

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE VETERINARIA

DEPARTAMENTO DE NUTRICION Y BROMATOLOGIA III
(HIGIENE Y TECNOLOGIA DE LOS ALIMENTOS)

***Aeromonas* spp. MOVILES:
FACTORES DE VIRULENCIA EN CEPAS AISLADAS
DE ALIMENTOS Y DE HECES DIARREICAS HUMANAS**

Memoria que para optar al grado de Doctor
en Veterinaria presenta la Licenciada
M^a Carmen Pin Arias.

Madrid, julio de 1995.



TELF. 34-(9)1-394 37 49

FAX: 34-(9)1-394 37 43

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE VETERINARIA

DPTO. DE NUTRICION Y BROMATOLOGIA III
HIGIENE Y TECNOLOGIA DE LOS ALIMENTOS

CIUDAD UNIVERSITARIA
28040 MADRID

JOSE TORMO IGUACEL Y CARMEN CASAS VALENCIA, PROFESORES DE
NUTRICION Y BROMATOLOGIA DE LA FACULTAD DE VETERINARIA DE LA
UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID,

CERTIFICAN:

Que la tesis doctoral titulada "***Aeromonas* spp. móviles: Factores de virulencia en cepas aisladas de alimentos y de heces diarreicas humanas**", de la que es autora la Licenciada en Veterinaria M^a Carmen Pin Arias, se ha realizado en el Departamento de Nutrición y Bromatología III (Higiene y Tecnología de los Alimentos) bajo la dirección conjunta de los que suscriben y cumple las condiciones exigidas para optar al título de Doctor en Veterinaria.

Madrid, 14 de julio de 1995

Fdo.: José Tormo Iguacel

Fdo.: Carmen Casas Valencia

A Tuco
A mis padres

**Algunas veces he creído hasta
seis cosas imposibles antes del
desayuno**

**La Reina Blanca
"Alicia a través del espejo"**

AGRADECIMIENTOS

Al Profesor Dr. José Tormo Iguacel, a quien esta tesis se lo debe todo y yo le debo mucho más.

A la Profesora Dra. Carmen Casas Valencia, por su inestimable y siempre acertada asistencia y supervisión.

Además, quiero darles las gracias por el trato y el cariño que he recibido en estos cuatro años.

Al Profesor Dr. Bernabé Sanz Pérez por acogerme en el Departamento que dirigía en el momento de mi incorporación y por el interés demostrado en mi trabajo y formación.

Al Profesor Dr. Juan Antonio Ordóñez Pereda, actual Director del Departamento, por su accesible y desinteresada ayuda, prestada en todo momento.

Al Profesor Dr. Gonzalo García de Fernando Minguillón, que con su generosidad y clarividencia ha facilitado, de forma muy importante, la realización de este trabajo.

A la Profesora Dra. Paloma Morales, por su inestimable ayuda en la ejecución de los ensayos de citotoxicidad y, en la misma línea, a los Profesores Dres. M^a Isabel Cambero, Lorenzo de la Hoz, Juan Miguel Rodríguez, Juan I. Azcona, M^a Luisa García y Dolores Selgas por echarme una mano, aclarar mis dudas y, sobre todo, por su amistad.

También, quiero expresar mi agradecimiento a todas las personas con las que he convivido en este Departamento por los consejos, el apoyo, la amistad, el humor y los buenos ratos, en especial, a Gonzalo Anguita, Sergio Mano, Isabel González, Manuela Fernández y Daniel López.

Al Dr. Jorge Reina, médico del Hospital Son Dureta de Palma de Mallorca, por proporcionarme las cepas de *Aeromonas* spp. aisladas en heces diarreicas humanas.

También, quiero agradecer la colaboración de los miembros del Servicio Central de Microscopía Electrónica de la Universidad Complutense y del Servicio de Microscopía Electrónica de la Facultad de Veterinaria, especialmente, a Agustín Fernández y a Ana Vicente.

Al Ministerio de Educación y Ciencia por la concesión de una beca del Programa General de Formación de Personal Investigador.

A Salva, a Lourdes y al resto de mis amigos.

A mis padres, a mis hermanos, a Manolo, a Esther, a José Juan, a Matilde, a Kiko y a Marta por su cariño y confianza.

Por último a Tuco, por su colaboración tanto en la parte experimental como en la escritura de esta tesis y, sobre todo porque, sorprendentemente, me sigue soportando.

INDICE

	Página
I. - INTRODUCCION	1
<u>I.1. - Taxonomía</u>	4
I.1.1. - Precedentes históricos	4
I.1.2. - Clasificación	7
I.1.2.1. - Grupos de hibridación: identificación bioquímica	9
<u>I.2. - Aislamiento e identificación de <i>Aeromonas</i> spp. móviles</u>	14
<u>I.3. - Epidemiología</u>	17
I.3.1. - Heces humanas	17
I.3.2. - Alimentos: Factores que influyen en la supervivencia y en el crecimiento	19
I.3.3. - Procesos clínicos	22
I.3.3.1. - Gastroenteritis asociadas a alimentos	22
I.3.3.2. - Infecciones extraintestinales	23
I.3.4. - Agua y portadores animales	24
<u>I.4. - Factores de virulencia</u>	27
I.4.1. - Productos exocelulares	27
I.4.1.1. - Exotoxinas	27
I.4.1.1.1. - Enterotoxina citotónica	28
I.4.1.1.2. - Enterotoxina citotóxica	29
I.4.1.1.3. - Hemolisinas	31
I.4.1.1.4. - Mecanismo de acción de la β-hemolisina	32
I.4.1.1.5. - Factor que presenta reacciones cruzadas con la toxina del cólera (CTC)	33

I.4.1.2. - Proteasas	34
I.4.1.3. - Sideróforos	34
I.4.2. - Características asociadas a la célula bacteriana	35
I.4.2.1. - Fimbrias o <i>pili</i>	35
I.4.2.2. - Proteínas de la membrana externa de la pared bacteriana (OMPs)	38
I.4.2.3. - Lipopolisacáridos de la membrana externa de la pared bacteriana (LPSs)	39
I.4.2.4. - Flagelo	39
I.4.2.5. - Capa extra, proteica y externa a la pared bacteriana (capa S)	40
I.4.2.6. - Invasividad	42
I.4.2.7. - Resistencia al suero	42
I.4.2.8. - Plásmidos	43
II. - OBJETIVOS DEL TRABAJO	45
III. - MATERIAL Y METODOS	49
III.1. - <u>Material y equipo</u>	51
III.2. - <u>Productos biológicos</u>	52
III.2.1. - Microorganismos	52
III.2.2. - Alimentos	52
III.2.3. - Aguas	52
III.2.4. - Preparados hematológicos	52
III.2.5. - Líneas celulares estables	54
III.3. - <u>Reactivos</u>	54
III.4. - <u>Métodos</u>	54

III.4.1. - Preparación de los medios de cultivo	54
III.4.2. - Preparación de soluciones	54
III.4.3. - Recuentos microbianos	54
III.4.4. - Aislamiento de colonias	55
III.4.5. - Toma de muestras	55
III.4.6. - Mantenimiento de las cepas	55
III.4.7. - Revitalización de las cepas	55
III.4.8. - Manejo de líneas celulares estables	56
III.4.8.1. - Mantenimiento	56
III.4.8.2. - Recuentos celulares	56
III.4.8.3. - Cultivo de células Vero	56
III.4.8.4. - Cultivo de células de mieloma	57
III.4.9. - Técnica para comparar el comportamiento de los medios selectivos (AAA, AGAP y mA) en el aislamiento de <i>Aeromonas</i> spp.móviles.....	58
III.4.10. - Técnica para investigar el comportamiento de <i>A.</i> <i>sobria</i> CECT 837 en los medios selectivos (AAA, AGAP y mA) modificados	61
III.4.10.1. - Antibiograma	62
III.4.11. - Técnicas de enriquecimiento, aislamiento e identificación de <i>Aeromonas</i> spp. móviles en aguas y alimentos.....	63
III.4.11.1. - Enriquecimiento y aislamiento	63
III.4.11.2. - Identificación bioquímica de género y especie	64
<u>III.4.11.2.1. - Pruebas</u>	64
III.4.11.2.1.1. - Oxidasa	64
III.4.11.2.1.2. - Fermentación de glucosa (Agar con hierro de Kligler)	65
III.4.11.2.1.3. - Gram	65
III.4.11.2.1.4. - ONPG	65

III.4.14.1.1.4. - Correspondientes a las distintas fases del crecimiento bacteriano	77
<u>III.4.14.1.2. - Pruebas hemolíticas</u>	77
III.4.14.1.2.1. - En agar sangre de caballo o cordero	77
III.4.14.1.2.2. - En eritrocitos de conejo o cordero en suspensión ...	77
III.4.14.1.2.3. - En eritrocitos de conejo incluidos en agar	78
<u>III.4.14.1.3. - Pruebas proteolíticas</u>	78
III.4.14.1.3.1. - Caseína	78
III.4.14.1.3.2. - Elastina	79
<u>III.4.14.1.4. - Pruebas lipolíticas</u>	79
<u>III.4.14.1.5. - Pruebas de toxicidad sobre cultivos celulares</u>	81
III.4.14.1.5.1. - Células Vero	81
III.4.14.1.5.2. - Células de mieloma	85
III.4.14.2. - Propiedades superficiales	86
III.4.14.2.1. - Hemaglutinación con eritrocitos de cordero y conejo	86
III.4.14.2.2. - Inhibición de la hemaglutinación por D-manosa, L-fucosa y D-galactosa	87
III.4.14.2.3. - Autoaglutinación	87
III.4.14.2.4. - Aglutinación con acriflavina	88
<u>III.4.14.2.5. - Pruebas para estimar la hidrofobicidad celular</u>	88
III.4.14.2.5.1. - Unión a filtros de nitrocelulosa (FNC)	90
III.4.14.2.5.2. - Adsorción a hidrocarburos (<i>n</i> -hexadecano, <i>n</i> -octano y <i>p</i> -xileno)	90
III.4.14.2.6. - Inclusión de las muestras para la observación de las estructuras bacterianas con el microscopio electrónico de transmisión	91
III.4.14.3. - Características bioquímicas	93
III.4.14.3.1. - Voges Proskauer	93
III.4.14.3.2. - Fermentación de la arabinosa	94

III.4.14.3.3. - Descarboxilación de la lisina	94
III.4.15. - Análisis estadístico	94
IV. - RESULTADOS Y DISCUSION	95
<u>IV.1. - Medios de cultivo específicos para el aislamiento de</u> <u><i>Aeromonas</i> spp. móviles</u>	97
IV.1.1. - Recuperación de <i>Aeromonas</i> spp. móviles e inhibición de la flora natural de los alimentos en los medios mA, AGAP y AAA	97
IV.1.2. - Comportamiento de <i>A. sobria</i> CECT 837 sobre los medios mA, AGAP y AAA	99
<u>IV.2. - Aislamiento e identificación de <i>Aeromonas</i> spp. móviles ...</u>	102
IV.2.1. - Pruebas bioquímicas seleccionadas para su identificación y diferenciación	102
IV.2.2. - Influencia del almacenamiento de los alimentos a baja temperatura en su aislamiento	104
IV.2.3. - Incidencia en aguas y alimentos	104
IV.2.3.1. - Aguas	104
IV.2.3.2. - Carnes	105
IV.2.3.3. - Pescados y mariscos	105
IV.2.3.4. - Leche cruda y queso fresco	106
IV.2.3.5. - Ensaladas preparadas	106
IV.2.4. - Distribución en especies de las cepas aisladas en los distintos alimentos	107
<u>IV.3. - Resistencia al cloro de seis cepas diarreicas y seis</u> <u>alimentarias de <i>Aeromonas</i> spp. móviles</u>	107

<u>IV.4. - Influencia de diferentes parámetros exógenos sobre el crecimiento de seis cepas diarreicas y seis alimentarias de <i>Aeromonas</i> spp. móviles</u>	108
IV.4.1. - Temperatura	108
IV.4.2. - Cloruro sódico	110
IV.4.3. - pH	110
IV.4.4. - Nitrito sódico	111
IV.4.5. - Efecto combinado de los parámetros ensayados	111
<u>IV.5. - Factores de virulencia de <i>Aeromonas</i> spp. móviles</u>	113
IV.5.1. - Productos exocelulares de cepas diarreicas y alimentarias	113
IV.5.1.1. - Hemolisinas	113
IV.5.1.1.1. - Hemolisis desarrollada por las colonias bacterianas sobre agar sangre	113
IV.5.1.1.2. - Hemolisis desarrollada por el sobrenadante completo libre de células sobre eritrocitos en suspensión	114
IV.5.1.1.3. - Hemolisis desarrollada por el sobrenadante libre de células, concentrado y fraccionado por diafiltración, sobre eritrocitos de conejo	117
IV.5.1.1.4. - Evolución de la producción de hemolisinas, activas sobre eritrocitos de conejo, en función del crecimiento bacteriano	118
IV.5.1.2. - Enzimas (proteasas y lipasas)	119
<u>IV.5.1.2.1. - Proteasas</u>	119

IV.5.1.2.1.1. - Caseinólisis y elastinólisis desarrollada por el sobrenadante completo libre de células	119
IV.5.1.2.1.2. - Caseinólisis desarrollada por el sobrenadante libre de células, concentrado y fraccionado por diafiltración	119
IV.5.1.2.1.3. - Evolución de la producción de caseinasa en función del crecimiento bacteriano	120
<u>IV.5.1.2.2. - Lipasas</u>	121
IV.5.1.2.2.1. - Lipólisis desarrollada por el sobrenadante completo libre de células	121
IV.5.1.2.2.2. - Lipólisis desarrollada por el sobrenadante libre de células, concentrado y fraccionado por diafiltración ..	121
IV.5.1.2.2.3. - Evolución de la producción de lipasas en función del crecimiento bacteriano	122
IV.5.1.3. - Citotoxinas	122
IV.5.1.3.1. - Citotoxicidad desarrollada por el sobrenadante completo libre de células sobre líneas celulares estables	123
IV.5.1.3.2. - Citotoxicidad desarrollada por el sobrenadante libre de células, concentrado y fraccionado por diafiltración, sobre células Vero	125
IV.5.2. - Propiedades superficiales de cepas diarreicas y alimentarias	126
IV.5.2.1. - Hemaglutinación	126
IV.5.2.2. - Inhibición de la hemaglutinación por D-manosa, L-fucosa y D-galactosa	127
IV.5.2.3. - Autoaglutinación	129
IV.5.2.4. - Aglutinación con acriflavina	130
IV.5.2.5. - Hidrofobicidad superficial	130

IV.5.2.5.1. - Unión a filtros de nitrocelulosa	131
<u>IV.5.2.5.2. - Adsorción a hidrocarburos líquidos</u>	131
IV.5.2.5.2.1. - Al hexadecano	131
IV.5.2.5.2.2. - Al octano	132
IV.5.2.5.2.3. - Al xileno	132
IV.5.2.6. - Aspectos morfológicos de la superficie bacteriana	133
IV.5.2.6.1. - Capa S	133
IV.5.2.6.2. - <i>Pili</i>	134
IV.5.3. - Características bioquímicas de cepas diarreicas y alimentarias	135
IV.5.3.1. - Voges Proskauer	136
IV.5.3.2. - Descarboxilación de la lisina	136
IV.5.3.3. - Fermentación de la arabinosa	136
IV.5.4. - Asociaciones detectadas entre los factores indicadores de virulencia	137
IVa. - ANEXO (Tablas y Figuras)	141
V. - CONCLUSIONES	207
VI. - BIBLIOGRAFIA	211

I. INTRODUCCION



En la década de los 80 tiene lugar una explosión de interés científico de los miembros del género *Aeromonas* como patógenos para el hombre y animales debido, principalmente, a la asociación de estas bacterias con procesos gastroentéricos humanos. Actualmente, existen otras áreas de interés creciente, como la compleja taxonomía y los factores asociados a la virulencia, potencialmente responsables de infecciones humanas y animales.

En distintas partes del mundo se han descrito procesos gastroentéricos asociados, aunque no necesariamente causados por *Aeromonas* spp. (Gracey y col., 1982; Janda y Duffey, 1988; Altwegg y Geiss, 1989); al parecer esta asociación es más frecuente en niños menores de 2 años, adultos mayores de 50 años y personas inmunodeficientes (Burke y col., 1983a; Agger, 1986; San Joaquin y Pickett, 1988; Kuijper y col., 1989a; Gluskin y col., 1992) habiéndose detectado un mayor número de casos en verano (Burke y col., 1984b; Agger y col., 1985; Nishikawa y Kishi, 1988; Wilcox y col., 1992). En general, las cepas poseen factores indicadores de virulencia como enterotoxinas, citotoxinas, hemolisinas, proteasas y o capacidad invasiva, aunque no está clara la repercusión relativa de estas propiedades en la patogenicidad, de modo que no todas las cepas que las poseen parecen ser virulentas, siendo necesaria la combinación de estas propiedades bacterianas con factores predisponentes en el hospedador para que aparezca la diarrea (Kirov, 1993). La hospitalización, terapia antimicrobiana, neutralización del ácido gástrico o inhibición de la secreción ácida, enfermedades hepáticas o desórdenes intestinales, así como las cirugías gástrica o entérica, cáncer de colon, hemorragias gastrointestinales e inflamaciones idiopáticas se consideran factores predisponentes por parte del hospedador (Goodwin y col., 1983; George y col., 1985; Moyer, 1987).

No existe un modelo animal que permita reproducir la diarrea asociada a *Aeromonas*, por lo que los postulados de Koch, necesarios para considerar a un microorganismo como agente causal de una enfermedad infecciosa, no se cumplen (Janda, 1991). Pazzaglia y col. (1994) han intentado establecer un modelo animal administrando 10^8 ufc/día durante 4 días a ratones alimentados con dietas hipoproteicas, sin detectar síntomas de enfermedad en ningún animal. Morgan y col. (1985), observan que sólo dos personas de 57 voluntarios sanos desarrollaron diarrea tras ingerir dosis superiores a 10^{10} bacterias procedentes de heces diarreicas y con capacidad toxigénica. Sin embargo, en este estudio no se tienen en cuenta las propiedades adhesivas de las cepas o el nivel de inmunidad de estas personas.

La principal fuente de infección parece ser el agua. Así, se han detectado recuentos elevados de *Aeromonas* en, prácticamente, todos los tipos de aguas, incluso en las sometidas a cloración (Hazen y col., 1978; Burke y col., 1984b; Schubert, 1991), considerándose el agua no tratada como un importante factor de riesgo (Moyer, 1987).

