 8 posiciones que diferencian *A. veronii* y *A. jandaei* y que se agrupaba en el árbol con *A. jandaei*, mientras que la otra cepa presentaba polimorfismo en 6 de estas posiciones y ocupaba una posición filogenética ambigua. El resto de cepas mostraban sólo 2 posiciones variables y se agrupaban en la rama de *A. veronii* en los 2 árboles. El polimorfismo en las 6 posiciones mencionadas se había descrito previamente en *A. culicicola* (Figueras y cols., 2005), pero no se había tenido cuenta en la descripción de esta especie publicada 3 años antes, en la que se indicaba que su gen ARNr 16S presentaba 5 bases de diferencia con el de *A. veronii* (Pidiyar y cols., 2002). La omisión de esta variabilidad junto con valores de DDH [método de Kaznowski (1995), a 78°C] del 42% obtenidos con la cepa tipo de *A. veronii* condujeron a su errónea identificación como nueva especie (Pidiyar y cols., 2002). Precisamente, en el mismo año que se publicó la existencia de microheterogeneidad por nuestro grupo, Huys y cols. (2005) reclasificaron *A. culicicola* como *A. veronii* en base a los nuevos valores de DDH [método de Ezaki y cols. (1989) a 46°C y el 50% de formamida] del 75% obtenidos entre las cepas tipo de ambas especies. En vista del impacto que tiene la existencia de microheterogeneidades en el gen ARNr 16S en la identificación correcta de *Aeromonas*, en nuestro estudio propusimos que cuando sea detectada, ésta se refleje en publicaciones y bases de datos (GenBank, etc.) para recoger fielmente la variabilidad de este

gen. Nuestros resultados apoyan los obtenidos por otros autores en otros géneros que indicaban que aunque las mutaciones afectaran a menos del 1% de las posiciones del gen ARNr 16S éstas tenían un impacto en la taxonomía (Boucher y cols., 2004; Marchandin y cols., 2003; Vásquez y cols., 2005).

El análisis filogenético de las secuencias de las copias (operones) del gen ARNr 16S (**estudio 4.1.4**) incluía los 5 clones de la cepa de *A. veronii* LMG13695 de Morandi y cols. (2005) obtenidos por subclonación y las obtenidas de los genomas completos de *A. hydrophila* (10 operones) y *A. salmonicida* (9 operones). Este análisis mostró que prácticamente todas las copias de estas dos últimas especies se agrupaban con la secuencia consenso del ADNr 16S de la cepa tipo (a excepción de un operón de *A. salmonicida*) mientras que sólo uno de los clones de *A. veronii* (clon 2) se agrupaba con la secuencia consenso de su cepa tipo y otros 2 (clon 3 y 5) en el mismo clado de esta especie dentro de la “rama Schubertii”. Estos resultados podrían indicar que en *A. veronii* existe mucha más diversidad en el gen ARNr 16S que en *A. salmonicida* o *A. hydrophila*, lo que concuerda con que ésta fuera una de las especies con mayor incidencia (con respecto al número de cepas) con microheterogeneidad en nuestro estudio (**Alperi y cols., 2008**). Sin embargo, el número máximo de posiciones variables que encontramos en una cepa de la especie *A. veronii* fue 11, la mitad de las 21 descritas por Morandi y cols. (2005), lo que nos indica que sus resultados pueden no ser del todo fiables. Es interesante destacar que una de las copias del gen ARNr 16S de *A. salmonicida* no se agrupa con la secuencia consenso de la cepa tipo de esta especie, tal como hemos indicado, sino con la de *A. bestiarum*, lo que ratifica lo sugerido por nuestro grupo, i.e. que ambas especies comparten operones (Martínez-Murcia y cols., 2005).

En conclusión, la secuenciación del gen ARNr 16S conjuntamente con el análisis de RFLP han demostrado ser técnicas válidas para la evaluación del polimorfismo de este gen.

Tal y como hemos indicado, el gen *rpoD* permitió identificar las cepas con patrón de RFLP atípico estudiadas como pertenecientes a *A. caviae* (25 cepas), *A. veronii* (16 cepas) y *A. media* (11 cepas). Estas especies son las que presentan una mayor incidencia en muestras clínicas (Abbott y cols., 2003; Figueras, 2005). Asimismo, en nuestro estudio se comprobó que existía una mayor prevalencia ($P < 0.01$) de microheterogeneidad en las cepas de origen clínico que en las de origen ambiental (**Alperi y cols., 2008**). En otros estudios, la existencia de polimorfismo en el gen ARNr 16S se ha relacionado con propiedades fisiológicas de las cepas como son su temperatura de crecimiento, adaptación a distintos nichos ecológicos e incluso su virulencia y resistencia a la estreptomicina u otros antibióticos (Prüb y cols., 1999; Carter y cols., 2000; Springer y cols., 2001; Clarridge, 2003; Criswell y cols., 2006; Vickery y cols., 2007). Sin embargo, desconocemos si estas mutaciones pueden tener algún significado parecido en *Aeromonas*. Asimismo, cabe destacar que en una cepa de *A. caviae*, identificada en base al *gyrB*, responsable de producir una cistitis se ha descrito también la existencia de microheterogeneidad en el gen ARNr 16S (Al-Benwan y cols., 2007). Esto parecería apoyar la mayor prevalencia en cepas clínicas observada en nuestro estudio.

Durante la preparación del **estudio 4.1.3 (Alperi y cols., 2008)** se publicó un protocolo de RFLP del ADNr 16S para diferenciar las especies de *Aeromonas* de importancia clínica (Ghatak y cols., 2007). Un análisis del protocolo propuesto en esta publicación, con todas las especies de *Aeromonas* mediante una simulación informática, nos mostró que los patrones propuestos por Ghatak y cols. (2007) para la separación de especies no eran especie-específicos ya que otras especies del género mostraban un patrón común con los descritos por estos autores. Por ejemplo, el patrón definido para *A. jandaei* era idéntico al que generaban *A. popoffii*, *A. bestiarum*, *A. salmonicida* y *A. bivalvium*. Tanto *A. bestiarum* como *A. salmonicida* han sido aisladas, aunque con baja incidencia, en muestras clínicas (Figueras, 2005). Asimismo, Ghatak y cols. (2007) proponen que se podrían diferenciar las dos biovariedades de *A. veronii*, no obstante, la simulación informática, utilizando la endonucleasa propuesta por estos autores, con cepas de referencia de ambas biovariedades de *A. veronii* no mostró que existiera dicha diferenciación. En base a estos datos se publicó una carta al editor (**estudio 4.1.2**) donde se ponían en evidencia las limitaciones del estudio de Ghatak y cols. (2007). La respuesta de estos autores incluía el número de acceso del GenBank (AY928477) de la secuencia del gen ARNr 16S de la cepa de *A. veronii* bv sobria (A155) con la que ellos realizaron la simulación. La búsqueda de esta secuencia en el GenBank mostró que correspondía a una copia (“heterologous copy-1”) del ADNr 16S de una cepa (A155) con microheterogeneidades en este gen, cuyas secuencias fueron depositadas en el GenBank por Morandi y cols. (2005). Sin embargo, Ghatak y cols. (2007) no tuvieron en cuenta que las cepas con las que deberían haber realizado la simulación eran las cepas de referencia de las 2 biovariedades de *A. veronii* ni tampoco reconocieron la existencia de polimorfismo en la cepa elegida. En conclusión, podemos decir que reconocer las microheterogeneidades en el gen ARNr 16S es fundamental ya que no sólo puede conducir a una incorrecta identificación de las especies de *Aeromonas*, como ya hemos comentado, sino que es esencial valorarla tanto en el diseño de protocolos de RFLP como de sondas específicas.

Tal y como hemos demostrado previamente, las cepas que presentaban patrones de RFLP atípicos, es decir, distintos a los esperados para especies conocidas, estaban generados por la presencia de microheterogeneidades entre las copias del gen ARNr 16S (**Alperi y cols., 2008**), sin embargo, estos patrones distintos también pueden estar generados por posibles nuevas especies del género *Aeromonas* (Borrell y cols., 1997; Figueras y cols., 2000a). En nuestro estudio, el análisis de cepas con patrones de RFLP atípicos con el gen *rpoD* ha permitido reconocer 5 casos en los que las cepas han demostrado representar 5 nuevas especies para el género: *A. fluvialis*, aislada a partir de agua de río; *A. taiwanensis* y *A. sanarellii*, aisladas de muestras clínicas; *A. piscicola*, aislada de peces enfermos y *A. rivuli*, aislada de agua de un riachuelo; y cuyas descripciones se han incluido en la presente tesis en los **estudios 4.1.6-4.1.9**. En estos 5 casos el valor de similitud del gen *rpoD* con la especie más cercana comprendía un rango del 92.2% (entre *A. sanarellii* y *A. caviae*) y el 96% (entre *A. piscicola* y *A. bestiarum*) por lo que estaban por debajo del 97% establecido como límite para la separación de

especies (Soler y cols., 2004). La posición taxonómica de todas las cepas de estas nuevas especies de *Aeromonas* se analizó en base a éste y a otros genes *housekeeping* (*gyrB*, *recA*, *dnaJ* y *gyrA*) concatenados (3684 pb), utilizados previamente en un estudio *Multi-Locus Phylogenetic Analysis* (MLPA) del género (Martínez-Murcia y cols., sometido). Este análisis confirmó que se trataba de líneas filogenéticas desconocidas, tal y como indicaban los resultados obtenidos por el *rpoD*. Por tanto, se ha demostrado de nuevo la capacidad del gen *rpoD* para la diferenciación de especies de *Aeromonas* y comprobado que el punto de corte (97%) previamente establecido (Soler y cols., 2004) para la separación de especies, se mantiene en las 149 cepas secuenciadas en esta tesis. Por otro lado, el MLPA mostró que ninguna de las cepas incluidas en estos estudios de nuevas especies presentaba secuencias idénticas con ninguno de los 5 genes estudiados lo que indicaba que se trataba de cepas diferentes, por lo que no fue necesario realizar otras técnicas de tipado. Además, es importante señalar que éstas son las 5 primeras descripciones de nuevas especies de *Aeromonas* que siguen la recomendación del ICSP de realizar un análisis multi-locus que incluya 5 genes *housekeeping*.

La DDH sigue siendo en la actualidad obligatoria para la definición de nuevas especies procariotas (Stackebrandt y Eber, 2006). No obstante, ésta es una técnica compleja que se realiza en pocos laboratorios lo que motivó la necesidad de poner a punto la técnica de DDH en nuestro laboratorio, siendo este uno de los objetivos de la presente tesis doctoral. La validación de la técnica, una vez implementada en nuestro laboratorio, se realizó mediante la determinación del RBR entre las cepas tipo de *A. allosaccharophila* y *A. caviae* y entre las cepas tipo de *A. allosaccharophila* y *A. sobria*. Los valores de DDH del 44% entre *A. allosaccharophila*-*A. caviae* y del 65% entre *A. allosaccharophila*-*A. sobria* fueron muy similares a los valores del 46% y el 64%, respectivamente, publicados recientemente por Nhung y cols. (2007), con una técnica diferente. Las desviaciones estándar de los datos obtenidos, en los diversos experimentos de evaluación de nuevas especies (**estudios 4.1.6-4.1.9**), bajo idénticas condiciones, variaban entre 1.2 y 14%, valores similares a los descritos en otros géneros (Goris y cols., 1989) lo que refleja la reproducibilidad del método en nuestro laboratorio. Además, la diferencia entre las medias de los valores de DDH directos y recíprocos obtenida (0.6-13%), se encontraba por debajo del límite aceptado (15%) y publicado por Stackebrandt y Ebers (2006). Por otro lado, aunque se obtuvieron algunos valores discordantes de RBR en nuestros estudios, no fueron comprables con la disparidad de resultados de DDH de los diversos trabajos recopilados en la introducción de esta tesis doctoral y que han generado importantes controversias taxonómicas.

Clásicamente, se recomienda que se determine el DDH entre las cepas representantes de una posible nueva especie y las cepas tipo de las especies con las que muestren un valor de similitud del gen ARNr 16S mayor del 97% (Wayne, 1987; Stackebrandt y Gobel, 1994). Sin embargo, recientemente se ha propuesto que este valor de similitud sea del 98-99% (Stackebrandt y Ebers, 2006). En *Aeromonas* los valores de similitud interespecie de este gen son muy elevados, entre el 96.7% y el 100% (Martínez-Murcia y cols., 1992; Saavedra y cols., 2006), al igual que en los géneros

Streptomyces (Santpierre-Bonaccio y cols., 2004) y *Mycobacterium* (Rhodes y cols., 2003). Debido a la poca capacidad discriminatoria del gen ARNr 16S de *Aeromonas* para la separación de especies y a la congruencia de los resultados obtenidos, tanto en el análisis filogenético individual con el gen *rpoD* como con el MLPA, los experimentos de DDH para cada uno de las cinco especies se realizaron, por lo menos, con las cepas tipo de las especies filogenéticamente más cercanas (que aparecían en la misma rama) en base al MLPA. En las 5 descripciones de nuevas especies de *Aeromonas*, incluidas en la presente tesis doctoral, los valores de DDH obtenidos entre las nuevas especies y las cepas tipo de las especies agrupadas en las mismas ramas en el árbol filogenético MLPA variaban entre 40-66% en *A. fluvialis*, entre 50-60% en *A. rivuli*, entre 50-65% en *A. piscicola* y entre 60-65% en *A. taiwanensis* y *A. sanarellii*. Es decir, los valores máximos medios han estado por debajo del 70% establecido para considerar las cepas como pertenecientes a nuevas especies (Wayne, 1987; Stackebrandt y Ebers, 2006). Los valores de DDH superiores al 60% podrían ser considerados valores *borderline*, sin embargo, en el género *Aeromonas* así como en el género vecino *Vibrio*, se han publicado valores de reasociación superiores al 60% tanto en la descripción de nuevas especies (Huys y cols., 1997; Gómez-Gil y cols., 2003; Thompson y cols., 2003) como en estudios de reasociación ADN-ADN (Nhung y cols., 2007).

En nuestros estudios (4.1.6-4.1.9) pudimos apreciar que especies que mostraban una similitud del gen ARNr 16S del 99.5% tenían valores de DDH del 66%, (*A. fluvialis*-*A. veronii*) mientras que en otros casos una similitud del 99.7% del ADNr 16S se correlacionaba con valores de DDH del 53% (*A. rivuli*-*A. sobria*) y valores de similitud ADNr 16S del 100% con valores de DDH del 65% (*A. piscicola*-*A. bestiarum*). Estos datos corroboran que organismos con valores de similitud del gen ARNr 16S superiores al 97% pertenecían a especies diferentes, incluso con similitudes del 99.8% (Stackebrandt y Goebel, 1994) o del 100% (Martínez-Murcia y cols., 1992; Harayama y Kasai, 2006). Por tanto, los valores propuestos recientemente del 98-99% de similitud del ADNr 16S, a partir de los cuales deberían ser obligatorios los experimentos de DDH (Stackebrandt y Ebers, 2006), no reflejan la taxonomía de este gen en *Aeromonas*. Sin tener en cuenta los casos del 100% de similitud y la existencia de microheterogeneidad, este punto de corte de similitud del gen ARNr 16S más adecuado en *Aeromonas* podría estar entre el 99.5-99.7%.

En el desarrollo de la presente tesis doctoral se observó que *A. aquariorum*, una nueva especie descrita a partir de cepas aisladas de peces ornamentales (Martínez-Murcia y cols., 2008), y *A. hydrophila* subsp. *dhakensis*, descrita a partir de aislados de heces de niños con diarrea en Bangladesh (Huys y cols., 2002) e incluida en diversos estudios de genes *housekeeping* (Küpfer y cols., 2006; Nhung y cols., 2007; Miñana-Galbis y cols., en prensa), ocupaban las mismas posiciones en los árboles filogenéticos construidos con los genes ARN 16S y *gyrB*, lo que indicaba que podría tratarse de un único taxón.

En la definición de *A. hydrophila* subsp. *dhakensis* (Huys y cols., 2002) tanto los datos bioquímicos como los del AFLP indicaban que este grupo constituía un taxón diferente de *A. hydrophila*, sin embargo, los valores de DDH entre 3 cepas de la subespecie y la cepa tipo de *A. hydrophila* fueron superiores al 70% (77%). Estos autores optaron por dar una mayor importancia a los resultados de DDH que a los otros datos, lo que dio lugar a la definición de la subespecie. En los últimos años, otros autores que han incluido cepas de *A. hydrophila* subsp. *dhakensis* en sus estudios con genes *housekeeping* (Küpfer y cols., 2006; Nhung y cols., 2007; Miñana-Galbis y cols., en prensa) han observado con los genes ARNr 16S, *gyrB* y *cpn60* localizaciones diferentes entre los aislados de *A. hydrophila* subsp. *dhakensis* y el resto de cepas *A. hydrophila* (Küpfer y cols., 2006; Miñana-Galbis y cols., en prensa). Sin embargo, las filogenias de los genes *rpoB* y *dnaJ* incluían *A. hydrophila* subsp. *dhakensis* en la misma rama que las subespecies de *A. hydrophila* (Küpfer y cols., 2006; Nhung y cols., 2007) pero en estos casos se incrementaba la diversidad intraespecie hasta solaparse con la diversidad interespecie media del género (Nhung y cols., 2007). A pesar de los datos existentes, sólo uno de estos autores (Miñana-Galbis y cols., en prensa) ha interpretado sus hallazgos como indicativos de que *A. hydrophila* subsp. *dhakensis* deba considerarse un taxón independiente de *A. hydrophila*, sin tener en cuenta que esta propuesta ya ha sido publicada.

A. aquariorum, descrita en el año 2008 por Martínez-Murcia y cols., mostró resultados de DDH entre la cepa tipo y *A. hydrophila* del 46% (Martínez-Murcia y cols., 2008). Este resultado de DDH es congruente con los resultados de los análisis filogenéticos incluidos en la descripción de esta especie. La elaboración de un árbol filogenético (**estudio 4.1.5**) con los genes *gyrB* y *rpoD* que incluía las 3 cepas de la descripción original de *A. hydrophila* subsp. *dhakensis* investigadas junto a 6 de *A. aquariorum* y el resto de especies del género mostró que las cepas de los dos grupos constituían un clado homogéneo y robusto (100% bootstrap). Asimismo, la nueva secuencia del ADNr 16S de la cepa tipo de la subespecie, obtenida en nuestro estudio, no mostró diferencias con la cepa tipo de *A. aquariorum*. Todos estos datos sugieren que *A. hydrophila* subsp. *dhakensis* y *A. aquariorum* constituyen un único taxón, sin embargo, sería necesario realizar experimentos de DDH entre los dos grupos para corroborarlo definitivamente y resolver cuál es el nombre correcto para esta especie.

A pesar de que los resultados de DDH obtenidos en nuestros estudios han sido congruentes con los resultados del MLPA y que la variabilidad observada se encontraba dentro del rango establecido (**estudios 4.1.6-4.1.9**), hemos de indicar que esta técnica presenta una elevada variabilidad. A nuestro entender, teniendo en cuenta el análisis comparativo realizado en la introducción con las diversas controversias taxonómicas en función de los valores de DDH, así como las reclasificaciones de *A. culicicola* y *A. hydrophila* subsp. *dhakensis*, se debería ser muy prudente a la hora de dar tanto peso a estos valores. La técnica del MLPA, con los cinco genes propuestos, ha demostrado ser estable y proporcionar una información más congruente y objetiva que la DDH.

Uno de los objetivos de la presente tesis doctoral, como se ha mencionado previamente, era la colaboración con diferentes hospitales en la identificación molecular de aislados de *Aeromonas*, ya que los métodos convencionales proporcionan identificaciones erróneas (Soler y cols., 2003; Ormen y cols., 2005) y no permiten reconocer especies poco frecuentes o raras. En este sentido, se pudo reconocer en base al gen *rpoD* (Soler y cols., 2004) que 22 de las 150 cepas de origen extraintestinal procedentes del Hospital Universitario National Cheng Kung de Tainan, Taiwán, pertenecían a la especie *A. aquariorum* (**estudio 4.2.1**). Estas cepas presentaron patrones de RFLP de *A. caviae* atípicos y típicos (**Alperi y cols., 2008**) y 19 de ellas se habían identificado bioquímicamente en el hospital de origen como *A. hydrophila* mientras que 3 sólo pudieron identificarse como *Aeromonas* sp. Estos datos sugerían que esta nueva especie podía estar enmascarada en el ámbito clínico por *A. hydrophila* y por *A. caviae* (en base al RFLP del ADNr 16S). Ambas especies y en especial *A. caviae*, son muy frecuentes en clínica (Abbott y cols., 2003; Figueras, 2005). El análisis de RFLP del ADNr 16S reveló que las cepas de *A. aquariorum* tenían el mismo patrón que *A. caviae*. Estos datos nos indicaron que podrían existir en nuestra colección cepas de origen clínico, identificadas en base su patrón de RFLP como *A. caviae*, que pertenecieran a *A. aquariorum*. Para evaluar esta posibilidad se analizó la producción de ácido de la celobiosa considerada 100% positiva para *A. caviae* (Abbott y cols., 2003) y negativa para *A. aquariorum* (Martínez-Murcia y cols., 2008), en cepas identificadas por RFLP del ADNr 16S como *A. caviae* en nuestro laboratorio. Todas las cepas con un resultado negativo para la celobiosa fueron identificadas en base al gen *rpoD* y se comprobó que sólo el 85% de las cepas de *A. caviae* eran capaces de producir ácido de la celobiosa, resultados concordantes con el 80% publicado previamente por otros autores (Martin-Carnahan y Joseph, 2005). Otras pruebas bioquímicas que podrían ser útiles para la diferenciación de *A. caviae* de *A. aquariorum*, según la descripción de esta última (Martínez-Murcia y cols., 2008), serían la presencia de lisina decarboxilasa (positiva para *A. aquariorum* y negativa para *A. caviae*) y la producción de ácido de la arabinosa (negativa para *A. aquariorum* y positiva para *A. caviae*). Se detectó que 2 aislados de nuestra colección pertenecían a *A. aquariorum*. Estos 2 aislados junto con otros 3 de origen clínico aislados en España, en el Hospital Comarcal Vega Baja de Orihuela y reconocidos en base al gen *gyrB*, indican que la distribución clínica de *A. aquariorum* no se limita a países Orientales, dónde se había aislado anteriormente enmascarada como *A. hydrophila* subsp. *dhakensis* (Kuhn y cols., 1997; Huys y cols., 2002; **Martínez-Murcia y cols., 2009**). Dado que el potencial virulento de las cepas de esta nueva especie no había sido investigado y sólo existían datos de la susceptibilidad frente a diversos agentes antimicrobianos obtenidos a partir de cepas ambientales, analizamos ambos aspectos en estas cepas clínicas. Los perfiles de resistencia a antibióticos de las cepas clínicas fueron similares a los obtenidos en las cepas ambientales (Martínez-Murcia y cols., 2008). Todas las cepas mostraron ser resistentes a la amoxicilina, cefalotina y cefoxitina, siendo el 96% resistente a la eritromicina mientras que el 4% lo fueron frente al cloranfenicol e imipenem. El 100% de las cepas clínicas demostraron poseer los genes que codifican para la aerolisina/hemolisina, mientras que sólo el 84% de las cepas presentó el gen de

la enterotoxina termoestable Ast y el 64% los genes pertenecientes al T3SS, lo cual demuestra el potencial patogénico de esta nueva especie y coincide con los altos valores de citotoxicidad publicados previamente en aislados de origen intestinal de *A. hydrophila* subsp. *dhakensis* (Kühn y cols., 1997).

La secuenciación de los genes *rpoD* y *gyrB* mostró que 3 de los aislados de *A. aquariorum* de Taiwán poseían secuencias idénticas como también lo fue su perfil de ERIC-PCR y su patrón de sensibilidad a los antibióticos, lo que sugiere una relación clonal de los tres aislados. Dos de ellos pertenecían al mismo paciente, uno fue aislado de bilis y el otro se aisló 14 días después de un exudado de herida quirúrgica abdominal, lo que indicaba que la infección de la herida podía tener un carácter endógeno. El tercer aislado se recogió 7 meses antes de una ascitis en un paciente con una apendicitis aguda. Estos datos indican una fuente común de infección aunque ésta no se pudo determinar. Nuestros resultados pretenden alertar a los clínicos de la importancia de esta especie proporcionándoles herramientas para su identificación.

En el año 2006 se recibió una cepa del hospital Royo Vilanova de Zaragoza, enviada por la Dra. M^a José Aldea aislada de muestras de heces de una paciente de 40 años con síndrome urémico hemolítico (SUH). Esta cepa había sido identificada bioquímicamente como *A. veronii* bv sobria y fue confirmada genéticamente por RFLP del ADNr 16S como *A. veronii* (**estudio 4.2.2**). Dado que existían pocos casos de SUH atribuidos a *Aeromonas* (San Joaquin y Pickett, 1988; Bogdanovic y cols., 1991; Robson y cols., 1992; Fang y cols., 1999; Filler y cols., 2000) se consideró importante hacer una revisión de todos ellos añadiendo el segundo caso de SUH en adultos asociado a este género. Nuestra cepa mostró citotoxicidad en células Vero. Asimismo, presentaba los genes del T3SS (*ascV*), relacionados con diarrea y colitis hemorrágica (Coburn y cols., 2007), el gen de la toxina efectora AexT, secretada por este sistema, y los genes para aerolisina/hemolisina, lo que puso de manifiesto su potencial virulencia. Sin embargo, el principal factor de virulencia asociado al SUH es la toxina Shiga tipo 2 (Lee y cols., 2007; Orth y cols., 2007). Existen 2 tipos de toxinas Shiga (Stx1 y Stx2) y ambas son importantes factores de virulencia en la patogénesis de la gastroenteritis y colitis hemorrágica. Dos autores (Haque y cols., 1996; Snowden y cols., 2005) habían detectado la existencia de *stx*₁ en *Aeromonas*, y sólo uno su producción, pero ninguno de ellos secuenció dicho gen. Pese a los casos en los que *Aeromonas* se ha aislado como agente del SUH y de ser la Stx2 el principal factor de virulencia del mismo sólo 3 autores han tratado de detectar sin éxito este gen en *Aeromonas* (Haque y cols., 1996; Filler y cols., 2000; Snowden y cols., 2005). Teniendo en cuenta los casos de SUH mencionados anteriormente (**Figueras y cols., 2007 estudio 4.2.2**) y el rol que los genes *stx*₁ y *stx*₂ pueden jugar en este tipo de infecciones, se evaluó su presencia por PCR en 80 cepas clínicas de *Aeromonas* de distintas especies aisladas de diversos orígenes (**estudio 4.2.3**). La presencia de *stx*₁ se detectó con mayor incidencia (en 19 de las 80 cepas, 23.75%) que en estudios anteriores, 10.25% (Haque y cols., 1996), utilizando los mismos cebadores y condiciones, y 9.1% (Snowden y cols., 2005), utilizando cebadores y condiciones de amplificación diferentes (Pass y cols., 2000). Un 74% de

las cepas *stx*₁-positivas pertenecieron a las especies con mayor relevancia en clínica (Figueras, 2005) i.e. *A. caviae* (42.1%), *A. veronii* (31.6%) y *A. hydrophila* (10.5%), siendo la mayoría aisladas de heces al igual que en el estudio de Haque y cols. (1996). Se pudo detectar por primera vez la presencia del gen *stx*₂ aunque sólo en una cepa de *A. caviae* que también era positiva para *stx*₁. La amplificación de este fragmento de *stx*₂ mostró resultados variables o inestables ya que de 5 reacciones de PCR efectuadas a partir de 4 extracciones de ADN sólo en 2 casos se pudo observar una banda tenue del tamaño esperado para este gen. La inestabilidad de *stx*₂ se había demostrado *in vitro* (Karch y cols., 1992) e *in vivo* (Bielaszewska y cols., 2007) en *E. coli*, *Citrobacter freundii* (Schmidt y cols., 1993) y *Enterobacter cloacae* (Paton y Paton, 1997). Dicha inestabilidad se debe a que los genes *stx* están codificados en fagos que actúan como elementos genéticos móviles, facilitando la transmisión horizontal (Herold y cols., 2004), lo que puede derivar, cuando los fagos se encuentran en estado plasmídico, en la pérdida de los genes tras las resiembras puesto que no toda la descendencia recibe una copia del ADN fágico (Karch y cols., 1992; Schmidt y cols., 1993; Paton y Paton, 1997; Herold y cols., 2004). Se observó esta misma inestabilidad en la detección del gen *stx*₁ y se corroboró que al menos en una de las cepas estudiadas el gen *stx*₁ se localiza en un plásmido, al igual que habían demostrado Haque y cols. (1996). Los resultados de inestabilidad del gen *stx*₂ en *Aeromonas* obtenidos en la presente tesis sugieren una localización equivalente a la de *stx*₁, aunque esto debería demostrarse.

La secuenciación de los fragmentos amplificados de los genes *stx*₁ y *stx*₂ puso de manifiesto su gran similitud con las variantes genéticas más patogénicas para humanos de *E. coli* productoras de toxina Shiga (STEC): la prototipo *stx*₁ de la toxina Shiga tipo 1 asociada con diarreas (Lee y cols., 2007) y la prototipo *stx*₂ y la variante *stx*_{2c} de la toxina Shiga tipo 2 asociadas con el SUH (Lee y cols., 2007; Orth y cols., 2007). La similitud con dichas variantes sugiere un mismo potencial patogénico de estos genes en *Aeromonas* y podría explicar su papel como agente causal de diarreas y del SUH (Figueras y cols., 2007). El análisis de la producción de toxinas Shiga en las cepas portadoras de los genes *stx*₁ y *stx*₂ mostró que sólo 2 cepas producían Stx1 mientras que no se pudo detectar la producción de Stx2. Aunque la tasa de producción fue baja, 10.25% de las cepas *stx*₁-positivas, estos valores son muy similares a los observados a partir de cepas de STEC, 6.7% para Stx1 y 6-7% para Stx2, aisladas de aguas residuales urbanas (García-Aljaro y cols., 2004, 2005). De este modo, se ha demostrado la posibilidad real de que la Stx1 producida por *Aeromonas* actúe como un factor de virulencia más en la patogénesis multifactorial de la diarrea producida por este microorganismo. Este estudio aporta datos que apoyan la capacidad de *Aeromonas* de producir diarreas, aspecto cuestionado en algunos estudios (Chu y cols., 2006; Figueras y cols., 2007).