El aislamiento de estos microorganismos a partir de alimentos es un hecho frecuente (Callister y Agger, 1987; Okrend y col., 1987; Abeyta y Wekell, 1988; Nishikawa y Kishi, 1988; Palumbo y col., 1989) por lo que, potencialmente, pueden incluirse dentro de los patógenos causantes de toxiinfecciones alimentarias (Buchanan y Palumbo, 1985; Morgan y Wood, 1988; Wadström y Ljungh, 1991). Además, Palumbo (1986) y Beuchat (1991) entre otros autores, comprueban que ciertas cepas, incluso enterotoxigénicas, son psicrótrofas por lo que la refrigeración de los alimentos no sería suficiente para frenar su desarrollo.

Numerosos investigadores han detectado enterotoxinas producidas por este grupo bacteriano (Burke y col., 1981b; Palumbo y col., 1987; Houston y col., 1991; Condon y col., 1992) incluso en alimentos refrigerados (Majeed y MacRae, 1991). Esto supondría que la presencia de un número elevado de *Aeromonas* en alimentos no sólo significaría un riesgo de infección, sino también de intoxicación. No obstante, los pocos casos de gastroenteritis asociados a *Aeromonas* registrados hasta el momento, presentan un periodo de incubación demasiado largo (> 6h.) como para ser reflejo de una intoxicación (Tabla I.1).

El controvertido papel de *Aeromonas* spp. móviles en las toxiinfecciones alimentarias es una realidad desde que los estudios microbiológicos, epidemiológicos, clínicos e inmunológicos indican que, al menos algunas cepas, son enteropatógenas.

I.1. - Taxonomía

I.1.1. - Precedentes históricos

El primer autor que describió un miembro perteneciente al actual género *Aeromonas* fue, probablemente, Zimmermann (1890). Este investigador aisló una bacteria del agua potable de la ciudad de Chemnitz que se caracterizaba por su crecimiento puntiforme en agar gelatina, por lo que la denominó *Bacillus punctatus*. En años posteriores, varios autores describieron cepas similares, procedentes de distintos orígenes acuáticos (Frankland y Frankland, 1889; Burckhardt, 1917) y su denominación pasó de *Bacterium punctatum* (Lehmann y Neumann, 1899) a *Achromobacter punctatum* (Bergey y col., 1923), siendo, posteriormente, transferida al género *Pseudomonas*, como *Ps. punctata* (Schäperclaus, 1930; Hitchner, 1948). Finalmente, en la séptima edición del Manual Bergey (Snieszko, 1957) este microorganismo se registra como *Aeromonas punctata*.

Un año después de la publicación de Zimmermann (1890), Sanarelli (1891), aisló un

Tabla I.1 - Procesos infecciosos asociados con la presencia de *Aeromonas* spp. móviles en alimentos

Lugar	Tasa de ataque	Periodo de incubación (h)	Aislamientos de <i>Aeromonas</i> en :		Referencia
			alimentos	heces	
Escuela (Rusia)	Intoxicación masiva	?	Pescado (precongelado)	?	Kalina, 1977
Hungría	Varios casos	20	Sopas, caldos de fécula	?	Jánossy y Tarjan, 1980
Cena festiva	1 / 2	20	Caracoles (precongelados)	Si	Agbonlahor y col., 1982
Lusiana (USA)	472	24-48	Ostras	NE	Abeyta y col., 1986
Florida (USA)	7 / 7	22-34	Ostras	Si	Abeyta y col., 1986
Escuela Primaria (Japón)	29 / 37	?	Desconocido ¿comida escuela?	Si	Kobayashi y Ohnaka, 1989
Hogar familiar (Japón)	4 / 5	?	Pescado (sashimi)	Si	Kobayashi y Ohnaka, 1989
Bar (Escocia)	> 20	< 24	Langostinos cocidos	No	Small, 1980*
Restaurante (UK)	3 / 3	24-36	Ostras	NE	McSwiggan y Jones, 1978*
Restaurante (UK)	14	> 24	Langostinos cocidos	NE	Informe hospitalario*
Restaurante (UK)	2	6-agos	Langostinos cocidos	No	Informe hospitalario*
Establecimiento especializado en comida preparada (USA)	1	48	Cóctel de gambas	Si	Altwegg y col., 1991

*. - Citado por Todd y col. (1989)

NE -- No examinado

bacilo de sangre y linfa de rana, que designó como *Bacillus hydrophilus fuscus*. El estudio comparativo de este microorganismo con la descripción microbiológica realizada por Ernst (1890) del bacilo *Bacillus ranicida* (agente causal de la enfermedad primaveral de las ranas), llevó a Sanarelli a la conclusión de que las dos especies debían de ser las mismas. Además, este autor rechazó el término *ranicida*, ya que este bacilo también podía ser agente infeccioso de peces y animales de sangre caliente. En el Manual Bergey (Bergey y col., 1923) a esta especie se le denomina *Proteus hydrophilus*, manteniéndose con este nombre (Reed y Toner, 1942; Kulp y Borden, 1942; Guthrie y Hitchner, 1943) hasta que se transfirió al género *Pseudomonas* (Hitchner, 1948). En la séptima edición del Manual Bergey (Snieszko, 1957) se reclasificó como *Aeromonas hydrophila*.

Hammer (1917) es el primer autor que describe la presencia de *Aeromonas* en alimentos, al aislar una bacteria en leche alterada que denominó *Bacillus ichthyosmius*. Entre los primeros investigadores que observaron *Aeromonas* spp. asociadas a infecciones humanas o animales se cita a Aikten y col. (1936) y Miles y Halnan (1937). En 1954, Hill y col. aíslan una cepa, a partir de un proceso septicémico desarrollado en un hombre y, posteriormente, Caselitz (1955) le asigna el nombre de *Vibrio jamaicensis*.

La especie denominada actualmente *A. caviae* fue descrita por primera vez por Scherago (1936) como *Pseudomonas caviae*, agente causante de la septicemia epizootica de los cobayas. Más tarde, Liu (1962) y Schubert (1964) establecieron que este bacilo podía ser una cepa anaerógena del grupo *Aeromonas* y la llamaron *A. punctata* subsp. *caviae*.

En 1936, Kluyver y van Niel proponen el nombre de *Aeromonas*; Stanier (1943) apoya esta iniciativa y, finalmente, la séptima edición del Manual Bergey (Snieszko, 1957) incluye este género dentro de la familia *Pseudomonadaceae*. La octava (Schubert, 1974) y novena (Popoff, 1984) edición reclasifican este género dentro de la familia *Vibrionaceae*.

En 1969 Schubert, describe dos especies: *A. hydrophila* (con tres subespecies: *A. hydrophila*, *A. anaerogenes* y *A. proteolytica*) y *A. punctata* (con dos subespecies: *A. punctata* y *A. caviae*).

Los datos expuestos, anteriormente, se han recogido de los trabajos publicados por von Graevenitz (1987) y Reina (1992).

En 1976, Popoff y Veron estudiaron el comportamiento de 68 *Aeromonas* mesófilas (anteriormente denominadas *A. hydrophila* y *A. punctata*) frente a 203 pruebas bioquímicas y fisiológicas, diferenciando *A. hydrophila* (con las biovariedades X₁ y X₂) y *A. sobria*. Posteriormente, Popoff y col. (1981) pudieron comprobar, estudiando la homología del ADN, que las tres especies previamente descritas (*A. hydrophila*, *A. sobria* y *A. caviae*,

esta última sería la biovariedad X₂ de *A. hydrophila*) eran genéticamente distintas y que, al menos dentro de cada una de ellas, se integraban dos o tres grupos de hibridación, lo que hacía suponer la existencia de más especies de las que en ese momento podían diferenciarse bioquímicamente.

I.1.2. - Clasificación

El género *Aeromonas* está constituido por formas bacilares rectas o curvas, de extremos redondeados, de 0,3 a 1,0 µm de diámetro y de 1,0 a 3,5 µm de longitud. Aparecen como células aisladas, en parejas o formando cadenas cortas. Gram-negativas, generalmente móviles (hay especies inmóviles) con un único flagelo polar. Anaerobias facultativas, con metabolismo respiratorio y fermentativo de la glucosa. Catalasa y oxidasa positivas y resistentes al agente vibriostático 2,4, diamino-6,7, diisopropilpteridina (0/129). El porcentaje molecular de G+C del ADN es 57-63 (Bd, T_m) (Joshep y col., 1987).

Las principales características que permiten diferenciar el grupo de *Aeromonas* spp. móviles de otros microorganismos frecuentes en los mismos ambientes radican en su carácter oxidasa positivo, que las diferencia de la familia *Enterobacteriaceae*; su capacidad para fermentar los carbohidratos que las distingue de *Pseudomonas* spp.; su crecimiento en caldo nutritivo en ausencia de ClNa y resistencia al agente vibriostático 0/129, en contraposición al comportamiento de *Vibrios* spp. halófilos; la producción de DNasa, el fracaso para metabolizar el inositol y, como se ha dicho anteriormente, la resistencia al agente vibriostático 0/129 que las distingue de *Plesiomonas shigelloides*. A diferencia de las aeromonas móviles y mesófilas *Aeromonas salmonicida* es inmóvil y no crece a 37°C (Holmberg y Farmer, 1984; Popoff, 1984; von Graevenitz, 1985).

Actualmente, el género *Aeromonas* está incluido junto con *Vibrio*, *Photobacterium* y *Plesiomonas* en la familia *Vibrionaceae* (Popoff, 1984; von Graevenitz, 1985). Estos autores describen dos grupos de *Aeromonas*, el primero formado por un grupo homogéneo y reducido de cepas psicrótrofas, inmóviles, incapaces de crecer a 37°C, productoras de un pigmento pardo soluble en agua, altamente patógenas para peces aunque no para el hombre, cuya única especie es *A. salmonicida*, que incluye tres subespecies: *salmonicida*, *achromogenes* y *mausocida*. El segundo grupo, amplio y heterogéneo, constituido por aeromonas móviles mesófilas, a menudo denominadas genéricamente como *A. hydrophila*,

y dividido en tres especies : *A. hydrophila*, *A. caviae* y *A. sobria*. El interés en los últimos años se ha centrado en este segundo grupo por su implicación en enfermedades humanas.

Las diferencias bioquímicas entre estas tres especies de aeromonas móviles se basan en la incapacidad de *A. sobria* de hidrolizar la esculina, crecer en presencia de CNK, utilizar la L-arginina, L-histidina y L-arabinosa y fermentar la salicina, mientras que, al igual que *A. hydrophila*, produce gas de la glucosa, H₂S de la cisteína, aunque muestra un comportamiento variable en el Voges Proskauer (producción de acetoina a partir de la glucosa). *A. caviae*, por el contrario, no produce gas, ni H₂S, ni acetoina, siendo positiva (al igual que *A. hydrophila*) en el resto de las pruebas en las que fracasa *A. sobria*. (Popoff, 1984).

Colwell y col. (1986) al estudiar las fracciones 5S y 16S del ARN_r han observado que la evolución filogenética de las cepas incluidas en el género *Aeromonas* difieren lo suficiente de la de los microorganismos pertenecientes a las familias *Enterobacteriaceae* y *Vibrionaceae*, como para excluirlas de esta última, y proponen la creación de la familia *Aeromonadaceae*. Ruimy y col. (1994) coinciden en la necesidad de crear esta familia, al analizar la secuencia de la subunidad pequeña del ARN_r.

Los estudios realizados por Fanning y col. (1985), confirmaron los resultados obtenidos previamente por Popoff y col. (1981), demostrando la existencia de cepas que no podían incluirse en ninguna de las especies conocidas hasta el momento, así como distintos grupos de hibridación, en base a la cinética de asociación ADN-ADN, dentro de cada una de las especies bioquímicamente definidas.

Allen y col. ya describieron en 1983 una nueva especie perteneciente al género *Aeromonas*, denominada *A. media* y caracterizada por ser inmóvil y producir un pigmento pardo.

En 1987, Hickman-Brenner y col., estudian genéticamente 11 cepas que, por su semejanza con *V. cholerae* y ser ornitina descarboxilasa negativas, habían sido previamente designadas como "Grupo entérico 77". En este trabajo se comprobó que podrían constituir una nueva especie (*A. veronii*), cuyas principales características bioquímicas radicaban en carecer de ornitina descarboxilasa y poseer arginina dihidrolasa. En este mismo estudio se comparó la cepa tipo de *A. veronii* con otras del género *Aeromonas*, diferenciándose un grupo con un elevado grado de hibridación genética que se caracterizaba por ser ornitina

descarboxilasa negativo y arginina dihidrolasa y lisina descarboxilasa positivo; la confirmación de estos datos conllevaría la existencia de un biogrupo dentro de esta especie (Fanning y col., 1985). Hickman-Brenner y col. (1988), comprobaron que 8 cepas similares a *Vibrio damsela*, aunque crecían en ausencia de CINa y habían sido consideradas como "Grupo entérico 501", en realidad, pertenecían al género *Aeromonas* y se correspondían con la especie denominada *A. schubertii*. Un segundo grupo, actualmente designado como "Grupo de *Aeromonas* 501", es similar a *A. schubertii* aunque muestra ciertas diferencias fenotípicas (indol positivo y lisina descarboxilasa negativo).

Schubert y Hegazy (1988) caracterizan a *A. eucrenophila* que, bioquímicamente, se corresponde con cepas aerogénicas de *A. caviae* y que representaría la especie anteriormente denominada *A. punctata* subsp. *punctata*.

Carnahan y col. (1991c) detectan un nuevo grupo de hibridación, denominado *A. jandaei*, similar a *A. sobria* pero sacarosa negativo. Posteriormente, se describió otro grupo de hibridación, caracterizado por su sensibilidad a la ampicilina, que se denominó *A. trota* (Carnahan y col., 1991b).

En 1992, Martínez-Murcia y col., basándose en la secuencia genética de la fracción 16S del ARN, describen una nueva especie, *A. allosaccharophila*, cuya cepa tipo es CECT 4199. Estudios de letalidad en peces parecen indicar que esta nueva especie puede que, únicamente, sea patógena oportunista, al contrario que *A. jandaei* que se ha manifestado como patógeno primario (Esteve y col., 1995).

Schubert y col. (1990a,b) propusieron dos especies de *Aeromonas* mesófilas: *A. enteropelogenes* y *A. ichthiosmia*, aunque la secuenciación de la fracción 16S del ARNr ha demostrado que estos microorganismos son idénticos a *A. trota* y *A. veronii*, respectivamente (Collins y col., 1993).

I.1.2.1. - Grupos de Hibridación: identificación bioquímica

Los grupos de hibridación (GH) se han constituido en función de la reasociación del ADN de las cepas. Los criterios empleados para establecer los 13 grupos de hibridación (Tabla I.2), descritos hasta ahora, se basan en las tasas relativas de unión del ADN. La especie genética incluida en cada grupo de hibridación, lo está en función de la cepa tipo que se integre en él (Janda, 1991). De este modo se han constituido once de los trece grupos de hibridación, ya que el 2 (GH2) y el 11 (GH11) no han podido ser asimilados en las especies descritas (Janda, 1991).

La especie fenotípica *A. hydrophila* engloba tres grupos de hibridación (GH1, GH2 y

Tabla I.2 - Actuales grupos de hibridación dentro del género *Aeromonas* (Fanning y col., 1985; Arduino y col., 1988; Hickman-Brenner y col., 1988; Schubert y Hegazi, 1988; Kuijper y col., 1989a; Altwegg y col., 1990; Carnahan y col., 1991b,c)

GH	Especie genética	Especie fenotípica	Aislamiento en el hombre	Frecuencia clínica
1	<i>A. hydrophila</i>	<i>A. hydrophila</i>	Si	(++++)
2	Sin nombre	<i>A. hydrophila</i>	Si	(+)
3	<i>A. salmonicida</i>	<i>A. hydrophila</i>	Si	(+)
4	<i>A. caviae</i>	<i>A. caviae</i>	Si	(++++)
5	<i>A. media</i>	<i>A. caviae</i>	Si	(++)
6	<i>A. eucrenophila</i>	<i>A. caviae</i>	No	(-)
7	<i>A. sobria</i>	<i>A. sobria</i>	No	(-)
8 / 10	<i>A. veronii</i>	<i>A. sobria</i>	Si	(++++)
9	<i>A. jandaei</i>	<i>A. sobria</i>	Si	(++)
10 / 8	<i>A. veronii</i>	<i>A. veronii</i>	Si	(++)
11	Sin nombre	<i>A. veronii</i>	Si	(+)
12	<i>A. schubertii</i>	<i>A. schubertii</i>	Si	(++)
13	<i>A. trota</i>	<i>A. sobria</i>	Si	(++)

Frecuencia clínica: (++++), predominan aislamientos clínicos; (++) de 10 a 50 aislamientos clínicos conocidos; (+) menos de 10 aislamientos clínicos conocidos; (-) ningún aislamiento clínico

GH3); la cepa tipo de *A. hydrophila* ATCC 7966 está incluida en el GH1, por lo que este grupo constituye la especie (genética) *A. hydrophila*. La cepa tipo de *A. salmonicida* ATCC 33658 se integra en el GH3, por lo que las diferencias fenotípicas (inmóvil y pigmento pardo) que, originalmente, distinguían las cepas de *A. salmonicida* de las *Aeromonas* mesófilas ahora, únicamente, definen una subespecie dentro del GH3 (Janda, 1991). Existen controversias en relación con el GH4, ya que *A. caviae* y *A. punctata* tienen la misma cepa tipo (ATCC 15468) (Farmer y col., 1986).

El GH5 contiene la cepa tipo *A. media* ATCC 33907. Hickman-Brenner y col. (1988) observan dos grupos de hibridación, relacionados genéticamente, que denominan GH5A y GH5B; *A. media* subsp. *new name* la incluyen en el GH5A y a *A. media* subsp. *media* en el GH5B. Debido a las importantes diferencias fenotípicas detectadas entre las cepas de *A. media* subsp. *media*, aisladas en aguas y en muestras clínicas, es preciso apuntar la posibilidad de que existan dos biogrupos: el I, constituido por cepas inmóviles e incapaces de usar la sacarosa como única fuente de carbono y el biogrupo II, que incluiría cepas móviles que crecen con dicho azúcar (Allen y col., 1983).

Los grupos de hibridación GH6 (*A. eucrenophila*) y GH7 (*A. sobria*) comprenden cepas que hasta el momento no han sido aisladas de muestras clínicas.

La mayoría de las cepas de *A. sobria*, aisladas en la clínica, no se integran en el GH7 (que contiene la cepa tipo de *A. sobria* CIP 7433), sino en el GH8 (que incluye la cepa tipo de *A. veronii* ATCC 9071), por lo que los aislamientos clínicos de *A. sobria* en realidad corresponderían a *A. veronii* biotipo *sobria* (Reina, 1992).

Los grupos GH8 y GH10 se establecieron independientemente y son distintos bioquímicamente, para Hickman-Brenner y col. (1987) el GH8 correspondería al fenotipo de *A. sobria* y el GH10 al de *A. veronii*. Sin embargo, recientemente, Kuijper y col. (1989b) han comprobado que estos dos grupos son idénticos genéticamente y, ya que el GH10 se describió antes, el GH8 debe considerarse un biotipo de *A. veronii*. Altwegg y col. (1990) han comprobado que la cepa tipo *A. sobria* CIP 7433 (GH7) muestra escasa correlación con las características bioquímicas observadas en los aislamientos clínicos, mientras que la cepa tipo *A. sobria* ATCC 9071 (incluida en el GH8) se asocia en mayor medida.

Kuijper y col. (1989b), trabajando con 142 cepas, compararon los grupos establecidos por hibridación del ADN con los obtenidos según la clasificación fenotípica de Popoff y col. (1981), llegando a observar serias diferencias; así, de las 26 cepas identificadas fenotípicamente como *A. hydrophila* sólo 15 pertenecían al genotipo GH1 y el

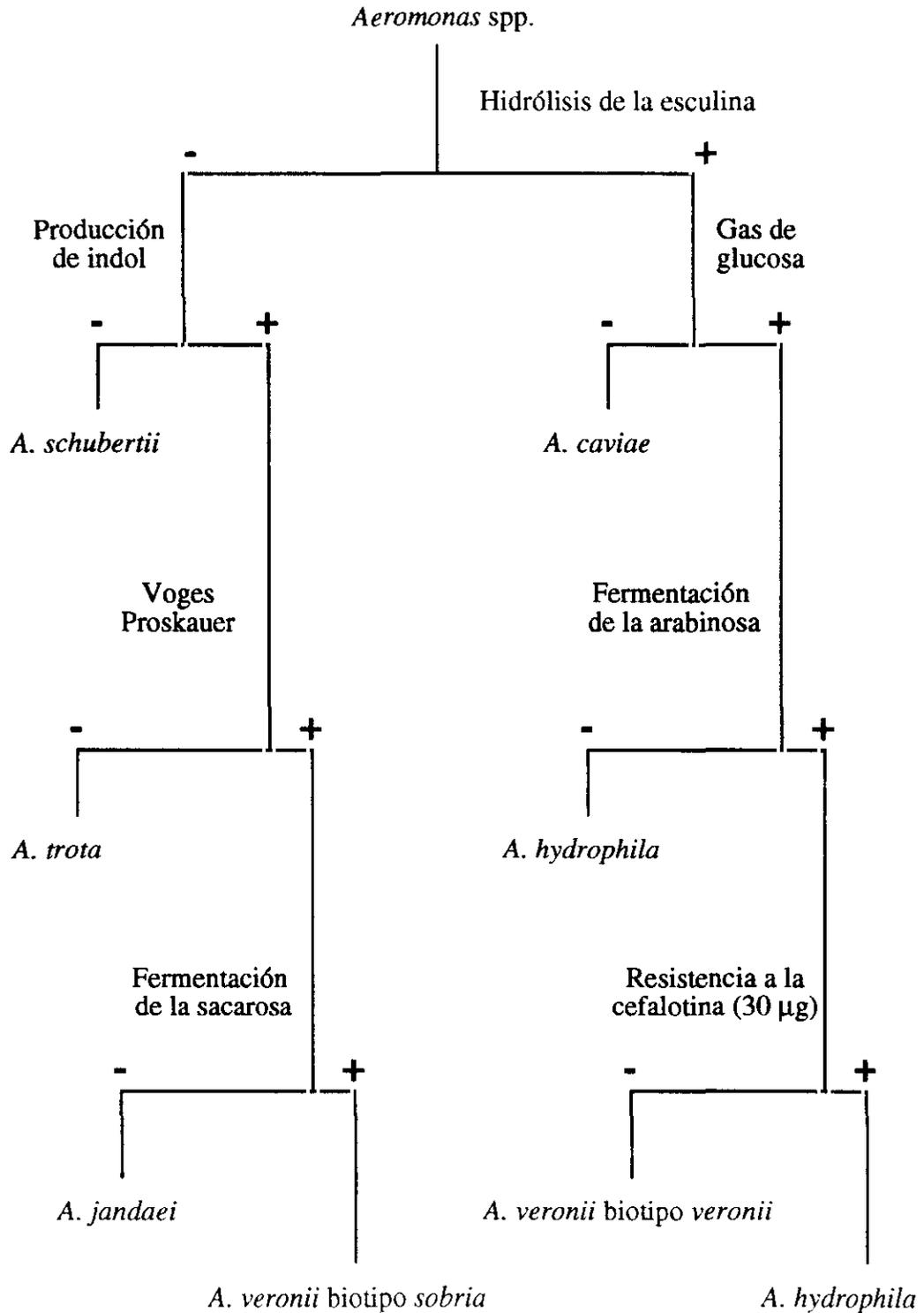
resto se repartía entre el GH2, GH3, GH5A y GH8.

Janda (1991) opina que las cepas de *Aeromonas* deben considerarse genéricamente como *Aeromonas* spp. o integrarse en el complejo de *A. hydrophila*. Es decir, sólo se debe identificar el género, ya que el papel de las especies en los procesos gastroentéricos no está establecido de forma concluyente, la identificación genética de las especies resulta cara y la bioquímica es excesivamente laboriosa y puede dar lugar a errores, sin olvidar que no existen informes de comunidades u hospitales sobre brotes de gastroenteritis por *Aeromonas* que justifiquen la identificación específica.

Por el contrario, otros autores consideran importante diferenciar las especies, desde que se conoce que la mayoría de las cepas fecales humanas (> 85%) pertenecen a GH1, GH4 y GH8 (*A. hydrophila*, *A. caviae* y *A. veronii* biotipo *sobria*) y el 15% restante a *A. media* (GH5) (Carnahan y col., 1991a, 1992; Abbott y col., 1992). Al parecer, *A. veronii* biotipo *sobria* (GH8) es el grupo de mayor virulencia (Daily y col., 1981; Janda y col., 1984b; Kirov y col., 1986; Carello y col., 1988; Havelaar y col., 1992; Kirov y Hayward, 1993), *A. caviae* (GH4) es más común en diarreas infantiles (Altwegg, 1985; Namdari y Bottone, 1990a,b, 1991), *A. veronii* biotipo *veronii* (GH10), *A. jandaei* (GH9) y *A. trota* (GH14) se aíslan de heces diarreicas con poca frecuencia (Carnahan y col., 1991b) y *A. schubertii* se ha asociado a heridas infectadas a través del agua, pero no a gastroenteritis (Hickman-Brenner y col., 1988; Carnahan y col., 1989b). En lo que se refiere al complejo de *A. hydrophila*, las cepas pertenecientes al GH1, frecuentemente se aíslan de muestras clínicas y producen factores de virulencia, mientras que el GH2 no elabora estos factores y el GH3 preferentemente se aísla de muestras ambientales (Kirov y col., 1994).

Carnahan y col. (1991a) proponen un sencillo esquema de siete pruebas bioquímicas, denominado "Aerokey II" (Figura I.1), para diferenciar las especies fenotípicas. Por otra parte, Abbott y col. (1992), recomiendan entre 19 y 24 pruebas bioquímicas para identificar los grupos de hibridación, siendo necesarias 9 pruebas (lisina descarboxilasa, ornitina descarboxilasa, arginina dihidrolasa, hidrólisis de la esculina, gas de glucosa, Voges Proskauer, fermentación de la arabinosa, del manitol y de la sacarosa) para separar el complejo *A. hydrophila* (GH1, GH2 y GH3), *A. caviae* (GH4 y GH5), el dúo GH12 y GH 13 y, de forma individualizada, el GH6, GH7, GH8, GH9, GH10 y GH11. La diferenciación de los tres grupos de hibridación que constituyen *A. hydrophila* se puede realizar en función de otras siete pruebas (producción de ácido de D-ramnosa, D-sorbitol, salicina y lactosa, oxidación del gluconato, elastasa y producción de ácido fenilpirúvico). Los genotipos que tienen el fenotipo de *A. caviae* (GH4, GH5 y GH6) se diferencian en la

Figura I.1. - Aerokey II (Carnahan *et al.*, 1991)



utilización del citrato, producción de ácido del glicerol y de la D-manosa, H₂S de la cisteína, hemólisis, pirazinamidasa y producción de ácido fenilpirúvico. *A. eucrenophila* (GH6) podría diferenciarse por la producción de gas, pero ésta es débil en comparación con la capacidad aerogénica de *A. hydrophila* o *A. veronii*, por lo que incluirla en este esquema evitaría un posible error de identificación. Finalmente, la lipólisis sobre aceite de maíz, la producción de ácido a partir de la celobiosa y de H₂S de la cisteína, así como la sensibilidad a la cefalotina y a la ampicilina son las cinco pruebas adicionales que diferencian *A. trota* y *A. schubertii*.

Recientemente, Hänninen (1994) observa que en el complejo *A. hydrophila*, el GH1 puede diferenciarse del GH2 y GH3 en función de la temperatura máxima de crecimiento, mientras que, en los patrones obtenidos en el análisis electroforético de las proteínas, el GH3 posee una banda de peso molecular variable entre 24, 25 o 26 kDa, que no aparece en las cepas del GH1 y GH2. Ash y col. (1993) han propuesto el uso de la reacción en cadena de la polimerasa y sondas génicas para la identificación de *A. schubertii* y *A. jandaei*.

I.2. - Aislamiento e identificación de *Aeromonas* spp. móviles

En un principio se emplearon medios diseñados para el aislamiento de enterobacterias (Pitarangsi y col., 1982; Champsaur y col., 1982; Le Chevallier y col., 1982) y vibrios marinos (Gracey y col., 1982). El grupo de *Aeromonas* spp. incluye microorganismos lactosa positivos y lactosa negativos (Popoff y Veron, 1976), por lo que no es adecuado el uso de medios entéricos, como el agar MacConkey o el agar azul de metileno eosina (von Graevenitz, 1985; von Graevenitz y Bucher, 1983). Además, Desmond y Janda (1986) comprueban que los medios utilizados para el aislamiento de patógenos entéricos pueden inhibir el crecimiento de *Aeromonas*.

Von Graevenitz y Bucher (1983) evalúan medios adaptados o desarrollados para el aislamiento específico de *Aeromonas* a partir de heces humanas, recomendando el agua de peptona alcalina como medio de enriquecimiento frente al caldo triptona soja con ampicilina. Por otro lado, se han descrito como medios sólidos selectivos el agar inositol verde brillante sales biliares, el agar dextrina fucsina sulfito (descrito en 1967 por Schubert para el aislamiento específico de *Aeromonas* en aguas), el agar xilosa desoxicolato sódico citrato (Shread y col., 1981) o el agar pril xilosa ampicilina (Rogol y col., 1979). Estos autores observaron que el agar peptona extracto de carne de vaca glicógeno (McKoy y Pilcher, 1974) no diferencia estos microorganismos de la flora normal de las heces y el medio

Rimler Shotts (Shotts y Rimler, 1973) no es lo suficientemente inhibidor para otros microorganismos gram-negativos. El agar DNasa azul de toluidina ampicilina (von Graevenitz y Zinterhofer, 1970), el medio mA (Rippey y Cabelli, 1979) y el agar sal almidón xilosa lisina desoxicolato sódico (Roland, 1977), tampoco dieron buenos resultados.

Otro medio con el que varios autores obtuvieron aislamientos fue el agar sangre de cordero con 10 ó 15 µg/l de ampicilina (Agger y col., 1985; Gracey y col., 1982), siendo además adecuado para realizar la prueba de la oxidasa, pues la fermentación de azúcares en otros medios altera el pH y dificulta su realización.

Palumbo y col. (1985a) desarrollan un medio específico (agar almidón ampicilina), para la cuantificación directa de *Aeromonas* spp. en alimentos, que contiene ampicilina (10 µg/l) como agente selectivo y almidón como diferencial, aunque tiene el inconveniente de no separar *Aeromonas* de *Vibrio* spp..

Altorfer y col. (1985) proponen el agar cefsulodín irgasán novobiocina (agar CIN), descrito por Schiemann en 1979 para el aislamiento de *Yersinia enterocolitica*, aunque recomiendan disminuir la concentración de cefsulodin (CIN II) para la detección simultánea de *Yersinia* spp. y *Aeromonas* spp. Fricker y Tompsett (1989) destacan el buen comportamiento del medio de *Aeromonas* (Difco) en el análisis de alimentos.

Para el análisis de aguas se han desarrollado dos medios, previa filtración y concentración a través de membranas: el agar de Rimler Shotts (Shotts y Rimler, 1973) que contiene citrato, novobiocina y desoxicolato sódico como agentes selectivos y lisina, ornitina y maltosa como diferenciales y el medio mA (Rippey y Cabelli, 1979) con ampicilina, etanol y desoxicolato sódico como agentes selectivos y trealosa como diferencial. Posteriormente, Havelaar y col. (1987, 1988) proponen el agar dextrina ampicilina (ADA), aunque no diferencia *Aeromonas* spp. de *Vibrios* marinos. Huguet y Ribas (1991) modifican el medio glutamato almidón ampicilina (GSP), propuesto por Kielwein en 1969 para el aislamiento simultáneo de *Aeromonas* y *Pseudomonas*, añadiendo 10 µg/l de C-glucosa y 20 de ampicilina (SGAP-10C), con lo que se mejora la recuperación de *Aeromonas* a partir de muestras acuáticas y se inhibe el crecimiento de *Pseudomonas*. Holmes y Sartory (1993) emplean el medio de *Aeromonas* de Ryan (comercializado por Oxoid) y resaltan su buen comportamiento. Warburton y col. (1994) diseñan un protocolo para aislar *Aeromonas* a partir del agua, que incluye filtración a través de membranas hidrofóbicas, revitalización en agar tripticasa soja y siembra en dos medios selectivos: medio de *Aeromonas* y agar trealosa *Aeromonas*.

Aunque muchos autores han empleado la siembra directa en placa, la recuperación de

Aeromonas aumenta, considerablemente, cuando se realiza un enriquecimiento previo (von Graevenitz y Bucher, 1983). Okrend (1987) compara el efecto de medios selectivos en la recuperación de *Aeromonas*, utilizando como medios de enriquecimiento agua de peptona alcalina (pH 8,6), caldo triptona soja, caldo triptona soja con ampicilina, caldo triptona soja con ClNa y caldo triptona, observando los mejores resultados con el caldo triptona soja con ampicilina. Sin embargo, muchos investigadores prefieren emplear el agua de peptona alcalina pues no impide la detección de cepas sensibles a la ampicilina (Varnam y Evans, 1991).

Un medio que podría resultar útil en la identificación, sería el AH, desarrollado por Kaper y col. (1979), ya que permite realizar, simultáneamente, cinco pruebas bioquímicas. El género *Aeromonas* puede ser diferenciado a través del sistema API 20E, aunque se requieren otras pruebas complementarias, como la sensibilidad al agente vibriostático O/129 (Varnam y Evans, 1991). El apartado IV.2.1 recoge más datos sobre este punto.

Además de los sistemas clásicos de aislamiento e identificación, ciertos autores proponen otros más actuales como el "GN microplate", basado en la oxidación de sustratos carbonados, capaz de diferenciar *A. hydrophila*, *A. sobria* y *A. caviae* (Carnahan y col., 1989a). La sensibilidad a la cefalotina y la actividad pirazinamidasa se han propuesto como pruebas específicas para diferenciar *A. sobria* del resto de las especies. (Janda y Motyl, 1985; Carnahan y col., 1990). Sugita y col. (1994) señalan la posibilidad de identificar especies realizando la hibridación en microplacas.

El serotipado se ha realizado en cepas patógenas para los peces, pero hay pocos estudios efectuados sobre cepas de *Aeromonas* spp. potencialmente patógenas para el hombre. Fricker (1987) utilizando 16 antisueros frente a antígenos lipopolisacáridos, desarrolla un esquema capaz de tipificar el 46% de las cepas aisladas en heces humanas. Thomas y col. (1990) reconocen, provisionalmente, 52 serogrupos. Janda y col. (1994a) indican que el 60% de las cepas implicadas en septicemias pertenecen a los serogrupos O:11, O:16, O:18 y O:34.

Otros sistemas de tipificación se basan en la comparación de los patrones proteicos obtenidos mediante marcaje radioactivo (Stepheson y col., 1987), tinción con plata (Millership y Want, 1989, 1993), quimioluminiscencia (Carey y col., 1994) o "immunoblotting" (Mulla y Millership, 1993) de los componentes celulares separados por SDS-PAGE. Frecuentemente, también se realiza la tipificación a nivel molecular, empleando el análisis del ADN con endonucleasas de restricción y la electroforesis en gel de poliacrilamida de las cubiertas celulares (Kuijper y col., 1989c). Huys y col. (1994, 1995),

al igual que Kampfer y col. (1994) y Altwegg y Kersters (1994), proponen y emplean el análisis, por cromatografía gaseosa, de los ácidos grasos celulares para identificar las especies fenotípicas y los grupos de hibridación incluidos en este género.

I.3. - Epidemiología

I.3.1. - Heces humanas

Las publicaciones sobre datos epidemiológicos de *Aeromonas* spp. son escasas, debido, fundamentalmente, a que las tasas de aislamiento en los medios entéricos estándar son bajas y no existe una clara evidencia de que estos microorganismos sean enteropatógenos, como para justificar su investigación específica en alimentos sospechosos o en heces. Sin embargo, la tasa de aislamientos aumenta considerablemente cuando, previamente, se efectúa enriquecimiento y se utilizan medios específicos (Burke y col., 1983a).

En Thailandia, Pitarangsi y col. (1982) observan un mayor nivel de aislamientos entre la población indígena (9-30%) sin síntomas de diarrea o con una rápida respuesta al tratamiento. Por el contrario, Echeverria y col. (1984) detectan que el aislamiento de *Aeromonas* es, significativamente más frecuente, en personas con diarrea (31-48%) que en individuos sin síntomas aparentes (9-15%), cuando se trata de sujetos recién llegados a las zonas afectadas. Gracey y col. (1984) en Asia, Black (1986) en áreas de Latinoamérica y Africa y Mattila y col. (1993) en Finlandia incluyen estos microorganismos dentro de los agentes causantes de la denominada "diarrea de los viajeros".