Las infecciones de herida quirúrgica (SSI) son en la mayoría de los casos nosocomiales y están asociadas con una elevada mortalidad y coste médico. Los agentes etiológicos son variados pero dependen en especial del lugar anatómico de la cirugía siendo *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus* spp., *E. coli* y *Pseudomonas aeruginosa* los microorganismos más frecuentemente aislados. Sólo

existían 15 casos en la literatura en los que *Aeromonas* se había relacionado con este tipo de infecciones (Slotnick, 1970; Washington, 1972; Soussy y cols., 1975; Janda y cols., 1983; Mellersh y cols., 1984; Isaacs y cols., 1988; Villuendas y cols., 1991; King y cols., 1992; Gold y Salit, 1993; Moawad y Zeiderman, 2002; Clark y Chenoweth, 2005). Por ello, la adición de 9 nuevos casos (**estudio 4.2.4**) procedentes 8 de ellos del Hospital Universitario de Guadalajara y 1 del Hospital Royo Vilanova de Zaragoza permitía, revisando los casos existentes, analizar las características clínicas de las SSI producidas por *Aeromonas*. La mayoría de pacientes con SSI asociados a *Aeromonas* presentaban coinfección con otros enteropatógenos y habían sido sometidos a cirugía de la región pélvica y/o abdominal, lo que sugiere una fuente de infección endógena a partir del sistema digestivo o del tracto hepatobiliar. La contribución específica de *Aeromonas* en estas infecciones polimicrobianas era difícil de determinar. Sin embargo, al compararse los casos de SSI de *Aeromonas* con los generados por otros microorganismos se observó una rápida evolución de la infección, que se manifestaba en el primer o segundo día tras la cirugía (Mangram y cols., 1999). En 5 de los 9 casos descritos en este trabajo se analizó por PCR la presencia de los genes de diversos factores de virulencia (aerolisina/hemolisina, enterotoxinas citotóxicas y citotónicas, flagelo lateral, serina proteasa, DNasa y lipasas) detectándose en 3 cepas la presencia de genes que codifican para la aerolisina/hemolisina, implicados en la degeneración tisular (Deepe y cols., 1980). Además el 100% de las cepas analizadas mediante métodos moleculares poseían los genes de la serina proteasa, asociada con la maduración/activación de la aerolisina (Chacón y cols., 2003) así como genes de diversas enterotoxinas (*alt* y *ast*), lo que demostró su potencial patogénico (**Tena y cols., 2009 estudio 4.2.4**). Ninguno de los pacientes desarrolló bacteriemia y la mayoría de pacientes respondieron bien al tratamiento antibiótico e incluso 2 de ellos, previamente estudiados (Villuedas y cols., 1991; Gold y Salit, 1993), al drenaje quirúrgico sin tratamiento antibiótico.

Las *Aeromonas* son responsables del 12% de las infecciones hepatobiliares o pancreáticas, entre las cuales la más común (en el 70% de los casos) es la colangitis (Figueras, 2005). En asociación a infección de este tipo se investigó el comportamiento atípico de 9 aislados procedentes de una paciente ya que presentaban una morfología colonial, perfil bioquímico y sensibilidad a los antibióticos variable (**estudio 4.2.5**). La paciente había padecido, un mes antes, una infección urinaria que había sido tratada con ciprofloxacino y amoxicilina-ácido clavulánico. En el tratamiento de la colangitis se administró amoxicilina-ácido clavulánico que se sustituyó posteriormente por piperacilina-tazobactam. Tanto los aislados recuperados a partir de la primera muestra de bilis, a través de un catéter, (3 aislados) como los de la segunda muestra, obtenida de un drenaje 5 días después (6 aislados), mostraron poseer idénticos perfiles genéticos por ERIC-PCR y PFGE. La identificación por RFLP del ADNr 16S y las características bioquímicas indicaron que los aislados pertenecían a *A. veronii* bv sobria. Estos 9 aislados eran sensibles al ciprofloxacino y 7 de ellos resistentes a la ampicilina. Este hecho es interesante ya que la mayoría de cepas de *Aeromonas*, con la excepción de *A. trota*, son

resistentes a la ampicilina (Abbott y cols., 2003; Maluping y cols., 2005). También la respuesta a la cefalotina fue variable presentando 5 de los 9 aislados resistencia. Esto es llamativo ya que Abbott y cols. (2003) describen *A. veronii* bv sobria como sensible a la cefalotina y considera esta respuesta una prueba diferencial en su identificación. A partir de los resultados obtenidos en el presente estudio, dicha característica no debe ser considerada fiable para la identificación de *A. veronii* bv sobria. Además, 7 de los aislados fueron resistentes al imipenem lo que no es extraño teniendo en cuenta que previamente se había detectado en otros casos de colangitis (Clark y Chenoweth, 2003) y recientemente se ha detectado, en un estudio en Taiwán, que el 35.6% de las *Aeromonas* aisladas de pacientes con procesos cancerosos también lo eran (Tsai y cols., 2006). Las CMI (concentración mínima inhibitoria) del imipenem de 32µg/ml descendieron hasta 1µg/ml en presencia de EDTA (10mM), lo que sugería que esta resistencia estaba mediada por la presencia de una β-metalo-lactasa. Entre las β-lactamasas descritas en *A. veronii* bv sobria se incluye una β-metalo-lactasa (ImiS) descrita por Tsai y cols. (2006) que pertenece a la clase B o grupo 3 muy semejante a la CphA encontrada en *A. hydrophila* (Hernández-Valladares y cols., 2000). La ImiS es una enzima capaz de hidrolizar carbapenemos como el imipenem (Walsh y cols., 1998). En vista a los resultados obtenidos (**estudio 4.2.5**) se decidió evaluar mediante RT-PCR el papel del gen *imiS* en la resistencia al imipenem en dos aislados, uno de ellos resistente y el otro sensible observándose una mayor expresión de este gen en el aislado resistente. Esta cepa además mostraba resistencia a la cefalotina sugiriendo una sobre-expresión de la cefalosporinasa cromosómica. De echo, las tres β-lactamasas cromosómicas detectadas en *A. veronii* (cefalosporinasas, penicilinasas y carbapenemasas) se sobre-expresan simultáneamente en cepas mutantes (Walsh y cols., 1995). El hallazgo más importante de este estudio fue el hecho de que hasta la fecha no se había descrito la inducción de resistencia al imipenem *in vivo* en *A. veronii* bv sobria. En nuestro estudio se ha observado la presencia de varios aislados imipenem-sensibles y –resistentes que pertenecían al mismo clon, lo que hace sospechar que la resistencia fue inducida con el tratamiento previo con β-lactámicos utilizados durante la infección de orina que había padecido la paciente.

1. Se ha demostrado que el tipado molecular de las cepas incluidas en la definición de nuevas especies evita la inclusión de duplicados y se ha propuesto que éste sea un requisito indispensable y no una recomendación tal y como establece el Comité Internacional para la Sistemática de Procariotas.
2. Se ha comprobado que el 8.1% de las cepas de *Aeromonas* muestran variabilidad interoperónica en el gen ARNr 16S y que ésta, en la mayoría de los casos, afecta a su correcta identificación. La frecuencia observada de esta variabilidad fue significativamente mayor en las cepas clínicas de las especies *A. caviae*, *A. veronii* y *A. media* que en las ambientales.
3. Se ha propuesto que en las secuencias del gen del ARNr 16S de *Aeromonas* en las que se detecte variabilidad interoperónica, ésta se refleje en las secuencias que se depositen en las bases de datos ya que esto es esencial tanto para conocer su incidencia como para el diseño correcto de sondas específicas o de protocolos de RFLP.
4. Se ha confirmado que el gen *rpoD* permite una identificación inequívoca de *Aeromonas* a nivel de especie. Asimismo, se ha demostrado que el valor del 97% de similitud máxima interespecie sigue conservándose tras la identificación de 149 nuevas cepas analizadas en este trabajo.
5. Se ha puesto a punto la técnica de hibridación ADN-ADN, obteniéndose una reproducibilidad adecuada y comparable a la obtenida por otros autores que utilizan otros métodos.
6. En base a un estudio polifásico se han propuesto las siguientes nuevas especies para la ciencia: *Aeromonas fluvialis*, *Aeromonas taiwanensis*, *Aeromonas sanarellii*, *Aeromonas piscicola* y *Aeromonas rivuli*. Dos de ellas, *A. taiwanensis* y *A. sanarellii*, de origen clínico y *A. piscicola*, aislada de peces enfermos, con una demostrada virulencia.
7. Se ha demostrado, mediante el análisis filogenético de los genes *rpoD* y *gyrB*, que las cepas utilizadas en la descripción de la subespecie *A. hydrophila* subsp. *dhakensis* no pertenecen a *A. hydrophila*. Sin embargo, se han identificado como miembros de *A. aquariorum* representando un único taxón, por lo que ambos grupos deben ser considerados sinónimos.
8. Se ha comprobado que cepas de la especie *A. aquariorum* son capaces de producir infecciones extraintestinales y que poseen genes de diversos factores de virulencia como la

aerolisina/hemolisina, la enterotoxina citotónica termoestable y el Sistema de Secreción Tipo 3.

9. Se ha descrito un nuevo caso de síndrome urémico hemolítico producido por *Aeromonas* siendo éste el sexto de los publicados hasta la fecha y el segundo en adultos. La cepa responsable se identificó como *A. veronii* bv sobria y era portadora de genes que codifican para proteínas del Sistema de Secreción Tipo 3.
10. Se ha observado que existen cepas de *Aeromonas* de origen clínico que poseen los genes *stx*₁ y *stx*₂, que codifican para las toxinas Shiga, demostrándose por primera vez que las secuencias de estos genes presentan una elevada similitud con los genes de las variantes más patogénicas para humanos de *E. coli* productoras de toxina Shiga.
11. Se ha observado que las infecciones de heridas quirúrgicas en las que están involucradas *Aeromonas* son relativamente frecuentes y tienen una evolución más rápida que en las que no lo están, siendo las especies implicadas *A. hydrophila* y *A. veronii*.
12. Se ha descrito por primera vez la posible inducción *in vivo* de resistencia al imipenem por tratamiento antibiótico previo en cepas de *A. veronii* bv sobria aisladas de un paciente con colangitis. Se ha demostrado que esta resistencia estaba asociada con la sobre-expresión del gen *imiS* que codifica una carbapenemasa capaz de hidrolizar el imipenem.

*Cepa con patrón atípico, ¹ Existe secuencia del gen *rpoD*.

Anexo 1. Cepas de origen clínico identificadas.

Fecha	Referencia URV	Referencia hospital	Hospital	Origen	Edad	Fenotipo	RFLP ADNr 16S
05/05/2005	752c	439146	Universitario Sant Joan	Heces	2	<i>Aeromonas sp</i>	<i>A. media</i>
24/05/2005	753c	447255	Universitario Sant Joan	Heces	1	<i>Aeromonas sp</i>	<i>A. media</i>
07/06/2005	754c	452637	Universitario Sant Joan	Heces	2	<i>Aeromonas sp</i>	<i>A. trota</i> *
21/06/2005	755c	457951	Universitario Sant Joan	Heces	2	<i>Aeromonas sp</i>	<i>A. media</i>
01/07/2005	756c	461891	Universitario Sant Joan	Heces	0.6	<i>Aeromonas sp</i>	<i>A. veronii</i>
28/07/2005	757c	462485	Universitario Sant Joan	Heces	85	<i>Aeromonas sp</i>	<i>A. caviae</i>
28/07/2005	758c	464631	Universitario Sant Joan	Exudado herida	29	<i>Aeromonas sp</i>	<i>A. hydrophila</i>
28/07/2005	759c	464646	Universitario Sant Joan	Sangre	77	<i>Aeromonas sp</i>	<i>A. caviae</i>
16/09/2005	760c	483039	Universitario Sant Joan	Heces	ND	<i>Aeromonas sp</i>	<i>A. caviae</i>
23/09/2005	761c	485198	Universitario Sant Joan	Heces	2	<i>Aeromonas sp</i>	<i>A. veronii</i>
28/10/2005	762c	82545/IV	Universitario Miguel Servet	Heces	1	<i>Aeromonas sp</i>	<i>A. caviae</i>
28/10/2005	763c	82846/IV	Universitario Miguel Servet	Heces	75	<i>Aeromonas sp</i>	<i>A. caviae</i>
28/10/2005	764c	84860/V	Universitario Miguel Servet	Heces	3	<i>Aeromonas sp</i>	<i>A. caviae</i>
28/10/2005	765c	85499/V	Universitario Miguel Servet	Heces	ND	<i>Aeromonas sp</i>	<i>A. caviae</i>
28/10/2005	766c	85510/V	Universitario Miguel Servet	Heces	8	<i>Aeromonas sp</i>	<i>A. caviae</i>
28/10/2005	767c	85800/V	Universitario Miguel Servet	Heces	32	<i>Aeromonas sp</i>	<i>A. caviae</i>
28/10/2005	768c	86369/V	Universitario Miguel Servet	Heces	45	<i>Aeromonas sp</i>	<i>A. media</i>
28/10/2005	769c	86373/V	Universitario Miguel Servet	Heces	3	<i>Aeromonas sp</i>	<i>A. caviae</i>
28/10/2005	770c	86375/V	Universitario Miguel Servet	Heces	1	<i>Aeromonas sp</i>	<i>A. caviae</i>
14/11/2005	771c	503334	Universitario Sant Joan	Heces	1	<i>Aeromonas sp</i>	<i>A. caviae</i>
21/11/2005	772c	68450/03	Universitario Miguel Servet	Heces	1	<i>A. caviae</i>	<i>A. caviae</i>
21/11/2005	773c	69795/03	Universitario Miguel Servet	Heces	1	<i>A. caviae</i>	<i>A. caviae</i>
21/11/2005	774c	75605/04	Universitario Miguel Servet	Heces	Adulto	<i>A. veronii</i> bt sobria	<i>A. veronii</i>
21/11/2005	775c	127290/10	Universitario Miguel Servet	Heces	59	<i>A. caviae</i>	<i>A. caviae</i>
21/11/2005	776c	133040/11	Universitario Miguel Servet	Heces	1	<i>A. caviae</i>	<i>A. caviae</i> *
21/11/2005	777c	133960/11	Universitario Miguel Servet	Heces	58	<i>A. caviae</i>	<i>A. caviae</i> *
21/11/2005	778c	134880/11	Universitario Miguel Servet	Heces	81	<i>A. caviae</i>	<i>A. caviae</i>

21/11/2005	779c	135300/11	Universitario Miguel Servet	Heces	35	<i>A. veronii</i> bt sobria	<i>A. veronii</i>
21/11/2005	780c	135635/11	Universitario Miguel Servet	Heces	2	<i>A. caviae</i>	<i>A. media</i>
21/11/2005	781c	135951/11	Universitario Miguel Servet	Heces	1	<i>A. caviae</i>	<i>A. caviae</i> *
21/11/2005	782c ¹	135952/11	Universitario Miguel Servet	Heces	1	<i>A. caviae</i>	<i>A. caviae</i> *
30/11/2005	783c	507108	Universitario Sant Joan	Heces	44	<i>Aeromonas</i> sp	<i>A. media</i>
02/12/2005	784	136661	Universitario Miguel Servet	Heces	81	<i>A. caviae</i>	<i>A. caviae</i>
02/12/2005	785c	137030	Universitario Miguel Servet	Heces	Pediátrico	<i>A. veronii</i> bt sobria	<i>A. veronii</i>
02/12/2005	786c ¹	137211	Universitario Miguel Servet	Heces	Adulto	<i>A. veronii</i> bt sobria	<i>A. veronii</i> *
02/12/2005	787c	137900	Universitario Miguel Servet	Heces	12	<i>A. caviae</i>	<i>A. caviae</i>
02/12/2005	788c	138349	Universitario Miguel Servet	Heces	1	<i>A. hydrophila</i>	<i>A. veronii</i>
02/12/2005	789c	138378	Universitario Miguel Servet	Heces	1	<i>A. caviae</i>	<i>A. caviae</i>
02/12/2005	790c	139150	Universitario Miguel Servet	Heces	87	<i>A. caviae</i>	<i>A. caviae</i>
02/12/2005	791c	139559	Universitario Miguel Servet	Heces	1	<i>A. hydrophila</i>	<i>A. veronii</i>
02/12/2005	792c	136460	Universitario Miguel Servet	Heces	1	<i>A. caviae</i>	<i>A. caviae</i> *
02/12/2005	793c	139133	Universitario Miguel Servet	Heces	1	<i>A. caviae</i>	<i>A. caviae</i> *
02/12/2005	794c	139886	Universitario Miguel Servet	Heces	1	<i>A. caviae</i>	<i>A. caviae</i>
02/12/2005	795c	139907	Universitario Miguel Servet	Heces	68	<i>A. caviae</i>	<i>A. caviae</i>
02/12/2005	796c	140675	Universitario Miguel Servet	Heces	1	<i>A. caviae</i>	<i>A. caviae</i>
02/12/2005	797c	141447	Universitario Miguel Servet	Heces	1	<i>A. caviae</i>	<i>A. caviae</i>
02/12/2005	798c	141624	Universitario Miguel Servet	Heces	0.10	<i>A. caviae</i>	<i>A. caviae</i>
02/12/2005	799c	141651	Universitario Miguel Servet	Heces	0.6	<i>A. caviae</i>	<i>A. caviae</i>
02/12/2005	800c	141987	Universitario Miguel Servet	Heces	1	<i>A. caviae</i>	<i>A. caviae</i> *
02/12/2005	801c	142325	Universitario Miguel Servet	Heces	5	<i>A. caviae</i>	<i>A. caviae</i>
02/12/2005	802c	142768	Universitario Miguel Servet	Heces	38	<i>A. caviae</i>	<i>A. media</i>
02/12/2005	803c	143088	Universitario Miguel Servet	Heces	1	<i>A. veronii</i> bt sobria	<i>A. veronii</i>
02/12/2005	804c	143879	Universitario Miguel Servet	Heces	3	<i>A. caviae</i>	<i>A. caviae</i>
02/12/2005	805c	144134	Universitario Miguel Servet	Heces	0.10	<i>A. caviae</i>	<i>A. caviae</i> *
02/12/2005	806c	144500	Universitario Miguel Servet	Heces	1	<i>A. caviae</i>	<i>A. caviae</i>
02/12/2005	807c	144505	Universitario Miguel Servet	Heces	0.021	<i>A. caviae</i>	<i>A. caviae</i> *
02/12/2005	808c	145184	Universitario Miguel Servet	Heces	1	<i>A. caviae</i>	<i>A. caviae</i> *
21/12/2005	809c	145234	Universitario Miguel Servet	Heces	2	<i>Aeromonas</i> sp	<i>A. veronii</i>
02/02/2006	810c	522079	Universitario Sant Joan	Heces	1	<i>Aeromonas</i> sp	<i>A. veronii</i>

16/02/2006	811c	15026	Royo Vilanova	ND	ND	<i>A. veronii</i>	<i>A. veronii</i>
16/02/2006	812c	1185	Royo Vilanova	ND	ND	<i>A. veronii</i>	<i>A. veronii</i> *
16/02/2006	813c	1185 bis	Royo Vilanova	ND	ND	<i>A. veronii</i>	<i>A. veronii</i> *
23/02/2006	814c	53070	Universitario Sant Joan	Sangre	85	<i>Aeromonas sp</i>	<i>A. veronii</i>
21/03/2006	815c	541508	Universitario Sant Joan	Heces	ND		<i>A. veronii</i>
03/04/2006	816c	549961	Universitario Sant Joan	Heces	77	<i>Aeromonas sp</i>	<i>Pseudomona</i>
16/05/2006	817c	562818	Universitario Sant Joan	Heces	1	<i>Aeromonas sp</i>	<i>A. media</i>
02/06/2006	818c	570887/c	Universitario Sant Joan	Heces	2	<i>Aeromonas sp</i>	<i>A. hydrophila</i>
22/06/2006	819c	576710/o	Universitario Sant Joan	Orina	ND	<i>Aeromonas sp</i>	<i>A. caviae</i>
22/06/2006	820c	575787/c	Universitario Sant Joan	Heces	0.7	<i>Aeromonas sp</i>	<i>A. caviae</i>
27/07/2006	821c	577810	Universitario Sant Joan	Heces	4	<i>Aeromonas sp</i>	<i>A. caviae</i>
27/07/2006	822c	310166	Universitario Sant Joan	Heces	ND	<i>Aeromonas sp</i>	<i>A. hydrophila</i>
31/08/2006	823c	4441/c	Universitario Sant Joan	Heces	2	<i>Aeromonas sp</i>	<i>A. caviae</i>
29/09/2006	825c	6708/v	Universitario Sant Joan	Pus herida	14	<i>Aeromonas sp</i>	<i>A. hydrophila</i>
29/09/2006	826c	6611/v	Universitario Sant Joan	Bilis	82	<i>Aeromonas sp</i>	<i>A. veronii</i> *
03/10/2006	827c	IOC 251/04	Instituto Oswaldo Cruz	Heces	0.8	<i>A. caviae</i>	<i>A. caviae</i>
03/10/2006	828c	IOC 252/04	Instituto Oswaldo Cruz	Heces	45	<i>A. caviae</i>	<i>A. caviae</i>
03/10/2006	829c	IOC 253/04	Instituto Oswaldo Cruz	Heces	4	<i>A. veronii</i> bt sobria	<i>A. caviae</i>
03/10/2006	830c	IOC 254/04	Instituto Oswaldo Cruz	Heces	26	<i>A. caviae</i>	<i>A. caviae</i>
03/10/2006	831c	IOC 255/04	Instituto Oswaldo Cruz	Heces	27	<i>A. caviae</i>	<i>A. caviae</i>
03/10/2006	832c	IOC 256/04	Instituto Oswaldo Cruz	Heces	38	<i>A. caviae</i>	<i>A. caviae</i>
03/10/2006	833c	IOC 257/04	Instituto Oswaldo Cruz	Heces	3	<i>A. veronii</i> bt sobria	<i>A. caviae</i>
03/10/2006	834c	IOC 258/04	Instituto Oswaldo Cruz	Heces	0.2	<i>A. veronii</i> bt sobria	<i>A. caviae</i>
03/10/2006	835c	IOC 261/04	Instituto Oswaldo Cruz	Heces	4	<i>A. caviae</i>	<i>A. caviae</i>
03/10/2006	836c	IOC 262/04	Instituto Oswaldo Cruz	Heces	3	<i>A. caviae</i>	<i>A. caviae</i>
03/10/2006	837c	IOC 263/04	Instituto Oswaldo Cruz	Heces	62	<i>A. caviae</i>	<i>A. caviae</i>
03/10/2006	838c	IOC 265/04	Instituto Oswaldo Cruz	Heces	37	<i>A. caviae</i>	<i>A. caviae</i>
03/10/2006	839c	IOC 266/04	Instituto Oswaldo Cruz	Heces	ND	<i>A. caviae</i>	<i>A. caviae</i>
03/10/2006	840c	IOC 268/04	Instituto Oswaldo Cruz	Heces	2	<i>A. caviae</i>	<i>A. caviae</i>
03/10/2006	841c	IOC 269/04	Instituto Oswaldo Cruz	Heces	2	<i>A. caviae</i>	<i>A. caviae</i>
03/10/2006	842c	IOC 270/04	Instituto Oswaldo Cruz	Heces	3	<i>A. veronii</i> bt sobria	<i>A. media</i>
03/10/2006	843c	IOC 274/04	Instituto Oswaldo Cruz	Heces	11	<i>A. caviae</i>	<i>A. caviae</i>

03/10/2006	844c	IOC 275/04	Instituto Oswaldo Cruz	Heces	1	<i>A. caviae</i>	<i>A. caviae</i>
03/10/2006	845c	IOC 276/04	Instituto Oswaldo Cruz	Heces	22	<i>A. caviae</i>	<i>A. caviae</i> *
03/10/2006	846c	IOC 277/04	Instituto Oswaldo Cruz	Heces	1	<i>A. caviae</i>	<i>A. caviae</i>
03/10/2006	847c	IOC 279/04	Instituto Oswaldo Cruz	Heces	24	<i>A. veronii</i> bt sobria	<i>A. veronii</i> *
03/10/2006	848c	IOC 281/04	Instituto Oswaldo Cruz	Heces	2	<i>A. veronii</i> bt sobria	<i>A. veronii</i>
03/10/2006	849c	IOC 283/04	Instituto Oswaldo Cruz	Heces	32	<i>A. veronii</i> bt sobria	<i>A. caviae</i>
03/10/2006	850c	IOC 285/04	Instituto Oswaldo Cruz	Heces	32	<i>A. veronii</i> bt sobria	<i>A. veronii</i>
03/10/2006	851c	IOC 286/04	Instituto Oswaldo Cruz	Heces	22	<i>A. veronii</i> bt sobria	<i>A. caviae</i>
03/10/2006	852c	IOC 288/04	Instituto Oswaldo Cruz	Heces	72	<i>A. caviae</i>	<i>A. caviae</i>
03/10/2006	853c	IOC 292/04	Instituto Oswaldo Cruz	Heces	1	<i>A. caviae</i>	<i>A. caviae</i>
03/10/2006	854c	IOC 293/04	Instituto Oswaldo Cruz	Heces	3	<i>A. caviae</i>	<i>A. caviae</i>
03/10/2006	855c	IOC 295/04	Instituto Oswaldo Cruz	Heces	49	<i>A. caviae</i>	<i>A. caviae</i>
03/10/2006	856c	IOC 296/04	Instituto Oswaldo Cruz	Heces	9	<i>A. veronii</i> bt sobria	<i>A. caviae</i>
03/10/2006	857c	IOC 297/04	Instituto Oswaldo Cruz	Heces	54	<i>A. caviae</i>	<i>A. caviae</i>
03/10/2006	858c	IOC 299/04	Instituto Oswaldo Cruz	Heces	4	<i>A. caviae</i>	<i>A. caviae</i>
03/10/2006	859c	IOC 301/04	Instituto Oswaldo Cruz	Heces	1	<i>A. caviae</i>	<i>A. caviae</i>
03/10/2006	860c	IOC 302/04	Instituto Oswaldo Cruz	Heces	12	<i>A. caviae</i>	<i>A. caviae</i>
03/10/2006	861c	IOC 308/04	Instituto Oswaldo Cruz	Heces	1	<i>A. caviae</i>	<i>A. caviae</i>
03/10/2006	862c	IOC 314/04	Instituto Oswaldo Cruz	Heces	5	<i>A. caviae</i>	<i>A. caviae</i>
03/10/2006	863c	IOC 339/04	Instituto Oswaldo Cruz	Heces	4	<i>A. veronii</i> bt sobria	<i>A. caviae</i>
03/10/2006	864c	IOC 340/04	Instituto Oswaldo Cruz	Heces	78	<i>A. veronii</i> bt sobria	<i>A. caviae</i>
03/10/2006	865c	IOC 344/04	Instituto Oswaldo Cruz	Heces	40	<i>A. veronii</i> bt sobria	<i>A. veronii</i>
03/10/2006	655c	IOC 345/04	Instituto Oswaldo Cruz	Heces	38	<i>A. veronii</i> bt sobria	<i>A. veronii</i> *
03/10/2006	867c	IOC 346/04	Instituto Oswaldo Cruz	Heces	54	<i>A. veronii</i> bt sobria	<i>A. veronii</i> *
03/10/2006	868c	IOC 347/04	Instituto Oswaldo Cruz	Heces	14	<i>A. veronii</i> bt sobria	<i>A. veronii</i>
03/10/2006	869c	IOC 363/04	Instituto Oswaldo Cruz	Heces	1	<i>A. veronii</i> bt sobria	<i>A. caviae</i>
06/10/2006	870c	7674/v	Universitario Sant Joan	Exudado herida	84	<i>Aeromonas</i> sp	<i>A. caviae</i>
25/10/2006	871c	8594/c	Universitario Sant Joan	Heces	ND	<i>Aeromonas</i> sp	NO <i>Aeromonas</i>
20/12/2006	872c	IOC 264/04	Instituto Oswaldo Cruz	Heces	3	<i>A. media</i>	<i>A. caviae</i>
20/12/2006	873c	IOC 289/04	Instituto Oswaldo Cruz	Heces	0.2	<i>A. media</i>	<i>A. caviae</i>
20/12/2006	874c	IOC 300/04	Instituto Oswaldo Cruz	Heces	0.02	<i>A. media</i>	<i>A. caviae</i>
20/12/2006	875c	IOC 304/04	Instituto Oswaldo Cruz	Heces	1	<i>A. media</i>	<i>A. caviae</i>

20/12/2006	876c	IOC 316/04	Instituto Oswaldo Cruz	Heces	8	<i>A. media</i>	<i>A. caviae</i>
20/12/2006	877c	IOC 331/04	Instituto Oswaldo Cruz	Heces	18	<i>A. media</i>	<i>A. caviae</i>
20/12/2006	878c	IOC 309/04	Instituto Oswaldo Cruz	Heces	40	<i>A. caviae</i>	<i>A. caviae</i>
20/12/2006	879c	IOC 315/04	Instituto Oswaldo Cruz	Heces	ND	<i>A. caviae</i>	<i>A. trota</i> *
20/12/2006	880c	IOC 317/04	Instituto Oswaldo Cruz	Heces	2	<i>A. caviae</i>	<i>A. caviae</i>
20/12/2006	881c	IOC 319/04	Instituto Oswaldo Cruz	Heces	3	<i>A. caviae</i>	<i>A. caviae</i>
20/12/2006	882c	IOC 322/04	Instituto Oswaldo Cruz	Heces	1	<i>A. caviae</i>	<i>A. caviae</i>
20/12/2006	883c	IOC 324/04	Instituto Oswaldo Cruz	Heces	5	<i>A. caviae</i>	<i>A. caviae</i>
20/12/2006	884c	IOC 325/04	Instituto Oswaldo Cruz	Heces	1	<i>A. caviae</i>	<i>A. caviae</i>
20/12/2006	885c	IOC 327/04	Instituto Oswaldo Cruz	Heces	17	<i>A. caviae</i>	<i>A. caviae</i>
20/12/2006	886c	IOC 272/04	Instituto Oswaldo Cruz	Heces	72	<i>A. hydrophila</i>	<i>A. media</i>
20/12/2006	887c	IOC 284/04	Instituto Oswaldo Cruz	Heces	76	<i>A. hydrophila</i>	<i>A. hydrophila</i>
20/12/2006	888c	IOC 287/04	Instituto Oswaldo Cruz	Heces	51	<i>A. hydrophila</i>	<i>A. media</i>
20/12/2006	889c	IOC 291/04	Instituto Oswaldo Cruz	Heces	80	<i>A. hydrophila</i>	<i>A. caviae</i> *
20/12/2006	890c	IOC 313/04	Instituto Oswaldo Cruz	Heces	2	<i>A. hydrophila</i>	<i>A. hydrophila</i>
20/12/2006	891c	IOC 337/04	Instituto Oswaldo Cruz	Heces	51	<i>A. jandaei</i>	<i>A. jandaei</i>
20/12/2006	892c	IOC 356/04	Instituto Oswaldo Cruz	Heces	28	<i>A. jandaei</i>	<i>A. trota</i>
20/12/2006	893c	IOC 371/04	Instituto Oswaldo Cruz	Heces	34	<i>A. trota</i>	<i>A. trota</i> *
20/12/2006	894c	IOC 259/04	Instituto Oswaldo Cruz	Heces	54	<i>A. veronii</i> bt sobria	<i>A. veronii</i>
20/12/2006	895c	IOC 260/04	Instituto Oswaldo Cruz	Heces	37	<i>A. veronii</i> bt sobria	<i>A. veronii</i>
20/12/2006	896c	IOC 278/04	Instituto Oswaldo Cruz	Heces	20	<i>A. veronii</i> bt sobria	<i>A. caviae</i>
20/12/2006	897c	IOC 282/04	Instituto Oswaldo Cruz	Heces	23	<i>A. veronii</i> bt sobria	<i>A. veronii</i>
20/12/2006	898c	IOC 298/04	Instituto Oswaldo Cruz	Heces	19	<i>A. veronii</i> bt sobria	<i>A. veronii</i>
20/12/2006	899c	IOC 305/04	Instituto Oswaldo Cruz	Heces	38	<i>A. veronii</i> bt sobria	<i>A. trota</i> *
20/12/2006	900c	IOC 335/04	Instituto Oswaldo Cruz	Heces	49	<i>A. veronii</i> bt sobria	<i>A. caviae</i>
20/12/2006	901c	IOC 367/04	Instituto Oswaldo Cruz	Heces	ND	<i>A. veronii</i> bt sobria	<i>A. veronii</i> *
20/12/2006	902c	3103238	Universitario Sant Joan	Heces	4	<i>Aeromonas spp</i>	<i>A. caviae</i> *
17/01/2007	903c	45014	Joan XXIII	ND	ND	<i>A. hydrophila</i>	<i>A. caviae</i>
17/01/2007	904c	41961	Joan XXIII	ND	ND	<i>A. hydrophila</i>	<i>A. veronii</i>
24/01/2007	905c ¹	15376/c	Universitario Sant Joan	Heces	1	<i>Aeromonas sp</i>	<i>A. veronii</i>
14/03/2007	906c	19766	Universitario Sant Joan	Heces	28	<i>Aeromonas sp</i>	<i>A. veronii</i>
03/04/2007	907c	22185	Universitario Sant Joan	Heces	81	<i>Aeromonas sp</i>	<i>A. caviae</i>