En un estudio realizado en Perth (Australia), Burke y col. (1983a) comprobaron que la detección de *Aeromonas* fue significativamente más alta en niños con diarrea (10,8%) que en controles asintomáticos (0,7%) observando, además, una marcada estacionalidad en los meses cálidos de verano y otoño, como también señalan Gracey y col. (1982), Janda y col. (1983a), Agger y col. (1985) y George y col. (1985). Contrariamente, en Italia las tasas de aislamiento fueron escasas (1%) sin diferencias marcadas entre los casos sintomáticos y los controles (Figura y col., 1986). En Bangladesh (Kay y col., 1986, citado en Sack y col., 1987) el uso de enriquecimiento previo y de medios selectivos ha puesto de manifiesto una tasa elevada de aislamientos en pacientes con diarrea aguda (33%).

En Perú (Gilman, R.H., citado en Sack y col., 1987) se controlaron 400 familias (2000 personas) de bajo nivel económico a lo largo de dos años, analizando la presencia de *Aeromonas* spp. en heces diarreicas y normales, previo enriquecimiento en agua de peptona

alcalina y aislamiento sobre agar sangre ampicilina, obteniéndose un número superior de aislamientos en heces diarreicas. Las mayores diferencias se detectaron en el grupo de edad inferior a seis meses (16% en heces diarreicas y 9% en controles). Un año después, al analizar el grupo de edad inferior a 3 años, se observaron también diferencias, pero menos marcadas (9% en heces diarreicas y 4,3% en heces normales). A lo largo de este periodo, *Aeromonas* spp. se aisló, de forma constante, en el agua de bebida de esta comunidad. En este sentido, Gracey y col. (1982) observan que el 13% de los procesos gastroentéricos asociados a *Aeromonas* afectan a niños menores de 6 meses, el 57,4% entre 6 meses y 2 años, el 22% a niños de 2 a 5 años y sólo el 7,6% a mayores de 5 años. Estos estudios sugieren que, al menos algunas cepas, son enteropatógenas y que las exposiciones primarias darían lugar al desarrollo de la enfermedad (niños pequeños y visitantes a zonas endémicas).

En Egipto se han detectado *Aeromonas* spp. en heces diarreicas de niños con mayor frecuencia que en no diarreicas, aunque la actividad enterotoxigénica no se asoció preferentemente a unas u otras cepas (Ghanem y col., 1993).

En Queensland (Australia) se ha observado la presencia de *Aeromonas* en las heces diarreicas de pacientes inmunocompetentes, distribuidos en dos grupos de edad: menores de 5 años y mayores de 25 (Ashdown y Koehler, 1993).

San Joaquin y Pickett (1988) y Kuijper y col. (1989a) observan que la diarrea asociada a *Aeromonas* se detecta, fundamentalmente, en niños de edades comprendidas entre 6 meses y 5 años y que las cepas citotoxigénicas parecen ser más frecuentes en personas mayores de 50 años. En conformidad con estos datos, Agger y col. (1985) y Millership y col. (1983) también observaron esta mayor incidencia en niños y personas mayores. Namdari y Bottone (1990a) apuntan que ciertos alimentos infantiles pueden incrementar el riesgo de infección al favorecer un aumento considerable del pH intestinal (superior a 7,5). De la Morena y col. (1993) aíslan especies móviles de *Aeromonas*, principalmente de *A. caviae*, en heces diarreicas de niños.

Otros autores han aislado tasas moderadas de estos microorganismos en casos de colitis crónicas, aunque no en las biopsias de los tejidos lesionados (Roberts y col., 1987; Doman y col., 1989; Farraye y col., 1989; Willoughby y col., 1989).

Durante mucho tiempo, este grupo de microorganismos se ha considerado como oportunista en individuos inmunodeficientes (Stelma, 1989). En los últimos años, numerosos autores han manifestado que podrían ser además patógenos primarios, puesto que también se han aislado en procesos infecciosos de personas normales (Rhamon y Willoughby, 1980; Janda y col., 1983a), destacando el aislamiento de *A. hydrophila* de un

proceso septicémico mortal desarrollado en un joven aparentemente sano y de un hombre inmunocompetente de 37 años con meningitis y bacteriemia (Qadri y col., 1976).

Aeromonas es un género de presencia transitoria en el tracto gastrointestinal del hombre. Las tasas de aislamiento a partir de heces humanas son más altas en regiones tropicales, como Asia, Sudamérica y Australia que en Estados Unidos y Europa. Parece ser que no son necesarias precauciones especiales con respecto a los portadores de *Aeromonas*, que puedan manipular alimentos (Varnam y Evans, 1991).

I.3.2. - Alimentos: Factores que influyen en la supervivencia y en el crecimiento

Este género se considera parte de la flora aerobia total presente, de forma natural, en alimentos (Palumbo y col., 1985a). Palumbo y col. (1985a) observan la presencia de *A. hydrophila* en distintos pescados y mariscos, carnes rojas y de aves y leche cruda. Myers y col. (1982) y Simard y col. (1984) la aíslan de carnes envasadas al vacío. Numerosos autores han comunicado el aislamiento de *Aeromonas* spp. en estos productos de origen animal, incluso envasados en atmósferas modificadas (Eddy y Kitchell, 1959; Gardner, 1965; Kielwein y col., 1969; Kleeberger, 1975; Toule y Murphy, 1978; Enfords y col., 1979; Grau, 1981; Blickstand y Molin, 1983; Hudson y DeLacy, 1991; Hanninen, 1993; Hudson y Mott, 1993). También se han detectado con frecuencia en vegetales crudos (Callister y Agger, 1987; Hudson y DeLacy, 1991). Gobat y Jemmi (1993) señalan su presencia en alimentos crudos, con tasas de 10^6 ufc/g, y listos para el consumo, a niveles de 10^3 ufc/g. Otros productos investigados como helados, huevos, ancas de rana y caracoles también han resultado positivos (Hunter y Burge, 1987; Varnam y Evans, 1991).

La incidencia de las distintas especies de *Aeromonas* en alimentos varía, en función de la zona geográfica considerada. Las cepas detectadas en aguas y alimentos australianos, que mostraron propiedades asociadas a virulencia, se incluían, principalmente, dentro de los grupos *A. veronii* biotipo *sobria* y *A. hydrophila* (Greenaway, 1988; Majeed y col., 1989a,b; Kirov y col., 1990; Ibrahim y Mac Rae, 1991; Kirov y col., 1993c). *A. veronii* biotipo *sobria* es la especie aislada con más frecuencia en casos de gastroenteritis en Australia (Kirov y col., 1986). También se ha detectado en el 24% del total de los aislamientos obtenidos en alimentos japoneses (Nishikawa y Kishi, 1988) y en el 42% de los alimentos ingleses (Fricker y Tompsett, 1989). Sin embargo, en otras partes del mundo como en USA (Palumbo y col., 1989), en Dinamarca (Knochel y Jeppesen, 1990) y en

Nueva Zelanda (Hudson y De Lacy, 1991) *A. veronii* biotipo *sobria* prácticamente no se encontró en alimentos, predominando *A. hydrophila* y *A. caviae* (Janda y col., 1984b; Altwegg, 1985; Altwegg y Geiss, 1989; Moyer y col., 1991). Recientemente, se ha comprobado que las tres especies comprenden microorganismos potencialmente enterotoxigénicos, independientemente de la fuente de aislamiento, ya que cepas que inicialmente no provocaban acúmulo de fluidos, comenzaron a producir enterotoxinas después de uno a tres pases por asa intestinal ligada de conejo (Singh y Sanyal, 1992a,b). Husslein y col. (1991, 1992) observan que la secuencia correspondiente a la citotoxina hemolítica (aerolisina) es un gen estructural ampliamente distribuido en las cepas de *Aeromonas* de estas tres especies.

Actualmente, los consumidores demandan alimentos más naturales, poco procesados y sin aditivos; en consecuencia, la refrigeración se ha erigido como una de las principales medidas para controlar el desarrollo de microorganismos patógenos y alterantes en alimentos. Aunque las aeromonas muestran una temperatura óptima y máxima de crecimiento mesófila, se pueden definir como microorganismos psicrótrofos si, de acuerdo con Eddy (1960), se asume que el término psicrótrofo corresponde a los microorganismos capaces de crecer a temperaturas de refrigeración, independientemente de su temperatura óptima de desarrollo. Muchos autores han descrito el crecimiento de *Aeromonas*, incluso de cepas exotoxigénicas, a bajas temperaturas (Palumbo y col., 1985a; Callister y Agger, 1987; Berrang y col., 1989; Kirov y col., 1990; Beuchat, 1991). La temperatura mínima de crecimiento depende de la cepa en cuestión y Rouf y Rigney (1971), Palumbo y col. (1985b), Walker y Stringer, 1987 y Kirov y col. (1993a,b) encuentran que algunas de ellas elaboran factores asociados a virulencia a temperaturas de crecimiento entre 4,4 y 6°C. Kirov y col. (1993a) observaron en una cepa aislada en leche de cabra una temperatura mínima de crecimiento de -5,3°C, óptima de 19°C y máxima de 43°C, mientras que el resto de las cepas aisladas de alimentos, aunque crecieron a bajas temperaturas, precisaron más de seis días para que la población aumentase significativamente.

Numerosos autores han comunicado la capacidad de cepas de *Aeromonas* para producir exotoxinas a bajas temperaturas en medios de cultivo (Knochel, 1989a; Majeed y col., 1990; Krovacek y col., 1991; Eley y col., 1993; Kirov y col., 1993a) y alimentos (Majeed y MacRae, 1991; Kirov y Brodrribb, 1993) aunque, en estos últimos, Todd y col. (1989) detectan actividades enterotóxicas, citotóxicas y hemolíticas inferiores a las registradas en medios bacteriológicos a las mismas temperaturas. Contrariamente, Kirov y Brodrribb (1993) señalan que, excepto en preparados alimenticios infantiles y leche UHT, la

producción de exotoxinas es tan eficaz en alimentos como en medios de cultivo.

La concentración de sal, el pH, la atmósfera y la flora competitiva influyen en el crecimiento y supervivencia de las *Aeromonas* en alimentos a bajas temperaturas (Palumbo, 1988; Palumbo y Buchanan, 1988; Knochel, 1990; Beuchat, 1991; Palumbo y col., 1991, 1992). Así, la tolerancia a la sal y al pH se reduce considerablemente a temperaturas de refrigeración, siendo incapaces de crecer con 3-3,5% de ClNa o a pHs inferiores a 6 (Palumbo, 1988; Palumbo y Buchanan, 1988). Sin embargo, cuando la temperatura de incubación es próxima a la óptima de crecimiento pueden multiplicarse incluso en presencia de 6% de ClNa (Knochel, 1990) y a pH 4,5 (Palumbo y col., 1985b).

No hay evidencia clara de que las *Aeromonas* sean lo suficientemente competitivas, frente al resto de la flora presente en los alimentos, para alcanzar tasas importantes a bajas temperaturas (Palumbo y Buchanan, 1988; Ingham y Potter, 1988; Kirov y col., 1990; Erickson y Jenkins, 1992). La disminución del oxígeno en la atmósfera que rodea a los alimentos parece favorecer el crecimiento de *Aeromonas*, posiblemente, porque retarda el crecimiento de la flora aerobia competitiva (Buchanan y Palumbo, 1985). Palumbo y col. (1992) observan que otros parámetros como el pH, el ClNa y los nitritos pueden ser necesarios para controlar el crecimiento de algunas especies de *Aeromonas* a bajas temperaturas.

Aeromonas spp. forma parte de la flora alterante de alimentos refrigerados, como carnes rojas (Jay, 1967; Len, 1987), pollo (Toule y Murphy, 1978) pescado (Gorczyca y col., 1985; Gram y col., 1987), mariscos (Smith y col., 1984) y huevos enteros pasteurizados (Mackenzie y Skerman, 1982). Especialmente en alimentos cocinados, mantenidos en refrigeración, pueden dar lugar a una rápida alteración (Toule y Murphy, 1978). Sin embargo, en leche UHT es posible llegar a alcanzar tasas muy elevadas sin modificaciones organolépticas (Kirov y col., 1993c).

Golden y col. (1989) han demostrado la inhibición específica del dióxido de carbono sobre el crecimiento de *A. hydrophila*, aunque Gill y Reichel (1989) e Ingham (1990) observaron desarrollo bacteriano a 10°C en alimentos envasados en atmósferas de CO₂. Sin embargo, los ambientes ricos en nitrógeno favorecen el crecimiento de células lesionadas e indemnes a 5°C; este hecho se atribuye al funcionamiento deficiente del sistema protector frente al oxígeno (enzima superóxido-dismutasa) en *Aeromonas* a 5°C, por lo que, el aumento en la concentración de nitrógeno, con la consiguiente disminución en la de oxígeno, tendría un efecto protector (Golden y col., 1989). No obstante, Mano y García de Fernando (1995) observan que el tiempo de duplicación de este microorganismo sobre

carne de cerdo y pavo, es más prolongado cuando crece en 100% de nitrógeno que cuando lo hace en aire.

En "mince" y "surimi", elaborados con poca sal, *A. hydrophila* crece bien a 5°C, pero se inhibe cuando el "surimi" contiene 2,5-3% de NaCl (Ingham y Potter, 1988). En carne de cerdo envasada al vacío, un 3% de ClNa es suficiente para impedir la multiplicación de *Aeromonas* (Palumbo, 1988).

También se ha investigado la influencia del sorbato y del humo líquido (Gram, 1991), poniéndose de manifiesto que el sorbato (1000 µg/ml) combinado con la sal impide el crecimiento a temperaturas elevadas (25-37°C). Sin embargo, el humo líquido sólo es eficaz cuando la contaminación inicial es baja ($< 10^2$ ufc/ml).

Aeromonas se elimina de los alimentos por los tratamientos térmicos diseñados para *Samonella* (Condón y col., 1992; Palumbo y col., 1991). No obstante, las curvas de supervivencia muestran una respuesta difásica, debido a la presencia de una subpoblación moderadamente termorresistente (Palumbo y col., 1987). También es relativamente sensible a las radiaciones ionizantes, con valores *D* en torno a 1,4-2,2 kGy (Palumbo y col., 1986). Nishikawa y col. (1993) han observado que estos microorganismos son más sensibles a los tratamientos térmicos y a la acidez que otros patógenos presentes en alimentos como *Escherichia coli* O157:H7, *Staphilococcus aureus* y *Salmonella typhimurium*.

I.3.3. - Procesos clínicos

I.3.3.1. - Gastroenteritis asociadas a alimentos

Los pocos casos publicados de gastroenteritis asociadas al consumo de alimentos, en los que se han implicado a las aeromonas móviles, se recogen en la Tabla I.1. Los alimentos sospechosos fueron, principalmente, ostras y otros mariscos. En todos los casos, el cocinado, previo al consumo de los alimentos, presumiblemente, fue inadecuado o incluso inexistente. Altwegg y col. (1991) encuentran pruebas concluyentes de que los alimentos pueden ser vehículos de transmisión, en las gastroenteritis asociadas a *Aeromonas*, al hallar una fuerte asociación entre cepas aisladas en gambas contaminadas y en las heces diarreicas de un paciente que consumió dicho producto. Sin embargo, el número de casos detectados es bajo y los alimentos implicados no son aquellos que, en teoría, consumen los grupos de población más afectados (niños pequeños), por lo que Kirov (1993) indica que, o bien la transmisión por alimentos no es frecuente, o bien los adultos portadores asintomáticos, contaminados a partir de alimentos, serían el vehículo

transmisor de la gastroenteritis en niños del entorno familiar. También, es preciso considerar los casos de gastroenteritis, asociados a *Aeromonas* por alimentos, que no son detectados, y que forman parte de ese elevado porcentaje (40%) de infecciones transmitidas por alimentos que no aparecen en las estadísticas oficiales. La investigación sistemática de *Aeromonas* en infecciones asociadas al consumo de alimentos aclararía, en parte, estos problemas.

Los estudios inmunológicos, realizados recientemente, han proporcionado información importante sobre la actividad enteropatógena de *Aeromonas* en el hombre. Kuijper y col. (1990) observan, en pacientes con gastroenteritis agudas asociadas a *Aeromonas*, una respuesta inmunológica específica frente a varias estructuras celulares y a la citolisina de la cepa homóloga, mediante la técnica ELISA; sin embargo, los resultados obtenidos por radioinmunoensayo no fueron concluyentes porque el suero no sólo reaccionó frente a cepas homólogas y heterólogas de *Aeromonas* sino también frente a *Escherichia coli* y *Vibrio cholerae*. Jiang y col. (1990) detectaron, en 12 de 13 pacientes infectados con *A. hydrophila* y *A. sobria*, respuestas inmunológicas específicas frente a cepas homólogas. En estos individuos se registró un aumento significativo de la secreción de inmunoglobulina A frente a los componentes lipopolisacáridos de peso molecular entre 20 y 80 kDa de las cepas infectantes. Si se contrastasen estos resultados se podría hablar de un avance importante en la confirmación de *Aeromonas* como patógeno gastrointestinal.

Se han descrito dos tipos de síndromes gastrointestinales asociados a *Aeromonas* (Gracey y col., 1982). El primero y más común es un proceso similar al cólera, que cursa con heces acuosas y fiebre moderada, pudiendo aparecer vómitos en niños menores de dos años y, en ocasiones, dolores abdominales. El segundo tipo, que se ha observado en, aproximadamente, el 25% de los casos detectados (George y col., 1985; Gracey y col., 1982), se desarrolla de forma similar a la disentería, con diarrea mucohemorrágica, rara vez con vómitos y, en ocasiones, con dolores abdominales. Estos procesos, generalmente, tienen buen pronóstico (Holmberg y Farmer, 1984), aunque algunos casos han puesto en peligro la vida de los pacientes (Rhamon y Willoughby, 1980; Champsaur y col., 1982).

I.3.3.2. - Infecciones extraintestinales

La vía de entrada en infecciones sistémicas es, probablemente, a través del tracto gastrointestinal como consecuencia de la ingestión de alimentos contaminados (Harris y col., 1985; Beebe, 1986). Se han aislado *Aeromonas* spp. en procesos septicémicos (von Graevenitz y Mensch, 1968; Slotnick, 1970; Davis y col., 1978; Abbott *et al.*, 1994),

meningitis (Qadri y col., 1976; Ellison y Mostow, 1984; Parras y col., 1993) y heridas infectadas (von Graevenitz y Mensch, 1968; Wolff y col., 1980; Ellison y Mostow, 1984; Newton y Kennedy, 1993; Gold y Salit, 1993). En ninguno de estos casos se detectó, únicamente, *Aeromonas*. La mayoría de las septicemias y meningitis atribuidas a *Aeromonas* se han desarrollado en personas inmunodeficientes, principalmente, en casos de leucemia y cirrosis (Davis y col., 1978; Wolff y col., 1980; Ellison y Mostow, 1984; Harris y col., 1985) aunque también se ha detectado septicemia en personas anémicas y sometidas a hemodiálisis (Wolff y col., 1980). Otras manifestaciones más inusuales de estos procesos extraintestinales incluyen infecciones oculares, osteomielitis, infecciones del tracto urinario y respiratorio, peritonitis y endocarditis (Slotnick, 1970; Turnbull y col., 1984; Muñoz y col., 1994; Pietu y col., 1993; Poirier y col., 1993). La tasa de mortalidad en infecciones extraintestinales asociadas a *Aeromonas* en personas inmunodeficientes supera el 60% (Abeyta y Wekell, 1988).

Las infecciones de heridas por *Aeromonas* están directamente relacionadas con la exposición del traumatismo al agua o tierra (Davis y col., 1978; Wolff y col., 1980); en individuos sanos se desarrollan como heridas localizadas, mientras que en sujetos inmunodeficientes pueden derivar en septicemias y dar lugar, en ocasiones, al fallecimiento (Wolff y col., 1980; Krovacek y col., 1993).

Recientemente, se ha descrito un nuevo síndrome asociado a *Aeromonas*, como consecuencia del empleo de sanguijuelas con fines terapéuticos (Abrutyn, 1988). Este viejo procedimiento se utiliza actualmente para tratar congestiones venosas, subsiguientes a cirugías plásticas o microvasculares, y se han descrito al menos ocho casos de heridas infectadas por *Aeromonas* derivadas de dicha práctica (Dickson y col., 1984; Mercer y col., 1987; Snower y col., 1989). Todos los casos remitieron con desbridación de la herida y o terapia antimicrobiana. La fuente de esta infección parece ser la sanguijuela *Hirudo medicinalis*, que mantiene simbióticamente aeromonas en su intestino para facilitar la digestión enzimática de la sangre que ingiere. En otras sanguijuelas, utilizadas con fines medicinales, también se han detectado estos microorganismos como parte de la flora intestinal (Wilken y Appleton, 1993; Bickel y col., 1994).

De las recientes especies incorporadas al género sólo *A. schubertii* se ha aislado de procesos extraintestinales (sangre y heridas) (Hickman-Brenner y col., 1988).

I.3.4. - Agua y portadores animales

Aeromonas es un género ubicuo que se ha aislado de muchos ambientes, pero al

parecer el hábitat más frecuente es el agua (Hazen y col., 1978; Grabow y DuPreez, 1979; Biamon y Hazen, 1983; Hazen, 1983). En ríos y lagos se han detectado tasas desde < 1 ufc/ml hasta $> 10^4$ ufc/ml; miembros de este género se han aislado en botellas de agua mineral, pantanos (Abeyta y Wekell, 1988) y pozos, también en agua clorada (LeChevallier, 1980, 1982; Burke y col., 1984c) y en distintos puntos de sistemas municipales de distribución de agua (Clark y col., 1982; LeChevallier y col., 1982; Notermans y col., 1986). En Suiza, el agua de un pozo mostró 640 ufc/ml de *A. hydrophila*, considerándose al género como un marcador de calidad de agua más eficaz que los coliformes o *E. coli* (Krovacek y col., 1989). En Holanda, van der Kooij (1988) propone una tasa máxima de 20 ufc/ml de *Aeromonas* en agua de bebida y de 200 ufc/ml. en los sistemas de distribución. Actualmente, en Canadá la presencia de *Aeromonas* en agua embotellada está regulada, siendo el límite admisible de 0 ufc/100 ml de agua (Warburton y col., 1994).

El agua de bebida se suele contaminar a partir de efluentes depurados o no, presentando algunos de ellos, como los de los mataderos, un alto contenido en nutrientes que favorecen su multiplicación (García-López y col., 1993). Wadström y Ljungh (1991) advierten del riesgo que suponen los fallos en el procesado del agua de bebida y Varnam y Evans (1991) resaltan que la actual tendencia a emplear agua embotellada en la alimentación de niños y personas inmunodeficientes entraña un peligro potencial, ya que constituyen los grupos de población con mayor riesgo de padecer infecciones por *Aeromonas*.

El número de *Aeromonas* en el agua depende de la polución, estado trófico del agua y temperatura ambiente. Su tasa es mayor en aguas corrientes que en las estancadas, encontrándose con más frecuencia en aguas con cierta concentración de sales, con pH 5,2 a 9,8 y temperaturas de 4°C a 45°C. No parece estar presente en lagos hipersalinos ni en aguas termales ($> 45^\circ\text{C}$) y tampoco en las muy contaminadas; además presenta variaciones estacionales con mayor incidencia en épocas cálidas (con temperaturas $> 20^\circ\text{C}$) (Hazen y col., 1978). Kaper y col. (1981) apuntan que la detección de *Aeromonas* en aguas disminuye cuando se trata de aguas con baja concentración de oxígeno disuelto. *Aeromonas*, probablemente, se nutre del fitoplacton y parece ser que existe correlación entre el número de *Aeromonas* y la concentración de clorofila y fósforo (van der Kooij, 1988). Por esta razón, la carga de *Aeromonas* es un buen indicador del estado trófico del agua (Rippey y Cabelli, 1980).

Aeromonas es capaz de crecer en aguas residuales hasta niveles de 10^7 - 10^8 ufc/ml. Este microorganismo es frecuente en sistemas domésticos, como tuberías de drenaje de agua sucia, sumideros, pilas de fregar y tuberías de salida de electrodomésticos (lavaplatos). Sin embargo, la polución que puedan representar estas fuentes no permite

explicar el alto número de *Aeromonas* presentes en el ambiente (Varnam y Evans, 1991).

Este microorganismo también se ha aislado en agua salina y estuarios (Williams y LaRoche, 1985; Abeyta y col., 1986), aunque en estos ambientes su presencia es transitoria.

Los animales de abasto pueden actuar como portadores sanos, ya que se han aislado *Aeromonas* en sus heces, en proporciones que oscilan desde el 4% (Stern y col., 1987) hasta el 11,8% (Gray, 1984). Wohlegemuth y col. (1972) relacionaron estos microorganismos con brotes de abortos bovinos y Dobrescu (1978) con diarrea en lechones. Morse y Hind (1984) detectaron *Aeromonas* en un 5,7% de nódulos linfáticos de cerdo y en aves se ha puesto de manifiesto un alto nivel de portadores. Por otra parte, Pasquale y col. (1994) describen un brote infeccioso causado por *A. hydrophila* en tortugas con un 95% de mortalidad e indican que estos animales pueden actuar como reservorios naturales. También estos microorganismos se han visto implicados en diversas infecciones de animales poiquilotermos (Heywood, 1968; Austin y Austin, 1987). En este sentido, una de las causas a las que se atribuye el declive de las poblaciones de anfibios, en distintas zonas del mundo, hace referencia a las infecciones por *A. hydrophila* (Blaustein y Wake, 1995).

I.4. - Factores de virulencia

Aunque la mayoría de las investigaciones, hoy día, se centran en la identificación de factores o mecanismos de virulencia, potencialmente implicados en infecciones humanas o animales, sólo la capa S de *A. salmonicida* (Kay y col., 1981) se ha asociado, inequívocamente, a la patogenicidad de cepas de esta especie en peces. La mayoría de los factores producidos por *Aeromonas* spp. se consideran indicadores de virulencia por inferencia, es decir, por presentar moléculas similares a otras que determinan la patogenicidad de otros microorganismos, como *E. coli*. La falta de un modelo animal que reproduzca la gastroenteritis asociada a *Aeromonas* incrementa el interés en el establecimiento de un esquema basado en propiedades estructurales y enzimáticas, asociadas a la célula, que puedan estar implicadas en las infecciones por *Aeromonas* de hombres y animales.

I.4.1. - Productos exocelulares

I.4.1.1. - Exotoxinas

Atendiendo a su relación con la bacteria, las toxinas se han dividido en exotoxinas y endotoxinas. Las exotoxinas son sustancias solubles y difusibles que la bacteria sintetiza en el curso de su desarrollo y secreta al exterior, mientras que las endotoxinas están ligadas a determinadas estructuras y se consideran compuestos tóxicos preformados, que se liberan por lisis de la bacteria. Sin embargo, el hecho de que las endotoxinas se encuentren localizadas en la superficie bacteriana y de que algunas exotoxinas se liberen, en gran parte, por lisis de la bacteria o estén asociadas a componentes estructurales ha hecho que, aún manteniéndose esta clasificación, se considere más apropiado dividir las, por su naturaleza química, en toxinas proteicas y lipopolisacáridas.

Según su importancia en la patogenia de las enfermedades, las exotoxinas se clasifican en toxinas mayores, cuando por sí solas son responsables del cuadro clínico, y toxinas menores, cuando sólo coadyuvan a la acción patógena junto con otros factores. Según el sitio de acción se dividen en toxinas que actúan sobre las membranas y toxinas que lo hacen sobre compuestos intracelulares y éstas, a su vez, según su especificidad y tropismos, se pueden clasificar en toxinas de acción general, neurotoxinas y enterotoxinas.

Las enterotoxinas muestran una acción específica sobre las células intestinales, que da lugar a la presentación de diarrea. Se clasifican en enterotoxinas citotónicas cuando sólo

producen alteraciones funcionales en el metabolismo del enterocito y enterotoxinas citotóxicas cuando producen alteraciones anatómicas o necróticas (Pumarola, 1987a).

Se han descrito dos tipos de enterotoxinas en *Aeromonas*:

- la enterotoxina citotónica, similar a la toxina colérica y a la toxina termolábil de *E. coli*, potencialmente responsable de la diarrea acuosa (Dubey y col., 1980; Ljungh y col., 1982; Chakraborty y col., 1984). Esta toxina redondea y estimula la esteroidogénesis de las células Y1 (Turnbull y col., 1984).

- la enterotoxina citotóxica (Cumberbacht y col., 1979; Johnson y Lior, 1981; Asao y col., 1984; Stelma y col., 1986), que da lugar a síntomas similares a la disentería, al igual que algunas especies de *Salmonella* y *Shigella*, caracterizada por diarrea mucohemorrágica. Estos síntomas se han detectado sólo en un 20% de las infecciones asociadas a *Aeromonas* (Gracey y col., 1982). En estudios realizados en diferentes líneas celulares (Vero, Int 407, CHO, HeLa, etc.), los efectos citotóxicos de los sobrenadantes de los cultivos de *Aeromonas* dan lugar a lesiones o muerte celular (Boulangier y col., 1977; Barer y col., 1986; Kindschuh y col., 1987).

Al parecer, la enterotoxina citotónica se detecta con menos frecuencia que la citotóxica (Stelma, 1988) y, sin embargo, la mayoría de las infecciones relacionadas con *Aeromonas* muestran síntomas asociados a la enterotoxina citotónica. Además, Morgan y col. (1985) administraron cepas citotóxicas (dosis de 10^4 a 10^{10}) a 57 voluntarios humanos, observando una diarrea débil en solo dos de ellos, y Kindschuh y col. (1987) afirman que el grado de citotoxicidad de las cepas no se correlaciona con la gravedad de los síntomas de enfermedad (diarrea o sepsis), por lo que se podría sugerir que esta enterotoxina citotóxica no juega un papel prioritario en la patogénesis. Por otro lado, Potomski y col. (1987b) indican que sólo la enterotoxina citotóxica es factor de virulencia, ya que fue la única que asociaron a la aparición de diarrea.

I.4.1.1.1. - Enterotoxina citotónica

Ljungh y col. (1981, 1982), en función del punto isoeléctrico y la filtración por gel, separaron dos hemolisinas (α y β) y una enterotoxina. Las características de la enterotoxina, parcialmente purificada, se correspondían con la de una enterotoxina citotónica: las células Y1 se redondearon sin producirse muerte celular, se vio estimulada la síntesis de AMPc y la secreción de esteroides y, en asa ligada de intestino de conejo, se detectó un incremento en la acumulación de fluidos. La inoculación intradérmica en conejo produjo sólo induración

de la piel y no resultó letal para el ratón. El peso molecular se estimó en 15.000 daltons. Las actividades biológicas permanecieron estables a 56°C durante 10 minutos, pero desaparecieron después de un tratamiento térmico de 60°C-20 minutos. No se han detectado reacciones cruzadas con la toxina del cólera ni con las hemolisinas (α y β), aunque se ha observado su neutralización con un antisuero homólogo.

Dubey y col. (1980) purificaron también una enterotoxina citotónica, aunque no determinaron su peso molecular. Chakraborty y col. (1984) clonan el gen de la enterotoxina citotónica de *A. hydrophila* en *E. coli* y las enterotoxinas que obtienen son estables a 56°C-20 minutos, elongan las células CHO, provocan acúmulo de fluidos en asa ligada de intestino de conejo y difieren de la toxina colérica y de la toxina TL de *E. coli*

Gosling y col. (1993) aislaron y purificaron una enterotoxina citotónica de 15 kDa y detectaron otro pico con esta actividad, que parecía corresponder a otra enterotoxina citotónica distinta.

Chopra y col. (1994) indican que *Aeromonas* spp. produce dos enterotoxinas citotónicas: una termolábil y la otra termoestable.

Muchos investigadores han detectado la enterotoxina citotónica en escaso número de cepas. En este sentido, Johnson y Lior (1981) no encontraron actividad citotónica en ninguna de las 73 cepas utilizadas y Seidler y col. (1980) sólo observaron actividad citotónica en el 6% de las cepas. Stelma (1988) basándose en estos datos, sugiere que la enterotoxina citotónica debe ser menos frecuente que la citotóxica. Sin embargo, el síndrome diarreico más frecuentemente asociado a *Aeromonas* coincide con el correspondiente a este grupo de enterotoxinas.

I.4.1.1.2. - Enterotoxina citotóxica

Cumberbatch y col. (1979) relacionaron las actividades citotóxica, hemolítica y enterotóxica, evidenciando la existencia de una enterotoxina citotóxica, al igual que Johnson y Lior (1981) que también relacionaron la actividad citotóxica con la enterotóxica. Sin embargo, es en 1984 cuando Asao y col., purificaron una β -hemolisina a partir de una cepa aislada de un paciente con diarrea, que fue citotóxica sobre células Vero y enterotóxica, tanto en asa ligada de intestino de conejo como en la prueba del ratón lactante. Por otra parte, era capaz de provocar la muerte en ratones un minuto después de la inoculación intravenosa, por lo que presentaba propiedades enterotóxicas, β -hemolíticas y citotóxicas. El peso molecular estimado fue de 60.000 daltons y se inactivaba a 56°C en 5 minutos. Stelma y col. (1986) observan que el suero elaborado frente a esta hemolisina neutraliza

completamente la actividad de cuatro cepas β -hemolíticas, por lo que concluyen que la β -hemolisina, por sí sola, puede determinar cambios en la permeabilidad intestinal. Hostacka y col. (1982), Bloch y Monteil (1989), Asao y col. (1984), Bunning y col. (1986), Stelma y col. (1986) y Burke y col. (1987) describieron moléculas con estas características.

Burke y col. (1981a) trabajan con 100 cepas de *A. hydrophila*, examinando sus actividades hemolítica, citotóxica y enterotóxica. Aunque encontraron una relación total entre la producción de hemolisinas, citotoxinas y enterotoxinas, no hallaron una asociación constante entre las diferentes cepas, por lo que consideraron que hemolisis, citotoxicidad y enterotoxicidad, en ocasiones, podrían no ser propiedades de una misma molécula. Además, observaron que la actividad enterotóxica detectada en rata persistía después de calentar el sobrenadante libre de células y se neutralizaba con la antitoxina colérica, mientras que la enterotoxicidad en ratones lactantes era extremadamente termolábil y no se neutralizaba con dicho suero, por lo que existirían dos enterotoxinas distintas.

Jiwa (1983), trabajando con cepas de *Aeromonas* de diversas fuentes (heces humanas, pescado, conejos, lombrices), encuentra relación entre citotoxicidad, enterotoxicidad y alteración de la permeabilidad en piel de conejo, por lo que atribuye todas estas actividades a la enterotoxina.

Chopra y col. (1986) pusieron de manifiesto dos enterotoxinas en los filtrados de *A. hydrophila*: una presentaba reacciones cruzadas con la antitoxina colérica y era termolábil, y otra de carácter heterólogo y termoestable (100°C- 20 minutos). Potomski y col. (1987a) purificaron una proteína β -hemolítica, citotóxica y enterotóxica que no reaccionaba con la antitoxina colérica y era termolábil. Mientras que Rose y col. (1989a,b) aislaron una enterotoxina citolítica, que ya ha sido secuenciada (Chopra y col., 1993) y que puede detectarse, inmunológicamente, con anticuerpos elaborados frente a la toxina colérica.

En 68 cepas de origen clínico y ambiental, Watson y col. (1985) observaron que el 41% de las aisladas en casos de diarrea no eran enterotoxigénicas. Esto sugiere que la gastroenteritis podría deberse a otros factores o que los métodos empleados para determinar la enterotoxicidad (asa ligada de intestino de conejo y ratones lactantes) no permiten detectar la actividad de esta molécula. Por otra parte, el aislamiento de *Aeromonas* spp. en heces podría únicamente reflejar su ingesta, mientras que la presencia de una carga elevada se debería a la alteración de la ecología intestinal. Por todo ello, parece necesario precisar y aclarar las relaciones entre bacterias, enterotoxinas y diarrea.

I.4.1.1.3. - Hemolisinas

Las hemolisinas son proteínas extracelulares citolíticas muy frecuentemente asociadas a *A. hydrophila* y *A. sobria* (Brenden y Janda, 1987; Kozaki y col., 1988). Pertenecen al grupo de citolisinas bacterianas formadoras de poros y causantes de pérdida del contenido citoplásmico por alteración de la membrana celular (Bhakdi y Trantum-Jensen, 1988).

Ljungh y col., (1981) han descrito dos hemolisinas en *Aeromonas*:

- la α -hemolisina, caracterizada por producir una zona opaca de hemolisis en agar sangre, que se inactiva a 56°C en 10 minutos y que produce modificaciones morfológicas en cultivos celulares. No es enterotóxica en asa ligada de intestino de conejo, pero por inoculación intradérmica causa induración, rotura de capilares y dermonecrosis, provocando además muerte en el ratón. Su peso molecular aproximado es de 65.000 daltons y su punto isoeléctrico de 4,8.