11/05/2007	908c	25741/c	Universitario Sant Joan	Heces	27	<i>Aeromonas sp</i>	<i>A. veronii</i>
22/05/2007	909c	25969/v	Universitario Sant Joan	Exudado herida	50	<i>Aeromonas sp</i>	<i>A. veronii</i>
13/07/2007	910c	30343/c	Universitario Sant Joan	Heces	62	<i>Aeromonas sp</i>	<i>A. veronii</i>
13/07/2007	911c	29412/c	Universitario Sant Joan	Heces	42	<i>Aeromonas sp</i>	<i>A. caviae</i>
01/08/2007	913c	32897/c	Universitario Sant Joan	Heces	90	<i>Aeromonas sp</i>	<i>A. caviae</i>
28/08/2007	914c	34135/c	Universitario Sant Joan	Heces	80	<i>Aeromonas sp</i>	<i>A. veronii</i>
28/08/2007	915c	34098/c	Universitario Sant Joan	Heces	5	<i>Aeromonas sp</i>	<i>A. veronii</i>
30/08/2007	916c	35533/v	Universitario Sant Joan	SSI	82	<i>Aeromonas sp</i>	<i>A. veronii</i>
26/09/2007	917c	39283	Universitario Sant Joan	Heces	71	<i>Aeromonas sp</i>	<i>A. veronii</i>
26/09/2007	918c	38761	Universitario Sant Joan	Heces	Adulto	<i>Aeromonas sp</i>	<i>A. veronii</i>
04/12/2007	919c	43324/c	Universitario Sant Joan	Heces	54	<i>Aeromonas sp</i>	<i>A. hydrophila</i>
21/12/2007	920c	44749/c	Universitario Sant Joan	Heces	1	<i>Aeromonas sp</i>	<i>A. caviae</i> *
19/02/2008	921c	4333/c	Universitario Sant Joan	Heces	78	<i>Aeromonas sp</i>	<i>A. caviae</i>
19/02/2008	922c	2933/c	Universitario Sant Joan	Heces	2	<i>Aeromonas sp</i>	<i>A. caviae</i> *
07/03/2008	923c	68711/c	Joan XXIII	Heces	1	<i>A. hydrophila</i>	<i>A. caviae</i>
07/03/2008	924c	68688/c	Joan XXIII	Heces	5	<i>A. hydrophila</i>	<i>A. caviae</i>
07/03/2008	925c	68684/c	Joan XXIII	Heces	1	<i>A. hydrophila</i>	<i>A. caviae</i>
07/03/2008	926c	68667/c	Joan XXIII	Heces	1	<i>A. hydrophila</i>	NO <i>Aeromonas</i>
07/03/2008	927c	69640/c	Joan XXIII	Heces	36	<i>A. hydrophila</i>	<i>A. media</i>
07/03/2008	928c	68711/c II	Joan XXIII	Heces	1	<i>A. hydrophila</i>	<i>A. caviae</i>
24/04/2008	929c	8747/an	Universitario Sant Joan	Sangre	84	<i>Aeromonas sp</i>	<i>A. caviae</i>
27/05/2008	930c	13716/o	Universitario Sant Joan	SSI	59	<i>Aeromonas sp</i>	<i>A. caviae</i>
27/05/2008	931c	11987/c	Universitario Sant Joan	Orina	60	<i>Aeromonas sp</i>	<i>A. media</i>
25/06/2008	932c	A11	Universitario Guadalajara	Heces	2	<i>A. caviae</i>	NO <i>Aeromonas</i>
25/06/2008	933c	A14	Universitario Guadalajara	Heces	ND	<i>A. caviae</i>	<i>A. caviae</i>
25/06/2008	934c	A17	Universitario Guadalajara	Heces	ND	<i>A. caviae</i>	<i>A. caviae</i>
25/06/2008	935c	A19	Universitario Guadalajara	Heces	ND	<i>A. caviae</i>	<i>A. caviae</i>
25/06/2008	936c	A22	Universitario Guadalajara	Heces	ND	<i>A. caviae</i>	<i>A. caviae</i>
25/06/2008	937c	A26	Universitario Guadalajara	Heces	ND	<i>A. caviae</i>	<i>A. caviae</i>
25/06/2008	938c	A3	Universitario Guadalajara	Heces	ND	<i>A. caviae</i>	<i>A. caviae</i>
25/06/2008	939c	A5	Universitario Guadalajara	Heces	ND	<i>A. caviae</i>	<i>A. caviae</i>
25/06/2008	940c	A2	Universitario Guadalajara	Heces	ND	<i>A. hydrophila</i>	<i>A. caviae</i>

25/06/2008	941c	A25	Universitario Guadalajara	Heces	ND	<i>A. hydrophila</i>	<i>A. veronii</i>
25/06/2008	942c	A4	Universitario Guadalajara	Heces	ND	<i>A. hydrophila</i>	<i>A. caviae</i>
25/06/2008	943c	A8	Universitario Guadalajara	Heces	ND	<i>A. hydrophila</i>	<i>A. veronii</i>
25/06/2008	944c	A9	Universitario Guadalajara	Heces	ND	<i>A. hydrophila</i>	<i>A. caviae</i>
25/06/2008	945c	AD23	Universitario Guadalajara	Heces	ND	<i>A. hydrophila</i>	<i>A. hydrophila</i>
25/06/2008	946c	AG50	Universitario Guadalajara	Heces	ND	<i>A. hydrophila</i>	<i>A. bestiarum</i>
25/06/2008	947c	AH90	Universitario Guadalajara	Heces	ND	<i>A. hydrophila</i>	<i>A. salmonicida</i>
25/06/2008	948c	AI10	Universitario Guadalajara	Heces	ND	<i>A. hydrophila</i>	<i>A. hydrophila</i>
25/06/2008	949c	AI14	Universitario Guadalajara	Heces	ND	<i>A. hydrophila</i>	<i>A. hydrophila</i>
25/06/2008	950c	AI52	Universitario Guadalajara	Heces	ND	<i>A. hydrophila</i>	<i>A. hydrophila</i>
25/06/2008	951c	AI64	Universitario Guadalajara	Heces	ND	<i>A. hydrophila</i>	<i>A. caviae</i>
25/06/2008	952c	AL80	Universitario Guadalajara	Heces	ND	<i>A. hydrophila</i>	<i>A. hydrophila</i>
25/06/2008	953c	AA47	Universitario Guadalajara	Sangre	ND	<i>A. sobria</i>	<i>A. veronii</i>
25/06/2008	954c	AA48	Universitario Guadalajara	Heces	ND	<i>A. sobria</i>	<i>A. veronii</i>
25/06/2008	955c	AA100	Universitario Guadalajara	Heces	ND	<i>A. sobria</i>	<i>A. veronii</i>
25/06/2008	956c	AB94	Universitario Guadalajara	Heces	ND	<i>A. sobria</i>	<i>A. veronii</i>
25/06/2008	957c	AC66	Universitario Guadalajara	Heces	ND	<i>A. sobria</i>	<i>A. veronii</i>
25/06/2008	958c	AC87	Universitario Guadalajara	Heces	ND	<i>A. sobria</i>	<i>A. veronii</i> *
25/06/2008	959c	AE100	Universitario Guadalajara	Heces	ND	<i>A. sobria</i>	<i>A. veronii</i> *
25/06/2008	960c	AE38	Universitario Guadalajara	Heces	ND	<i>A. sobria</i>	<i>A. veronii</i>
25/06/2008	961c	AE42	Universitario Guadalajara	Heces	ND	<i>A. sobria</i>	<i>A. veronii</i>
25/06/2008	962c	AE48	Universitario Guadalajara	Heces	ND	<i>A. sobria</i>	<i>A. veronii</i>
25/06/2008	963c	AE51	Universitario Guadalajara	Heces	ND	<i>A. sobria</i>	<i>A. veronii</i>
25/06/2008	964c	AE63	Universitario Guadalajara	Heces	ND	<i>A. sobria</i>	<i>A. caviae</i>
25/06/2008	965c	AA79	Universitario Guadalajara	Espuito	ND	<i>A. veronii</i>	<i>A. veronii</i>
16/07/2008	966c	17207/AE	Universitario Sant Joan	Sangre	67	<i>Aeromonas sp</i>	No <i>Aeromonas</i>
22/07/2008	967c	18760/c	Universitario Sant Joan	Heces	7	<i>Aeromonas sp</i>	<i>A. veronii</i>
25/07/2008	968c	19673/v	Universitario Sant Joan	Aspirado bronquial	81	<i>Aeromonas sp</i>	<i>A. hydrophila</i>
07/08/2008	969c	20709/c	Universitario Sant Joan	Heces	1	<i>Aeromonas sp</i>	<i>A. caviae</i>
19/08/2008	970c	21177/c	Universitario Sant Joan	Heces	ND	<i>Aeromonas sp</i>	<i>A. caviae</i>
02/09/2008	971c	22577/an	Universitario Sant Joan	Sangre	61	<i>Aeromonas sp</i>	<i>A. hydrophila</i>
09/09/2008	972c	23515/c	Universitario Sant Joan	Heces	1	<i>Aeromonas sp</i>	<i>A. veronii</i>

01/10/2008	973c	24787/c	Universitario Sant Joan	Heces	8	<i>Aeromonas sp</i>	<i>A. caviae</i>
01/10/2008	974c	24746/C	Universitario Sant Joan	Heces	61	<i>Aeromonas sp</i>	<i>A. hydrophila</i>
09/10/2008	975c	24073/v	Universitario Sant Joan	Exudado herida	19	<i>Aeromonas sp</i>	<i>A. hydrophila</i>
14/10/2008	976c	26325/c	Universitario Sant Joan	Heces	66	<i>Aeromonas sp</i>	<i>A. veronii</i>
22/10/2008	977c	27680/c	Universitario Sant Joan	Heces	31	<i>Aeromonas sp</i>	<i>A. caviae*</i>
04/11/2008	978c	28387/c	Universitario Sant Joan	Heces	0.9	<i>Aeromonas sp</i>	<i>A. veronii</i>
11/11/2008	979c	28876/v	Universitario Sant Joan	Exudado herida	57	<i>Aeromonas sp</i>	<i>A. caviae</i>

Universitario Sant Joan, Reus (España); Universitario Miguel Servet, Zaragoza (España); Royo Vilanova, Zaragoza (España); Instituto Oswaldo Cruz, Río de Janeiro (Brasil); Joan XXIII, Tarragona (España); Universitario de Guadalajara, Guadalajara (España)

Anexo 2. Cepas de origen animal identificadas.

Fecha	Cepa	Enviadas por	Centro	Origen del aislamiento	Fenotipo	RFLP ADN τ 16S
27/07/2006	616C	M ^a Cristina Ossiprandi	Università degli Studi di Parma	Exudado absceso de hígado bovino	<i>A. hydrophila</i>	<i>A. veronii</i> *
28/07/2006	701/H	M ^a Cristina Ossiprandi	Università degli Studi di Parma	Exudado absceso de hígado bovino	<i>A. hydrophila</i>	<i>A. allosaccharophila</i>
29/07/2006	302/B6	M ^a Cristina Ossiprandi	Università degli Studi di Parma	Exudado absceso de hígado bovino	<i>Aeromonas</i> spp.	<i>A. bestiarum/A. salmonicida</i>
30/07/2006	302/89 ¹	M ^a Cristina Ossiprandi	Università degli Studi di Parma	Exudado absceso de hígado bovino	<i>A. hydrophila</i>	<i>A. media</i> *
31/07/2006	206/Gb	M ^a Cristina Ossiprandi	Università degli Studi di Parma	Exudado absceso de hígado bovino	<i>Aeromonas</i> spp.	<i>A. eucrenophila</i>
01/08/2006	701/B2	M ^a Cristina Ossiprandi	Università degli Studi di Parma	Exudado absceso de hígado bovino	<i>Aeromonas</i> spp.	<i>A. media</i>
02/08/2006	701/G	M ^a Cristina Ossiprandi	Università degli Studi di Parma	Exudado absceso de hígado bovino	<i>A. hydrophila</i>	<i>A. veronii</i>
07/09/2006	316/A	M ^a Cristina Ossiprandi	Università degli Studi di Parma	Exudado absceso de hígado bovino	<i>Aeromonas</i> spp.	<i>A. salmonicida</i>
08/09/2006	316/E	M ^a Cristina Ossiprandi	Università degli Studi di Parma	Exudado absceso de hígado bovino	<i>A. hydrophila</i>	<i>A. salmonicida</i>
10/09/2006	616L	M ^a Cristina Ossiprandi	Università degli Studi di Parma	Exudado absceso de hígado bovino	<i>A. hydrophila</i>	<i>A. veronii</i>
11/09/2006	12It	M ^a Cristina Ossiprandi	Università degli Studi di Parma	Exudado absceso de hígado bovino	<i>A. hydrophila</i>	<i>A. veronii</i>
12/09/2006	701/Ib	M ^a Cristina Ossiprandi	Università degli Studi di Parma	Exudado absceso de hígado bovino	<i>A. hydrophila</i>	<i>A. veronii</i>
13/09/2006	701G	M ^a Cristina Ossiprandi	Università degli Studi di Parma	Exudado absceso de hígado bovino	<i>A. hydrophila</i>	<i>A. veronii</i>
01/10/2007	R1	Dr. Jesús Romalde	U. Santiago de Compostela	Salmón	<i>Aeromonas</i> spp.	<i>A. media</i>
01/10/2007	R3	Dr. Jesús Romalde	U. Santiago de Compostela	Lamprea	<i>Aeromonas</i> spp.	Patron común
01/10/2007	R4 ¹	Dr. Jesús Romalde	U. Santiago de Compostela	Salmón	<i>A. hydrophila</i>	Patron común
01/10/2007	R5 ¹	Dr. Jesús Romalde	U. Santiago de Compostela	Lamprea	<i>A. hydrophila</i>	Patron común
01/10/2007	R6 ¹	Dr. Jesús Romalde	U. Santiago de Compostela	Boga	<i>A. hydrophila</i>	<i>A. media/A. veronii</i>
01/10/2007	R7	Dr. Jesús Romalde	U. Santiago de Compostela	Rodaballo	<i>A. hydrophila</i>	<i>A. hydrophila</i>
01/10/2007	R8	Dr. Jesús Romalde	U. Santiago de Compostela	ND	<i>A. media</i>	<i>A. media</i>
01/10/2007	R9 ¹	Dr. Jesús Romalde	U. Santiago de Compostela	Trucha	<i>A. veronii</i>	Patron común
01/10/2007	R10	Dr. Jesús Romalde	U. Santiago de Compostela	Trucha	<i>Aeromonas</i> spp.	<i>A. sobria</i>
01/10/2007	R14	Dr. Jesús Romalde	U. Santiago de Compostela	Trucha	<i>A. hydrophila</i>	<i>A. sobria</i>
01/10/2007	R16	Dr. Jesús Romalde	U. Santiago de Compostela	Trucha	<i>A. sobria</i>	<i>A. sobria</i>
01/10/2007	R20	Dr. Jesús Romalde	U. Santiago de Compostela	Trucha	<i>A. salmonicida</i> subsp. <i>salmonicida</i>	<i>A. salmonicida</i>
01/10/2007	R21	Dr. Jesús Romalde	U. Santiago de Compostela	Salmón	<i>A. salmonicida</i> subsp. <i>salmonicida</i>	<i>A. salmonicida</i>
01/10/2007	R23	Dr. Jesús Romalde	U. Santiago de Compostela	Rodaballo	<i>A. salmonicida</i> subsp. <i>salmonicida</i>	<i>A. salmonicida</i>
01/10/2007	R24	Dr. Jesús Romalde	U. Santiago de Compostela	Rodaballo	<i>A. salmonicida</i> subsp. <i>salmonicida</i>	<i>A. salmonicida</i>
01/10/2007	R25	Dr. Jesús Romalde	U. Santiago de Compostela	Rodaballo	<i>A. salmonicida</i> subsp. <i>salmonicida</i>	<i>A. salmonicida</i>
01/10/2007	R26	Dr. Jesús Romalde	U. Santiago de Compostela	Trucha	<i>A. hydrophila</i>	<i>A. sobria</i>
01/10/2007	R27 ¹	Dr. Jesús Romalde	U. Santiago de Compostela	Trucha	<i>A. hydrophila</i>	<i>Aeromonas</i> spp.
01/10/2007	R29	Dr. Jesús Romalde	U. Santiago de Compostela	Almeja japonesa	<i>A. salmonicida</i> subsp. <i>pectinolitica</i>	<i>A. salmonicida</i>

01/10/2007	R30	Dr. Jesús Romalde	U. Santiago de Compostela	Almeja japonesa	<i>A. salmonicida</i> subsp. <i>pectinolitica</i>	<i>A. salmonicida</i>
15/10/2007	R54 ¹	Dr. Jesús Romalde	U. Santiago de Compostela	Lamprea	<i>A. hydrophila</i>	Patron común
15/10/2007	R55	Dr. Jesús Romalde	U. Santiago de Compostela	Salmón	<i>A. hydrophila</i>	<i>A. bestiarum</i>
15/10/2007	R56	Dr. Jesús Romalde	U. Santiago de Compostela	Salmón	<i>A. hydrophila</i>	<i>A. sobria</i>
15/10/2007	R57	Dr. Jesús Romalde	U. Santiago de Compostela	Salmón	<i>A. hydrophila</i>	<i>A. bestiarum</i>
15/10/2007	R58 ¹	Dr. Jesús Romalde	U. Santiago de Compostela	Salmón	<i>A. hydrophila</i>	Patron común
15/10/2007	R59	Dr. Jesús Romalde	U. Santiago de Compostela	Dorosoma cepedianum	<i>A. hydrophila</i>	<i>A. sobria</i>
15/10/2007	R60	Dr. Jesús Romalde	U. Santiago de Compostela	ND	<i>A. hydrophila</i>	<i>A. hydrophila</i>
15/10/2007	R61	Dr. Jesús Romalde	U. Santiago de Compostela	Trucha	<i>A. hydrophila</i>	<i>A. sobria</i>
15/10/2007	R62 ¹	Dr. Jesús Romalde	U. Santiago de Compostela	Salmón	<i>A. hydrophila</i>	Patron común
15/10/2007	R63	Dr. Jesús Romalde	U. Santiago de Compostela	Salmón	<i>A. hydrophila</i>	<i>Aeromonas</i> spp.
15/10/2007	R64 ¹	Dr. Jesús Romalde	U. Santiago de Compostela	Trucha	<i>A. hydrophila</i>	Patron común
15/10/2007	R65	Dr. Jesús Romalde	U. Santiago de Compostela	Trucha	<i>A. hydrophila</i>	<i>A. hydrophila</i>
15/10/2007	R66	Dr. Jesús Romalde	U. Santiago de Compostela	Trucha	<i>A. hydrophila</i>	<i>A. hydrophila</i>
15/10/2007	R67 ¹	Dr. Jesús Romalde	U. Santiago de Compostela	Rodaballo	<i>A. hydrophila</i>	Patron común
15/10/2007	R68	Dr. Jesús Romalde	U. Santiago de Compostela	Salmón	<i>A. hydrophila</i>	<i>A. eucrenophila</i>
15/10/2007	R69	Dr. Jesús Romalde	U. Santiago de Compostela	Trucha	<i>A. hydrophila</i>	<i>A. sobria</i>
15/10/2007	R70	Dr. Jesús Romalde	U. Santiago de Compostela	Trucha	<i>A. hydrophila</i>	<i>A. sobria</i>
15/10/2007	R71	Dr. Jesús Romalde	U. Santiago de Compostela	Trucha	<i>A. hydrophila</i>	<i>A. hydrophila</i>
15/10/2007	R72	Dr. Jesús Romalde	U. Santiago de Compostela	Trucha	<i>A. hydrophila</i>	Patron común
15/10/2007	R73	Dr. Jesús Romalde	U. Santiago de Compostela	Trucha	<i>A. hydrophila</i>	<i>A. sobria</i>
15/10/2007	R74	Dr. Jesús Romalde	U. Santiago de Compostela	Salmón	<i>A. hydrophila</i>	<i>A. hydrophila</i>
15/10/2007	R75	Dr. Jesús Romalde	U. Santiago de Compostela	Lamprea	<i>A. hydrophila</i>	<i>A. eucrenophila</i>
15/10/2007	R76	Dr. Jesús Romalde	U. Santiago de Compostela	Salmón	<i>A. hydrophila</i>	<i>A. sobria</i>
15/10/2007	R77	Dr. Jesús Romalde	U. Santiago de Compostela	Lamprea	<i>A. hydrophila</i>	Patron común
15/10/2007	R78	Dr. Jesús Romalde	U. Santiago de Compostela	ND	<i>A. hydrophila</i>	<i>A. media</i>
15/10/2007	R79	Dr. Jesús Romalde	U. Santiago de Compostela	Lamprea	<i>A. hydrophila</i>	Patron común
15/10/2007	R80	Dr. Jesús Romalde	U. Santiago de Compostela	Salmón	<i>A. hydrophila</i>	Patron común
15/10/2007	R81a	Dr. Jesús Romalde	U. Santiago de Compostela	Tilapia	<i>A. hydrophila</i>	<i>A. sobria</i>
15/10/2007	R81b	Dr. Jesús Romalde	U. Santiago de Compostela	Tilapia	<i>A. hydrophila</i>	<i>A. hydrophila</i>
15/10/2007	R81c	Dr. Jesús Romalde	U. Santiago de Compostela	Tilapia	<i>A. hydrophila</i>	<i>A. sobria</i>
15/10/2007	R82	Dr. Jesús Romalde	U. Santiago de Compostela	Trucha	<i>A. hydrophila</i>	<i>A. sobria</i>
15/10/2007	R83	Dr. Jesús Romalde	U. Santiago de Compostela	Trucha	<i>A. hydrophila</i>	<i>A. sobria</i>
15/10/2007	R84	Dr. Jesús Romalde	U. Santiago de Compostela	ND	<i>Aeromonas</i> spp.	No <i>Aeromonas</i>
15/10/2007	R85	Dr. Jesús Romalde	U. Santiago de Compostela	ND	<i>Aeromonas</i> spp.	No <i>Aeromonas</i>

15/10/2007	R86	Dr. Jesús Romalde	U. Santiago de Compostela	ND	<i>Aeromonas</i> spp.	No <i>Aeromonas</i>
15/10/2007	R87	Dr. Jesús Romalde	U. Santiago de Compostela	ND	<i>Aeromonas</i> spp.	No <i>Aeromonas</i>
15/10/2007	R88	Dr. Jesús Romalde	U. Santiago de Compostela	ND	<i>Aeromonas</i> spp.	No <i>Aeromonas</i>
15/10/2007	R89	Dr. Jesús Romalde	U. Santiago de Compostela	ND	<i>Aeromonas</i> spp.	No <i>Aeromonas</i>
15/10/2007	R90	Dr. Jesús Romalde	U. Santiago de Compostela	Salmón	<i>A. salmonicida</i>	<i>A. salmonicida</i>
15/10/2007	R91	Dr. Jesús Romalde	U. Santiago de Compostela	Trucha	<i>A. hydrophila</i>	<i>A. salmonicida</i>
15/10/2007	R92	Dr. Jesús Romalde	U. Santiago de Compostela	Trucha	<i>A. hydrophila</i>	Patron común
15/10/2007	R93	Dr. Jesús Romalde	U. Santiago de Compostela	ND	<i>A. hydrophila</i>	Patron común
15/10/2007	R94	Dr. Jesús Romalde	U. Santiago de Compostela	ND	<i>A. hydrophila</i>	<i>A. hydrophila</i>
15/10/2007	R95	Dr. Jesús Romalde	U. Santiago de Compostela	Trucha	<i>A. hydrophila</i>	<i>A. sobria</i>
15/10/2007	R96	Dr. Jesús Romalde	U. Santiago de Compostela	Trucha	<i>A. hydrophila</i>	<i>A. sobria</i>
15/10/2007	R97	Dr. Jesús Romalde	U. Santiago de Compostela	Trucha	<i>A. hydrophila</i>	<i>A. hydrophila/A. media</i>
15/10/2007	R98	Dr. Jesús Romalde	U. Santiago de Compostela	Salmón	<i>A. hydrophila</i>	<i>A. hydrophila</i>
15/10/2007	R99	Dr. Jesús Romalde	U. Santiago de Compostela	Trucha	<i>A. hydrophila</i>	<i>A. sobria</i>
15/10/2007	R100	Dr. Jesús Romalde	U. Santiago de Compostela	Trucha	<i>A. hydrophila</i>	<i>A. hydrophila/A. media</i>
15/10/2007	R101	Dr. Jesús Romalde	U. Santiago de Compostela	Rodaballo	<i>A. hydrophila</i>	<i>A. hydrophila</i>
15/10/2007	R102	Dr. Jesús Romalde	U. Santiago de Compostela	Salmón	<i>A. salmonicida</i>	<i>A. salmonicida</i>
15/10/2007	R103	Dr. Jesús Romalde	U. Santiago de Compostela	ND	<i>A. salmonicida</i>	<i>A. salmonicida</i>
15/10/2007	R104	Dr. Jesús Romalde	U. Santiago de Compostela	ND	<i>Aeromonas</i> spp.	No <i>Aeromonas</i>
15/10/2007	R105	Dr. Jesús Romalde	U. Santiago de Compostela	ND	<i>Aeromonas</i> spp.	No <i>Aeromonas</i>
15/10/2007	R106	Dr. Jesús Romalde	U. Santiago de Compostela	ND	<i>Aeromonas</i> spp.	No <i>Aeromonas</i>
15/10/2007	R107	Dr. Jesús Romalde	U. Santiago de Compostela	ND	<i>Aeromonas</i> spp.	No <i>Aeromonas</i>
15/10/2007	R108	Dr. Jesús Romalde	U. Santiago de Compostela	Salmón	<i>A. salmonicida</i>	<i>A. salmonicida</i>
15/10/2007	R109	Dr. Jesús Romalde	U. Santiago de Compostela	Trucha	<i>A. sobria</i>	<i>A. sobria</i>
15/10/2007	R110	Dr. Jesús Romalde	U. Santiago de Compostela	ND	<i>Aeromonas</i> spp.	No <i>Aeromonas</i>
15/10/2007	R111	Dr. Jesús Romalde	U. Santiago de Compostela	ND	<i>Aeromonas</i> spp.	No <i>Aeromonas</i>
15/10/2007	R112	Dr. Jesús Romalde	U. Santiago de Compostela	ND	<i>A. salmonicida</i>	<i>A. salmonicida</i>
15/10/2007	R113	Dr. Jesús Romalde	U. Santiago de Compostela	ND	<i>A. salmonicida</i>	<i>A. salmonicida</i>
15/10/2007	R114	Dr. Jesús Romalde	U. Santiago de Compostela	ND	<i>Aeromonas</i> spp.	No <i>Aeromonas</i>
15/10/2007	R115	Dr. Jesús Romalde	U. Santiago de Compostela	ND	<i>Aeromonas</i> spp.	No <i>Aeromonas</i>
15/10/2007	R116	Dr. Jesús Romalde	U. Santiago de Compostela	ND	<i>Aeromonas</i> spp.	<i>A. salmonicida</i>
15/10/2007	R117	Dr. Jesús Romalde	U. Santiago de Compostela	ND	<i>A. salmonicida</i>	<i>A. salmonicida</i>
15/10/2007	R118	Dr. Jesús Romalde	U. Santiago de Compostela	ND	<i>Aeromonas</i> spp.	No <i>Aeromonas</i>
15/10/2007	R119	Dr. Jesús Romalde	U. Santiago de Compostela	ND	<i>Aeromonas</i> spp.	No <i>Aeromonas</i>
30/11/2005	A138/03	Dr. Jens Teifke	Friedrich Loeffler Institut	Glándulas de la sal de pato	<i>A. hydrophila</i>	<i>A. hydrophila</i>

30/11/2005	A40/04.1	Dr. Jens Teifke	Friedrich Loeffler Institut	Bacteriemia en una pitón reticulada	<i>A. hydrophila</i>	<i>A. bestiarum</i>
30/11/2005	A40/04.2	Dr. Jens Teifke	Friedrich Loeffler Institut	Bacteriemia en una pitón reticulada	<i>A. hydrophila</i>	<i>A. hydrophila</i>
30/11/2005	A7173/04	Dr. Jens Teifke	Friedrich Loeffler Institut	Grulla muerta	<i>A. hydrophila</i>	<i>A. bestiarum</i>
30/11/2005	A138/05	Dr. Jens Teifke	Friedrich Loeffler Institut	Corazón de buho	<i>A. hydrophila</i>	<i>A. bestiarum</i>
30/11/2005	A129/00.1	Dr. Jens Teifke	Friedrich Loeffler Institut	Bazo de cerdo	<i>A. caviae</i>	<i>A. caviae</i>
30/11/2005	A78/04.1	Dr. Jens Teifke	Friedrich Loeffler Institut	Becerro	<i>A. hydrophila</i>	<i>A. bestiarum/A. salmonicida</i>
30/11/2005	A78/04.2	Dr. Jens Teifke	Friedrich Loeffler Institut	Becerro	<i>A. hydrophila</i>	<i>A. bestiarum/A. salmonicida</i>
30/11/2005	A227/1/00	Dr. Jens Teifke	Friedrich Loeffler Institut	Amnion jabalí	<i>A. hydrophila</i>	<i>A. bestiarum/A. salmonicida</i>
30/11/2005	A02/00	Dr. Jens Teifke	Friedrich Loeffler Institut	Endometrio de jabalí	<i>A. hydrophila</i>	<i>A. bestiarum/A. salmonicida</i>
30/11/2005	A129/00.2	Dr. Jens Teifke	Friedrich Loeffler Institut	Pulmón de cerdo	<i>A. hydrophila</i>	<i>A. media</i>
30/11/2005	A227/3700	Dr. Jens Teifke	Friedrich Loeffler Institut	Feto de cerdo	<i>A. hydrophila</i>	<i>A. bestiarum/A. salmonicida</i>
30/11/2005	A59/02	Dr. Jens Teifke	Friedrich Loeffler Institut	Lechón muerto	<i>A. hydrophila</i>	<i>A. bestiarum/A. salmonicida</i>
30/11/2005	A100/02	Dr. Jens Teifke	Friedrich Loeffler Institut	Raya común	<i>A. sobria</i>	<i>A. sobria</i>
30/11/2005	A62/03	Dr. Jens Teifke	Friedrich Loeffler Institut	Bacteriemia en un lechón	<i>A. hydrophila</i>	<i>A. bestiarum</i>
30/11/2005	A180/04	Dr. Jens Teifke	Friedrich Loeffler Institut	Pulmón de oveja	<i>A. hydrophila</i>	<i>A. bestiarum</i>
30/11/2005	Uni37	Dr. Jens Teifke	Friedrich Loeffler Institut	Pez carbonero	<i>A. hydrophila</i>	<i>A. sobria</i>
30/11/2005	Uni38	Dr. Jens Teifke	Friedrich Loeffler Institut	Pez carbonero	<i>A. hydrophila</i>	<i>A. bestiarum/A. salmonicida</i>
16/11/2004	CVM13880	Dr. Ron A. Miller	Center of Veterinary Medicine	Trucha	<i>A. salmonicida</i> subsp <i>salmonicida</i>	<i>A. salmonicida</i>
16/11/2004	CVM18887	Dr. Ron A. Miller	Center of Veterinary Medicine	Salmón atlántico	<i>A. salmonicida</i>	<i>A. salmonicida</i>
16/11/2004	CVM18888	Dr. Ron A. Miller	Center of Veterinary Medicine	ND	<i>A. salmonicida</i> subsp <i>salmonicida</i>	<i>A. salmonicida</i>
16/11/2004	CVM18889	Dr. Ron A. Miller	Center of Veterinary Medicine	Trucha marrón	<i>A. salmonicida</i> subsp <i>salmonicida</i>	<i>A. salmonicida</i>
16/11/2004	CVM18890	Dr. Ron A. Miller	Center of Veterinary Medicine	Trucha marrón	<i>A. salmonicida</i> subsp <i>salmonicida</i>	<i>A. salmonicida</i>
16/11/2004	CVM18893	Dr. Ron A. Miller	Center of Veterinary Medicine	Trucha arcoiris	<i>A. salmonicida</i>	<i>A. salmonicida</i>
16/11/2004	CVM18894	Dr. Ron A. Miller	Center of Veterinary Medicine	Salmón rojo	<i>A. salmonicida</i> subsp <i>salmonicida</i>	<i>A. salmonicida</i>
16/11/2004	CVM18895	Dr. Ron A. Miller	Center of Veterinary Medicine	Lucio tigre	<i>A. salmonicida</i> subsp <i>salmonicida</i>	<i>A. salmonicida</i>
16/11/2004	CVM18896	Dr. Ron A. Miller	Center of Veterinary Medicine	Salmón atlántico	<i>A. salmonicida</i> subsp <i>salmonicida</i>	<i>A. salmonicida</i>
16/11/2004	CVM18897	Dr. Ron A. Miller	Center of Veterinary Medicine	Salmón plateado	<i>A. salmonicida</i> subsp <i>salmonicida</i>	<i>A. salmonicida</i>
16/11/2004	CVM18898	Dr. Ron A. Miller	Center of Veterinary Medicine	Amia	<i>A. salmonicida</i> subsp <i>salmonicida</i>	<i>A. salmonicida</i>
16/11/2004	CVM18899	Dr. Ron A. Miller	Center of Veterinary Medicine	Trucha de lago	<i>A. salmonicida</i> subsp <i>salmonicida</i>	<i>A. salmonicida</i>
16/11/2004	CVM18900	Dr. Ron A. Miller	Center of Veterinary Medicine	Lobina boca pequeña	<i>A. salmonicida</i> subsp <i>salmonicida</i>	<i>A. salmonicida</i>
16/11/2004	CVM18901	Dr. Ron A. Miller	Center of Veterinary Medicine	Salmón atlántico	<i>A. salmonicida</i>	<i>A. salmonicida</i>
16/11/2004	CVM18902	Dr. Ron A. Miller	Center of Veterinary Medicine	Salmón atlántico	<i>A. salmonicida</i> subsp <i>salmonicida</i>	<i>A. salmonicida</i>
16/11/2004	CVM18903	Dr. Ron A. Miller	Center of Veterinary Medicine	Salmón atlántico	<i>A. salmonicida</i> subsp <i>salmonicida</i>	<i>A. salmonicida</i>
16/11/2004	CVM22667	Dr. Ron A. Miller	Center of Veterinary Medicine	Raya común	<i>A. salmonicida</i> subsp <i>salmonicida</i>	<i>A. salmonicida</i>
16/11/2004	CVM22668	Dr. Ron A. Miller	Center of Veterinary Medicine	Salmón plateado	<i>A. salmonicida</i> subsp <i>salmonicida</i>	<i>A. salmonicida</i>

16/11/2004	CVM22669	Dr. Ron A. Miller	Center of Veterinary Medicine	Salmón plateado	<i>A. salmonicida</i> subsp <i>salmonicida</i>	<i>A. salmonicida</i>
16/11/2004	CVM22670	Dr. Ron A. Miller	Center of Veterinary Medicine	Salmón plateado	<i>A. salmonicida</i> subsp <i>salmonicida</i>	<i>A. salmonicida</i>
16/11/2004	CVM22675	Dr. Ron A. Miller	Center of Veterinary Medicine	Trucha marrón	<i>A. salmonicida</i> subsp <i>salmonicida</i>	<i>A. salmonicida</i>
16/11/2004	CVM22678	Dr. Ron A. Miller	Center of Veterinary Medicine	Salmón chinook	<i>A. salmonicida</i> subsp <i>salmonicida</i>	<i>A. salmonicida</i>
16/11/2004	CVM22679	Dr. Ron A. Miller	Center of Veterinary Medicine	Lucio tigre	<i>A. salmonicida</i> subsp <i>salmonicida</i>	<i>A. salmonicida</i>
16/11/2004	CVM22680	Dr. Ron A. Miller	Center of Veterinary Medicine	Trucha arcoiris	<i>A. salmonicida</i> subsp <i>salmonicida</i>	<i>A. salmonicida</i>
16/11/2004	CVM33708	Dr. Ron A. Miller	Center of Veterinary Medicine	Trucha arcoiris	<i>A. salmonicida</i>	<i>A. salmonicida</i>
16/11/2004	CVM33709	Dr. Ron A. Miller	Center of Veterinary Medicine	Trucha marrón	<i>A. salmonicida</i>	<i>A. salmonicida</i>
16/11/2004	CVM33710	Dr. Ron A. Miller	Center of Veterinary Medicine	Trucha marrón	<i>A. salmonicida</i>	<i>A. salmonicida</i>
16/11/2004	CVM33711	Dr. Ron A. Miller	Center of Veterinary Medicine	Trucha marrón	<i>A. salmonicida</i>	<i>A. salmonicida</i>
16/11/2004	CVM33712	Dr. Ron A. Miller	Center of Veterinary Medicine	Trucha arcoiris	<i>A. salmonicida</i>	<i>A. salmonicida</i>
16/11/2004	CVM33713	Dr. Ron A. Miller	Center of Veterinary Medicine	Salmón plateado	<i>A. salmonicida</i>	<i>A. salmonicida</i>
16/11/2004	CVM33714	Dr. Ron A. Miller	Center of Veterinary Medicine	Trucha arcoiris	<i>A. salmonicida</i>	<i>A. salmonicida</i>
16/11/2004	CVM33715	Dr. Ron A. Miller	Center of Veterinary Medicine	Trucha marrón	<i>A. salmonicida</i>	<i>A. salmonicida</i>
16/11/2004	CVM33716	Dr. Ron A. Miller	Center of Veterinary Medicine	Salmón chinook	<i>A. salmonicida</i>	<i>A. salmonicida</i>
16/11/2004	CVM33717	Dr. Ron A. Miller	Center of Veterinary Medicine	Salmón	<i>A. salmonicida</i>	<i>A. salmonicida</i>
16/11/2004	CVM33718	Dr. Ron A. Miller	Center of Veterinary Medicine	Salmón	<i>A. salmonicida</i>	<i>A. salmonicida</i>
16/11/2004	CVM33719	Dr. Ron A. Miller	Center of Veterinary Medicine	Salmón	<i>A. salmonicida</i>	<i>A. salmonicida</i>
16/11/2004	CVM33720	Dr. Ron A. Miller	Center of Veterinary Medicine	Salmón	<i>A. salmonicida</i>	<i>A. salmonicida</i>
16/11/2004	CVM33721	Dr. Ron A. Miller	Center of Veterinary Medicine	Salmón	<i>A. salmonicida</i>	<i>A. salmonicida</i>
16/11/2004	CVM33722	Dr. Ron A. Miller	Center of Veterinary Medicine	Salmón	<i>A. salmonicida</i>	<i>A. salmonicida</i>
16/11/2004	CVM33723	Dr. Ron A. Miller	Center of Veterinary Medicine	Salmón	<i>A. salmonicida</i>	<i>A. salmonicida</i>
16/11/2004	CVM33724	Dr. Ron A. Miller	Center of Veterinary Medicine	Salmón	<i>A. salmonicida</i>	<i>A. salmonicida</i>
16/11/2004	CVM33725	Dr. Ron A. Miller	Center of Veterinary Medicine	Salmón	<i>A. salmonicida</i>	<i>A. salmonicida</i>
16/11/2004	CVM33726	Dr. Ron A. Miller	Center of Veterinary Medicine	Salmón	<i>A. salmonicida</i>	<i>A. salmonicida</i>
16/11/2004	CVM33730	Dr. Ron A. Miller	Center of Veterinary Medicine	ND	<i>A. salmonicida</i>	<i>A. salmonicida</i>
16/11/2004	CVM33731	Dr. Ron A. Miller	Center of Veterinary Medicine	Trucha de arroyo	<i>A. salmonicida</i>	<i>A. salmonicida</i>
16/11/2004	CVM33732	Dr. Ron A. Miller	Center of Veterinary Medicine	Trucha de arroyo	<i>A. salmonicida</i>	<i>A. salmonicida</i>
16/11/2004	CVM33733	Dr. Ron A. Miller	Center of Veterinary Medicine	Trucha de arroyo	<i>A. salmonicida</i>	<i>A. salmonicida</i>
16/11/2004	CVM33734	Dr. Ron A. Miller	Center of Veterinary Medicine	Trucha marrón	<i>A. salmonicida</i>	<i>A. salmonicida</i>
16/11/2004	CVM33739	Dr. Ron A. Miller	Center of Veterinary Medicine	Trucha marrón	<i>A. salmonicida</i>	<i>A. salmonicida</i>
16/11/2004	CVM33741	Dr. Ron A. Miller	Center of Veterinary Medicine	ND	<i>A. salmonicida</i>	<i>A. salmonicida</i>
16/11/2004	CVM33742	Dr. Ron A. Miller	Center of Veterinary Medicine	ND	<i>A. salmonicida</i>	<i>A. salmonicida</i>
16/11/2004	CVM33743	Dr. Ron A. Miller	Center of Veterinary Medicine	Trucha arcoiris	<i>A. salmonicida</i>	<i>A. salmonicida</i>
16/11/2004	CVM33744	Dr. Ron A. Miller	Center of Veterinary Medicine	Salmón rojo	<i>A. ichthiosmia</i>	<i>A. salmonicida</i>

16/11/2004	CVM33746	Dr. Ron A. Miller	Center of Veterinary Medicine	Salmón rojo	<i>A. salmonicida</i>	<i>A. salmonicida</i>
16/11/2004	CVM33747	Dr. Ron A. Miller	Center of Veterinary Medicine	Trucha	<i>A. salmonicida</i>	<i>A. salmonicida</i>
16/11/2004	CVM33752	Dr. Ron A. Miller	Center of Veterinary Medicine	Salmón plateado	<i>A. salmonicida</i>	<i>A. salmonicida</i>
16/11/2004	CVM33753	Dr. Ron A. Miller	Center of Veterinary Medicine	Salmón plateado	<i>A. salmonicida</i>	<i>A. salmonicida</i>
16/11/2004	CVM33777	Dr. Ron A. Miller	Center of Veterinary Medicine	Salmón plateado	<i>A. salmonicida</i>	<i>A. salmonicida</i>
16/11/2004	CVM33778	Dr. Ron A. Miller	Center of Veterinary Medicine	Salmón plateado	<i>A. salmonicida</i>	<i>A. salmonicida</i>
16/11/2004	CVM33779	Dr. Ron A. Miller	Center of Veterinary Medicine	Salmón plateado	<i>A. salmonicida</i>	<i>A. salmonicida</i>
16/11/2004	CVM33785	Dr. Ron A. Miller	Center of Veterinary Medicine	Salmón plateado	<i>A. salmonicida</i>	<i>A. salmonicida</i>
16/11/2004	CVM33786	Dr. Ron A. Miller	Center of Veterinary Medicine	Salmón atlántico	<i>A. salmonicida</i>	<i>A. salmonicida</i>
16/11/2004	CVM33787	Dr. Ron A. Miller	Center of Veterinary Medicine	ND	<i>A. salmonicida</i>	<i>A. salmonicida</i>
16/11/2004	CVM33788	Dr. Ron A. Miller	Center of Veterinary Medicine	Amia	<i>A. salmonicida</i>	<i>A. salmonicida</i>
16/11/2004	CVM33789	Dr. Ron A. Miller	Center of Veterinary Medicine	Trucha marrón	<i>A. salmonicida</i>	<i>A. salmonicida</i>
16/11/2004	CVM33790	Dr. Ron A. Miller	Center of Veterinary Medicine	Trucha marrón	<i>A. salmonicida</i>	<i>A. salmonicida</i>
16/11/2004	CVM33791	Dr. Ron A. Miller	Center of Veterinary Medicine	Trucha marrón	<i>A. salmonicida</i>	<i>A. salmonicida</i>
16/11/2004	CVM33794	Dr. Ron A. Miller	Center of Veterinary Medicine	Salmón chinook	ND	<i>A. salmonicida</i>
16/11/2004	CVM33795	Dr. Ron A. Miller	Center of Veterinary Medicine	Salmón chinook	<i>A. salmonicida</i>	<i>A. salmonicida</i>
16/11/2004	CVM33955	Dr. Ron A. Miller	Center of Veterinary Medicine	ND	ND	<i>A. salmonicida</i>

Anexo 3. Cepas identificadas proporcionadas por diversos autores.

Referencia URV	Referencia autor	Autor	Origen	Patología de base	Fecha recepción	Fenotipo	16S rDNA RFLP
A2-001	A2-001	Wen Chien Ko	Sangre	Coalingitis aguda	03/06/2005	<i>A. hydrophila</i>	<i>A. media</i>
A2-002	A2-002	Wen Chien Ko	Bilis	Coalingitis aguda y pancreatitis	03/06/2005	<i>A. sobria</i>	No <i>Aeromonas</i>
A2-003 ¹	A2-003	Wen Chien Ko	Appendix	Apendicitis	03/06/2005	<i>A. hydrophila</i>	<i>A. caviae</i>
A2-004 ¹	A2-004	Wen Chien Ko	Herida	Quemado	03/06/2005	<i>A. hydrophila</i>	<i>A. aquariorum</i>
A2-005	A2-005	Wen Chien Ko	Sangre	Bacteriemia	03/06/2005	<i>A. hydrophila</i>	<i>A. caviae</i>
A2-006 ¹	A2-006	Wen Chien Ko	Sangre	Bacteriemia	03/06/2005	<i>A. trota</i>	<i>A. caviae</i>
A2-007	A2-007	Wen Chien Ko	Sangre	Bacteriemia	03/06/2005	<i>A. sobria</i>	<i>A. veronii</i>
A2-008 ¹	A2-008	Wen Chien Ko	Sangre	Bacteriemia	03/06/2005	<i>A. caviae</i>	<i>A. caviae</i>
A2-009	A2-009	Wen Chien Ko	Espuito	Pneumonía	03/06/2005	<i>A. hydrophila</i>	<i>A. hydrophila</i>
A2-010	A2-010	Wen Chien Ko	Herida	Celulitis	03/06/2005	<i>A. hydrophila</i>	<i>A. hydrophila</i>
A2-011	A2-011	Wen Chien Ko	Sangre	Bacteriemia	03/06/2005	<i>A. hydrophila</i>	<i>A. hydrophila</i> *
A2-012	A2-012	Wen Chien Ko	Sangre	Bacteriemia	03/06/2005	<i>Aeromonas</i> spp.	<i>A. caviae</i>
A2-013 ¹	A2-013	Wen Chien Ko	Sangre	Bacteriemia	03/06/2005	<i>Aeromonas</i> spp.	<i>A. aquariorum</i>
A2-014	A2-014	Wen Chien Ko	Sangre	Bacteriemia-quemado	03/06/2005	<i>A. caviae</i>	<i>A. caviae</i>
A2-016	A2-016	Wen Chien Ko	Herida	Bacteriemia-quemado	03/06/2005	<i>A. caviae</i>	<i>A. caviae</i>
A2-019	A2-019	Wen Chien Ko	Espuito	Pneumonía	03/06/2005	<i>A. veronii</i>	No <i>Aeromonas</i>
A2-021	A2-021	Wen Chien Ko	Herida	Quemado	03/06/2005	<i>A. hydrophila</i>	<i>A. caviae</i>
A2-022	A2-022	Wen Chien Ko	Herida	Trauma	03/06/2005	<i>A. hydrophila</i>	<i>A. caviae</i>
A2-025	A2-025	Wen Chien Ko	Sangre	Quemadura química	03/06/2005	<i>A. caviae</i>	<i>A. caviae</i>
A2-026	A2-026	Wen Chien Ko	Ascites	Lobectomía de hígado	03/06/2005	<i>A. hydrophila</i>	No <i>Aeromonas</i>
A2-027 ¹	A2-027	Wen Chien Ko	Sangre	Coalingitis aguda y pancreatitis	03/06/2005	<i>A. species</i>	<i>A. caviae</i>
A2-028 ¹	A2-028	Wen Chien Ko	Herida	Celulitis	03/06/2005	<i>A. hydrophila</i>	<i>A. caviae</i>
A2-030 ¹	A2-030	Wen Chien Ko	Sangre	Bacteriemia	03/06/2005	<i>A. species</i>	<i>A. aquariorum</i>
A2-036	A2-036	Wen Chien Ko	Viginal discharge	ND	03/06/2005	<i>A. hydrophila</i>	<i>A. caviae</i>
A2-037	A2-037	Wen Chien Ko	Herida	Quemado	03/06/2005	<i>A. sobria</i>	<i>A. veronii</i>
A2-039 ¹	A2-039	Wen Chien Ko	Herida	Diabetes	03/06/2005	<i>A. hydrophila</i>	<i>A. media</i>
A2-040 ¹	A2-040	Wen Chien Ko	Herida	Celulitis	03/06/2005	<i>A. hydrophila</i>	<i>A. caviae</i>
A2-041	A2-041	Wen Chien Ko	Sangre	Bacteriemia	03/06/2005	<i>A. sobria</i>	No <i>Aeromonas</i>

A2-042 ¹	A2-042	Wen Chien Ko	Sangre	Bacteriemia	03/06/2005	<i>A. hydrophila</i>	<i>A. caviae</i>
A2-043	A2-043	Wen Chien Ko	Espujo	Pneumonía	03/06/2005	<i>A. hydrophila</i>	<i>A. caviae</i> *
A2-044	A2-044	Wen Chien Ko	Espujo	Pneumonía	03/06/2005	<i>A. hydrophila</i>	<i>A. hydrophila</i>
A2-045	A2-045	Wen Chien Ko	Sangre	Coalingitis aguda y pancreatitis	03/06/2005	<i>A. hydrophila</i>	<i>A. caviae</i> *
A2-046 ¹	A2-046	Wen Chien Ko	Sangre	Bacteriemia	03/06/2005	<i>A. caviae</i>	<i>A. caviae</i>
A2-048	A2-048	Wen Chien Ko	Sangre	Fascitis necrotizante	03/06/2005	<i>A. hydrophila</i>	<i>A. hydrophila</i>
A2-049	A2-049	Wen Chien Ko	Ascites	Peritonitis	03/06/2005	<i>A. sobria</i>	<i>A. veronii</i>
A2-050 ¹	A2-050	Wen Chien Ko	Herida	Quemado	03/06/2005	<i>A. hydrophila</i>	<i>A. taiwanensis</i>
A2-052	A2-052	Wen Chien Ko	Herida	Cáncer	03/06/2005	<i>A. hydrophila</i>	<i>A. hydrophila</i>
A2-053 ¹	A2-053	Wen Chien Ko	Herida	Herida	03/06/2005	<i>A. hydrophila</i>	<i>A. aquariorum</i>
A2-054	A2-054	Wen Chien Ko	Herida	Herida	03/06/2005	<i>A. hydrophila</i>	<i>A. hydrophila</i>
A2-055 ¹	A2-055	Wen Chien Ko	Sangre	Bacteriemia	03/06/2005	<i>A. hydrophila</i>	<i>A. aquariorum</i>
A2-056 ¹	A2-056	Wen Chien Ko	Sangre	Bacteriemia	03/06/2005	<i>Aeromonas</i> spp.	<i>A. aquariorum</i>
A2-057	A2-057	Wen Chien Ko	Ascites	Cáncer	03/06/2005	<i>A. caviae</i>	<i>A. caviae</i>
A2-058 ¹	A2-058	Wen Chien Ko	Herida	Left forearm wd infection	03/06/2005	<i>A. hydrophila</i>	<i>A. aquariorum</i>
A2-061 ¹	A2-061	Wen Chien Ko	Sangre	Bacteriemia	03/06/2005	<i>A. hydrophila</i>	<i>A. aquariorum</i>
A2-062	A2-062	Wen Chien Ko	Sangre	SBP	03/06/2005	<i>A. sobria</i>	<i>A. veronii</i>
A2-063 ¹	A2-063	Wen Chien Ko	Ascites	SBP	03/06/2005	<i>A. sobria</i>	<i>A. veronii</i>
A2-064 ¹	A2-064	Wen Chien Ko	Sangre	Bacteriemia	03/06/2005	<i>A. caviae</i>	<i>A. caviae</i> *
A2-065	A2-065	Wen Chien Ko	Sangre	Bacteriemia	03/06/2005	<i>A. caviae</i>	<i>A. caviae</i>
A2-066	A2-066	Wen Chien Ko	Sangre	Bacteriemia	03/06/2005	<i>A. hydrophila</i>	<i>A. hydrophila</i>
A2-067 ¹	A2-067	Wen Chien Ko	Herida	Herida	03/06/2005	<i>A. caviae</i>	<i>A. sanarellii</i>
A2-068	A2-068	Wen Chien Ko	Herida	Herida	03/06/2005	<i>A. sobriae</i>	<i>A. hydrophila</i>
A2-070 ¹	A2-070	Wen Chien Ko	Sangre	Bacteriemia	03/06/2005	<i>A. hydrophila</i>	<i>A. aquariorum</i>
A2-071	A2-071	Wen Chien Ko	Herida	Herida	03/06/2005	<i>A. hydrophila</i>	<i>A. hydrophila</i>
A2-072	A2-072	Wen Chien Ko	Herida	Quemado	03/06/2005	<i>A. hydrophila</i>	No <i>Aeromona</i>
A2-073	A2-073	Wen Chien Ko	Sangre	Bacteriemia	03/06/2005	<i>A. sobria</i>	<i>A. veronii</i>
A2-074	A2-074	Wen Chien Ko	Sangre	r/ o portA infection	03/06/2005	<i>A. caviae</i>	<i>A. caviae</i>
A2-076	A2-076	Wen Chien Ko	Ear discharge	Otitis	03/06/2005	<i>A. sobria</i>	<i>A. veronii</i>
A2-078	A2-078	Wen Chien Ko	Sangre	Bacteriemia	03/06/2005	<i>A. hydrophila</i>	<i>A. hydrophila</i>
A2-079 ¹	A2-079	Wen Chien Ko	Herida	Abceso	03/06/2005	<i>A. hydrophila</i>	<i>A. caviae</i>

A2-080	A2-080	Wen Chien Ko	Herida	Herida	03/06/2005	<i>A. hydrophila</i>	<i>A. caviae</i>
A2-081	A2-081	Wen Chien Ko	Herida	Quemado	03/06/2005	<i>A. hydrophila</i>	<i>A. hydrophila</i>
A2-084	A2-084	Wen Chien Ko	Sangre	Coalingitis aguda	03/06/2005	<i>Aeromonas</i> spp.	<i>A. media</i>
A2-085	A2-085	Wen Chien Ko	Herida	Herida	03/06/2005	<i>A. hydrophila</i>	<i>A. trota</i>
A2-086 ¹	A2-086	Wen Chien Ko	Herida	Herida	03/06/2005	<i>A. hydrophila</i>	<i>A. aquariorum</i>
A2-087 ¹	A2-087	Wen Chien Ko	Herida	Quemado	03/06/2005	<i>A. caviae</i>	<i>A. caviae</i>
A2-090 ¹	A2-090	Wen Chien Ko	Herida	Celulitis	03/06/2005	<i>Aeromonas</i> spp.	<i>A. caviae</i>
A2-091 ¹	A2-091	Wen Chien Ko	Bilis	Coalingitis aguda	03/06/2005	<i>A. caviae</i>	<i>A. aquariorum</i>
A2-092	A2-092	Wen Chien Ko	Sangre	Bacteriemia	03/06/2005	<i>A. sobria</i>	<i>A. veronii</i>
A2-093	A2-093	Wen Chien Ko	Espuito	-	03/06/2005	<i>A. sobria</i>	<i>A. veronii</i>
A2-094 ¹	A2-094	Wen Chien Ko	Sangre	Bacteriemia	03/06/2005	<i>A. hydrophila</i>	<i>A. aquariorum</i>
A2-096 ¹	A2-096	Wen Chien Ko	Ascites	Apendicitis	03/06/2005	<i>A. hydrophila</i>	<i>A. aquariorum</i>
A2-097	A2-097	Wen Chien Ko	Herida	Quemado	03/06/2005	<i>A. caviae</i>	<i>A. caviae</i>
A2-098 ¹	A2-098	Wen Chien Ko	Sangre	Celulitis	03/06/2005	<i>A. hydrophila</i>	<i>A. aquariorum</i>
A2-099	A2-099	Wen Chien Ko	Sangre	Bacteriemia	03/06/2005	<i>A. hydrophila</i>	<i>A. media</i>
A2-103	A2-103	Wen Chien Ko	Herida	Fascitis necrotizante	03/06/2005	<i>A. hydrophila</i>	<i>A. hydrophila</i>
A2-106	A2-106	Wen Chien Ko	Sangre	Bacteriemia	03/06/2005	<i>A. hydrophila</i>	<i>A. caviae</i>
A2-107	A2-107	Wen Chien Ko	Sangre	SBP	03/06/2005	<i>A. hydrophila</i>	<i>A. caviae</i>
A2-108	A2-108	Wen Chien Ko	Sangre	Bacteriemia	03/06/2005	<i>A. hydrophila</i>	<i>A. caviae</i>
A2-109	A2-109	Wen Chien Ko	Herida	Quemado	03/06/2005	<i>A. hydrophila</i>	<i>A. hydrophila</i>
A2-110	A2-110	Wen Chien Ko	Bilis	Coalingitis aguda	03/06/2005	<i>A. hydrophila</i>	<i>A. hydrophila</i>
A2-111	A2-111	Wen Chien Ko	Bilis	Colecistitis	03/06/2005	<i>A. sobria</i>	<i>A. trota</i>
A2-112 ¹	A2-112	Wen Chien Ko	Bilis	Coalingitis aguda	03/06/2005	<i>A. hydrophila</i>	<i>A. aquariorum</i>
A2-114 ¹	A2-114	Wen Chien Ko	joint fluid	Artritis	03/06/2005	<i>A. hydrophila</i>	<i>A. aquariorum</i>
A2-116	A2-116	Wen Chien Ko	Sangre	Bacteriemia	03/06/2005	<i>A. caviae</i>	<i>A. caviae</i>
A2-118	A2-118	Wen Chien Ko	Espuito	Pneumonía	03/06/2005	<i>A. hydrophila</i>	<i>A. hydrophila</i>
A2-120	A2-120	Wen Chien Ko	Herida	Abceso	03/06/2005	<i>A. sobria</i>	<i>A. veronii</i>
A2-122	A2-122	Wen Chien Ko	Espuito	Fascitis necrotizante	03/06/2005	<i>A. sobria</i>	<i>A. veronii*</i>
A2-126 ¹	A2-126	Wen Chien Ko	Bilis	Coalingitis aguda	03/06/2005	<i>A. hydrophila</i>	<i>A. aquariorum</i>
A2-127	A2-127	Wen Chien Ko	Espuito	ND	03/06/2005	<i>A. hydrophila</i>	<i>A. caviae</i>
A2-128	A2-128	Wen Chien Ko	Sangre	cellulitis r/o catheter related	03/06/2005	<i>Aeromonas</i> spp.	<i>A. caviae</i>