- la β -hemolisina, detectada en grandes cantidades cuando la temperatura de incubación es de 37°C, se inactiva con el mismo tratamiento térmico y da lugar a una zona clara de hemolisis en agar sangre y vacuolización irreversible del citoplasma en ensayos celulares. No es enterotóxica en asa ligada de intestino de conejo, pero sí letal en el ratón por inoculación intraperitoneal, presentando los mismos efectos sobre piel de conejo que la α -hemolisina. Su peso molecular se estimó en torno a 49.000-53.0000 daltons y su punto isoeléctrico en 5.5. Se la conoce también como "aerolisina" (Bernheimer y Avigad, 1974) y presenta reacción inmunológica cruzada con la hemolisina α .

Al menos se han descrito otras dos β -hemolisinas, distintas y con actividad enterotóxica, producidas por *Aeromonas* (Asao y col., 1984; Asao y col., 1986; Kozaki y col., 1987). Ambas proteínas tienen un peso molecular aproximado de 50.000 daltons, aunque sus puntos isoeléctricos difieren notablemente (5.3 a 5.4 frente a 7.6). Los ensayos de inmunodifusión indican que estas dos β -hemolisinas están inmunológicamente relacionadas (Asao y col., 1986).

La escasa actividad enterotóxica de la β -hemolisina parcialmente purificada por Ljung y col (1981) y la elevada actividad de la hemolisina detectada por Asao y col. (1984) sobre asa ligada de intestino de conejo, probablemente, se deba a las distintas técnicas de purificación empleadas (Stelma, 1988).

Chakraborty y col. (1984) han señalado que los clones de *E. coli* que portaban los genes de la hemolisina y la citotoxina de *A. hydrophila* son inactivos sobre el asa ligada de intestino de conejo, posiblemente, por la incapacidad de *E. coli* para liberar las hemolisinas al medio (Chakraborty y col., 1986).

I.4.1.1.4. - Mecanismo de acción de la β -hemolisina

Las hemolisinas de *Aeromonas* producen alteraciones en la permeabilidad vascular, edemas y necrosis (Chakraborty y col., 1986). Scheffer y col. (1988) estudiaron la capacidad de las bacterias productoras de hemolisinas para liberar factores mediadores de la inflamación. La α -hemolisina de *E. coli* y la β -hemolisina de *Aeromonas* son potentes estimuladores de la liberación de leucotrienos (LTB₄ y LTC₄) a partir de granulocitos humanos. El primero es quimiotáctico para neutrófilos y eosinófilos humanos y el segundo es un mediador de las reacciones anafilácticas, implicado en la broncoconstricción, producción de mucus y aumento de la permeabilidad vascular. La liberación de estos mediadores de la inflamación pueden ser la causa del incremento de la permeabilidad vascular y de la formación de edemas por hemolisinas, mientras que la interacción de la aerolisina con los polimorfonucleocitos humanos puede dar lugar a la liberación de metabolitos, a partir de estas células, que estimulen la secreción en la mucosa. Estos hechos podrían explicar la aparición de la diarrea.

Chakraborty y col. (1987) constataron que una cepa mutante, deficiente en la β -hemolisina, era menos tóxica para el ratón, no causó lesiones necróticas en el punto de inyección y no se detectó en cultivos realizados 24 horas después de la inoculación, mientras que la cepa paterna β -hemolítica era más tóxica, produjo necrosis y se aisló hasta 14 días después de su inoculación.

Garland y Buckley (1988) comprobaron que la β -hemolisina es un proteína hidrofílica y soluble que se secreta como una protoxina inactiva y se reactiva por la eliminación de 25 aminoácidos del extremo C terminal. La ruptura de los glóbulos rojos implica tres fases: unión a los receptores, agregación de toxinas y ruptura de la membrana del eritrocito. Van der Goot y col. (1993) observan que tanto la proaerolisina como la forma activa son dímeros de similar estabilidad y solubles en agua. La protoxina se activaría eliminando el péptido del carbono terminal, que no estaría implicado en la formación de poros en membranas, pudiendo entonces oligomerizarse y dar lugar a la forma activa (Van der Goot y col., 1994a,b).

Bunning y col. (1986) utilizaron células de melanoma para comprobar la producción de los efectos, mediados por el AMPc, de la β -hemolisina purificada (inhibición del crecimiento celular, incremento de la actividad tirosinasa y acúmulo de melanina) característicos de las enterotoxinas citotónicas. Esta β -hemolisina purificada era

extremadamente tóxica para las células de melanoma y no se la consideró con efectos citotónicos.

I.4.1.1.5. - Factor que presenta reacciones cruzadas con la toxina del cólera (CTC)

Jiwa (1983), Burke y col. (1984b) y Turnbull y col. (1984) han observado reacción cruzada entre la toxina colérica y la enterotoxina de *Aeromonas* spp. El uso de la antitoxina colérica en técnicas ELISA mostró la existencia de un factor enterotóxico y hemolítico en *Aeromonas* spp., que reacciona con los anticuerpos de la antitoxina colérica. En ningún caso se ha podido detectar homología entre este factor y la toxina colérica por lo que no se ha podido denominar toxina "cólera-like", sino "factor que presenta reacciones cruzadas con la toxina colérica" o "CTC". La similitud antigénica y el hecho de que se observara incremento intestinal de fluidos sugiere que es enterotóxico y, por tanto, un posible factor de virulencia en *Aeromonas* spp. (Campbell y Houston, 1985).

Schultz y McCardell (1988) utilizaron sondas génicas específicas, sintetizadas a partir de ciertas regiones de las subunidades A y B de la toxina colérica, y comprobaron que estas sondas hibridaban con el ADN de algunas cepas de *A. hydrophila*; además, la enterotoxina que producían estas cepas reaccionaba con el suero de antitoxina colérica y se la podía describir como una enterotoxina citotónica. Potomski y col. (1987b) detectaron una toxina, a partir de cepas fecales de *Aeromonas* spp., que reaccionaba con la antitoxina colérica, no era citotóxica ni hemolítica y tenía efectos citotónicos. Hoy día, aunque no está completamente establecido, algunos autores opinan que la enterotoxina citotónica y este factor se pueden considerar moléculas muy similares o incluso idénticas (Janda, 1991). No obstante, hay que tener en cuenta que la enterotoxina citotónica, descrita por Ljungh y col. (1981) y Chakraborty y col. (1984), es más termorresistente y no presenta reacciones cruzadas con la toxina del cólera, por lo que en todo caso, este factor que se inactiva a 56°C en 10 minutos (Cahill, 1990) constituiría una enterotoxina citotónica distinta.

Las reacciones inmunológicas cruzadas detectadas entre las enterotoxinas citotóxicas descritas por Asao y col. (1984), Howard y Buckley (1986), Chakraborty y col. (1986) y Bunning y col. (1986) sugieren que son moléculas similares, aunque pueden presentar diferencias estructurales y funcionales importantes y, en cualquier caso, no se relacionan antigénicamente con la toxina colérica (Cahill, 1990). Por todo ello, parece que sólo la enterotoxina citotónica y la enterotoxina citolítica purificada por Rose y col. (1989a,b) se asocian con la toxina del cólera.

I.4.1.2. - Proteasas

Las proteasas producen una acción patógena de lesión directa de los tejidos, facilitando así la invasividad (Sakai, 1985); además, pueden tener un efecto indirecto al activar el precursor de la β -hemolisina (Leung y Stevenson, 1988). Ciertas proteasas exocelulares, producidas por otras bacterias gram-negativas, como la elastasa (33 kDa) de *Pseudomonas aeruginosa* y algunas proteasas de *Serratia marcescens* (50 y 56 kDa) tienen un papel importante en la patogenicidad (Wandersman, 1989).

Aeromonas spp. secreta al menos cuatro o cinco proteasas, en función del pH óptimo y la especificidad del sustrato (Nieto y Ellis, 1986). Las dos proteasas principales han sido descritas por Leung y Stevenson (1988); una de ellas es una metalproteasa termoestable y, la otra, una serinoproteasa termolábil. La mayoría de las cepas de *Aeromonas*, analizadas inmunológicamente, secretan ambas proteasas. Loewy y col. (1993) han purificado y caracterizado una nueva zinc-proteína de 19 kDa. Aunque el papel de las proteasas no está claro, la LD₅₀ para el salmón y la trucha de una cepa mutante, deficiente en proteasas, fue de 1000 a 10000 veces más alta que la de la cepa paterna, productora de proteasas (Sakai, 1985).

I.4.1.3. - Sideróforos

Los sideróforos son compuestos de bajo peso molecular con una alta afinidad y capacidad de unión a distintas formas orgánicas e inorgánicas de hierro, particularmente bajo condiciones limitantes para este metal (Crosa, 1989). Estos compuestos pueden desarrollar importantes papeles en el establecimiento de la infección, ya que el hierro es fundamental para el crecimiento de la mayoría de las especies bacterianas. Los microorganismos patógenos son capaces de obtener el hierro a partir de formas combinadas, mediante la síntesis de sustancias quelantes o secuestradoras de hierro (sideróforos o quelinas) (Pumarola, 1987b), asociándose ciertos sideróforos extracelulares a bacterias gram-negativas, como *E. coli*, productoras de enfermedades invasivas (Payne, 1988). En el caso de *Aeromonas* spp., Janda y col. (1994a) observan que las cepas implicadas en bacteriemias, elaboran sideróforos, son muy hemolíticas y proteolíticas y resistentes al complemento.

Casi todas las cepas de *A. salmonicida*, *A. hydrophila*, *A. sobria* y *A. caviae* elaboran

uno o más tipos de sideróforos (Barghouthi y col., 1981; Chart y Trust, 1983). En *A. salmonicida* existe un mecanismo de adquisición de hierro, que precisa un sideróforo de bajo peso molecular (Chart y Trust, 1983). En el caso de las *Aeromonas* mesófilas, la mayoría de las cepas de *A. hydrophila* y *A. caviae* y, algunas de *A. sobria*, producen un sideróforo denominado amonabactina, o bien, el llamado enterobactina (Barghouthi y col., 1981, 1989; Zywno y col., 1989). Massad y col. (1991) observan dos mecanismos de adquisición de hierro en distintas cepas de este género, uno de ellos, mediado por la amonabactina, permite utilizar el hierro de la Fe-transferrina, mientras el otro proceso, independiente de los sideróforos, accede al hierro de distintos compuestos hemo. Telford y col. (1994) describen 4 variedades de amonabactinas producidas por distintas cepas de *A. hydrophila* bajo condiciones restrictivas de hierro. Massad y col. (1994) señalan que la síntesis del ácido 2-3 dihidroxibenzoico, presente en sideróforos, está codificada en dos grupos de genes distintos, uno de ellos detectado en las cepas productoras de enterobactina y el otro en las de amonabactina.

I.4.2.- Características asociadas a la célula bacteriana

Muchos factores asociados a la patogenicidad, como los determinantes de invasividad o de resistencia al suero, las proteínas de la membrana externa reguladoras de hierro y la capacidad para enfrentarse al sistema inmune mediante la variación antigénica no han sido objeto de un estudio profundo que, sin embargo, podría aportar datos muy interesantes (Finlay y Falkow, 1989; Smith, 1990).

I.4.2.1. - Fimbrias o *pili*

La presencia de adhesinas en las fimbrias o en otras estructuras de la superficie bacteriana (proteínas de la membrana externa, lipopolisacáridos y flagelos) explica la adhesión de las bacterias gram-negativas. En bacterias gram-positivas, la adherencia se encuentra asociada a otros mecanismos (ácido lipoteitónico, glicocalix u otras estructuras superficiales).

La adherencia requiere el contacto de la bacteria con la célula pero, como ambas superficies son electronegativas, se crea una fuerza de repulsión, que sólo es neutralizada, en parte, por débiles impulsos de atracción (fuerzas de Van der Waals, enlaces iónicos, enlaces de hidrógeno, interacciones hidrofóbicas) que dan lugar a una barrera electrostática que dificulta la aproximación. La presencia en la superficie de la bacteria de moléculas

hidrofóbicas y, en especial de adhesinas, que por su pequeño tamaño no están sujetas a las fuerzas de repulsión, facilitan el contacto.

Una infección es un proceso secuencial cuya primera etapa sería la fijación y colonización de las bacterias patógenas en las células epiteliales de la puerta de entrada. La adherencia de las bacterias patógenas al epitelio evita su eliminación por factores mecánicos y facilita su desarrollo y multiplicación. Todo ello, no sólo representa una protección frente a los agentes externos, sino que, además, les permite alcanzar el número crítico de bacterias o la concentración adecuada de productos para poder iniciar la infección. El estudio de la relación entre adherencia e infectividad ha demostrado que, en la mayoría de los casos, existe un grado de correlación alto, tanto en las infecciones invasivas como por toxinas. Por otra parte, se ha sugerido que los fenómenos de adherencia también intervienen en la difusión de infecciones bacterianas secundarias. Se ha señalado que las alteraciones de las células epiteliales, producidas en la infección primaria, podrían dar lugar a la pérdida de ciertas sustancias de la superficie de la célula (fibronectina), que facilitarían el acceso a los receptores, o bien a la formación de otros nuevos, como se supone que ocurre en las células infectadas por virus.

Sin embargo, la adhesión no constituye un factor indispensable para la infección, pues anulando o reduciendo los mecanismos de defensa de la mucosa, las bacterias sin capacidad de adhesión pueden multiplicarse e incluso producir una acción patógena. En consecuencia, la capacidad de adherencia representa una ventaja ecológica para la colonización e infección pero no constituye un requisito imprescindible.

Las fimbrias o *pili* son apéndices filamentosos de naturaleza proteica con capacidad antigénica y, frecuentemente, portadores de adhesinas, que presentan la propiedad de combinarse con receptores de naturaleza polisacárida, localizados en la superficie de las células epiteliales, mediante uniones del tipo azúcar-lectina. La zona combinante está constituida por un pequeño segmento de las subunidades proteicas de la fimbria (región amino-terminal).

Las fimbrias se pueden diferenciar por una serie de caracteres como el tamaño, peso molecular, composición en aminoácidos y poder inmunógeno y, además, en relación con la presencia de adhesinas, por la capacidad de fijación selectiva en los receptores de diversas células y especies de hematíes responsables del fenómeno de hemaglutinación; también, por la naturaleza química de estos receptores y, sobre todo, porque la adición de los mismos o de sustancias análogas permite inhibir específicamente el fenómeno de adherencia o de hemaglutinación. Las adhesinas de las fimbrias, atendiendo a su sensibilidad al monosacárido manosa, se dividen en dos grandes grupos: sensibles y resistentes a la

manosa.

Las fimbrias manosa-sensibles, MS o fimbrias de tipo 1 son las más frecuentes y están presentes en las bacterias gram-negativas. Presentan la propiedad de combinarse con receptores que contienen D-manosa, que se encuentran en muchas glicoproteínas del moco, así como en los fagocitos y hematíes de diversas especies de animales y del hombre, dando lugar al fenómeno de la hemaglutinación, reacción que se inhibe por la adición de D-manosa al medio. Estas fimbrias se consideran poco relacionadas con el poder patógeno, pero intervienen en el proceso de colonización.

Las fimbrias manosa-resistentes o MR, por el contrario, son menos frecuentes y se caracterizan porque producen la aglutinación de los hematíes, aún en presencia de D-manosa. Recientemente, se ha demostrado que las fimbrias manosa-resistentes no forman un grupo homogéneo, sino que agrupan todas las fimbrias que se combinan con receptores específicos que no contienen manosa. La mayoría de las fimbrias de *E. coli* asociadas con patogenicidad en el hombre y animales son manosa-resistentes (Pumarola, 1987c).

Existe una subclase de fimbrias que intervienen en la conjugación bacteriana. Estas fimbrias son más largas, flexuosas y poco numerosas (1 a 4 por bacteria) y finalizan en una especie de botón. Son necesarias para transferir el material genético desde las bacterias donantes a las receptoras durante la conjugación bacteriana (García-Rodríguez, 1987).

Los estudios realizados con microscopía electrónica han puesto de manifiesto que al menos existen dos tipos morfológicos de fimbrias en cepas de *Aeromonas* clínicas y ambientales (Carrello y col., 1988): los *pili* rígidos (numerosos por célula) con una longitud de 0,6 a 2,0 μm ., formados por subunidades de peso molecular de 17.000 a 18.000, y los *pili* flexibles (1-60 por célula), denominados "mini pilin", por el bajo peso molecular de la subunidad que los constituye (4.000) (Ho y col., 1990; Honma y Nakasone, 1990). Sato y col. (1989) han observado que no existen reacciones cruzadas entre los *pili* rígidos y los antígenos de los factores de colonización I y II de *E. coli*. Ho y col. (1990) secuencian la unidad constituyente de los *pili* flexible ("mini pilin"), observando que esta molécula de 46 aminoácidos parece ser totalmente nueva y no muestra homología con otras secuencias de *pili* conocidas. La expresión del "mini pilin" se puede regular ambientalmente, siendo máxima a 22°C, en medio líquido y en presencia de hierro reducido, mientras que los *pili* rígidos parecen ser constitutivos y aparecen en todas las condiciones. Estos hechos sugieren que la síntesis de los *pili* flexibles podría ser un requisito para la colonización en hospedadores mamíferos dependiente de las condiciones del medio.

I.4.2.2. - Proteínas de la membrana externa de la pared bacteriana (OMPs)

Aoki y Holland (1985) han separado electroforéticamente las proteínas de la membrana externa de ocho cepas de *A. hydrophila* y otras ocho de *A. salmonicida*. En el caso de *A. hydrophila*, las proteínas de la membrana externa son distintas de una cepa a otra, aunque la mayoría de ellas contenían una proteína de 36 kDa; por el contrario, en las cepas de *A. salmonicida* se observaron muchas proteínas comunes a todas las cepas, siendo la más abundante una de 32 kDa. Bajo condiciones restrictivas de hierro, tanto *A. hydrophila* como *A. salmonicida*, sintetizaron nuevas proteínas de la membrana externa con un peso molecular entre 68 y 93 kDa. Kuijper y col. (1989c) estudian las proteínas de la membrana externa en 46 cepas fecales, apareciendo las bandas más prominentes entre 25 y 45 kDa. En las cepas de *A. caviae*, los perfiles de las proteínas fueron similares, mientras que en las cepas de *A. hydrophila* y *A. veronii* biotipo *sobria* se observó una marcada heterogeneidad.