A2-130	A2-130	Wen Chien Ko	Herida	Celulitis	03/06/2005	<i>A. hydrophila</i>	<i>A. hydrophila</i>
A2-131 ¹	A2-131	Wen Chien Ko	Herida	ND	03/06/2005	<i>A. hydrophila</i>	<i>A. aquariorum</i>
A2-132	A2-132	Wen Chien Ko	Herida	Herida	03/06/2005	<i>A. hydrophila</i>	No <i>Aeromonas</i>
A2-134	A2-134	Wen Chien Ko	Sangre	Bacteriemia	03/06/2005	<i>A. sobria</i>	No <i>Aeromonas</i>
A2-135	A2-135	Wen Chien Ko	Bilis	Coalingitis aguda	03/06/2005	<i>A. sobria</i>	<i>A. veronii</i> *
A2-136	A2-136	Wen Chien Ko	Heces	ND	03/06/2005	<i>A. sobria</i>	<i>A. caviae</i>
A2-137	A2-137	Wen Chien Ko	Sangre	Celulitis	03/06/2005	<i>A. sobria</i>	<i>A. veronii</i>
A2-138	A2-138	Wen Chien Ko	Herida	Herida	03/06/2005	<i>A. sobria</i>	<i>A. caviae</i>
A2-139	A2-139	Wen Chien Ko	Heces	ND	03/06/2005	<i>A. sobria</i>	<i>A. veronii</i>
A2-140 ¹	A2-140	Wen Chien Ko	Espuito	ND	03/06/2005	<i>A. hydrophila</i>	<i>A. aquariorum</i>
A2-141	A2-141	Wen Chien Ko	Sangre	Bacteriemia	03/06/2005	<i>A. sobria</i>	<i>A. veronii</i>
A2-143	A2-143	Wen Chien Ko	Herida	Herida	03/06/2005	<i>A. caviae</i>	<i>A. caviae</i>
A2-145	A2-145	Wen Chien Ko	Ascites	SBP	03/06/2005	<i>A. sobria</i>	No <i>Aeromonas</i>
A2-149	A2-149	Wen Chien Ko	Herida	Quemado	03/06/2005	<i>A. sobria</i>	<i>A. media</i>
A2-152	A2-152	Wen Chien Ko	Sangre	port A infection	03/06/2005	<i>A. hydrophila</i>	<i>A. caviae</i>
A2-153	A2-153	Wen Chien Ko	Sangre	port A infection	03/06/2005	<i>Aeromonas</i> spp.	No <i>Aeromonas</i>
A2-154	A2-154	Wen Chien Ko	Sangre	Bacteriemia	03/06/2005	<i>A. sobria</i>	<i>A. veronii</i>
A2-155 ¹	A2-155	Wen Chien Ko	Sangre	Fascitis necrotizante	03/06/2005	<i>A. hydrophila</i>	<i>A. aquariorum</i>
A2-156	A2-156	Wen Chien Ko	Sangre	Abceso	03/06/2005	<i>A. hydrophila</i>	<i>A. hydrophila</i>
A2-157 ¹	A2-157	Wen Chien Ko	Sangre	Bacteriemia	03/06/2005	<i>A. hydrophila</i>	<i>A. aquariorum</i>
A2-159 ¹	A2-159	Wen Chien Ko	Sangre	Colecistitis	03/06/2005	<i>A. hydrophila</i>	<i>A. aquariorum</i>
A2-161	A2-161	Wen Chien Ko	Sangre	Bacteriemia	03/06/2005	<i>A. caviae</i>	<i>A. caviae</i>
A2-162	A2-162	Wen Chien Ko	Herida	Quemado	03/06/2005	<i>A. hydrophila</i>	<i>A. caviae</i>
A2-163	A2-163	Wen Chien Ko	Herida	Fascitis necrotizante	03/06/2005	<i>A. sobria</i>	<i>A. trota</i>
A2-166	A2-166	Wen Chien Ko	Herida	Herida	03/06/2005	<i>A. hydrophila</i>	No <i>Aeromonas</i>
A2-167	A2-167	Wen Chien Ko	Sangre	Quemado	03/06/2005	<i>A. hydrophila</i>	No <i>Aeromonas</i>
A2-200	A2-200	Wen Chien Ko	Sangre	Bacteriemia	03/06/2005	<i>A. hydrophila</i>	<i>A. caviae</i>
A2-201	A2-201	Wen Chien Ko	Sangre	Bacteriemia	03/06/2005	<i>A. hydrophila</i>	<i>A. caviae</i>
A2-203	A2-203	Wen Chien Ko	Sangre	Bacteriemia	03/06/2005	<i>A. hydrophila</i>	<i>A. caviae</i>
A2-204	A2-204	Wen Chien Ko	Sangre	Bacteriemia	03/06/2005	<i>A. hydrophila</i>	No <i>Aeromonas</i>
A2-206	A2-206	Wen Chien Ko	Sangre	Bacteriemia	03/06/2005	<i>A. caviae</i>	<i>A. caviae</i>
A2-207	A2-207	Wen Chien Ko	Sangre	Bacteriemia	03/06/2005	<i>A. caviae</i>	<i>A. caviae</i>

A2-238	A2-238	Wen Chien Ko	Sangre	Fascitis necrotizante	03/06/2005	<i>A. hydrophila</i>	<i>A. caviae</i>
A2-239 ¹	A2-239	Wen Chien Ko	Sangre	Fascitis necrotizante	03/06/2005	<i>A. hydrophila</i>	<i>A. aquariorum</i>
A2-248	A2-248	Wen Chien Ko	Sangre	Bacteriemia	03/06/2005	<i>A. hydrophila</i>	<i>A. caviae</i>
A2-249	A2-249	Wen Chien Ko	Sangre	Bacteriemia	03/06/2005	<i>A. hydrophila</i>	<i>A. caviae</i>
A2-264 ¹	A2-264	Wen Chien Ko	Sangre	Bacteriemia	03/06/2005	<i>A. hydrophila</i>	<i>A. aquariorum</i>
A2-265	A2-265	Wen Chien Ko	Sangre	Bacteriemia	03/06/2005	<i>A. hydrophila</i>	<i>A. caviae</i>
A2-9307091	A2-9307091	Wen Chien Ko	Sangre	Pneumonía	03/06/2005	<i>A. hydrophila</i>	<i>A. caviae</i>
A2-9307092	A2-9307092	Wen Chien Ko	Sangre	Pneumonía	03/06/2005	<i>A. hydrophila</i>	<i>A. caviae</i>
A2-9307093	A2-9307093	Wen Chien Ko	Sangre	Pneumonía	03/06/2005	<i>A. hydrophila</i>	<i>A. caviae</i>
O. 80	600647	Daniel Tena	Bilis	Colelitiasis y cáncer	18/04/2007	<i>A. hydrophila</i>	<i>A. hydrophila</i>
P. 28 ¹	601577	Daniel Tena	Sangre	Colédocolitiasis	18/04/2007	<i>A. caviae</i>	<i>A. caviae</i> *
AC.55 ¹	537785	Daniel Tena	Exudado herida	-	18/04/2007	<i>A. caviae</i>	<i>A. salmonicida</i> *
AG.70 ¹	632706	Daniel Tena	Sangre	Cáncer	18/04/2007	<i>A. caviae</i>	<i>A. caviae</i> *
AI. 7 ¹	548824	Daniel Tena	Sangre	Cirrosis hepática	18/04/2007	<i>A. veronii</i> bv. sobria	<i>A. veronii</i> *
AJ. 83 ¹	552662	Daniel Tena	Exudado herida	Diabetes	18/04/2007	<i>A. hydrophila</i>	<i>A. salmonicida</i> *
AK. 72 ¹	120308	Daniel Tena	Orina	Cáncer	18/04/2007	<i>A. hydrophila</i>	<i>A. salmonicida</i> *
AM. 11 ¹	640870	Daniel Tena	Exudado herida	Diabetes mellitus	18/04/2007	<i>A. hydrophila</i>	<i>A. hydrophila</i> *
AM. 10	640836	Daniel Tena	Exudado herida	-	18/04/2007	<i>A. hydrophila</i>	<i>A. hydrophila</i> *
AQ. 18 ¹	5001155	Daniel Tena	Exudado herida quirúrgica	Cáncer	18/04/2007	<i>A. hydrophila</i>	<i>A. hydrophila</i> *
AZ. 28	50027025	Daniel Tena	Exudado herida	-	18/04/2007	<i>A. veronii</i> bv. sobria	<i>A. veronii</i>
AZ. 99 ¹	50029324	Daniel Tena	Exudado herida quirúrgica	Cáncer	18/04/2007	<i>A. hydrophila</i>	<i>A. hydrophila</i> *
BA. 25	50030190	Daniel Tena	Aspirado traqueobronquial	Hemorragia	18/04/2007	<i>A. caviae</i>	<i>A. hydrophila</i>
BB. 14	5505186	Daniel Tena	Líquido perihepático	Diabetes mellitus	18/04/2007	<i>A. caviae</i>	<i>A. hydrophila</i>
BJ. 3 ¹	50066470	Daniel Tena	Exudado herida quirúrgica	Diabetes mellitus	18/04/2007	<i>A. hydrophila</i>	<i>A. hydrophila</i> *
BH. 13	50059061	Daniel Tena	Exudado absceso	Hemorragia	18/04/2007	<i>A. veronii</i> bv. sobria	<i>A. veronii</i>
BF. 24	50049882	Daniel Tena	Exudado herida	-	18/04/2007	<i>A. veronii</i> bv. sobria	<i>A. hydrophila</i>
226365	226365	Daniel Tena	Exudado herida	ND	03/11/2007	<i>A. hydrophila</i>	<i>A. veronii</i>

Anexo 4. Cepas de origen ambiental identificadas.

Fecha	Cepa	Origen	Fenotipo	Identificación molecular
28/06/2006	1121	Balsa regadío 1S	<i>Aeromonas</i> sp	<i>A. veronii</i>
28/06/2006	1122	Balsa regadío 1S	<i>Aeromonas</i> sp	<i>A. veronii</i>
28/06/2006	1123	Balsa regadío 1S	<i>Aeromonas</i> sp	<i>A. salmonicida</i> / <i>A. bestiarum</i>
28/06/2006	1124	Balsa regadío 1S	<i>Aeromonas</i> sp	<i>A. veronii</i>
28/06/2006	1125	Balsa regadío 1S	<i>Aeromonas</i> sp	<i>A. sobria</i>
28/06/2006	1126 ¹	Balsa regadío 1F	<i>Aeromonas</i> sp	<i>A. veronii</i> *
28/06/2006	1127	Balsa regadío 1F	<i>Aeromonas</i> sp	<i>A. veronii</i>
28/06/2006	1128	Balsa regadío 1F	<i>Aeromonas</i> sp	<i>A. veronii</i>
28/06/2006	1129 ¹	Balsa regadío 1F	<i>Aeromonas</i> sp	<i>A. media</i> *
28/06/2006	1130	Balsa regadío 2S	<i>Aeromonas</i> sp	<i>A. veronii</i>
28/06/2006	1131	Balsa regadío 2S	<i>Aeromonas</i> sp	<i>A. veronii</i>
28/06/2006	1132	Balsa regadío 2S	<i>Aeromonas</i> sp	<i>A. veronii</i>
28/06/2006	1133	Balsa regadío 2S	<i>Aeromonas</i> sp	<i>A. veronii</i>
28/06/2006	1134	Balsa regadío 2S	<i>Aeromonas</i> sp	<i>A. veronii</i>
28/06/2006	1135	Balsa regadío 2S	<i>Aeromonas</i> sp	<i>A. veronii</i>
28/06/2006	1136	Balsa regadío 2F	<i>Aeromonas</i> sp	<i>A. veronii</i>
28/06/2006	1137 ¹	Balsa regadío 3S	<i>Aeromonas</i> sp	<i>A. veronii</i> *
28/06/2006	1138	Balsa regadío 3S	<i>Aeromonas</i> sp	<i>A. veronii</i> *
28/06/2006	1139	Balsa regadío 3S	<i>Aeromonas</i> sp	<i>A. veronii</i> *
28/06/2006	1140	Balsa regadío 3S	<i>Aeromonas</i> sp	<i>A. veronii</i> *
28/06/2006	1141	Balsa regadío 3F	<i>Aeromonas</i> sp	<i>A. veronii</i> *
28/06/2006	1142	Balsa regadío 4S	<i>Aeromonas</i> sp	<i>A. veronii</i>
28/06/2006	1143	Balsa regadío 4S	<i>Aeromonas</i> sp	<i>A. veronii</i>
28/06/2006	1144	Balsa regadío 4S	<i>Aeromonas</i> sp	<i>A. veronii</i>
28/06/2006	1145	Balsa regadío 4I	<i>Aeromonas</i> sp	<i>A. veronii</i>
28/06/2006	1146	Balsa regadío 4I	<i>Aeromonas</i> sp	<i>A. veronii</i>
28/06/2006	1147	Balsa regadío 4I	<i>Aeromonas</i> sp	<i>A. veronii</i>
28/06/2006	1148	Balsa regadío 4F	<i>Aeromonas</i> sp	<i>A. veronii</i> *
12/07/2006	1149	Fuente llarga	<i>Aeromonas</i> sp	<i>A. bestiarum</i> / <i>A. salmonicida</i>
12/07/2006	1150	1º Aflojamiento Rosario	<i>Aeromonas</i> sp	<i>A. bestiarum</i>
12/07/2006	1151	Pto 1/2 Rosario	<i>Aeromonas</i> sp	<i>A. veronii</i>
20/12/2006	1153	IOC 463/04 Aguas Amb. Brasil	<i>A. caviae</i>	<i>A. caviae</i>
20/12/2006	1154	IOC 465/04 Aguas Amb. Brasil	<i>A. caviae</i>	<i>A. caviae</i>
20/12/2006	1156	IOC 501/04 Aguas Amb. Brasil	<i>A. caviae</i>	<i>A. caviae</i>
20/12/2006	1159	IOC 579/04 Aguas Amb. Brasil	<i>A. caviae</i>	<i>A. caviae</i>
20/12/2006	1160	IOC 593/04 Aguas Amb. Brasil	<i>A. caviae</i>	<i>A. caviae</i>
20/12/2006	1161	IOC 596/04 Aguas Amb. Brasil	<i>A. caviae</i>	<i>A. caviae</i>
20/12/2006	1162	IOC 601/04 Aguas Amb. Brasil	<i>A. caviae</i>	<i>A. caviae</i>
20/12/2006	1163	IOC 462/04 Aguas Amb. Brasil	<i>A. hydrophila</i>	<i>A. hydrophila</i>
20/12/2006	1164	IOC 464/04 Aguas Amb. Brasil	<i>A. hydrophila</i>	<i>A. hydrophila</i>
20/12/2006	1166	IOC 505/04 Aguas Amb. Brasil	<i>A. hydrophila</i>	<i>A. veronii</i> *
20/12/2006	1171	IOC 612/04 Aguas Amb. Brasil	<i>Aeromonas</i> sp	<i>A. caviae</i>
28/09/2007	1172	T0 Aeropuerto Reus	<i>Aeromonas</i> sp	<i>A. caviae</i>
28/09/2007	1173	T0 Aeropuerto Reus	<i>Aeromonas</i> sp	<i>A. media</i>
28/09/2007	1174	T0 Aeropuerto Reus	<i>Aeromonas</i> sp	<i>A. caviae</i>
28/09/2007	1176	T1a Aeropuerto Reus	<i>Aeromonas</i> sp	<i>A. hydrophila</i>
28/09/2007	1177	T1a Aeropuerto Reus	<i>Aeromonas</i> sp	<i>A. hydrophila</i>
28/09/2007	1178	T1b Aeropuerto Reus	<i>Aeromonas</i> sp	<i>A. media</i>
28/09/2007	1179	T1b Aeropuerto Reus	<i>Aeromonas</i> sp	<i>A. media</i>
28/09/2007	1180	T1b Aeropuerto Reus	<i>Aeromonas</i> sp	<i>A. hydrophila</i> *
28/09/2007	1181	T2 Aeropuerto Reus	<i>Aeromonas</i> sp	<i>A. hydrophila</i>

28/09/2007	1184 ¹	T4 Aeropuerto Reus	<i>Aeromonas</i> sp	<i>A. veronii</i> *
28/09/2007	1185	T4 Aeropuerto Reus	<i>Aeromonas</i> sp	<i>A. veronii</i>
28/09/2007	1186	T4 Aeropuerto Reus	<i>Aeromonas</i> sp	<i>A. caviae</i>
28/09/2007	1187	T5 Aeropuerto Reus	<i>Aeromonas</i> sp	<i>A. caviae</i>
28/09/2007	1188	T5 Aeropuerto Reus	<i>Aeromonas</i> sp	<i>A. hydrophila</i>
28/09/2007	1189	T6 Aeropuerto Reus	<i>Aeromonas</i> sp	<i>A. media</i>
28/09/2007	1190	T6 Aeropuerto Reus	<i>Aeromonas</i> sp	<i>A. caviae</i>
28/09/2007	1191	T8 Aeropuerto Reus	<i>Aeromonas</i> sp	<i>A. veronii</i>
28/09/2007	1192	T8 Aeropuerto Reus	<i>Aeromonas</i> sp	<i>A. veronii</i>
28/09/2007	1193	T8 Aeropuerto Reus	<i>Aeromonas</i> sp	<i>A. veronii</i>
28/09/2007	1194	T10 Aeropuerto Reus	<i>Aeromonas</i> sp	<i>A. veronii</i>
28/09/2007	1195	T10 Aeropuerto Reus	<i>Aeromonas</i> sp	<i>A. veronii</i>
28/09/2007	1196	T10 Aeropuerto Reus	<i>Aeromonas</i> sp	<i>A. media</i>
28/02/2008	1201	Agua Río Llobregat	<i>Aeromonas</i> sp	<i>A. veronii</i>
28/02/2008	1203	Agua Río Llobregat	<i>Aeromonas</i> sp	<i>A. caviae</i>
28/02/2008	1204	Agua Río Llobregat	<i>Aeromonas</i> sp	<i>A. media</i>
28/02/2008	1208	Agua Río Llobregat	<i>Aeromonas</i> sp	<i>A. media</i>
28/02/2008	1209	Agua Río Llobregat	<i>Aeromonas</i> sp	<i>A. media</i>
28/02/2008	1210	Agua Río Llobregat	<i>Aeromonas</i> sp	<i>A. hydrophila</i>
28/02/2008	1211	Agua Río Llobregat	<i>Aeromonas</i> sp	<i>A. media</i>
28/02/2008	1214	Agua Río Llobregat	<i>Aeromonas</i> sp	<i>A. caviae</i>
28/02/2008	1216	Agua Río Llobregat	<i>Aeromonas</i> sp	<i>A. sobria</i>
28/02/2008	1217	Agua Río Llobregat	<i>Aeromonas</i> sp	<i>A. caviae</i>
28/02/2008	1218	Agua Río Llobregat	<i>Aeromonas</i> sp	<i>A. caviae</i>
28/02/2008	1219	Agua Río Llobregat	<i>Aeromonas</i> sp	<i>A. media</i>
28/02/2008	1220	Agua Río Llobregat	<i>Aeromonas</i> sp	<i>A. media</i>
17/03/2008	1221	Agua Río Llobregat	<i>Aeromonas</i> sp	<i>A. media</i>
17/03/2008	1222	Agua Río Llobregat	<i>Aeromonas</i> sp	<i>A. media</i>
17/03/2008	1223	Agua Río Llobregat	<i>Aeromonas</i> sp	<i>A. media</i>
17/03/2008	1224	Agua Río Llobregat	<i>Aeromonas</i> sp	<i>A. media</i>
17/03/2008	1225	Agua Río Llobregat	<i>Aeromonas</i> sp	<i>A. media</i>
17/03/2008	1226	Agua Río Llobregat	<i>Aeromonas</i> sp	<i>A. caviae</i>
17/03/2008	1227	Agua Río Llobregat	<i>Aeromonas</i> sp	<i>A. media</i>
12/11/2008	WB-2.1-13 ¹	Riachuelo de 150 m aguas abajo	<i>A. salmonicida</i>	<i>A. encheleia</i>
12/11/2008	WB-2.1-14 ¹	Riachuelo de 150 m aguas abajo	<i>A. salmonicida</i>	<i>A. encheleia</i>
12/11/2008	WB-2.3-16 ¹	Riachuelo de 150 m aguas abajo	<i>A. encheleia</i>	<i>A. encheleia</i>
12/11/2008	WB-2.3-12 ¹	Riachuelo de 150 m aguas abajo	<i>A. salmonicida</i>	<i>A. encheleia</i>
12/11/2008	WB-2.3-17 ¹	Riachuelo de 150 m aguas abajo	<i>A. sobria</i>	<i>A. encheleia</i>
12/11/2008	WB-2.3-29 ¹	Riachuelo de 150 m aguas abajo	<i>A. salmonicida</i>	<i>A. bestiarum</i>
12/11/2008	WB-2.3-47 ¹	Riachuelo de 150 m aguas abajo	<i>A. salmonicida</i>	<i>A. encheleia</i>
12/11/2008	WB-2.3-48 ¹	Riachuelo de 150 m aguas abajo	<i>A. salmonicida</i>	<i>A. encheleia</i>
12/11/2008	WB-2.3-50 ¹	Riachuelo de 150 m aguas abajo	<i>A. molluscorum</i>	<i>A. encheleia</i>
12/11/2008	WB-3.1-29a ¹	Riachuelo de 250 m aguas abajo	<i>A. salmonicida</i>	<i>A. bestiarum</i>
12/11/2008	WB-3.1-59 ¹	Riachuelo de 250 m aguas abajo	<i>A. molluscorum</i>	<i>A. encheleia</i>
12/11/2008	WB-3.1-67 ¹	Riachuelo de 250 m aguas abajo	<i>A. salmonicida</i>	<i>A. bestiarum</i>
12/11/2008	WB-3.1-81 ¹	Riachuelo de 250 m aguas abajo	<i>A. salmonicida</i>	<i>A. bestiarum</i>
12/11/2008	WB-3.2-3 ¹	Riachuelo de 250 m aguas abajo	<i>A. salmonicida</i>	<i>A. bestiarum</i>
12/11/2008	WB-3.2-14 ¹	Riachuelo de 250 m aguas abajo	<i>A. salmonicida</i>	<i>A. bestiarum</i>
12/11/2008	WB-3.2-54 ¹	Riachuelo de 250 m aguas abajo	<i>A. salmonicida</i>	<i>A. encheleia</i>
12/11/2008	WB-3.4-15 ¹	Riachuelo de 250 m aguas abajo	<i>A. salmonicida</i>	<i>A. bestiarum</i>
12/11/2008	WB-3.4-35 ¹	Riachuelo de 250 m aguas abajo	<i>A. encheleia</i>	<i>A. encheleia</i>
12/11/2008	WB-3.4-41 ¹	Riachuelo de 250 m aguas abajo	<i>A. encheleia</i>	<i>A. encheleia</i>
12/11/2008	WB-4.1-19 ¹	Riachuelo de 350 m aguas abajo	<i>A. sobria</i>	<i>Aeromonas rivuli</i>
12/11/2008	WB-4.1-30 ¹	Riachuelo de 350 m aguas abajo	<i>A. encheleia</i>	<i>A. encheleia</i>

12/11/2008	WB-4.1-37 ¹	Riachuelo de 350 m aguas abajo	<i>A. encheleia</i>	<i>A. encheleia</i>
12/11/2008	WB-4.1-61 ¹	Riachuelo de 350 m aguas abajo	<i>A. salmonicida</i>	<i>A. salmonicida</i>
12/11/2008	WB-4.1-91 ¹	Riachuelo de 350 m aguas abajo	<i>A. salmonicida</i>	<i>A. encheleia</i>
12/11/2008	WB-4.1-102 ¹	Riachuelo de 350 m aguas abajo	<i>A. sobria</i>	<i>A. encheleia</i>
12/11/2008	WB-4.2-10 ¹	Riachuelo de 350 m aguas abajo	<i>A. salmonicida</i>	<i>A. salmonicida</i>
12/11/2008	WB-4.2-11 ¹	Riachuelo de 350 m aguas abajo	<i>A. salmonicida</i>	<i>A. encheleia</i>
12/11/2008	WB-4.4-37 ¹	Riachuelo de 350 m aguas abajo	<i>A. salmonicida</i>	<i>A. bestiarum</i>
12/11/2008	WB-4.4-67 ¹	Riachuelo de 350 m aguas abajo	<i>A. salmonicida</i>	<i>A. bestiarum</i>
12/11/2008	WB-4.4-95 ¹	Riachuelo de 350 m aguas abajo	<i>A. encheleia</i>	<i>A. encheleia</i>
12/11/2008	WB-4.4-101 ¹	Riachuelo de 350 m aguas abajo	<i>A. sobria</i>	<i>Aeromonas rivuli</i>

Anexo 5. Cepas utilizadas en el estudio 4.1.1.

Cepa	Otras colecciones	Origen	Especie
MTCC3249T	NCIM 5147T; LMG 21852; CIP 107763; CECT5761 ^T	Mosquito <i>Culex quinquefasciatus</i> (India)	<i>A. culicicola</i>
SH		Mosquito <i>Aedes aegyptii</i> (India)	<i>A. culicicola</i>
SLH		Mosquito <i>Aedes aegyptii</i> (India)	<i>A. culicicola</i>
CIP107797	IBS S6652	Heces de mono sano <i>Macaca fascicularis</i> (Francia)	<i>A. simiae</i>
CIP107798T	DSM 16559; CCUG 47378; IBS S6874	Heces de mono sano <i>Macaca fascicularis</i> (Francia)	<i>A. simiae</i>
CECT5864	848T; CIP 108676; LMG 22214	Coquina (<i>Donax trunculus</i>) (España)	<i>A. molluscorum</i>
CECT5865	93M; LMG 22215	Mejillón (<i>Mytilus</i> sp.) (España)	<i>A. molluscorum</i>
CECT5866	431E; LMG 22216	Berbercho (<i>Cardium</i> sp.) (España)	<i>A. molluscorum</i>
CECT5867	849T; LMG 22217	Coquina (<i>Donax trunculus</i>) (España)	<i>A. molluscorum</i>
CECT5868	869N; LMG 22218	Navaja (<i>Ensis</i> sp.) (España)	<i>A. molluscorum</i>

Anexo 6. Cepas utilizadas en el estudio 4.1.3.

Cepa	Aislado	Origen	Especie RFLP ADNr 16S	Numero patrón asignado	Identificación por <i>rpoD</i>	Nº acceso al GenBank ADNr 16S	<i>rpoD</i>
75	ambiental	St.Pere Pescador	<i>A. caviae</i> *	1	<i>A. caviae</i>	FJ168770	EU488677
89	ambiental	Cubelles	<i>A. caviae</i> *	1	<i>A. caviae</i>	FJ168769	EU488678
115	ambiental	Llobregat	<i>A. caviae</i> *	1	<i>A. caviae</i>		EU488661
706	ambiental	Bota	<i>A. caviae</i> *	1			
721	ambiental	Badalona	<i>A. caviae</i> *	1			
733	ambiental	Gava	<i>A. caviae</i> *	1			
757	ambiental	Llobregat	<i>A. caviae</i> *	1			
761	ambiental	Parc Litoral	<i>A. caviae</i> *	1			
808	ambiental	La Muga	<i>A. caviae</i> *	1			
104c	clinico	Valle Hebrón	<i>A. caviae</i> *	1			
133c	clinico	Valle Hebrón	<i>A. caviae</i> *	1			
134c	clinico	Valle Hebrón	<i>A. caviae</i> *	1	<i>A. caviae</i>		EU488668
145c	clinico	Valle Hebrón	<i>A. caviae</i> *	1	<i>A. caviae</i>		EU488675
162c	clinico	Valle Hebrón	<i>A. caviae</i> *	1	<i>A. caviae</i>		EU488672
176c	clinico	Valle Hebrón	<i>A. caviae</i> *	1	<i>A. caviae</i>	FJ168775	EU488670
204c	clinico	ND	<i>A. caviae</i> *	1			
219c	clinico	Valle Hebrón	<i>A. caviae</i> *	1	<i>A. caviae</i>	FJ168776	EU488671
261c	clinico	Valle Hebrón	<i>A. caviae</i> *	1	<i>A. caviae</i>		EU488667
296c	clinico	Valle Hebrón	<i>A. caviae</i> *	1	<i>A. caviae</i>		EU488669
315c	clinico	Valle Hebrón	<i>A. caviae</i> *	1	<i>A. caviae</i>		EU488666
320c	clinico	Valle Hebrón	<i>A. caviae</i> *	1	<i>A. caviae</i>		EU488673
356c	clinico	Valle Hebrón	<i>A. caviae</i> *	1			

359c	clinico	Valle Hebrón	<i>A. caviae</i> *	1			
360c	clinico	Valle Hebrón	<i>A. caviae</i> *	1	<i>A. caviae</i>	FJ168774	EU488665
462c	clinico	Valle Hebrón	<i>A. caviae</i> *	1			
499c	clinico	Valle Hebrón	<i>A. caviae</i> *	1	<i>A. caviae</i>	EU488689	EU488643
555c	clinico	Valle Hebrón	<i>A. caviae</i> *	1	<i>A. caviae</i>	EU488690	EU488644
622c	clinico	Sant Joan	<i>A. caviae</i> *	1			
694c	clinico	ND	<i>A. caviae</i> *	1	<i>A. caviae</i>	FJ168772	EU488659
698c	clinico	ND	<i>A. caviae</i> *	1			
782c	clinico	Miguel Servet	<i>A. caviae</i> *	1	<i>A. caviae</i>	FJ168777	EU488662
792c	clinico	Miguel Servet	<i>A. caviae</i> *	1			
793c	clinico	Miguel Servet	<i>A. caviae</i> *	1			
800c	clinico	Miguel Servet	<i>A. caviae</i> *	1	<i>A. caviae</i>		EU488660
805c	clinico	Miguel Servet	<i>A. caviae</i> *	1			
280	ambiental	Banyoles	<i>A. jandaei</i> *	2	<i>A. media</i>		AY308846[54]
610	ambiental	ND	<i>A. jandaei</i> *	2	<i>A. media</i>		AY308847[54]
743	ambiental	St. Simo	<i>A. media</i> *	2			
136c	clinico	Valle Hebrón	<i>A. veronii</i> *	2	<i>A. caviae</i>	EU488688	EU488640
225c	clinico	La Concha	<i>A. jandaei</i> *	2			
309c	clinico	Valle Hebrón	<i>A. caviae</i> *	2	<i>A. caviae</i>		EU488656
370c	clinico	Valle Hebrón	<i>A. jandaei</i> *	2			
566c	clinico	Valle Hebrón	<i>A. jandaei</i> *	2			
770c	clinico	Miguel Servet	<i>A. caviae</i> *	2			
776c	clinico	Miguel Servet	<i>A. caviae</i> *	2			
777c	clinico	Miguel Servet	<i>A. caviae</i> *	2			
781c	clinico	Miguel Servet	<i>A. caviae</i> *	2			
808c	clinico	Miguel Servet	<i>A. caviae</i> *	2			
93c	clinico	Valle Hebrón	<i>A. veronii</i> *	2	<i>A. caviae</i>	EU488686	EU488637
98c	clinico	Valle Hebrón	<i>A. veronii</i> *	2	<i>A. caviae</i>	EU488687	EU488638
141c	clinico	Valle Hebrón	<i>A. caviae</i> *	3	<i>A. veronii</i>		EU488674
317c	clinico	Valle Hebrón	<i>A. veronii</i> *	3	<i>A. veronii</i>	EU488695	EU488641
625c	clinico	Valle Hebrón	<i>A. veronii</i> *	3	<i>A. veronii</i>		EU488655
633c	clinico	Valle Hebrón	<i>A. veronii</i> *	3	<i>A. veronii</i>	EU488693	EU488645
813c	clinico	Royo Vilanova	<i>A. veronii</i> *	3			
236	ambiental	ND	<i>A. jandaei</i> *	4	<i>A. media</i>		EU488680
922	ambiental	422 Llobregat	<i>A. jandaei</i> *	4			
924	ambiental	422 Llobregat	<i>A. jandaei</i> *	4			
925	ambiental	422 Llobregat	<i>A. jandaei</i> *	4			
938	ambiental	425 Llobregat	<i>A. jandaei</i> *	4	<i>A. media</i>	EU488682	EU488646
974	ambiental	Pozo 18S	<i>A. jandaei</i> *	4	<i>A. media</i>	EU488683	EU488647
975	ambiental	Pozo 19S	<i>A. jandaei</i> *	4	<i>A. media</i>	EU488684	EU488652
750	ambiental	Rec Moli	<i>A. veronii</i> *	5	<i>A. veronii</i>		EU488663
796	ambiental	Emb. San Antonio	<i>A. allossaccharophila</i> *	5	<i>A. veronii</i>		EU488654
39c	clinico	Palma	<i>A. veronii</i> *	5	<i>A. veronii</i>	EU488692	EU488635
41c	clinico	Palma	<i>A. veronii</i> *	5	<i>A. veronii</i>	EU488697	EU488636
43c	clinico	Palma	<i>A. veronii</i> *	5	<i>A. veronii</i>		EU488676
121c	clinico	Valle Hebrón	<i>A. caviae</i> *	6	<i>A. caviae</i>	EU488685	EU488639
153c	clinico	Valle Hebrón	<i>A. veronii</i> *	6			
178c	clinico	Valle Hebrón	<i>A. veronii</i> *	7	<i>A. veronii</i>	EU488694	EU488634
741c	clinico	Sant Joan	<i>A. veronii</i> *	7	<i>A. veronii</i>		EU488653
83	ambiental	Castelldefels	<i>A. caviae</i> *	8	<i>A. media</i>	EU488681	EU488648
302c	clinico	Valle Hebrón	<i>A. caviae</i> *	8	<i>A. media</i>		EU488658
542c	clinico	ND	<i>A. media</i> *	8			
480	ambiental	ND		9	<i>A. media</i>	FJ168773	AY308844[54]
457c	clinico	Valle Hebrón	<i>A. veronii</i> *	10	<i>A. veronii</i>	EU488696	EU488642

126c	clínico	Valle Hebrón	<i>A. jandaei</i> *	11	<i>A. veronii</i>	EU488699	EU488650
616c	clínico	ND	<i>A. jandaei</i> *	11	<i>A. veronii</i>		EU488657
702c	clínico	Sant Joan	<i>A. jandaei</i> *	11			
786c	clínico	Miguel Servet	<i>A. veronii</i> *	11	<i>A. veronii</i>	FJ168771	EU488679
812c	clínico	Royo Vilanova	<i>A. veronii</i> *	11	<i>A. veronii</i>		EU488664
807c	clínico	Miguel Servet	<i>A. caviae</i> *	12		EU488691	EU488649

Anexo 7. Cepas utilizadas en el estudio 4.2.1.

Cepa	Centro de origen	Origen	Patología	Identificación		
				Fenotipo	RFLP ADN 16S	Secuencia <i>rpoD</i>
A2.004	National Cheng Kung University Hospital, Taiwan	Herida	Quemado	<i>A. hydrophila</i>	<i>A. caviae</i>	<i>A. aquariorum</i>
A2.013	National Cheng Kung University Hospital, Taiwan	Sangre	Bacteriemia	<i>Aeromonas</i> spp	<i>A. caviae</i>	<i>A. aquariorum</i>
A2.040	National Cheng Kung University Hospital, Taiwan	Herida	Celulitis	<i>A. hydrophila</i>	<i>A. caviae</i>	<i>A. aquariorum</i>
A2.042	National Cheng Kung University Hospital, Taiwan	Sangre	Bacteriemia	<i>A. hydrophila</i>	<i>A. caviae</i>	<i>A. aquariorum</i>
A2.053	National Cheng Kung University Hospital, Taiwan	Herida	Herida	<i>A. hydrophila</i>	<i>A. caviae</i>	<i>A. aquariorum</i>
A2.056	National Cheng Kung University Hospital, Taiwan	Sangre	Bacteriemia	<i>Aeromonas</i> spp	<i>A. caviae</i>	<i>A. aquariorum</i>
A2.058	National Cheng Kung University Hospital, Taiwan	Herida	Left forearm wd infection	<i>A. hydrophila</i>	<i>A. caviae</i>	<i>A. aquariorum</i>
A2.061	National Cheng Kung University Hospital, Taiwan	Sangre	Bacteriemia	<i>A. hydrophila</i>	<i>A. caviae</i>	<i>A. aquariorum</i>
A2.070	National Cheng Kung University Hospital, Taiwan	Sangre	Bacteriemia	<i>A. hydrophila</i>	<i>A. caviae</i>	<i>A. aquariorum</i>
A2.086	National Cheng Kung University Hospital, Taiwan	Herida	Herida	<i>A. hydrophila</i>	<i>A. caviae</i>	<i>A. aquariorum</i>
A2.094	National Cheng Kung University Hospital, Taiwan	Sangre	Bacteriemia	<i>A. hydrophila</i>	<i>A. caviae</i>	<i>A. aquariorum</i>
A2.096	National Cheng Kung University Hospital, Taiwan	Ascites	Apendicitis con peritonitis	<i>A. hydrophila</i>	<i>A. caviae</i>	<i>A. aquariorum</i>
A2.098	National Cheng Kung University Hospital, Taiwan	Sangre	celulitis	<i>A. hydrophila</i>	<i>A. caviae</i>	<i>A. aquariorum</i>
A2.107	National Cheng Kung University Hospital, Taiwan	Sangre	SBP	<i>A. hydrophila</i>	<i>A. caviae</i>	<i>A. aquariorum</i>
A2.112	National Cheng Kung University Hospital, Taiwan	Bilis	Coalingitis aguda	<i>A. hydrophila</i>	<i>A. caviae</i>	<i>A. aquariorum</i>
A2.114	National Cheng Kung University Hospital, Taiwan	joint fluid	septic arthritis	<i>A. hydrophila</i>	<i>A. caviae</i>	<i>A. aquariorum</i>
A2.126	National Cheng Kung University Hospital, Taiwan	Bilis	Coalingitis aguda	<i>A. hydrophila</i>	<i>A. caviae</i>	<i>A. aquariorum</i>
A2.131	National Cheng Kung University Hospital, Taiwan	Herida	ND	<i>A. hydrophila</i>	<i>A. caviae</i>	<i>A. aquariorum</i>
A2.140	National Cheng Kung University Hospital, Taiwan	Espuito	ND	<i>A. hydrophila</i>	<i>A. caviae</i>	<i>A. aquariorum</i>
A2.155	National Cheng Kung University Hospital, Taiwan	Sangre	Fascitis necrotizante	<i>A. hydrophila</i>	<i>A. caviae</i>	<i>A. aquariorum</i>
A2.157	National Cheng Kung University Hospital, Taiwan	Sangre	Bacteriemia	<i>A. hydrophila</i>	<i>A. caviae</i>	<i>A. aquariorum</i>
A2.159	National Cheng Kung University Hospital, Taiwan	Sangre	Colecistitis aguda	<i>A. hydrophila</i>	<i>A. caviae</i>	<i>A. aquariorum</i>
MDC 562	Hospital Comarcal Vega Baja, Orihueña, España	Heces	Diarrea	ND	<i>A. caviae</i>	<i>A. aquariorum</i>
MDC 573	Hospital Comarcal Vega Baja, Orihueña, España	Heces	Diarrea	ND	<i>A. caviae</i>	<i>A. aquariorum</i>
MDC 671	Hospital Comarcal Vega Baja, Orihueña, España	Heces	Diarrea	ND	<i>A. caviae</i>	<i>A. aquariorum</i>

Anexo 8. Cepas utilizadas en el estudio 4.2.3.

Especie	Origen	Cepa
<i>A. salmonicida</i>	Absceso	361c
<i>A. caviae</i>	Orina	363c, 533c , 737c, * 819c
	Sangre	19c, 224c, 290c, 431c, 535c , 600c , 664c, 759c
	Bilis	468c, 540c
	Absceso	25c
	Heces	800c, 466c, 576c, 414c, 426c, 444c, 478c, 509c, 340c, 477c, 495c, 872c, 874c, 875c , 876c, 877c, 878c, 882c, 883c , 884c, 885c
<i>A. hydrophila</i>	Orina	366c
	Sangre	24c
	Herida	221c, 758c
	Absceso	602c
	Líquido úlcera	603c
	Extra-intestinal	191c , 194c
	Heces	825c, 506c, 364c, 482c, 887c
<i>A. jandaei</i>	Sangre	721c
	Heces	891c
<i>A. media</i>	Orina	541c
	Sangre	717c
	Heces	394c, 507c, 886c, 888c
<i>A. veronii</i>	Sangre	187c, 195c, 22c , 283c, 568c, 362c
	Heces	729c , 178c, 126c, 357c, 365c, 473c, 589c, 489c, 575c, 410c, 472c, 469c, 471c, 480c, 901c, 741c

Se destacan en negrita las cepas que poseen el gen *stx*₁

Anexo 9. Cepas utilizadas en el estudio 4.2.4.

Cepa	Centro de origen	Edad	Identificación			Patología de base	Aislamiento	Infección monomicrobiana
			Fenotipo	RFLP rDNA 16S	Secuencia <i>rpoD</i>			
AQ.18	Hospital Universitario de Guadalajara.	77	<i>A. hydrophila</i>	<i>A. hydrophila</i>	<i>A. hydrophila</i>	Cáncer de colon	Exudado de herida quirúrgica	<i>E. coli</i> , <i>Morganella morganii</i>
BJ.3	Hospital Universitario de Guadalajara	80	<i>A. hydrophila</i>	<i>A. hydrophila</i>	<i>A. hydrophila</i>	Diabetes mellitus y Colelitiasis	Exudado de herida quirúrgica (absceso de pared abdominal)	Si
AZ.99	Hospital Universitario de Guadalajara	81	<i>A. hydrophila</i>	<i>A. hydrophila</i>	<i>A. hydrophila</i>	Cáncer de recto	Exudado de herida quirúrgica	<i>E. anaerogenes</i> , <i>E. faecalis</i>
226365	Hospital Universitario de Guadalajara	88	<i>A. hydrophila</i>	<i>A. veronii</i>	<i>A. veronii</i>	Oclusión intestinal	Exudado de herida quirúrgica	<i>Klebsiella pneumoniae</i> , <i>S. anginosus</i>
22748	Hospital Royo Vilanova	62	<i>A. veronii bt sobria</i>	<i>A. veronii</i>	<i>A. veronii</i>	Cáncer de colon y diabetes mellitus	Exudado de herida quirúrgica	ND

- 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.
- ABRAMI L, FIRAZ M, DECROLY E, SEIDAH NG, JEAN J, THOMAS G, LEPLA SH, BUCKLEY JT, VANDER GOOT FG.** The pore forming toxin aerolysin is activated by furin. *J Biol Chem.* 1998. 271: 32656-32661.
- 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.
- ADEKAMBI T, SHINNICK TM, RAOULT D, DRANCOURT M.** Complete *rpoB* gene sequencing as a suitable supplement to DNA-DNA hybridization for bacterial species and genus delineation. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2008. 58: 1807-1814.
- AGUILAR A, MERINO S, RUBIERES X, TOMAS JM.** Influence of osmolarity on lipopolysaccharides and virulence of *Aeromonas hydrophila* serotype O:34 strains grown at 37 degrees C. *Infect Immun.* 1997. 65: 1245-1250.
- 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.
- ALBERT MJ, ANSARUZZAMAN M, TALUKDER KA, CHOPRA AK, KUHN I, RAHMAN M, FARUQUE AS, ISLAM MS, SACK RB, MOLLBY R.** Prevalence of enterotoxin genes in *Aeromonas* spp. isolated from children with diarrhea, healthy controls, and the environment. *J Clin Microbiol.* 2000. 38: 3785-3790.
- ALI A, CARNAHAN A, ALTWEGG M, LUTHYHOTTENSTEIN J, JOSEP SW.** *Aeromonas bestiarum* sp. nov. (formerly genomospecies DNA group 2 *Aeromonas hydrophila*), a new species isolated from non human sources. *Med Microbiol Lett.* 1996. 5: 156-165.
- ALKSNE LE, RASMUSSEN BA.** Expression of the AsbA1, OXA-12, and AsbM1 beta-lactamases in *Aeromonas jandaei* AER 14 is coordinated by a two-component regulon. *J Bacteriol.* 1997. 179: 2006-2013.
- 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.
- ALTWEGG M.** *Aeromonas* and *Plesiomonas*. p. 507-516. En: P.R. Murray, E. J. Baron, M.A. Pfaller, F.C. Tenover and R.H. Tenover (ed), Manual of Clinical Microbiology. ASM Press, Washington. 1999.

- ALTWEGG M, MARTINETTI LUCCHINI G, LÜTHY-HOTTENSTEIN J, ROHRBACH M.** *Aeromonas*-associated gastroenteritis after consumption of contaminated shrimp. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 1991. 10: 44-45.
- AMPEL N, PETER G.** *Aeromonas* bacteraemia in a burn patient. *Lancet.* 1981. 2: 987.
- AUSIO J, VAN DER GOOT FG, BUCKLEY JT.** Physical and chemical characterization of the oligomerization state of the *Aeromonas hydrophila* lipase/acyltransferase. *FEBS Lett.* 1993. 333: 296-300.
- 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.
- BARNETT TC, KIROV SM, STROM MS, SANDERSON K.** *Aeromonas* spp. possess at least two distinct type IV pilus families. *Microb Pathog.* 1997. 23: 241-247.
- BARRILLO DJ, McMANUS AT, CIOFFI WG, McMANUS WF, KIM SH, PRUITT BA, Jr.** *Aeromonas* bacteremia in burn patients. *Burns.* 1996. 22: 48-52.
- 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.* 2008. 20: 75-85.
- BIELASZEWSKA M, PRAGER R, KÖCK R, MELLMANN A, ZHANG W, TSCHÄPE H, TARR PI, KARCH H.** Shiga toxin gene loss and transfer *in vitro* and *in vivo* during enterohemorrhagic *Escherichia coli* O26 infection in humans. *Appl Environ Microbiol.* 2007. 73: 3144-3150.
- BINGLE LE, BAILEY CM, PALLEN MJ.** Type VI secretion: A beginner's guide. *Curr Opin Microbiol.* 2008. 11: 3-8.
- BOGDANOVIC R, COBELJIC M, MAKOVIC M, NIKOLIC V, OGNJANOVIC M, SARAJANOVIC L, MAKIC D.** Haemolytic-uraemic syndrome associated with *Aeromonas hydrophila* enterocolitis. *Pediatr Nephrol.* 1991. 5: 293-295.
- BONADONNA L.** Potential relationship between microbiological indicators of contamination and emergent pathogens. *Ann Ig.* 2003. 15: 31-38.
- 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.
- 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.

- BOUCHOTROCH S, QUESADA E, DEL MORAL A, LLAMAS I, BÉJAR V.** *Halomonas maura* sp. nov., a novel moderately halophilic, exopolysaccharide-producing bacterium. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2001. 51: 1625-1632.
- BOYD JM, DACANAY A, KNICKLE LC, TOUHAMI A, BROWN LL, JERICHO MH, JOHNSON SC, REITH M.** Contribution of type IV pili to the virulence of *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida* in atlantic salmon (*salmo salar* L.). *Infect Immun.* 2008. 76: 1445-1455.
- 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.
- BRENNER DJ, FANNING GR, RAKE AV, JOHNSON KE.** Batch procedure for thermal elution of DNA from hydroxyapatite. *Anal Biochem.* 1969. 28: 447-459.
- BROSIOUS J, PALMER ML, KENNEDY PJ, NOLLER HF.** Complete nucleotide sequence of a 16S ribosomal RNA gene from *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1978. 75: 4801-4805.
- BUCKLEY JT.** The channel-forming toxin aerolysin. *FEMS Microbiol Immunol.* 1992. 5:13-17.
- BUZOLITS S, DENNER EB, VYBIRAL D, WIESER M, KÄMPFER P, BUSSE HJ.** Classification of three airborne bacteria and proposal of *Hymenobacter aerophilus* sp. nov. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2002. 52: 445-456.
- BÜRK C, DIETRICH R, ACAR G, MORAVEK M, BULTE M, MARTLBAUER E.** Identification and characterization of a new variant of Shiga toxin 1 in *Escherichia coli* ONT:H19 of bovine origin. *J Clin Microbiol.* 2003. 41: 2106-2112.
- BURR SE, FREY J.** Analysis of type III effector genes in typical and atypical *Aeromonas salmonicida*. *J Fish Dis.* 2007. 30: 711-714.
- BURR S, STUBER K, WAHLI T, FREY J.** Evidence for a Type III secretion system in *Aeromonas salmonicida* subs. *salmonicida*. *J. Bacteriol.* 2002. 184: 5966-5970.
- CANALS R, ALTARRIBA M, VILCHES S, HORSBURGH G, SHAW JG, TOMAS JM, MERINO S.** Analysis of the lateral flagellar gene system of *Aeromonas hydrophila* AH-3. *J Bacteriol.* 2006a. 188: 852-862.
- CANALS R, VILCHES S, WILHELMS M, SHAW JG, MERINO S, TOMÁS JM.** Non-structural flagella genes affecting both polar and lateral flagella-mediated motility in *Aeromonas hydrophila*. *Microbiol.* 2007. 153: 1165-1175.
- CANALS R, RAMIREZ S, VILCHES S, HORSBURGH G, SHAW JG, TOMAS JM, MERINO S.** Polar flagellum biogenesis in *Aeromonas hydrophila*. *J Bacteriol.* 2006b. 188: 542-555.
- CAPLAN AJ, CYR DM, DOUGLAS MG.** Eukaryotic homologues of *Escherichia coli dnaJ*: a diverse protein family that functions with hsp70 stress proteins. *Mol Biol Cell.* 1993. 6:555-63.
- CASCON A, ANGUITA J, HERNANZ C, SANCHEZ M, FERNANDEZ M, NAHARRO G.** Identification of *Aeromonas hydrophila* hybridization group 1 by PCR assays. *Appl Environ Microbiol.* 1996. 62: 1167-1170.
- CASE RJ, BOUCHER Y, DAHLLOF I, HOLMSTROM C, DOOLITTLE WF, KJELLEBERG S.** Use of 16S rRNA and *rpoB* genes as molecular markers for microbial ecology studies. *Appl Environ Microbiol.* 2007. 73: 278-288.

- 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.
- CARNAHAN AM.** *Aeromonas* taxonomy: A sea of change. *Med Microbiol Lett.* 1993. 2: 206-211.
- 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 AM, FANNING GR, JOSEPH SW.** *Aeromonas jandaei* (formerly genospecies DNA group 9 *Aeromonas sobria*), a new sucrose-negative species isolated from clinical specimens. *J Clin Microbiol.* 1991c. 29: 560-564.
- CARNAHAN AM, JOSEPH SW.** Systematic assessment of geographically and clinically diverse aeromonads. *Syst Appl Microbiol.* 1993. 16: 72-84.
- CARTER AP, CLEMONS WM, BRODERSEN DE, MORGAN-WARREN RJ, WIMBERLY BT, RAMAKRISHNAN V.** Functional insights from the structure of the 30S ribosomal subunit and its interactions with antibiotics. *Nature.* 2000. 407: 340-348.
- CEYLAN E, BERKTAS M, AĞAOĞLU Z.** The occurrence and antibiotic resistance of motile *Aeromonas* in livestock. *Trop Anim Health Prod.* 2009. 41:199-204.
- 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.
- CHANG MC, CHANG SY, CHEN SL, CHUANG SM.** Cloning and expression in *Escherichia coli* of the gene encoding an extracellular deoxyribonuclease (DNase) from *Aeromonas hydrophila*. *Gene.* 1992. 94: 175-180.
- CHIM H, SONG C.** *Aeromonas* infection in critically ill burn patients. *Burns.* 2007. 33: 756-759.
- CHOPRA AK, HOUSTON CW.** Enterotoxins in *Aeromonas* associated gastroenteritis. *Microb Infect.* 1999. 1: 1129-1137.
- CHOPRA AK, PETERSON JW, XU XJ, COPPENHAVER DH, HOUSTON CW.** Molecular and biochemical characterization of a heat-labile cytotoxic enterotoxin from *Aeromonas hydrophila*. *Microb Pathog.* 1996. 21:357-377.
- CHRISTENSEN H, BISGAARD M, FREDERIKSEN W, MUTTERS P, KUHNERT P, OLSEN JE.** Is characterization of a single isolate sufficient for valid publication of new genus or species? Proposal to modify Recommendation 30b of the Bacteriological Code (1990 Revision). *Int J Syst Evol Microbiol.* 2001. 51: 2221-2225.

- CHU YW, WONG CH, TSANG GK, KWOK MS, WONG RK, LO JY, KAM KM.** Lack of association between presentation of diarrhoeal symptoms and faecal isolation of *Aeromonas* spp. amongst outpatients in Hong Kong. *J Med Microbiol.* 2006. 55:349-351
- CIANCIOTTO NP.** Type II secretion: A protein secretion system for all seasons. *Trends Microbiol.* 2005. 13: 581-588.
- 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
- CLARK NM, CHENOWETH CE.** *Aeromonas* infection of the hepatobiliary system: report of 15 cases and review of the literature. *Clin Infect Dis.* 2003. 37: 506-513.
- CLARRIDGE JE, 3RD.** Impact of 16S rRNA gene sequence analysis for identification of bacteria on clinical microbiology and infectious diseases. *Clin Microbiol Rev.* 2004. 17: 840-862.
- 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-A. Wayne PA: Clinical and laboratory standard institute. 2005.
- CLSI.** Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; 16th Informational Supplement. M100-S16. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute. 2006
- CLSI.** Performance standards for antimicrobial susceptibility testing, CLSI/NCCLS M100-S16. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute 2007.
- COBURN B, SEKIROV I, FINLAY BB.** Type III Secretion Systems and Disease. *Clin Microbiol Rev.* 2007. 20: 535-549.
- 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 hydrolysis-negative bacterium isolated from mussels. *Int J Syst Evol Microbiol.* (in press).
- COLLINS MD, MARTINEZ-MURCIA AJ, CAI J.** *Aeromonas enteropelogenes* and *Aeromonas ichthiosmia* are identical to *Aeromonas trota* and *Aeromonas veronii*, respectively, as revealed by small-subunit rRNA sequence analysis. *Int J Syst Bacteriol.* 1993. 43: 855-856.
- COLWELL RR, MacDONELL MR, DE LEY J.** Proposal to recognize the family *Aeromonadaceae* fam. nov. *Int J Syst Bacteriol.* 1986. 36: 473-477
- CORNELIS GR.** The type III secretion injectisome. *Nat Rev Microbiol.* 2006. 4:811-825.
- COSTELLO GM, VIPOND R, MACINTYRE S.** *Aeromonas salmonicida* possesses two genes encoding homologs of the major outer membrane protein, OmpA. *J Bacteriol.* 1996. 178: 1623-1630.
- CRISWELL D, TOBIASON VL, LODMELL JS, SAMUELS DS.** Mutations conferring aminoglycoside and spectinomycin resistance in *Borrelia burgdorferi*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2006. 50: 445-452.

- DACANAY A, KNICKLE L, SOLANKY KS, BOYD JM, WALTER JA, BROWN LL, JOHNSON SC, REITH M.** Contribution of the type III secretion system (TTSS) to virulence of *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida*. *Microbiol.* 2006. 152: 1847-1856.
- DATTA S, KHAN A, NANDY RK, REHMAN M, SINHA S, CHATTOPADHYAY S, DAS SC, NAIR GB.** Environmental isolates of *Aeromonas* spp. harboring the *cagA*-like gene of *Helicobacter pylori*. *Appl Environ Microbiol.* 2003. 69: 4291-4295.
- DAVIN-REGLI 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 ERIC-PCR. *J Med Microbiol.* 1998. 47: 499-504
- DEEPE GS, COONROD JD.** Fulminant wound infection with *Aeromonas hydrophila*. *South Med J.* 1980. 73: 1546-1547.
- 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, HUYS G, TONOLLA M, SWINGS J, PEDUZZI R.** Polyphasic taxonomic study of "Aeromonas eucrenophila-like" isolates from clinical and environmental sources. *Syst Appl Microbiol.* 2004. 27: 343-349.
- DEMARTA A, KÜPFER M, RIEGEL P, HARF-MONTEIL 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.
- DODD HN, PEMBERTON JM.** Cloning, sequencing, and characterization of the *nucH* gene encoding an extracellular nuclease from *Aeromonas hydrophila* JMP636. *J Bacteriol.* 1996. 178: 3926-3933.
- DODD HN, PEMBERTON JM.** The gene encoding periplasmic deoxyribonuclease for *Aeromonas hydrophila*. *FEMS Microbiol Lett.* 1999. 173: 41-46.
- DODSWORTH SJ, BENNETT AJ, COLEMAN G.** Molecular cloning and nucleotide sequence analysis of the maltose-inducible porin gene of *Aeromonas salmonicida*. *FEMS Microbiol Lett.* 1993. 112: 191-197.
- DOOLEY JS, MCCUBBIN WD, KAY CM, TRUST TJ.** Isolation and biochemical characterization of the S-layer protein from a pathogenic *Aeromonas hydrophila* strain. *J Bacteriol.* 1988. 170: 2631-2638.
- 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.
- EGGSET G, BJORNSDOTTIR R, LEIFSON RM, ARNESEN JA, COUCHERON DH, JORGENSEN TO.** Extracellular glycerophospholipid:cholesterol acyltransferase from *Aeromonas salmonicida*: activation by serine protease. *J Fish Dis.* 1994. 17: 17-29.
- EKLUND M, LEINO K, SIITONEN A.** Clinical *Escherichia coli* strains carrying *stx* genes: *stx* variants and *stx*-positive virulence profiles. *J Clin Microbiol.* 2002. 40: 4585-4593.

- ELLIOTT EJ, ROBINS-BROWNE RM, O'LOUGHLIN EV, BENNETT-WOOD V, BOURKE J, HENNING P, HOGG GG, KNIGHT J, POWELL H, REDMOND D.** Nationwide study of haemolytic uraemic syndrome: clinical, microbiological, and epidemiological features. *Arch Dis Child*. 2001. 85: 125-131.
- ERIKSSON A, ERIKSSON B, HOLM SE, NORGRÉN M.** Streptococcal DNase B is immunologically identical to superantigen SpeF but involves separate domains. *Clin Diagn Lab Immunol*. 1999. 6: 133-136.
- EROVA TE, KOSYKH VG, FADL AA, SHA J, HORNEMAN AJ, CHOPRA AK.** Cold shock exoribonuclease R (VacB) is involved in *Aeromonas hydrophila* pathogenesis. *J Bacteriol*. 2008. 190: 3467-3474.
- EROVA TE, SHA J, HORNEMAN AJ, BORCHARDT MA, KHAJANCHI BK, FADL AA, Y COLS.** Identification of a new hemolysin from diarrheal isolate SSU of *Aeromonas hydrophila*. *FEMS Microbiol Lett*. 2007. 275: 301-311.
- ESTEVE C.** Numerical taxonomy of *Aeromonadaceae* and *Vibrionaceae* associated with reared fish and surrounding fresh and brackish water. *Syst Appl Microbiol*. 1995a. 18: 391-402.
- 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*. 1995b. 45: 390-391.
- ESTEVE C, GUTIERREZ MC, VENTOSA A.** *Aeromonas encheleia* sp. nov., isolated from European eels. *Int J Syst Bacteriol*. 1995c. 45: 462-466.
- ESTEVE C, VALERA L, GUTIÉRREZ C, VENTOSA A.** Taxonomic study of sucrose-positive *Aeromonas jandaei*-like isolates from faeces, water and eels: emendation of *Aeromonas jandaei* (Carnahan et al. 1991). *Int J Syst Evol Microbiol*. 2003. 53: 1411-1419.
- ETEMADI J, ARDALAN MR, MOTAVALI R, TUBBS RS, SHOJA MM.** Thrombotic microangiopathy as a complication of medicinal leech therapy. *South Med J*. 2008. 101: 845-7.
- 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.
- FANG JS, CHEN JB, CHEN WJ, HSU KT.** Haemolytic-uraemic syndrome in an adult male with *Aeromonas hydrophila* enterocolitis. *Nephrol Dial Transplant*. 1999. 14: 439-440.
- 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, Washington, DC. 1985.
- FARMER JJ, ARDUINO, MJ HICKMAN-BRENNER FW.** The Genera *Aeromonas* and *Plesiomonas* in The Prokaryotes, a handbook on the biology of Bacteria, Third Edition, Vol 6: Proteobacteria: Gamma Subclass p. 564. Edited by Martin Dworkin. Springer Science+Business Media, LLC. 2006.
- 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-kappaB signalling 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.
- FIGUERAS MJ.** Clinical relevance of *Aeromonas*. *Rev Med Microbiol.* 2005. 16: 145-153.
- FIGUERAS MJ, ALDEA MJ, FERNÁNDEZ N, ASPIROZ C, ALPERI A, GUARRO J.** *Aeromonas* hemolytic uremic syndrome. A case and a review of the literature. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2007 58: 231-234.
- FIGUERAS MJ, ALPERI A, GUARRO J.** On the identification of clinical *Aeromonas* by a new restriction fragment length polymorphism of 16S rDNA method. *Lett Appl Microbiol.* 2007. 45:692-693.
- FIGUERAS MJ, GUARRO J, MARTÍNEZ-MURCIA AJ.** Use of restriction fragment length polymorphism of the PCR-amplified 16S rRNA gene for the identification of *Aeromonas* spp. *J Clin Microbiol.* 2000b. 38: 2023-2025.
- 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.* 2007b. 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.* 2000a. 50: 2069-2073.
- FIGUERAS MJ, SUAREZ-FRANQUET A, CHACÓN MR, SOLER L, NAVARRO M, ALEJANDRE C, GRASA B, MARTÍNEZ-MURCIA AJ, GUARRO J.** First record of the rare species *Aeromonas culicicola* from a drinking water supply. *Appl Environ Microbiol.* 2005. 71: 538-541.
- FILLER G, EHRICH JH, STRAUCH E, BEUTIN L.** Acute renal failure in an infant associated with cytotoxic *Aeromonas sobria* isolated from patient's stool and from aquarium water as suspected source of infection. *J Clin Microbiol.* 2000. 38: 469-470.
- FRIEDRICH AW, BIELASZEWSKA M, ZHANG WL, PULZ M, KUCZIUS T, AMMON A, KARCH H.** *Escherichia coli* harboring Shiga toxin 2 gene variants: frequency and association with clinical symptoms. *J Infect Dis.* 2002. 185: 74-84.
- FRONZES R, REMAUT H, WAKSMAN G.** Architectures and biogenesis of non-flagellar protein appendages in Gram-negative bacteria. *EMBO J.* 2008. 27:2271-2280.
- FRY DE, FRY RV.** Surgical site infection: the host factor. *AORN J.* 2007. 86: 801-810.
- GALINDO CL, SHA J, FADL AA, PILLAI LL AND CHOPRA AK.** Host Immune Responses to *Aeromonas* Virulence Factors. *Curr Microbiol Rev.* 2006. 2: 13-26.
- GALLARDO F, RUIZ J, MARCO F, TOWNER KJ, VILA J.** Increase in incidence of resistance to ampicillin, chloramphenicol and trimethoprim in clinical isolates of *Salmonella* serotype Typhimurium with investigation of molecular epidemiology and mechanisms of resistance. *J Med Microbiol.* 1999. 48: 367-374.
- GARCÍA-ALJARO C, MUNIESA M, BLANCO JE, BLANCO M, BLANCO J, JOFRE J, BLANCH AR.** Characterization of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolated from aquatic environments. *FEMS Microbiol. Lett.* 2005. 246: 55-65.
- GARCÍA-ALJARO C, MUNIESA M, JOFRE J, BLANCH AR.** Prevalence of the *stx*₂ gene in coliform populations from aquatic environments. *Appl Environ Microbiol.* 2004. 70: 3535-3540.
- GARDUÑO RA, MOORE AR, OLIVIER G, LIZAMA AL, GARDUNO E, KAY WW.** Host cell invasion and intracellular residence by *Aeromonas salmonicida*: role of the S-layer. *Can J Microbiol.* 2000. 46: 660-668.