Atkinson y col. (1987) señalaron que la hemaglutinación y la producción de *pili* son independientes, al observar que la capacidad hemaglutinante se asocia a una proteína de la membrana externa que permitiría a las células adherirse a receptores (antígeno H) de los eritrocitos humanos. Estos receptores también se encuentran en las células intestinales, por lo que esta proteína de la membrana externa facilitaría la unión a las células intestinales, en las que la producción de enterotoxinas adquiere su máxima relevancia. Por otra parte, Wilcox y col. (1994) observan la expresión de nuevas proteínas de la membrana externa, que no aparecen en caldo de cultivo, cuando el crecimiento ocurre en contenido ileal humano. Quinn y col. (1994) aíslan, mediante cromatografía de afinidad basada en la reactividad con carbohidratos, dos proteínas formadoras de poro en bicapas lipídicas que podrían actuar como adhesinas.

Las aeromonas son capaces de adherirse a eritrocitos, levaduras, células del epitelio bucal y a la mucosa intestinal de conejo por mecanismos que implican la existencia de proteínas no fimbriadas de la superficie bacteriana (Atkinson y Trust, 1980; Levett y Daniel, 1981). Singh y col. (1993), indican que la adhesión al epitelio intestinal puede estar mediada por factores de colonización fimbriados o no y hemaglutinantes o no. Neves y col. (1994), detectan adherencia agregativa a células HEp-2 en *A. hydrophila* y *A. sobria*, similar a la enteroadherencia agregativa detectada en *E. coli*. Gray y Kirov (1993) observan que *A. veronii* biotipo *sobria* presenta una capacidad de adherencia a células HEp-2 superior al resto de las especies.

I.4.2.3. - Lipopolisacáridos de la membrana externa de la pared bacteriana (LPSs)

Forman parte de la membrana externa de la pared celular de las bacterias gram-negativas, asociándose al antígeno O y a las endotoxinas. En el lipopolisacárido de la membrana externa de la pared bacteriana se describen tres fracciones (Pumarola, 1987a):

- Fracción externa o cadenas laterales del lipopolisacárido, constituida por unidades de oligosacáridos, cuyo número, composición y secuencia diferirían según la especie bacteriana y serían responsables de la especificidad del antígeno O.

- Fracción central o núcleo del polisacárido (core), formado por oligosacáridos y KDO (ácido ketodesoxioctónico) que sería común entre las bacterias gram-negativas, y explicaría las reacciones cruzadas que se presentan entre las distintas especies.

- Fracción interna o lípido A, que se identificaría con la endotoxina, responsable de la toxicidad y de ciertas manifestaciones clínicas similares en infecciones causadas por distintas especies, que se liberaría por lisis celular. Su toxicidad es inferior a la de las exotoxinas, diferenciándose de éstas en que su acción es inespecífica, son termoestables, no se detoxican por acción del formol por lo que no se transforman en toxoides y tienen escaso poder inmunógeno.

Al analizar los polisacáridos de la región específica (cadenas laterales O) del LPS por SDS-PAGE se han detectado al menos tres modelos. Uno de ellos, de carácter homogéneo, se relaciona con el serogrupo O:11 de *Aeromonas* y, al parecer, este tipo de LPS desempeña un importante papel en el anclaje de la capa S. Además, a este serogrupo se le ha relacionado con la mayor virulencia en peces y con la resistencia a la acción bactericida del suero. (Dooley y col., 1985; Kokka y col., 1991b). Esteve y col. (1994), describen dos grupos de cepas patógenas, uno de ellos constituido por cepas PAB+, pertenecientes al serotipo O:19, que presentan cadenas de tamaño homogéneo en el LPS y una proteína de la membrana externa de 50 kDa. Las cepas del otro grupo fueron serológicamente variables, PAB-, presentaron un LPS heterogéneo y OMPs de 33 a 45 kDa. Por otro lado, Francki y Chang (1994) indican que el LPS podría actuar como una adhesina en *A. sobria*.

I.4.2.4. - Flagelo

Los miembros de *Aeromonas* spp. son generalmente móviles con un único flagelo polar de 1,7 μm , aunque en cultivos jóvenes, a veces se observan flagelos laterales cortos (< 1,7 μm) (Stelma, 1989). Existe muy poca información sobre el flagelo de *Aeromonas* spp., a pesar de que la movilidad se relaciona con la patogenicidad ya que, únicamente, las

especies móviles se consideran potencialmente patógenas para el hombre.

I.4.2.5. - Capa extra, proteica y externa a la pared bacteriana (Capa S)

La presencia de una "monocapa macromolecular periódica", de estructura paracristalina, sobre la pared bacteriana se observó, por primera vez, hace 42 años, en fotografías realizadas con un microscopio electrónico (Houwink, 1953, citado en Sleyrt y Messner, 1983). Posteriormente, se ha comprobado que esta capa es más frecuente de lo que en un principio se sospechaba, observándose su presencia en *Acinetobacter* spp., *Campylobacter fetus*, *Aeromonas salmonicida*, distintas especies de *Bacillus*, de *Clostridium*, de *Lactobacillus* y en otros microorganismos (Yamada y col., 1981; Ishiguro y col., 1981; Evenberg y col., 1982; Tsuboi y col., 1982; Sleyrt y Messner, 1983). La capa S se puede considerar como la membrana biológica más sencilla desarrollada a lo largo de la evolución; generalmente, está formada por un sólo polipéptido homogéneo de peso molecular alto y, ocasionalmente, por carbohidratos como componentes minoritarios en forma de glicoproteínas. Los pesos moleculares determinados por SDS-PAGE varían de 40 a 200 kDa.

Está directamente implicada en las interacciones entre la célula y su entorno y, desaparece cuando la bacteria se cultiva de forma prolongada en el laboratorio, indicando que su presencia es un elemento de protección para los microorganismos que la poseen (Sleytr, 1978).

Se precisan 5×10^5 monómeros de la capa S para dar lugar a una cadena bidimensional totalmente cerrada alrededor de un bacilo. En algunos microorganismos, la síntesis de la proteína de la capa S parece estar completamente controlada, dada la escasa cantidad que se detecta en el medio de crecimiento (Thorne y col., 1976), mientras que, en otros, la producción es excesiva (Beveridge y Murray, 1975; Smit y col., 1981; Yamada y col., 1981). La capa S no sólo desempeña una acción protectora frente a ataques externos e internos, sino que también contribuye a mantener la morfología celular y juega un papel importante en la adhesión. La existencia de canales, de 2 a 3 nm de diámetro, no impediría el paso de nutrientes y productos de degradación, pero sí podría proteger a las células de la acción de enzimas líticas y de otros agentes hostiles del entorno (Sleyrt, 1978; Beveridge, 1979; Stewart y Beveridge, 1980; Stewart y Murray, 1982). Se ha observado que la capa S puede evitar la liberación de macromoléculas, aumentando la concentración celular sobre todo en la fase exponencial de crecimiento (Sleyrt y Messner, 1983). Además de las funciones dependientes del tamaño de los poros, la capa S puede actuar como una barrera

física frente a la respuesta inmune del hospedador (Trust y col, 1980; Ishiguro y col., 1981; Evenberg y Lugtenberg, 1982; Evenberg y col., 1982; Munn y col., 1982). En ocasiones se opone a la infección por bacteriófagos (Ishiguro y col., 1981), aunque también puede presentar receptores específicos a ciertos bacteriófagos (Sleyrt y Messner, 1983). Además, la capa S se considera implicada en fenómenos de adhesión como autoaglutinación y adhesión a epitelios (Sleyrt y Messner, 1983), en el intercambio iónico (Beveridge, 1978; Beveridge, 1979) y en el efecto tampón frente a ácidos e hidrogeniones de la célula y el entorno (Sleyrt y Messner, 1983).

En lo que se refiere a *Aeromonas*, en 1981 Kay y col. identificaron, con el microscopio electrónico de transmisión, una capa adicional (originalmente llamada capa A) externa a la pared celular en cepas autoaglutinantes de *A. salmonicida* (HG3) patógenas para peces. Los estudios bioquímicos y genéticos indican que está compuesta por una simple cadena proteica superficial de 49 a 51 kDa (Kay y col., 1984). La capa S confiere una hidrofobicidad superficial elevada a las cepas autoaglutinantes de *A. salmonicida* y es el factor de virulencia más importante (Trust y col., 1983; Belland y Trust, 1985; Ishiguro y col., 1985). La capacidad de unión al rojo Congo, la resistencia a la lisis mediada por el complemento y la asociación a monocitos fagocíticos parecen relacionarse con la presencia de la capa S en *A. salmonicida* (Ishiguro y col., 1985; Munn y col., 1982; Trust y col., 1983).

Posteriormente, en varias investigaciones simultáneas, se detectaron cepas de *A. hydrophila* (GH1) y de *A. veronii* biotipo *sobria* (GH8), provistas de capa S, implicadas en infecciones humanas y animales (Dooley y Trust, 1988; Paula y col., 1988; Kokka y col., 1991a). Las cepas de origen humano se aislaron, principalmente, en infecciones extraintestinales, como peritonitis y bacteriemias (Janda y col., 1987). Independientemente de su procedencia (humano, animal o ambiental), estas cepas presentaron idénticas estructuras y propiedades genéticas, así como, características fenotípicas similares (Paula y col., 1988; Kokka y col., 1991a). El análisis electroforético de las proteínas superficiales de la capa S, indicó que son moléculas ácidas con un peso de 52 a 58 kDa (Dooley y col., 1988; Kokka y col., 1990, 1991a). La composición en aminoácidos de estas proteínas resultó similar a la de las proteínas de *A. salmonicida*, aunque no se observó homología en la secuencia aminoacídica terminal, que es repetitiva en las cepas de *A. salmonicida* (Kay y col., 1984; Dooley y col., 1988). También se detectaron diferencias funcionales con respecto a la capa S de *A. salmonicida*, ya que no se observó que se incrementase la hidrofobicidad de la superficie celular, ni la capacidad de unión del rojo Congo (Paula y col., 1988). Recientemente, Thomas y Trust (1995) han clonado y expresado en *E. coli* la

subunidad proteica que constituye esta capa. Kokka y col. (1991b) afirman que la presencia de capa S no está directamente implicada en la patogenicidad para el ratón e indican que su papel en la patogénesis puede ser totalmente distinto al de la capa S de *A. salmonicida*. En cualquier caso, las cepas de *A. hydrophila* con capa S, pertenecientes al serotipo O:11, se consideran altamente virulentas para hombres y peces (Dooley y Trust, 1988; Paula y col., 1988). Algunas investigaciones seroepidemiológicas ponen de manifiesto que este tipo de cepas representan el 20-30% de todas las de *A. hydrophila* y *A. veronii* biotipo *sobria* aisladas de infecciones humanas (Kokka y col., 1992). En este sentido, Merino y col. (1993) han desarrollado una prueba inmunoenzimática para detectar este tipo de cepas en alimentos.

I.4.2.6. - Invasividad

La capacidad de *Aeromonas* para producir síntomas disentéricos podría relacionarse con la invasividad celular, como ocurre en *Salmonella* y *Shigella* (Watson y col., 1985). Al investigar cepas de origen fecal, se observó que la invasividad era más frecuente en *A. sobria* que en el resto de las especies, aunque esta característica no se relacionaba con la enterotoxigenicidad. Sin embargo, en el caso de *A. hydrophila*, sí se detectó asociación entre la aparición de síntomas de disentería y la invasividad de las cepas (Watson y col., 1985). En 1985, Lawson y col. (1985) observaron que 6 de 10 cepas de *A. hydrophila* eran capaces de invadir células HEp-2; la composición plasmídica de estas cepas invasivas sugirió que, probablemente, los genes responsables se localizaban en el cromosoma y que, en cualquier caso, no estaba clara la relación entre invasividad *in vitro* y patogenicidad *in vivo*. Gray y col. (1990) comprobaron que entre el 14 y el 36% de las cepas de *Aeromonas* invaden células HEp-2, siendo también *A. sobria* la más invasiva. Nishikawa y col. (1994) señalan la adhesión e invasión en células de carcinoma de colon humano (Caco-2).

I.4.2.7. - Resistencia al suero

Muchas *Aeromonas*, tanto mesófilas como psicrótrofas, son resistentes a la lisis mediada por el complemento humano, de peces y conejos (Munn y col., 1982; Janda y col., 1984a). La mayoría de las cepas de *A. hydrophila* y *A. sobria* son más refractarias a la acción bactericida del suero que *A. caviae*; las cepas sensibles parecen activar el complemento dando lugar a una rápida lisis (Brenden y Janda, 1986). Mittal y col. (1980) asociaron la resistencia a la acción bactericida del suero con cepas altamente virulentas para

peces. Sin embargo, Montenegro y col. (1985) no han detectado, en 66 cepas de *Aeromonas*, el gen traT, que codifica una proteína de la membrana externa, responsable de la resistencia al suero de *E. coli*. Merino y col. (1994) observan que la resistencia a la lisis mediada por el complemento, además de ser dependiente de la temperatura de crecimiento y de asociarse a distintas formas del lipopolisacárido, puede deberse a la rápida degradación de algunos elementos de este sistema, impidiendo la formación del complejo lítico. Janda y col. (1994b) han detectado resistencia a la acción lítica del complemento, principalmente, en cepas del serogrupo O:11 y provistas de capa S.

I.4.2.8. - Plásmidos

Entre el 20 y el 100% de las cepas de *A. salmonicida*, *A. hydrophila* y *A. sobria* examinadas portaban plásmidos de peso molecular entre 2 y 100 MDa (Toranzo y col., 1983a; Chang y Bolton, 1987; Belland y Trust, 1989). La mayoría de las cepas de *A. salmonicida* presentan perfiles plasmídicos bastante homogéneos. En *A. hydrophila* y *A. sobria*, la frecuencia de plásmidos es más baja (20 a 58%) y las variaciones en los perfiles plasmídicos son mayores. Muchos de los plásmidos de *Aeromonas* son factores R que llevan marcadores de resistencia frente a la tetraciclina, ampicilina, tobramicina y kanamicina (Toranzo y col., 1983a; Hedges y col., 1985; Chang y Bolton, 1987). Toranzo y col. (1983a) observaron en una cepa de *A. hydrophila*, "curada" de plásmidos, numerosas diferencias con respecto a la cepa paterna, que afectaban a la producción de indol y gelatinasa, a las propiedades superficiales y a la resistencia a la tetraciclina. Posteriormente, Hanes y Chandler (1993) detectan un plásmido de 40 MDa que regula la adhesividad a células Caco-2, la actividad hemolítica y la resistencia a antibióticos.

En los últimos años se ha intentado establecer el papel que las aeromonas juegan en las enfermedades humanas y animales. Los mayores avances hacen referencia al conocimiento de nuevas especies, la identificación de estructuras (capa S, "mini pilin") y la caracterización genética de factores de virulencia (hemolisinas y proteasas). Sin embargo, quedan muchas cuestiones por resolver, siendo primordial el desarrollo de un modelo animal donde se reproduzca la diarrea asociada a *Aeromonas* y, por tanto, sea posible establecer, inequívocamente, el papel de *Aeromonas* como patógenos gastrointestinales.

También son necesarias las investigaciones sobre productos extracelulares y asociados a la célula, en cepas patógenas y no patógenas, para determinar los factores implicados en la virulencia. La frecuencia de los distintos grupos de hibridación requiere también un estudio más profundo con el fin de aclarar la epidemiología de este tipo de infecciones (Janda, 1991). Por otro lado, son necesarios exámenes rutinarios de heces diarreicas y de alimentos sospechosos para valorar la importancia sanitaria de las gastroenteritis asociadas a *Aeromonas* spp. transmitidas por alimentos. Algunos estudios sugieren que su presencia en alimentos representaría un riesgo bajo, ya que tanto estos microorganismos como sus toxinas son termolábiles, la producción de toxinas es más elevada en medios bacteriológicos que en los alimentos y, aunque algunas cepas pueden crecer competitivamente en alimentos a 5°C, la detección de una carga elevada en los mismos no parece ser frecuente (Kirov, 1993). Hasta que las cuestiones concernientes a la patogenicidad de *Aeromonas* y su comportamiento en alimentos no estén totalmente resueltas, la presencia de un número elevado de *Aeromonas* en alimentos debería ser considerada, únicamente, como un riesgo potencial para la salud, principalmente, en personas inmunodeficientes.

II. OBJETIVOS DEL TRABAJO

El planteamiento de este trabajo se centró en el estudio comparativo de cepas de *Aeromonas* spp. móviles aisladas de alimentos y de heces diarreicas humanas, en cuanto a sus posibilidades de llegar a producir una acción patógena en el hombre. En consecuencia, una vez seleccionados los medios de cultivo y técnicas de identificación y aislamiento de más garantía y después de comparar la resistencia de ambos tipos de cepas, se abordó el problema del estudio y valoración de los factores de virulencia asociados a los productos exocelulares, propiedades superficiales y características bioquímicas de las cepas de *Aeromonas* spp. Para conseguir estos objetivos se estructuró el trabajo del siguiente modo:

- Evaluación del comportamiento de tres medios selectivos para el aislamiento de *Aeromonas* spp. móviles, así como selección de las pruebas bacteriológicas y bioquímicas que garantizan la correcta identificación de este grupo bacteriano y su diferenciación a nivel de especie.

- Determinación de su incidencia en alimentos españoles (carnes, pescados, mariscos, etc.) recogidos de supermercados y establecimientos de venta al público.

- Comprobación de la resistencia de *Aeromonas* spp. frente a diferentes parámetros físicos y químicos (temperatura, pH, cloruro sódico, nitritos, cloro, antibióticos, etc.).

- Estudio de los factores de virulencia de cepas aisladas en alimentos y en heces diarreicas humanas:
 - . Actividad hemolítica (eritrocitos de cordero y conejo y sangre de caballo y cordero).
 - . Actividad enzimática (proteasas y lipasas).
 - . Citotoxicidad (líneas celulares estables Vero y mieloma).
 - . Hemaglutinación e inhibición de la hemaglutinación por azúcares.
 - . Autoaglutinación y aglutinación con acriflavina.
 - . Hidrofobicidad superficial (unión a filtros de nitrocelulosa y adsorción a hidrocarburos).
 - . Detección de *pili* y de la capa S mediante microscopía electrónica de transmisión.
 - . Características bioquímicas que pudieran relacionarse con la patogenicidad.
 - . Asociaciones presentes entre los factores de virulencia estudiados.