- GAUTOM RK.** Rapid pulsed-field gel electrophoresis protocol for typing of *Escherichia coli* O157:H7 and other gram-negative organisms in 1 day. *J Clin Microbiol.* 1997. 35: 2977-2980.
- GAVÍN R, RABAAN AA, MERINO S, TOMÁS J, GRYLLOS I, SHAW JG.** Lateral flagella of *Aeromonas* species are essential for epithelial cell adherence and biofilm formation. *Mol Microbiol.* 2002. 43: 383-397.
- GHATAK S, AGARWAL RK, BHILEGAONKAR KN.** Species identification of clinically important *Aeromonas* spp. by restriction fragment length polymorphism of 16S rDNA. *Lett Appl Microbiol.* 2007. 44: 550-554.
- GIRAUD E, BLANC G, BOUJU-ALBERT A, WEILL FX, DONNAY-MORENO C.** Mechanisms of quinolone resistance and clonal relationship among *Aeromonas salmonicida* strains isolated from reared fish with furunculosis. *J Med Microbiol.* 2004. 53: 895-901.
- GOLD WL, SALIT IE.** *Aeromonas hydrophila* infections of skin and soft tissue: report of 11 cases and review. *Clin Infect Dis.* 1993. 16: 69-74.
- GÓMEZ-GIL, B., THOMPSON, F. L., THOMPSON, C. C. & SWINGS, J.** *Vibrio rotiferianus* sp. nov., isolated from cultures of the rotifer *Brachionus plicatilis*. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2003. 53: 239-243.
- GONZÁLEZ-RODRÍGUEZ MN, SANTOS JA, OTERO A, GARCÍA-LÓPEZ ML.** PCR detection of potentially pathogenic aeromonads in raw and cold-smoked freshwater fish. *J Appl Microbiol.* 2002. 93: 675-680.
- GOÑI-URRIZA M, ARPIN C, CAPDEPUY M, DUBOIS V, CAUMETTE P, QUENTIN C.** Type II topoisomerase quinolone resistance-determining regions of *Aeromonas caviae*, *A. hydrophila*, and *A. sobria* complexes and mutations associated with quinolone resistance. *Antimicrob Agents Chemother.* 2002. 46: 350-359.
- GOÑI-URRIZA M, PINEAU L, CAPDEPUY M, ROQUES C, CAUMETTE P, QUENTIN C.** Antimicrobial resistance of mesophilic *Aeromonas* spp. isolated from two European rivers. *J Antimicrob Chemother.* 2000. 46: 297-301.
- GORIS J, SUZUKI K, DE VOS P, NAKASE T, KERSTERS K.** Evaluation of a microplate DNA-DNA hybridization method compared with the initial renaturation method. *Can J Microbiol.* 1998. 44: 1148-1153.
- GRAEVENITZ A VON.** The role of *Aeromonas* in diarrhea: a review. *Infection.* 2007. 35:59-64.
- GRAEVENITZ A VON, MENSCH AH.** The genus *Aeromonas* in human bacteriology: report of 30 cases and review of the literature. *N Engl J Med.* 1968. 278: 245-249.
- GRAF J.** Diverse restriction fragment length polymorphism patterns of the PCR-amplified 16S rRNA genes in *Aeromonas veronii* strains and possible misidentification of *Aeromonas* species. *J Clin Microbiol.* 1999. 37: 3194-3197.
- 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.
- GRIMONT P.** Use of DNA reassociation in bacterial classification. *Can J Microbiol.* 1988. 34: 541-546.
- GROTIUZ G, SIROK A, GADEA P, VARELA G, SCHELOTTO F.** Shiga toxin 2-producing *Acinetobacter haemolyticus* associated with a case of bloody diarrhea. *J Clin Microbiol.* 2006. 44: 3838-3841.
- GRYLLOS I, SHAW IG, GAVIN R, MERINO S, TOMAS JM.** Role of *flm* locus in mesophilic *Aeromonas* species adherence. *Infect Immun.* 2001. 69: 65-74.

- GUGLIANDOLO C, LENTINI V, FERA MT, LA CAMERA E, MAUGERI TL.** Water quality and ecological status of the Alcantara River estuary (Italy). *New Microbiol.* 2009. 32: 77-87.
- GUNASEKARAN L, AMBALKAR S, SAMARJI RA, QAMRUDDIN A.** Post-traumatic osteomyelitis due to aeromonas species. *Indian J Med Microbiol.* 2009. 27:163-165.
- GÜRTLER V, STANISICH V.** New approaches to typing and identification of bacteria using the 16S-23S rDNA spacer region. *Microbiology.* 1996. 142: 3-16.
- GUSTAFSON CE, THOMAS CJ, TRUST TJ.** Detection of *Aeromonas salmonicida* from fish by using polymerase chain reaction amplification of the virulence surface array protein gene. *Appl Environ Microbiol.* 1992. 58: 3816-3825.
- HÄNNINEN ML, HIRVELA-KOSKI V.** Genetic diversity of atypical *Aeromonas salmonicida* studied by pulsed-field gel electrophoresis. *Epidemiol Infect.* 1999. 123: 299-307.
- HAQUE QM, SUGIYAMA A, IWADE Y, MIDORIKAWA Y, YAMAUCHI T.** Diarrheal and environmental isolates of *Aeromonas* spp. produce a toxin similar to Shiga-like toxin 1. *Curr Microbiol.* 1996. 32: 239-245.
- HARAYAMA S, KASAI H.** Bacterial phylogeny reconstruction from molecular sequences. In Molecular identification, systematics, and population structure of Prokaryotes. p.105. Edited by E. Stackebrandt. Spriger-Verlag Berlin Heidelberg. 2006.
- 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.
- HERNÁNDEZ-VALLADARES M, KIEFER M, HEINZ U, SOTO RP, MEYER- KLAUCKE W, NOLTING HF, ZEPPEZAUER M, GALLEN M, FRERE JM ET AL.** Kinetic and spectroscopic characterization of native and metal-substituted b-lactamase from *Aeromonas hydrophila*. *FEBS Lett* 2000. 467: 221-225.
- HEROLD S, KARCH K, SCHMIDT H.** Shiga-toxin-converting bacteriophages. Genomes in motion. *Int J Med Microbiol.* 2004. 294: 115-121.
- HEUZENROEDER MW, WONG CYF, FLOWER RFLP.** Distribution of two hemolytic toxin genes in clinical and environmental isolates of *Aeromonas* spp.: correlation with virulence in a suckling mouse model. *FEMS Microbiol Lett.* 1999. 174: 131-136.
- HICKMAN-BRENNER FW, FANNING G, 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 FR, BRENNER DJ, FARMER JJ.** *Aeromonas veronii* a new ornithine decarboxylase-positive species that may cause diarrhea. *J Clin Microbiol.* 1987. 25: 900-906.
- HILTON S, MCCUBBIN WD, KEY CM, BUCKLEY JT.** Purification and spectral study of a microbial fatty acyltransferase: activation by limited proteolysis. *Biochemistry.* 1990. 29: 9072-9078.
- HIRANSUTHIKUL N, TANTISIRIWAT W, LERTUTSAHAKUL K, VIBHAGOOL A, BOONMA P.** Skin and soft-tissue infections among tsunami survivors in Southern Thailand. *Clin Infect Dis.* 2005. 41: 93-96.

- HØIE S, DALSGAARD I, AASE IL, HEUM M, THORNTON JM, POWELL P.** Polymerase chain reaction (PCR)-based typing analysis of atypical isolates of the fish pathogen *Aeromonas salmonicida*. *Syst Appl Microbiol.* 1999. 22: 403-411.
- HOWARD A, MACINTYRE M, BUCKLEY P.** Toxins. p. 267-286. En: B. Austin, M. Altwegg, PJ Gosling, S. Joseph. (ed), *The genus Aeromonas*. John Wiley and Sons, New York. 1996.
- HUA HT, BOLLET C, TERCIAN S, DRANCOURT M, RAOULT D.** *Aeromonas popoffii* urinary tract infection. *J Clin Microbiol.* 2004. 42: 5427-5428.
- HUECK JH.** Type III protein secretion systems in bacterial pathogens of animals and plants. *Microbiol Mol Biol Rev.* 1998. 62: 379-433.
- 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 R, JANSSEN P, KERSTERS K.** High-resolution genotypic analysis of the genus *Aeromonas* by AFLP fingerprinting. *Int J Syst Bacteriol.* 1996. 46: 572-580.
- HUYS G, KÄMPFER P, ALBERT MJ, KÜHN I, DENYS R, SWINGS J.** *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.* 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.* 1997b. 47: 1157-1164.
- HUYS G, KÄMPFER P, ALTWEGG M, KERSTERS I, LAMB A, COOPMAN R, LÜTHY-HOTTENSTEIN J, VANCANNEYT M, JANSSEN P, KERSTERS K.** *Aeromonas popoffii* sp. nov., a mesophilic bacterium isolated from drinking water production plants and reservoirs. *Int J Syst Bacteriol.* 1997a. 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, KÄMPFER P, SWING J.** DNA-DNA reassociation and phenotypic data indicate synonymy between *Aeromonas enteropelogenes* Schubert et al. 1990 and *Aeromonas trota* Carnahan et al. 1991. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2002b. 52: 1969-1972.
- 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.
- HUYS G, SWINGS J.** Evaluation of a fluorescent amplified fragment length polymorphism (FAFLP) methodology for the genotypic discrimination of *Aeromonas* taxa. *FEMS Microbiol Lett.* 1999. 177: 83-92.
- INUKAI Y, KODAMA H.** Studies on hemolytic *Escherichia coli* of O-139. A certain factor essential for hemolysin production. *Jpn J Vet Res.* 1965. 13: 87-95.
- ISAACS RD, PAVIOUR SD, BUNKER DE, LANG SDR.** Wound infection with aerogenic *Aeromonas* strains: a review of twenty-seven cases. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 1988. 7: 355-360.
- ISHIGURO EE, AINSWORTH T, KAY WW, TRUST TJ.** Heme requirement for growth of fastidious atypical strains of *Aeromonas salmonicida*. *Appl Environ Microbiol.* 1986. 15: 668-670.

- ISRAIL AM, BALOTESCU MC, ALEXANDRU I, DOBRE G.** Discordancies between classical and API 20E microtest biochemical identification of *Vibrio* and *Aeromonas* strains. *Bacteriol Virusol Parazitol Epidemiol.* 2003. 48: 141-143.
- JAEGER KE, RANSAC S, DIJKSTRA BW, COLSON C, VAN HEUVEL M, MISSET O.** Bacterial lipases. *FEMS Microbiol Rev.* 1994. 15: 29-63.
- JANDA, JM.** *Aeromonas* and *Plesiomonas* p. 1237-1270. In M. Sussman (ed.), *Molecular Medical Microbiology*. Academic Press, San Diego, USA. 2001.
- 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.** 1996. Human pathogens. p. 151-174. En: B. Austin, M. Altwegg, PJ Gosling and S. Joseph. (ed), *The genus Aeromonas*. John Wiley and Sons, New York.
- 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.
- JANDA JM, BOTTONE EJ, REITANO M.** *Aeromonas* species in clinical microbiology: significance, epidemiology and speciation. *Diag Microbiol Infect Dis.* 1983. 1: 221-228.
- JEANTEUR D, GLETSU N, PATTUS F, BUCKLEY JT.** Purification of the *Aeromonas hydrophila* major outer-membrane proteins: N-terminal sequence analysis and channel forming properties. *Mol Microbiol.* 1992. 6: 25-41.
- JENKINS C, WILLSHAW GA, EVANS J, CHEASTY T, CHART H, SHAW DJ, DOUGAN G, FRANKEL G, SMITH HR.** Subtyping of virulence genes in verocytotoxin-producing *Escherichia coli* (VTEC) other than serogroup O157 associated with disease in the United Kingdom. *J Med Microbiol.* 2003. 52: 941-947.
- JIMENEZ N, CANALS R, LACASTA A, KONDAKOVA AN, LINDNER B, KNIREL YA, MERINO S, REGUE M, TOMAS JM.** Molecular analysis of three *Aeromonas hydrophila* AH-3 (serotype O34) lipopolysaccharide core biosynthesis gene clusters. *J Bacteriol.* 2008. 190: 3176-3184.
- JIMENEZ N, LACASTA A, VILCHES S, REYES M, VAZQUEZ J, AQUILLINI E, MERINO S, REGUE M, TOMAS JM.** Genetics and proteomics of *Aeromonas salmonicida* lipopolysaccharide core biosynthesis. *J Bacteriol.* 2009. 191: 2228-2236.
- JOHNSON JL.** Genetic characterization. In *Manual of methods for general bacteriology*. Edited by P. Gerhardt, R. G. E. Murray, R. N. Costilaw, E. W. Nester, W. A. Wood, N. R. Krieg & G. B. Phillips. Washington, D.C: American Society for Microbiology. 1981.
- JOSEPH SW, CARNAHAN AM, BRAYTON PR, FANNING GR, ALMAZAN R, DRABICK C, TRUDO EW, COLWELL RR.** *Aeromonas jandaei* and *Aeromonas veronii* dual infection of a human wound following aquatic exposure. 1991. 29: 565-569.
- 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: 108-111.
- KÄMPFER P, ALTWEGG M.** Numerical classification and identification of *Aeromonas* genespecies. *J Appl Bacteriol.* 1992. 72: 341-351.
- KÄMPFER P, ERHART R, BEIMFOHR C, BÖHRINGER J, WAGNER M, AMANN R.** Characterization of bacterial communities from activated sludge: culture-dependent numerical identification versus in situ

- identification using group- and genus-specific rRNA-targeted oligonucleotide probes. *Microb Ecol.* 1996. 32: 101-121.
- KANNO Y, KOBAYASHI H, RAI T, KANNO K, WATANABE K, OBARA K, SATO Y.** Hemolytic uremic syndrome associated with Shiga toxin producing *Escherichia coli* infection in a healthy adult woman. *Intern Med.* 2004. 43: 620-623.
- KAPER J, SEIDLER RJ, LOCKMAN H, COLWELL RR.** Medium for the presumptive identification of *Aeromonas hydrophila* and *Enterobacteriaceae*. *Appl Environ Microbiol.* 1979. 38: 1023-1026.
- KARCH H, MEYER T.** Single primer pair for amplifying segments of distinct Shiga-like-toxin genes by polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol.* 1989. 27: 2751-2757.
- KARCH H, MEYER T, RUSSMANN H, HESEMANN J.** Frequent loss of Shiga-like toxin genes in clinical isolates of *Escherichia coli* upon subcultivation. *Infect Immun.* 1992. 60: 3464-3467.
- KARMALI MA.** Infection by Shiga toxin-producing *Escherichia coli*: an overview. *Mol Biotechnol.* 2004. 26: 117-122.
- KARMALI M A, PETRIC M, LIM C, CHUENG R, ARBUS GS.** Sensitive method for detecting low numbers of verotoxin-producing *E. coli* in mixed cultures by use of colony sweeps and polymyxin extraction of verotoxin. *J Clin Microbiol.* 1985. 22: 614-619.
- KAY WW, TRUST TJ.** Form and functions of the regular surface array (S-layer) of *Aeromonas salmonicida*. *Experientia.* 1991. 47: 412-414.
- KAZNOWSKI A.** Identification of *Aeromonas* strains of different origin to the genomic species level. *J Appl Microbiol.* 1998. 84: 423-430.
- KAZNOWSKI A, KONECKA E.** Identification of *Aeromonas culicicola* by 16S rDNA RFLP. *Pol J Microbiol.* 2005. 54: 335-338.
- KHAN AA, NAWAZ MS, KHAN SA, CERNIGLIA CE.** Identification of *Aeromonas trota* (hybridization group 13) by amplification of the aerolysin gene using polymerase chain reaction. *Mol Cell Probes.* 1999. 13: 93-98.
- KIENZLE N, MULLER M, PEGG S.** *Aeromonas* wound infection in burns. *Burns.* 2000. 26: 478-482.
- 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
- KING GE, WERNER SB, KIZER KW.** Epidemiology of *Aeromonas* infections in California. *Clin Infect Dis.* 1992. 15: 449-452.
- 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.
- KIROV SM, CASTRISIOS M, SHAW JG.** *Aeromonas flagella* (polar and lateral) are enterocyte adhesins that contribute to biofilm formation on surfaces. *Infect Immun.* 2004. 72: 1939-1945.
- KIROV SM, SANDERSON K.** Characterization of a type IV bundle-forming pilus (SFP) from a gastroenteritis-associated strain of *Aeromonas veronii* biovar *sobria*. *Microb Pathog.* 1996. 21: 23-34.

- KLUYVER AJ, VAN NEIL CB.** Prospects for a natural system of classification of bacteria. *Zentralbl Bakteriol Parasitenkd Infectionskr Hyg Abt.* 1936. 94: 369-403.
- KO WC, CHIANG SR, LEE HC, TANG HJ, WANG YY, CHUANG YC.** *In vitro* and *in vivo* activities of fluoroquinolones against *Aeromonas hydrophila*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2003. 47: 2217-2222.
- KO WC, CHUANG YC.** *Aeromonas* bacteriemia: review of 59 episodes. *Clin Infect Dis.* 1995. 20: 1298-1304.
- KO WC, LEE HC, CHUANG YC, LIU CC, WU JJ.** Clinical features and therapeutic implications of 104 episodes of monomicrobial *Aeromonas* bacteraemia. *J Inf.* 2000. 40: 267-273.
- KO WC, YU KW, LIU CY, HUANG CT, LEU HS, CHUANG YC.** Increasing antibiotic resistance in clinical isolates of *Aeromonas* strains in Taiwan. *Antimicrob Agents Chemother.* 1996. 40: 1260-1262.
- KO WC, WU HM, CHANG TC, YAN JJ, WU, JJ.** Inducible b lactam resistance in *Aeromonas hydrophila*: therapeutic challenge for antimicrobial therapy. *J Clin Microbiol .* 1998. 36, 3188-3192.
- KOEHLER JM, ASHDOWN LR.** *In vitro* susceptibilities of tropical strains of *Aeromonas* species from Queensland, Australia, to 22 antimicrobial agents. *Antimicrob Agents Chemother.* 1993. 37: 905-907.
- KOKKA RP, JANDA JM, OSHIRO LS, ALTWEGG M, SHIMADA T, SAKAZAKI R, BRENNER DJ.** Biochemical and genetic characterization of autoagglutinating phenotypes of *Aeromonas* species associated with invasive and noninvasive disease. *J Infect Dis.* 1991. 163: 890-894.
- KOKKA RP, VELJI AM, CLARK RB, BOTTONE EJ, JANDA J.** 1992. Immune response to S layer-positive 0:11 *Aeromonas* associated with intestinal and extraintestinal infections. *Immunol. Infect. Dis.* 2: 111-114.
- KOKSAL F, OGUZKURT N, SAMASTI M, ALTAS K.** Prevalence and antimicrobial resistance patterns of *Aeromonas* strains isolated from drinking water samples in Istanbul, Turkey. *Chemotherapy.* 2007. 53: 30-35.
- KORBSRISATE S, TRAKULSOMBOON S, DAMNIN S, GATEDEE J, RATCHTRACHENCHAI OA, LEELAPORN A, EAMPOKALAP B, GONGVISEISOOG C, SUPARAK S.** Genetic variations in *Aeromonas hydrophila* isolates from clinical and environmental sources in Thailand. *Southeast Asian J Trop Med Public Health.* 2007. 38:721-727.
- KOZINSKA A.** Dominant pathogenic species of mesophilic aeromonads isolated from diseased and healthy fish cultured in Poland. *J Fish Dis.* 2007. 30: 293-301.
- KROVACEK K, DUMONTET S, ERIKSSON E, BALODA SB.** Isolation, and virulence profiles, of *Aeromonas hydrophila* implicated in an outbreak of food poisoning in Sweden. *Microbiol Immunol.* 1995. 39: 655-661.
- 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.
- KÜHN I, ALBERT MJ, ANSARUZZAMAN M, BHUIYAN NA, ALABI SA, ISLAM MS, NEOGI PK, HUYS G, JANSSEN P, KERSTERS K, MÖLLBY R.** Characterization of *Aeromonas* spp. isolated from humans with diarrhea, from healthy controls, and from surface water in Bangladesh. *J Clin Microbiol.* 1997. 35: 369-373.
- 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, TAMURA K, NEI M.** MEGA3: Integrated software for Molecular Evolutionary Genetics Analysis and sequence alignment. *Brief Bioinform*. 2004. 5: 150-163.
- 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.
- LAGANOWSKA M, KAZNOWSKI A.** Restriction fragment length polymorphism of 16S-23S rDNA intergenic spacer of *Aeromonas* spp. *Syst Appl Microbiol*. 2004. 27:549-557.
- LAI CC, DING LW, HSUEH PR.** Wound infection and septic shock due to *Aeromonas trota* in a patient with liver cirrhosis. *Clin Infect Dis*. 2007a. 44: 1523-1524.
- LAI CC, SHIAO CC, LU GD, DING LW.** *Aeromonas hydrophila* and *Aeromonas sobria* bacteremia: Rare pathogens of infection in a burn patient. *Burns*. 2007b. 33: 255-257.
- 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.
- LEE C, CHO JC, LEE SH, LEE DG, KIM SJ.** Distribution of *Aeromonas* spp. as identified by 16S rDNA restriction fragment length polymorphism analysis in a trout farm. *J Appl Microbiol*. 2002. 93: 976-985.
- LEE KK, ELLIS AE.** Glycerophospholipid:cholesterol acyltransferase complexed with lipopolysaccharide (LPS) is a major lethal exotoxin and cytotoxin of *Aeromonas salmonicida*: LPS stabilizes and enhances toxicity of the enzyme. *J Bacteriol*. 1990. 172: 5382-5393.
- LEE JE, REED J, SHIELDS MS, SPIEGEL KM, FARRELL LD, SHERIDAN PP.** Phylogenetic analysis of Shiga toxin 1 and Shiga toxin 2 genes associated with disease outbreaks. *BMC Microbiol*. 2007. doi:10.1186/1471-2180-7-109.
- LEMO ML, TORANZO AE, BARJA JL.** Modified medium for the oxidation fermentation test in the identification of marine bacteria. *Appl Environ Microbiol*. 1985. 49: 1541-1543.
- LIM PL.** Appendicitis associated with travelers' diarrhea caused by *Aeromonas sobria*. *J Travel Med*. 2009, 16: 132-133.
- LIND E, URSING J.** Clinical strains of *Enterobacter agglomerans* (synonyms: *Erwinia herbicola*, *Erwinia milletiae*) identified by DNA-DNA-hybridization. *Acta Pathol Microbiol Immunol Scand [B]*. 1986. 94: 205-213.
- 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
- LUDWIG W, DORN S, SPRINGER N, KIRCOF G, SCHLEIFER K.** PCR-based preparation of 23S rRNA-targeted group-specific polynucleotide probes. *Appl Environ Microbiol*. 1994. 60: 3236-3244.
- LUND V, JENSSEN LM, WESMAJERVI MS.** Assessment of genetic variability and relatedness among atypical *Aeromonas salmonicida* from marine fishes, using AFLP-fingerprinting. *Dis Aquat Org*. 2002. 50: 119-126.

- LYE DJ.** A mouse model for characterization of gastrointestinal colonization rates among environmental *Aeromonas* isolates. *Curr Microbiol.* 2009. 58: 454-458.
- MACFADDIN JF.** Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia clínica. The William & Wilkins Company. Baltimore. Translation by Médica Panamericana S.A. 1993.
- MACINNES JI, TRUST TJ, GROSA.** Deoxiribonucleic acid relationship among members of the genus *Aeromonas*. *Can J Microbiol.* 1979. 25: 579-586.
- MALUPING RP, LAVILLA-PITOGO CR, DEPAOLA A, JANDA JM, KROVACEK K, GREKO C.** Antimicrobial susceptibility of *Aeromonas* spp., *Vibrio* spp. and *Plesiomonas shigelloides* isolated in the Philippines and Thailand. *Int J Antimicrob Agents.* 2005. 25: 348-350.
- MANGRAM AJ, HORAN TC, PEARSON ML, SILVER LC, JARVIS WR.** Guideline for prevention of surgical site infection. *Infect Control Hosp Epidemiol.* 1999. 20: 250-278.
- MARCHANDIN H, TEYSSIER C, SIMEON DE BUOCHBERG M, JEAN-PIERRE H, CARRIERE C, JUMAS-BILAK E.** Intra-chromosomal heterogeneity between the four 16S rRNA gene copies in the genus *Veillonella*: implications for phylogeny and taxonomy. *Microbiology.* 2003. 149: 1493-1501
- MARMUR J.** A procedure for the isolation of deoxyribonucleic acid from micro-organisms. *J Mol Biol.* 1961. 3: 208-218.
- MAROLDA CL, VICARIOLI J, VALVANO MA.** Wzx proteins involved in biosynthesis of O antigen function in association with the first sugar of the O-specific lipopolysaccharide subunit. *Microbiology.* 2004. 150: 4095-4105.
- MARTIN-CARNAHAN A, JOSEPH SW.** (2005). Order XII. *Aeromonadales* ord. nov. In Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, 2nd edn, vol. 2, part B, p. 556. Edited by D. J. Brenner, N. R. Krieg, J. T. Staley & G. M. Garrity. New York: Springer.
- MARTINETTI-LUCCINI G, ALTWEGG M.** rRNA gene restriction patterns as taxonomic tools for the genus *Aeromonas*. *Int J Syst Bacteriol.* 1992. 42: 384-389.
- MARTÍNEZ-MURCIA AJ.** Phylogenetic positions of *Aeromonas* DNA hybridization group 11, *Aeromonas popoffii*, and *Aeromonas* Group 501. *Int J Syst Bacteriol.* 1999. 49: 1403-1408.
- 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 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, FIGUERAS MJ, SAAVEDRA MJ, STACKEBRANDT E.** The recently proposed species *Aeromonas sharmans* sp. nov., isolate GPTSA-6T, is not a member of the genus *Aeromonas*. *Int Microbiol.* 2007. 10: 61-64.
- 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.

- MELLERSH AR, NORMAN P, SMITH GH.** *Aeromonas hydrophila*: an outbreak of hospital infection. *J Hosp Infect.* 1984. 5: 425-430.
- MENCACCI, A., CENCI, E., MAZZOLLA, R., FARINELLI, S., D'ALO, F., VITALI, M. & BISTONI, F.** *Aeromonas veronii* biovar *veronii* septicemia and acute suppurative cholangitis in a patient with hepatitis B. *J Med Microbiol.* 2003. 52: 727-730.
- MERINO S, AGUILAR A, RUBIRES X, ABITIU N, REGUE M, TOMAS JM.** The role of the capsular polysaccharide of *Aeromonas hydrophila* serogroup O:34 in the adherence to and invasion of fish cell lines. *Res Microbiol.* 1997. 148: 625-631.
- MERINO S, AGUILAR A, NOGUERAS MM, REGUE M, SWIFT S, TOMÁS JM.** Cloning, sequencing, and role in virulence of two phospholipases (A1 and C) from mesophilic *Aeromonas* sp. serogroup O:34. *Infect Immun.* 1999. 67: 4008-4013.
- 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.
- MERINO S, RUBIRES X, KNOCHEL S, TOMÁS JM.** Emerging pathogens: *Aeromonas* sp. *Int J Food Microbiology.* 1995. 28: 157-168.
- MERINO S, RUBIRES X, AGUILLAR A, GUILLOT JF, TOMAS JM.** The role of the O-antigen lipopolysaccharide on the colonization in vivo of the germfree chicken gut by *Aeromonas hydrophila* serogroup O:34. *Microbiol Pathog.* 1996. 20: 325-333.
- MERINO S, TOMÁS J.** Characterization of an *Aeromonas hydrophila* strain isolated on a septicemic out-break in a fish-farm of Spain. *Microbiologia.* 1988. 4: 181-184.
- 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, URBIZU-SERRANO A, FARFÁN M, FUSTÉ MC, LORÉN JG.** Phylogenetic analysis and identification of *Aeromonas* species based on sequencing of the *cpn60* universal target. *IJSEM.* En prensa.
- MOAWAD MR, ZEIDERMAN M.** *Aeromonas hydrophila* wound infection in elective surgery. *J Wound Care.* 2002. 11: 210-211.
- MONTEIL H, HARF-MONTEIL C.** *Aeromonas* infections. *Presse Med.* 1997. 26:1790-1798.
- 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.
- 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*. *Microbiology.* 2002. 148: 1233-1239.
- MUNN CB, ISHIGURO EE, KAY WW, TRUST TJ.** Role of surface components in serum resistance of virulent *Aeromonas salmonicida*. *Infect Immun.* 1982. 36: 1069-1075.

- MURRAY PR, ROSENTHAL KS, KOBAYASHI GS, PFALLER MA.** Microbiología Médica. 4rt Ed. Elsevier Science. 2002.
- NAKAO H, KIMURA K, MURAKAMI H, MARUYAMA T, TAKEDA T.** Subtyping of Shiga toxin 2 variants in human-derived Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains isolated in Japan. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 2002. 34:289-297.
- NAMBA A, MANO N, TAKANO H, BEPPU T, UEDA K, HIROSE H. J.** OmpA is an adhesion factor of *Aeromonas veronii*, an optimistic pathogen that habituates in carp intestinal tract. *Appl Microbiol.* 2008. 105: 1441-1451.
- NAMDARI H, BOTTONE EJ.** Microbiologic and clinical evidence supporting the role of *Aeromonas caviae* as a pediatric enteric pathogen. *J Clin Microbiol.* 1990. 28: 837-840.
- NAWAZ M, SUNG K, KHAN SA, KHAN AA, STEELE R.** Biochemical and molecular characterization of tetracycline-resistant *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.
- NELSON KL, RAJA SM, BUCKLEY JT.** The glycosylphosphatidylinositol-anchored surface glycoprotein Thy-1 is a receptor for the channel-forming toxin aerolysin. *J Biol Chem.* 1997. 272: 12170-12174.
- 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, HIRSCHHEL B.** Two different 16S rRNA genes in a mycobacterial strain. *J Clin Microbiol.* 1996. 34: 2531-2536.
- NOGUERAS MM, MERINO S, AGUILAR A, BENEDI VJ, TOMAS JM.** Cloning, sequencing, and role in serum susceptibility of porin II from mesophilic *Aeromonas hydrophila*. *Infect Immun.* 2000. 68: 1849-1854.
- NORIS M, REMUZZI G.** Hemolytic uremic syndrome. *J Am Soc Nephrol.* 2005. 16: 1035-1050.
- 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.
- 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.
- NUCCIO SP, BAUMLER AJ.** Evolution of the chaperone/usher assembly pathway: Fimbrial classification goes greek. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2007. 71: 551-575.
- OAKEY HJ, ELLIS JT, GIBSON LF.** A biochemical protocol for the differentiation of current genomospecies of *Aeromonas*. *Zbl Bakteriol.* 1996. 284: 32-46.
- OAKEY HJ, GIBSON LF, GEORGE AM.** DNA probes specific for *Aeromonas hydrophila* (HG1). *J Appl Microbiol.* 1999. 86: 187-193.
- O'BRIEN AD, CHEN ME, HOLMES RK, KAPER J, LEVINE MM.** Environmental and human isolates of *Vibrio cholerae* and *Vibrio parahaemolyticus* produce a *Shigella dysenteriae* 1 (Shiga)-like cytotoxin. *Lancet.* 1984. 1:77-78.

- OKPOKWASILI GC. 1991.** *Aeromonas hydrophila*: variability of biochemical characteristics of environmental isolates. *J Basic Microbiol.* 31: 169-176.
- O'HICI B, OLIVIER G, POWELL R.** Genetic diversity of the fish pathogen *Aeromonas salmonicida* demonstrated by random amplified polymorphic DNA and pulsed-field gel electrophoresis analyses. *Dis Aquat Organ.* 2000. 14:109-119.
- ORMEN O, GRANUM PE, LASSEN J, FIGUERAS MJ.** Lack of agreement between biochemical and genetic identification of *Aeromonas* spp. *APMIS.* 2005. 113: 203-207.
- ORTH D, GRIF K, KHAN AB, NAIM A, DIERICH MP, WURZNER R.** The Shiga toxin genotype rather than the amount of Shiga toxin or the cytotoxicity of Shiga toxin in vitro correlates with the appearance of the hemolytic uremic syndrome. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2007. 59: 235-242.
- OSORIO CR, COLLINS MD, TORANZO AE, ROMALDE JL.** 16S rRNA gene sequence analysis of *Photobacterium damsela* and Nested-PCR method for rapid detection of fish pasteurellosis. *Appl Environ Microbiol.* 1999. 65: 2942-2946.
- 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.** 1986. Feasibility of same-day identification of members of the family Vibrionaceae by the API 20E system. *J Clin Microbiol.* 23: 715-717.
- PALÚ AP, GOMES LM, MIGUEL MA, BALASSIANO IT, QUEIROZ ML, FREITAS-ALMEIDA AC, DE OLIVEIRA SS.** Antimicrobial resistance in food and clinical *Aeromonas* isolates. *Food Microbiol.* 2006. 23: 504-509.
- PAVAN ME, ABBOTT SL, ZORZÓPULOS J, JANDA JM.** *Aeromonas salmonicida* subsp. *pectinolytica* subsp. nov., a new pectinase-positive subspecies isolated from a heavily polluted river. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2000. 50: 1119-1124.
- PARK CH, KIM HJ, HIXON DL, BUBERT A.** Evaluation of the Duopath Verotoxin test for detection of shiga toxins in cultures of human stools. *J Clin Microbiol.* 2003. 41: 2650-2653.
- 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.
- PASS MA, ODERA R, BATT RM.** Multiplex PCRs for identification of *Escherichia coli* virulence genes. *J Clin Microbiol.* 2000. 38: 2001-2004.
- PATON AW, PATON JC.** *Enterobacter cloacae* producing a Shiga-like toxin II-related cytotoxin associated with a case of hemolytic-uremic syndrome. *J Clin Microbiol.* 1996. 34: 463-465.
- PATON JC, PATON AW.** Instability of a Shiga toxin type 2 gene in *Enterobacter cloacae*. *J Clin Microbiol.* 1997. 35: 1917.
- PETTERSSON B, BOLSKE G, THIAUCOURT F, UHLEN M, JOHANSSON KE.** Molecular evolution of *Mycoplasma capricolum* subsp. *capripneumoniae* strains, based on polymorphisms in the 16S rRNA genes. *J Bacteriol.* 1998. 180: 2350-2358.
- PEMBERTON JM, KIDD SP, SCHMIDT R.** Secreted enzymes of *Aeromonas*. *FEMS Microbiol. Lett.* 1997. 152: 1-10.

- PIDIYAR VJ, JANGID K, PATOLE MS, SHOUCHE YS.** Analysis of 16S-23S intergenic spacer regions and *rrn* operon copy number of *Aeromonas culicicola* MTCC 3249T. *DNA Seq.* 2003. 14: 183-194.
- 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.
- PODBIELSKI A, ZARGES I, FLOSDORFF A, WEBER-HEYNEMANN J.** Molecular characterization of a major serotype M49 group A streptococcal DNase gene (*sdaD*). *Infect Immun.* 1996. 64: 5349-5356.
- POOBALANE S, THOMPSON KD, DIAB A, ARDO L, JENEY G, ADAMS A.** Protein expression by *Aeromonas hydrophila* during growth in vitro and in vivo. *Microb Pathog.* 2008. 45: 60-69.
- POPOFF M, COYNAULT C, KRIEDJAN M, LEMELIN M.** Polynucleotide sequence relatedness among motile *Aeromonas* species. *Curr Microbiol.* 1981. 5: 109-114.
- POSADA D.** jModelTest: phylogenetic model averaging. *Mol Biol Evol.* 2008. 25: 1253-1256.
- PROFT T, BAKER EN.** Pili in gram-negative and gram-positive bacteria - structure, assembly and their role in disease. *Cell Mol Life Sci.* 2009. 66: 613-635.
- PRÜB BM, FRANCIS KP, VON STETTEN F, SCHERER S.** Correlation of 16S ribosomal DNA signature sequences with temperature-dependent growth rates of mesophilic and psychrotolerant strains of the *Bacillus cereus* Group. *J Bacteriol.* 1999. 181: 2624-2630.
- PUKALL R.** DNA fingerprinting techniques applied to the identification, taxonomy and community analysis of prokaryotes. In molecular identification, systematics, and population structure of prokaryotes. p.51. Edited by E. Stackebrandt. Springer-Verlag Berlin Heidelberg. 2006.
- PURDUE GF, HUNT JL.** *Aeromonas hydrophila* infection in burn patients. *Burns Incl Therm Inj.* 1988. 14: 220-221.
- 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.
- RABAAN AA, GRYLLOS I, TOMAS JM, SHAW JG.** Motility and the polar flagellum are required for *Aeromonas caviae* adherence to HEp-2 cells. *Infect Immun.* 2001. 69: 4257-4267.
- RAHMAN M, COLQUE-NAVARRO P, KUHN I, HUYS G, SWINGS J, MOLLBY R.** Identification and characterization of pathogenic *Aeromonas veronii* biovar *sobria* associated with epizootic ulcerative syndrome in fish in Bangladesh. *Appl Environ Microbiol.* 2002. 68: 650-655.
- RAHMAN M, HUYS G, RAHMAN M, ALBERT MJ, KUHN I, MOLLBY R.** Persistence, transmission, and virulence characteristics of *Aeromonas* strains in a duckweed aquaculture-based hospital sewage water recycling plant in Bangladesh. *Appl Environ Microbiol.* 2007. 73: 1444-1451.
- RANGREZ AY, DAYANANDA KM, ATANUR S, JOSHI R, PATOLE MS, SHOUCHE YS.** Detection of conjugation related type four secretion machinery in *Aeromonas culicicola*. *PLoS ONE.* 2006. 27: e115.
- 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.
- REYSENBACH AL, GIVER LJ, WICKHAM GS, PACE NR.** Differential amplification of rRNA genes by polymerase chain reaction. *Appl Environ Microbiol*. 1992. 58: 3417-3418.
- 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.
- RHODES G, PARKHILL J, BIRD C, AMBROSE K, JONES MC, HUYS G, SWINGS J, PICKUP RW.** Complete nucleotide sequence of the conjugative tetracycline resistance plasmid pFBAOT6, a member of a group of IncU plasmids with global ubiquity. *Appl Environ Microbiol*. 2004. 70: 7497-7510.
- RINGO E, SEPPOLA M, BERG A, OLSEN RE, SCHILLINGER U, HOLZAPFEL W.** Characterization of *Carnobacterium divergens* strain 6251 isolated from intestine of arctic charr (*Salvelinus alpinus* L.). *Syst Appl Microbiol*. 2002. 25: 120-129.
- 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
- ROBSON WLM, LEUNG AKC, TREVENEN CL.** Haemolytic-uraemic syndrome associated with *Aeromonas hydrophila* enterocolitis. *Pediatr Nephrol*. 1992. 6: 221-222.
- ROCHA DE SOUZA CM, COLOMBO AV, HIRATA R, MATTOS-GUARALDI AL, MONTEIRO LEAL LH, PREVIATO JO, FREITAS AC, ANDRADE AFB.** Identification of a 43-kDa outer-membrane protein as an adhesin in *Aeromonas caviae*. *J Med Microbiol*. 2001. 50: 313-319.
- ROCHA-DE-SOUZA CM, HIRATA R, MATTOS-GUARALDI AL, FREITAS-ALMEIDA AC, ANDRADE AFB.** Lecitin-binding properties of *Aeromonas caviae* strains. *Brazilian Journal of Microbiology*. 2008. 39: 214-218.
- ROSSELLÓ-MÓRA, R.** DNA-DNA reassociation methods applied to microbial taxonomy and their critical evaluation. In molecular identification, systematics, and population structure of prokaryotes. p.23. Edited by E. Stackebrandt. Springer-Verlag Berlin Heidelberg. 2006.
- ROSSOLINI GM, WALSH T, AMICOSANTE G.** The *Aeromonas* metallo-beta-lactamases: genetics, enzymology, and contribution to drug resistance. *Microb Drug Resist*. 1996. 2: 245-252.
- RUIZ M, MARTÍ S, FERNANDEZ-CUENCA F, PASCUAL A, VILA J.** High prevalence of carbapenem-hydrolysing oxacillinases in epidemiologically related and unrelated *Acinetobacter baumannii* clinical isolates in Spain. *Clin Microbiol Infect*. 2007. 13: 1192-1198.
- SAAVEDRA MJ, FIGUERAS MJ, MARTÍNEZ-MURCIA AJ.** Updated phylogeny of the genus *Aeromonas*. *Int J Syst Evol Microbiol*. 2006. 56: 2481-2487.
- SAAVEDRA MJ, PEREA V, FONTES MC, MARTINS C, MARTÍNEZ-MURCIA AJ.** Phylogenetic identification of *Aeromonas* strains isolated from carcasses of pig as new members of the species *Aeromonas allosaccharophila*. *Antonie Van Leeuwenhoek*. 2007. 91: 159-167.
- SACCHI CT, WHITNEY AM, REEVES MW, MAYER LW, POPOVIC T.** Sequence diversity of *Neisseria meningitidis* 16S rRNA genes and use of 16S rRNA gene sequencing as a molecular subtyping tool. *J Clin Microbiol*. 2002. 40: 4520-4527.

- SADER HS, JONES RN.** Antimicrobial susceptibility of uncommonly isolated non-enteric Gram-negative bacilli. *Int J Antimicrob Agents*. 2005. 25: 95-109.
- SAHA P, CHAKRABARTI T.** *Aeromonas sharmana* sp. nov., isolated from a warm spring. *Int J Syst Evol Microbiol*. 2006. 56: 1905-1909.
- SAINTPIERRE-BONACCIO, D., AMIR, H., PINEAU, R., LEMRISS, S. & GOODFELLOW, M.** *Streptomyces ferralitis* sp. nov., a novel streptomycete isolated from a New-Caledonian 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.
- SAMBROOK J, FRITTOCH EF, MANNIATIS T.** Molecular cloning. A laboratory Manual. Cold Spring Harbor, Laboratory Press. London. 1989.
- SANDERSON K, GHAZALI FM, KIROV SM.** Colonization of streptomycin-treated mice by *Aeromonas* species. *J Diarrhoeal Dis Res*. 1996. 14: 27-32.
- SAN JOAQUIN VH, PICKETT DA.** *Aeromonas*-associated gastroenteritis in children. *Pediatr Infect Dis J*. 1988. 7: 53-57.
- SCHMIDT H, MONTAG M, BOCKEMUHL J, HEESEMANN J, KARCH H.** Shiga-like toxin II-related cytotoxins in *Citrobacter freundii* strains from humans and beef samples. *Infect Immun*. 1993. 61: 534-543.
- SCHUBERT RHW, HEGAZI M.** *Aeromonas eucrenophila* species nova *Aeromonas caviae* a later and illegitimate synonym of *Aeromonas punctata*. *Zentrabl Bakteriell Hyb*. 1988. 268: 34-39.
- SCHUBERT RHW, HEGAZI M, WAHLIG W.** *Aeromonas enteropelogenes* species nova. *Hyg Med*. 1990a. 15: 471-472.
- SCHUBERT RHW, HEGAZI M, WAHLIG W.** *Aeromonas ichthiosmia* species nova. *Hyg Med*. 1990b.15: 477-479.
- SCOARIS DO, COLACITE J, NAKAMURA CV, UEDA-NAKAMURA T, DE-ABREU-FILHO BA, DIAS-FILHO BP.** Virulence and antibiotic susceptibility of *Aeromonas* spp. isolated from drinking water. *Antonie van Leeuwenhoek* .2008. 93: 111-122.
- 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.
- 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.
- SENDEROVICH Y, GERSHTEIN Y, HALEWA E, HALPERN M.** *Vibrio cholerae* and *Aeromonas*: do they share a mutual host? *ISME J*. 2008. 2:276-83.
- SESHADRI R, JOSEPH SW, CHOPRA AK Y COLS.** Genome sequence of *Aeromonas hydrophila* ATCC 7966T: jack of all trades. *J Bacteriol*. 2006. 188: 8272-8282.
- SHA J, KOZLOVA EV, CHOPRA AK.** Role of various enterotoxins in *Aeromonas hydrophila*-induced gastroenteritis: generation of enterotoxin gene-deficient mutants and evaluation of their enterotoxic activity. *Infect Immun*. 2002. 70: 1924-35.
- SHA J, PILLAI L, FADL AA, GALINDO CL, EROVA TE, CHOPRA AK.** The type III secretion system and cytotoxic enterotoxin alter the virulence of *Aeromonas hydrophila*. *Infect Immun*. 2005. 73: 6446-6457.

- SHA J, WANG SF, SUAREZ G, SIERRA JC, FADL AA, EROVA TE, FOLTZ SM, KHAJANCHI BK, SILVER A, GRAF J, SCHEIN CH, CHOPRA AK.** Further characterization of a type III secretion system (T3SS) and of a new effector protein from a clinical isolate of *Aeromonas hydrophila*--part I. *Microb Pathog.* 2007. 43:127-1246.
- SHARMA N, HU Z, CROWDER MW, BENNETT B.** Conformational changes in the metallo-beta-lactamase ImiS during the catalytic reaction: an EPR spectrokinetic study of Co(II)-spin label interactions. *J Am Chem Soc.* 2008. 130: 8215-8222.
- SHIBATA M, MORITA K, WATANABE N, WADA H, OKITSU T, YAMAI S, ITOH K, SHIMADA T, WATANABE H, KANAMORI M.** 1996. Rapid detection of the hemolysin genes in *Aeromonas sobria* by the polymerase chain reaction. *Kansenshogaku Zasshi.* 70: 1266-1270.
- SHINA, Y., II, K. & IWANAGA, M.** An *Aeromonas veronii* biovar *sobria* infection with disseminated intravascular gas production. *J Infect Chemother.* 2004. 10, 37-41.
- 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.
- SKOLL PJ, HUDSON DA, SIMPSON JA.** *Aeromonas hydrophila* in burn patients. *Burns.* 1998. 24: 350-353.
- SLOTNICK IJ.** *Aeromonas* species isolates. *Ann N Y Acad Sci.* 1970. 174: 503-510.
- SNEATH PHA.** Evidence from *Aeromonas* for genetic crossing-over in ribosomal sequences. *Int J Syst Bacteriol.* 1993. 43: 626-629.
- SNOWDEN L, WERNBACHER L, STENZEL D, TUCKER J, MCKAY D, O'BRIEN M, KATOULI M.** Prevalence of environmental *Aeromonas* in South East Queensland, Australia: a study of their interactions with human monolayer Caco-2 cells. *J Appl Microbiol.* 2006.101:964-975.
- 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.
- SOLER L, FIGUERAS MJ, CHACÓN MR, GUARRO J, MARTÍNEZ-MURCIA AJ.** Comparison of three molecular methods for typing *Aeromonas popoffii* isolates. *Antonie van Leeuwenhoek.* 2003. 83: 341-349.
- 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.* 2003. 41: 5732-5734.
- SOLER L, FIGUERAS MJ, CHACÓN MR, VILA J, MARCO F, MARTÍNEZ-MURCIA AJ, GUARRO J.** 2002. Potential virulence and antimicrobial susceptibility of *Aeromonas popoffii* recovered from freshwater and seawater. *FEMS Immun Med Microbiol.* 32: 243-247.
- SOLTAN-DALLAL MM, MOEZARDALAN K.** *Aeromonas* spp associated with children's diarrhoea in Tehran: a case-control study. *Ann Trop Paediatr.* 2004. 24: 45-51.
- SOUSSY CJ, SQUINAZI FJ, DUVAL J.** Les *Aeromonas* en pathologie humaine. A propos de vingt observations personnelles. *Med Mal Infect.* 1975. 5: 9-11. (In French.)
- SPRINGER B, KIDAN YG, PRAMMANANAN T, ELLROTT K, BÖTTGER EC, SANDER P.** Mechanisms of streptomycin resistance: selection of mutations in the 16S rRNA gene conferring resistance. *Antimicrob Agents Chemother.* 2001. 45: 2877-2884.

- 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, 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.
- STACKEBRANDT E, FREDERIKSEN W, GARRITY GM, GRIMONT PAD, KÄMPFER P, MAIDEN MCJ, NESME X, ROSSELLÓ-MÓRA 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.
- STAINER RY.** A note on the taxonomy of *P. hydrophilus*. *J Bacteriol.* 1943. 46: 213-214.
- STEINFELD S, ROSSI C, BOURGEOIS N, MANSOOR I, THYS JP, APPELBOOM T.** Septic arthritis due to *Aeromonas veronii* biotype *sobria*. *Clin Infect Dis.* 1998. 27: 402-403.
- STUNT RA, AMYES AK, THOMSON CJ, PAYNE DJ, AMYES SG.** The production of a novel carbapenem-hydrolysing betalactamase in *Aeromonas veronii* biovar *sobria*, and its association with imipenem resistance. *J Antimicrob Chemother.* 1998. 42: 835-836.
- SUAREZ G, SIERRA JC, SHA J, WANG S, EROVA TE, FADL AA, FOLTZ SM, HORNEMAN AJ, CHOPRA AK.** Molecular characterization of a functional type VI secretion system from a clinical isolate of *Aeromonas hydrophila*. *Microb Pathog.* 2008. 44:344-361.
- 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.
- TACAO M, ALVES A, SAAVEDRA MJ, CORREIA A.** BOX-PCR is an adequate tool for typing *Aeromonas* spp. *Antonie Van Leeuwenhoek.* 2005a. 88: 173-179.
- TACAO M, MOURA A, ALVES A, HENRIQUES I, SAAVEDRA MJ, CORREIA A.** Evaluation of 16S rDNA- and *gyrB*-DGGE for typing members of the genus *Aeromonas*. *FEMS Microbiol Lett.* 2005b. 246: 11-18.
- TALON D, DUPONT MJ, LESNE J, THOUVEREZ M, MICHEL-BRIAND Y.** Pulsed-field gel electrophoresis as an epidemiological tool for clonal identification of *Aeromonas hydrophila*. *J Appl Bacteriol.* 1996. 80: 277-282.
- TALON D, MULIN B, THOUVEREZ M.** Clonal identification of *Aeromonas hydrophila* strains using randomly amplified polymorphic DNA analysis. *Eur J Epidemiol.* 1998. 14: 305-310.
- TAMURA K, DUDLEY J, NEI M, KUMAR S.** MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol Biol Evol.* 2007. 24: 1596-1599.
- TAN YW, YU HB, LEUNG KY, SIVARAMAN J, MOK YK.** Structure of AscE and induced burial regions in AscE and AscG upon formation of the chaperone needle-subunit complex of type III secretion system in *Aeromonas hydrophila*. *Protein Sci.* 2008. 17: 1748-1760.
- TENA D, GONZÁLEZ-PRAETORIUS A, GIMENO C, PÉREZ-POMATA MT, BISQUERT J.** Infección extraintestinal por *Aeromonas* spp.: revisión de 38 casos. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2007. 25: 435-441. (In Spanish.)
- THOMPSON JD, HIGGINS DG, GIBSON TJ.** CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* 1994. 22: 4673-4680.

- THOMPSON FL, THOMPSON CC, LI Y, GÓMEZ-GIL B, VANDENBERGHE J, HOSTE B, SWINGS J.** *Vibrio kanaloae* sp. nov., *Vibrio pomeroyi* sp. nov. and *Vibrio chagasii* sp. nov., from sea water and marine animals. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2003. 53: 753-759.
- THOMPSON CC, THOMPSON FL, VANDEMEULEBROECKE K, HOSTE B, DAWYNDT P, SWINGS J.** Use of *recA* as an alternative phylogenetic marker in the family *Vibrionaceae*. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2004. 54: 919-929.
- THOMAS S, AUSTIN JW, MCCUBBIN WD, KAY CM, TRUST TJ.** Roles of structural domains in the morphology and surface anchoring of the tetragonal paracrystalline array of *Aeromonas hydrophila*. Biochemical characterization of the major structural domain. *J Mol Biol.* 1992. 228: 652-661.
- THOMAS SR, TRUST TJ.** Tyrosine phosphorylation of the tetragonal paracrystalline array of *Aeromonas hydrophila*: molecular cloning and high level of expression of the S-layer protein gene. *J Mol Biol.* 1995. 245: 568-581.
- TIMOTHY L, OVERMAN J, JANDA M.** Antimicrobial Susceptibility Patterns of *Aeromonas jandaei*, *A. schubertii*, *A. trota*, and *A. veronii* Biotype *veronii*. *J Clin Microbiol.* 1999. 706-708.
- TORANZO AE, SANTOS I, NIETO TP, BARJA JL.** Evaluation of different assay systems for identification of environmental *Aeromonas* strains. *Appl Environ Microbiol.* 1986. 51: 652-656.
- TREASURER JW, BIRKBECK TH, LAIDLER LA, COX DI.** Links Atypical *Aeromonas salmonicida* infection in naturally- and laboratory-challenged farmed haddock, *Melanogrammus aeglefinus* (L.). *J Fish Dis.* 2007. 30: 313-318.
- 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.
- TSCHAPE H, PRAGER R, STRECKEL W, FRUTH A, TIETZE E, BOHME G.** Verotoxinogenic *Citrobacter freundii* associated with severe gastroenteritis and cases of haemolytic uraemic syndrome in a nursery school: Green butter as the infection source. *Epidemiol Infect.* 1995. 114: 441-450.
- TSENG TT, TYLER BM, SETUBAL JC.** Protein secretion systems in bacterial-host associations, and their description in the Gene Ontology. *BMC Microbiology.* 2009. doi:10.1186/1471-2180-9-S1-S2
- TZIPORI S, SHEORAN A, AKIYOSHI D, DONOHUE-ROLFEA, TRACHTMAN H.** Antibody therapy in the management of Shiga toxin-induced Hemolytic Uremic Syndrome. *Clin Microbiol Rev.* 2004 24: 926-941.
- UEDA K, SEKI T, KUDO T, YOSHIDA T, KATAOKA M.** Two distinct mechanisms cause heterogeneity of 16S rRNA.. *J Bacteriol.* 1999. 181: 78-82.
- UMELO E, NOONAN B, TRUST TJ.** Cloning, characterization and expression of the *recA* gene of *Aeromonas salmonicida*. *Gene.* 1996. 175: 133-136.
- UPADHYAYA T, SINGH RK, DIXIT A.** Molecular cloning and sequence analysis of *lamB* encoding outer membrane maltose-inducible porin of *Aeromonas hydrophila*. *DNA Seq.* 2007. 18: 302-306.
- URDIAIN M, LÓPEZ-LÓPEZ A, GONZALO C, BUSSE HJ, LANGER S, KÄMPFER P, ROSSELLÓ-MÓRA R.** Reclassification of *Rhodobium marinum* and *Rhodobium pfennigii* as *Afifella marina* gen. nov. comb. nov. and *Afifella pfennigii* comb. nov., a new genus of photoheterotrophic Alphaproteobacteria and emended descriptions of *Rhodobium*, *Rhodobium orientis* and *Rhodobium gokarnense*. *Syst Appl Microbiol.* 2008. 31: 339-351.

- 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.
- 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: 430-441.
- VÁZQUEZ-JUÁREZ RC, GÓMEZ-CHIARRI M, BARRERA-SALDAÑA H, HERNÁNDEZ N, ASCENCIO F. The major *Aeromonas veronii* outer membrane protein: gene cloning and sequence analysis. *Curr Microbiol.* 2005. 51: 372-378.
- VÁZQUEZ-JUÁREZ RC, ROMERO MJ, ASCENCIO F.J. Adhesive properties of a LamB-like outer-membrane protein and its contribution to *Aeromonas veronii* adhesion. *Appl Microbiol.* 2004. 96: 700-708.
- VICKERY MCL, NILSSON WB, STROM MS, NORDSTROM JL, DEPAOLA A. A real-time PCR assay for the rapid determination of 16S rRNA genotype in *Vibrio vulnificus*. *J Microbiol Methods.* 2007. 68: 376-384
- VILA J, MARCOS MA, JIMENEZ DE ANTA MT. A comparative study of different PCR-based DNA fingerprinting techniques for typing of the *Acinetobacter calcoaceticus-A. baumannii* complex. *J Med Microbiol.* 1996. 44: 482-489.
- VILA J, MARCO F, SOLER L, CHACON M, FIGUERAS MJ. In vitro antimicrobial susceptibility of clinical isolates of *Aeromonas caviae*, *Aeromonas hydrophila* and *Aeromonas veronii* biotype sobria. *J Antimicrob Chemother.* 2002. 49: 701-702.
- 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. 44:1-12.
- VILLARI P, CRISPINO M, MONTUORI P, BOCCIA S. Molecular typing of *Aeromonas* isolates in natural mineral waters. *Appl Environ Microbiol.* 2003. 69: 697-701.
- VILLARI P, CRISPINO M, MONTUORI P, STANZIONE S. Prevalence and molecular characterization of *Aeromonas* spp. in ready-to-eat foods in Italy. *J Food Prot.* 2000. 63: 1754-1757.
- VILLUENDAS MC, ESTEBAN A, LÓPEZ-GÓMEZ C, FORTUÑO B, SERRANO M, MOLES B. *Aeromonas* en infecciones extraintestinales. *Rev Esp Microbiol Clin.* 1991. 6: 446-450.
- 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.
- VIPOND R, BRICKNELL IR, DURANT E, BOWDEN T, ELLIS AE, SMITH M, MACINTYRE S. Defined deletion mutants demonstrate that the major secreted toxins are not essential for the virulence of *Aeromonas salmonicida*. *Infect Immun.* 1998. 66: 1990-1998.
- VOSS LM, RHODES KH, JOHNSON KA. Musculoskeletal and soft tissue *Aeromonas* infection: an environmental disease. *Mayo Clin Proc.* 1992. 67: 422-427.

- WALSH TR, PAYNE DJ, MACGOWAN AP, BENNETT PM.** A clinical isolate of *Aeromonas sobria* with three chromosomally mediated inducible b-lactamases: a cephalosporinase, a penicillinase and a third enzyme, displaying carbapenemase activity. *J Antimicrob Chemother.* 1995. 35: 271–279.
- WALSH TR, GAMBLIN S, EMERY DC, MACGOWAN AP, BENNETT PM.** Enzyme kinetics and biochemical analysis of ImiS, the metallo-b-lactamase from *Aeromonas sobria*. 163a. *J Antimicrob Chemother.* 1996. 37: 423–431.
- WALSH TR, NEVILLE WA, HARAN MH, TOLSON D, PAYNE DJ, WALSH TR, STUNT RA, NABI JA, MACGOWAN AP, BENNETT PM.** Distribution and expression of beta-lactamase genes among *Aeromonas* spp. *J Antimicrob Chemother.* 1997. 40: 171–178.
- WALSH TR, NEVILLE WA, HARAN MH, TOLSON D, PAYNE DJ, BATESON JH, MACGOWAN AP, BENNETT PM.** Nucleotide and amino acid sequences of the metallo-b-lactamase, ImiS, from *Aeromonas veronii* bv. *sobria*. *Antimicrob Agents Chemother.* 1998. 42: 436–439.
- WANG G, TYLER KD, MUNRO CK, JOHNSON WM.** Characterization of cytotoxic, hemolytic *Aeromonas caviae* clinical isolates and their identification by determining the presence of a unique hemolysin gene. *J Clin Microbiol.* 1996. 34: 3203-3205.
- WANG G, CLARK CG, LIU C, PUCKNELL C, MUNRO CK, KRUK TMAC, CALDEIRA R, WOODWARD DL, RODGERS FG.** Detection and characterization of the hemolysin genes in *Aeromonas hydrophila* and *Aeromonas sobria* by multiplex PCR. *J Clin Microbiol.* 2003. 41: 1048-1054.
- WASHINGTON JA.** *Aeromonas hydrophila* in clinical bacteriological specimens. *Ann Intern Med* 1972. 76: 611-614.
- 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.
- WEIGELT JA, DRYER D, HALEY RW.** The necessity and efficiency of wound surveillance after discharge. *Arch Surg.* 1992. 127: 77-82.
- WESTERLUND B, KORHONEN TK.** Bacterial proteins binding to the mammalian extracellular matrix. *Mol Microbiol.* 1993. 9: 687-694.
- WIKLUND T, DALSGAARD I.** Occurrence and significance of atypical *Aeromonas salmonicida* in non-salmonicida and salmonid fish species: a review. *Diseases of Aquatic Organism.* 1998
- WILCOX MH, COOK AM, THICKETT KJ, ELEY A, SPENCER RC.** Phenotypic methods for speciating clinical *Aeromonas* isolates. *J Clin Pathol.* 1992. 45: 1079-1083.
- WILHELMS M, VILCHES S, MOLERO R, SHAW JG, JM TOMAS, MERINO S.** Two redundant sodium-driven stator motor proteins are involved in *Aeromonas hydrophila* polar flagellum rotation. *J Bacteriol.* 2009. 4: 2206–2217.
- WOESE CR.** Bacterial evolution. *Microbiol Rev.* 1987. 51: 221-271.
- 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.
- XU XJ, FERGUSON MR, POPOV VL, HOUSTON CW, PETERSON JW, CHOPRA AK.** Role of a cytotoxic enterotoxin in *Aeromonas*-mediated infections: development of transposon and isogenic mutants. *Infect Immun.* 1998. 66: 3501-3509.

- YANG JL, ZHAN WB, ZHOU L, XING J.** Purification, virulence and characterization of an extracellular peptidase produced by *Aeromonas salmonicida* ssp. *masoucida* isolated from cultured sea cucumber *Apostichopus japonicus*. *Dis Aquat Organ*. 2008. 82:223-229.
- 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.
- YU HB, ZHANG YL, LAU YL, YAO F, VILCHES S, MERINO S, TOMAS JM, HOWARD SP, LEUNG KY.** Identification and characterization of putative virulence genes and gene clusters in *Aeromonas hydrophila* PPD134/91. *Appl Environ Microbiol*. 2005. 71: 4469-4477.
- YU HB, RAO PS, LEE HC, VILCHES S, MERINO S, TOMAS JM, LEUNG KY.** A type III secretion system is required for *Aeromonas hydrophila* AH-1 pathogenesis. *Infect Immun*. 2004. 72: 1248-1256.
- YU HB, KAUR R, LIM S, WANG XH, LEUNG KY.** Characterization of extracellular proteins produced by *Aeromonas hydrophila* AH-1. *Proteomics*. 2007. 7: 436-449.
- ZHANG YL, ARAKAWA E, LEUNG KY.** Novel *Aeromonas hydrophila* PPD134/91 genes involved in O-antigen and capsule biosynthesis. *Infect Immun*. 2002. 70: 2326-2335.
- 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.