III. MATERIAL Y METODOS

III.1. - Material y equipo

- Material de vidrio (pipetas, tubos, matraces, etc.) "Pyrex" o de calidad similar.
- Material de plástico estéril (microplacas, placas de petri, botellas, tubos, etc.) "Nunc", "Falcon" y "Sterilin"
- Micropipetas automáticas P-20, P-200, P-1000 y P-5000 (Gilson), pipeteador automático (Falcon), agitadores, etc.
- Destilador de agua "Pobel".
- Homogeneizador "Stomacher" mod. 400 Colworth.
- Balanzas "A/D" mod. ER-120A, "A/D" mod. ER-600A y mod. ER-3000A.
- Ph-metro Metrohm mod. 654.
- Autoclaves "Selecta" mod. 437-G.
- Estufa de aire forzado "Heraeus" mod. KFTU-K.
- Filtros "Millipore" de 0,22 y 0,45 μm de diámetro de poro. La filtración de grandes volúmenes se realizó con un sistema conectado a una bomba de vacío EYELA A-3S.
- Sistema de ultrafiltración tangencial "Minisette" TM de "FILTRON", conectado a una bomba peristáltica "Masterflex" y con 3 paquetes compactos, "cassettes" o cartuchos de membranas (serie "Omega", "FILTRON") específicos para realizar cortes moleculares a 50, 30 y 8 kDa.
- Filtros de nitrocelulosa "Millipore" mod. SCWP.
- Centrífugas "Sorvall" mods. RC-5B y GLC-1 con rotores SS-34 y GSA y microcentrífuga "Heraeus" mod. Biofuge con rotor 1220.
- Sistema de evaporación-centrifugación al vacío "Howe" mod. GV1 conectado a una bomba de vacío "Titan" mod. Trap.
- Cámara de flujo laminar "Telstar" mod. CE-A.
- Estufas "Heraeus" mods. KB-500, B6200 y BK-600 y "Selecta", mod. Termotronic 338. Baños de agua o propilenglicol provistos con termostatos "Selecta", mod. Tectron. Baño de agua con agitación orbital "GFL" mod. 1092 conectado a una unidad de refrigeración "Braun" mod. Frigomix U.
- Microscopio óptico "Nikon", mod. L-Ke, equipado con un dispositivo de contraste de fases.
- Ultramicrotomo "LKB" mod. Ultratome III,
- Microscopio electrónico de transmisión "Zeiss" mod. 902 con equipo fotográfico.
- Espectrofotómetros "Kontron" mod. Uvikon 820 y "Hitachi" mod. U-2000, con impresora térmica "Kontron" mod. Uvikon LS Thermoprinter 4B. Lector de microplacas

"Cultek" mod. Tietertek Multiskan Plus.

- Congeladores "Liebherr", mod. GT6102 y "Sanyo" mod. Ultra low. Frigorífico "Kelvinator" mod. AKR. Recipiente de Nitrógeno líquido

- Cámara con equipo de filtración-esterilización de aire "Telstar" y acondicionador de temperatura "Interclisa", provisto de: campana de flujo laminar "MDH" mod. 20134; centrífuga "Sorvall" mod. TC6 con un rotor H-400; incubador de CO₂ con camisa de agua "REVCO" mod. Ultima; baño de agua con termostato "Bunsen" mod. BA-12; microscopio invertido equipado con cámara fotográfica "Olympus" mod. CK2 y frigorífico y congelador "Liebherr".

III.2. - Productos biológicos

III.2.1. - Microorganismos

Se emplearon 100 cepas de *Aeromonas* spp.: 4 procedentes de la Colección Española de Cultivos Tipo (Burjasot, Valencia), 15 aisladas por el Dr. J. Reina en heces diarreicas humanas (Hospital Son Dureta, Palma de Mallorca) y el resto obtenidas a partir de alimentos y aguas. (Tabla III.1).

III.2.2. - Alimentos

Se tomaron muestras de los siguientes alimentos: carnes (vacuno, cerdo, pollo y cordero), pescados (pescadilla, gallo, jurel, sardina, trucha), mariscos (chirlas, mejillones, gambas, cigalas), leche cruda, queso fresco y ensaladas preparadas.

III.2.3. - Aguas

Se recogieron muestras de agua potable clorada, agua potable no clorada y agua no potable.

III.2.4. - Preparados hematológicos

La sangre de caballo y cordero, así como, las suspensiones de eritrocitos de conejo y cordero fueron suministrados por "Biomerieux".

Tabla III.1 - Cepas de *Aeromonas* spp. móviles empleadas en este trabajo

Nº	Especie	Origen	Nº	Especie	Origen
1	<i>A. hydrophila</i>	CECT (839)*	50	No clasificada	Carne de pollo
2	<i>A. hydrophila</i>	CECT (398)*	51	No clasificada	Carne de pollo
3	<i>A. caviae</i>	CECT (838)*	52	No clasificada	Carne de pollo
4	<i>A. sobria</i>	CECT (837)*	53	<i>A. sobria</i>	Carne de cerdo
5	<i>A. hydrophila</i>	Heces diarreicas humanas	54	<i>A. caviae</i>	Carne de cerdo
6	<i>A. hydrophila</i>	Heces diarreicas humanas	55	<i>A. hydrophila</i>	Carne de cerdo
7	<i>A. hydrophila</i>	Heces diarreicas humanas	56	<i>A. hydrophila</i>	Carne de cerdo
8	<i>A. hydrophila</i>	Heces diarreicas humanas	57	<i>A. sobria</i>	Carne de cerdo
9	<i>A. hydrophila</i>	Heces diarreicas humanas	58	No clasificada	Carne de pollo
10	<i>A. sobria</i>	Heces diarreicas humanas	59	<i>A. sobria</i>	Carne de pollo
11	<i>A. sobria</i>	Heces diarreicas humanas	60	No clasificada	Carne de cerdo
12	<i>A. sobria</i>	Heces diarreicas humanas	61	No clasificada	Carne de cerdo
13	<i>A. sobria</i>	Heces diarreicas humanas	62	No clasificada	Queso fresco
14	<i>A. sobria</i>	Heces diarreicas humanas	63	<i>A. hydrophila</i>	Carne de vaca
15	<i>A. caviae</i>	Heces diarreicas humanas	64	No clasificada	Carne de pollo
16	<i>A. caviae</i>	Heces diarreicas humanas	65	<i>A. hydrophila</i>	Pescadilla
17	<i>A. caviae</i>	Heces diarreicas humanas	66	No clasificada	Pescadilla
18	<i>A. caviae</i>	Heces diarreicas humanas	67	<i>A. hydrophila</i>	Jurel
19	<i>A. caviae</i>	Heces diarreicas humanas	68	<i>A. sobria</i>	Jurel
20	<i>A. hydrophila</i>	Agua no potable	69	No clasificada	Jurel
21	<i>A. hydrophila</i>	Agua no potable	70	No clasificada	Pescadilla
22	No clasificada	Agua no potable	71	<i>A. hydrophila</i>	Gallo
23	<i>A. sobria</i>	Agua no potable	72	No clasificada	Gallo
24	<i>A. hydrophila</i>	Agua no potable	73	<i>A. hydrophila</i>	Sardina
25	<i>A. hydrophila</i>	Agua no potable	74	<i>A. hydrophila</i>	Jurel
26	No clasificada	Agua no potable	75	<i>A. hydrophila</i>	Pescadilla
27	<i>A. hydrophila</i>	Agua no potable	76	<i>A. hydrophila</i>	Jurel
28	<i>A. sobria</i>	Agua no potable	77	No clasificada	Sardina
29	No clasificada	Carne de pollo	78	<i>A. hydrophila</i>	Trucha
30	No clasificada	Carne de cordero	79	<i>A. sobria</i>	Trucha
31	<i>A. hydrophila</i>	Carne de vaca	80	<i>A. hydrophila</i>	Jurel
32	No clasificada	Carne de cordero	81	<i>A. hydrophila</i>	Pescadilla
33	<i>A. caviae</i>	Carne de cordero	82	No clasificada	Pescadilla
34	<i>A. sobria</i>	Carne de cordero	83	<i>A. caviae</i>	Mejillón
35	No clasificada	Carne de pollo	84	<i>A. sobria</i>	Chirla
36	<i>A. hydrophila</i>	Carne de pollo	85	<i>A. hydrophila</i>	Chirla
37	<i>A. sobria</i>	Carne de pollo	86	<i>A. hydrophila</i>	Gambas
38	<i>A. hydrophila</i>	Carne de vaca	87	<i>A. caviae</i>	Gambas
39	No clasificada	Queso fresco	88	<i>A. hydrophila</i>	Mejillón
40	No clasificada	Queso fresco	89	<i>A. sobria</i>	Mejillón
41	<i>A. sobria</i>	Carne de pollo	90	<i>A. caviae</i>	Mejillón
42	No clasificada	Carne de pollo	91	<i>A. sobria</i>	Chirla
43	<i>A. hydrophila</i>	Carne de cordero	92	<i>A. sobria</i>	Gambas
44	<i>A. hydrophila</i>	Carne de pollo	93	No clasificada	Cigala
45	<i>A. hydrophila</i>	Carne de cerdo	94	<i>A. hydrophila</i>	Chirla
46	<i>A. hydrophila</i>	Carne de cerdo	95	No clasificada	Cigala
47	No clasificada	Carne de cordero	96	<i>A. hydrophila</i>	Mejillón
48	<i>A. sobria</i>	Carne de cordero	97	<i>A. caviae</i>	Mejillón
49	<i>A. sobria</i>	Carne de cerdo	98	<i>A. hydrophila</i>	Mejillón
			99	<i>A. sobria</i>	Chirla
			100	<i>A. hydrophila</i>	Leche cruda

* - Número correspondiente en la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT) (Burjasot, Valencia)

III.2.5. - Líneas celulares estables

Se utilizó la línea celular Vero (riñón de mono verde africano), cedida por el Centro de Biología Molecular de la Universidad Autónoma de Madrid y células de mieloma de ratón (P3X63-Ag 8.653), procedentes del Instituto Llorente de Madrid.

III.3. - Reactivos

Los reactivos utilizados fueron de la calidad "reactivo" suministrados por "Merck", "Sigma", "Fluka" y "Panreac".

Los productos empleados en las experiencias microbiológicas procedieron de las firmas "Oxoid", "Merck" y "Difco".

Los cultivos celulares se realizaron con los productos suministrados por "Gibco".

III.4. - Métodos

III.4.1. - Preparación de los medios de cultivo

Se llevó a cabo, de acuerdo con las instrucciones de los suministradores. Se ajustaron al pH correspondiente y se esterilizaron a 120°C y una atmósfera de presión durante 20 minutos, excepto aquellos medios o suplementos en los que se especifica otro método de esterilización.

III.4.2. - Preparación de soluciones

Se realizaron en agua destilada, excepto aquellas en las que se indicaba otro diluyente particular.

III.4.3. - Recuentos microbianos

Para realizar los recuentos se hicieron diluciones decimales de las muestras en suero fisiológico (0,85%) o en agua de peptona (1%) estériles. Las diluciones se sembraron (en masa o en superficie) en los medios sólidos, utilizando dos placas para cada dilución.

III.4.4. - Aislamiento de colonias

Se realizó de acuerdo con el método descrito por Ordóñez (1978). Para ello se numeraron las colonias de las placas, en las que aparecían entre 100 y 200 colonias, y se eligió el 20% de ellas, de acuerdo con una tabla de números estrictamente aleatorios.

III.4.5. - Toma de muestras

Las muestras de un mismo alimento se adquirieron en distintos días y comercios de Madrid. La leche cruda procedió de la granja Priégola La Chirigota de Madrid. El agua potable clorada se recogió de la red de distribución de Madrid, el agua potable no clorada de un manantial situado en el Parque del Oeste de Madrid y las muestras de agua no potable de distintos tramos de los ríos Manzanares y Guadarrama.

III.4.6. - Mantenimiento de las cepas

Medio empleado:

Caldo triptono soja con extracto de levadura (TSB+YE):

Caldo triptono soja:		31 g/l
Digerido pancreático de caseína	17	g/l
Digerido papaínico de semilla de soja	3	g/l
Cloruro sódico	5	g/l
Fosfato potásico dibásico	2,5	g/l
Glucosa	2,5	g/l
Extracto de levadura		6 g/l

Todas las cepas se conservaron a -80°C y a -20°C , en caldo triptono soja con extracto de levadura (0,6%) (TSB+YE) y glicerol (12 a 15%).

III.4.7. - Revitalización de las cepas

Previamente a la realización de los ensayos se revitalizaron las cepas, partiendo siempre de un cultivo puro de 24h obtenido en TSB+YE a 28°C .

III.4.8. - Manejo de líneas celulares estables

III.4.8.1. - Mantenimiento

Se resuspendieron 5×10^6 células por ml en la mezcla de congelación (90% de suero fetal bovino y 10% de dimetilsulfóxido) y se dispensan en volúmenes de 1 ml en viales estériles. Se conservaron a -85°C en un arcón congelador y a -150°C en nitrógeno líquido.

Tras la descongelación, las células se mantuvieron en los medios de cultivo a 37°C , con un 5% de CO_2 y una humedad relativa próxima al 100%, sustituyendo el medio de cultivo por medio fresco recién preparado y ajustando el número de células, siempre que se consideró necesario, con el fin de mantener la población celular en fase de crecimiento exponencial.

III.4.8.2. - Recuentos celulares

El número aproximado de células se estimó en una cámara de Neubauer con la ayuda de un microscopio invertido. Previamente, las células de mieloma se tiñeron (1:1) con Tripan azul al 2% en PBS.

III.4.8.3. - Cultivo de células Vero

Medio de Eagle modificado por Dulbecco:

CaCl ₂ .2H ₂ O	264 mg/l	L-Lisina HCl	146 mg/l
Fe(NO ₃).9H ₂ O	0,10 mg/l	L-Metionina	30 mg/l
KCl	400 mg/l	L-Fenilalanina	66 mg/l
MgSO ₄ .7H ₂ O	200 mg/l	L-Serina	42 mg/l
NaCl	6400 mg/l	L-Treonina	95 mg/l
NaHCO ₃	3700 mg/l	L-Triptófano	16 mg/l
NaH ₂ PO ₄ .2H ₂ O	141 mg/l	L-Tirosina	72 mg/l
D-Glucosa	1000 mg/l	L-Valina	94 mg/l
Fenol rojo	15 mg/l	Pantotenato cálcico	4 mg/l
Piruvato de sodio	110 mg/l	Cloruro de colina	4 mg/l
L-Arginina.HCl	84 mg/l	Acido fólico	4 mg/l
L-Cistina	48 mg/l	i-Inositol	7,2 mg/l
L-Glutamina	580 mg/l	Nicotinamida	4 mg/l
Glicina	30 mg/l	Piridoxal HCl	4 mg/l
L-Histidina HCl.H ₂ O	42 mg/l	Riboflavina	0,4 mg/l
L-Isoleucina	105 mg/l	Tiamina HCl	4 mg/l
L-Leucina	105 mg/l		

El medio de cultivo completo utilizado para las células Vero contenía:

- Medio de Eagle modificado por Dulbecco	100 ml
- Suero fetal bovino (previamente inactivado a 56°C-10 minutos)	10 ml
- Solución de Penicilina-Estreptomicina (10000 UI y 10 mg/ml, resp.)	1 ml
- Solución de L-Glutamina 200 mM	1 ml

Las condiciones de crecimiento fueron 37°C, 5% de CO₂ y humedad relativa alta.

III.4.8.4 - Cultivo de células de mieloma

Medio RPMI 1640 sin glutamina:

Ca(NO ₃) ₂ ·4H ₂ O	100 mg/l	L-Metionina	15 mg/l
KCl	400 mg/l	L-Fenilalanina	15 mg/l
MgSO ₄ ·7H ₂ O	100 mg/l	L-Prolina	20 mg/l
NaCl	6000 mg/l	L-Serina	30 mg/l
NaHCO ₃	2000 mg/l	L-Treonina	20 mg/l
NaH ₂ PO ₄ (anhid)	800 mg/l	L-Triptófano	5 mg/l
D-Glucosa	2000 mg/l	L-Tirosina	20 mg/l
Glutaciona	1 mg/l	L-Valina	20 mg/l
Fenol rojo	5 mg/l	Biotina	0,2 mg/l
L-Arginina	200 mg/l	Pantotenato cálcico	0,3 mg/l
L-Asparagina	50 mg/l	Cloruro de colina	3 mg/l
Acido L-Aspártico	20 mg/l	Acido fólico	1 mg/l
L-Cistina	50 mg/l	i-Inositol	35 mg/l
Acido L-Glutámico	20 mg/l	Nicotinamida	1 mg/l
Glicina	10 mg/l	Acido Para-aminobenzoico	1 mg/l
L-Histidina	15 mg/l	Piridoxina HCl	1 mg/l
L-Hidroxiprolina	20 mg/l	Riboflavina	0,2 mg/l
L-Isoleucina	50 mg/l	Tiamina HCl	1 mg/l
L-Leucina	50 mg/l	Vitamina B ₁₂	0,005 mg/l
L-Lisina HCl	40 mg/l		

El medio de cultivo empleado en esta línea celular se componía de:

- Medio RPMI 1640 sin glutamina	100 ml
- Suero fetal bovino (previamente inactivado a 56°C-10 minutos)	15 ml
- Solución de Penicilina-Estreptomicina (10000 UI y 10 mg/ml, resp.)	1 ml
- Solución de L-Glutamina 200 mM	1 ml

Las condiciones de crecimiento fueron 37°C, 5% de CO₂ y humedad relativa alta.

III.4.9. - Técnica para comparar el comportamiento de los medios selectivos (AAA, AGAP y mA) en el aislamiento de *Aeromonas* spp. móviles.

Medios:

- Medio de *Aeromonas* (mA) (Ryan, 1985. Datos proporcionados por Oxoid):

Proteosa-peptona	5	g/l	Sales biliares nº3	3	g/l
Extracto de levadura	3	g/l	Tiosulfato sódico	10,67	g/l
Clorhidrato de L-lisina	3,5	g/l	Cloruro sódico	5	g/l
Clorhidrato de L-arginina	2	g/l	Citrato amónico férrico	0,8	g/l
Inositol	2,5	g/l	Azul de bromotimol	0,04	g/l
Lactosa	1,5	g/l	Agar	12,5	g/l
Sorbosa	3	g/l	Azul de timol	0,04	g/l
Xilosa	3,75	g/l	Ampicilina	0,005	g/l

pH $8 \pm 0,1$

Las colonias de *Aeromonas* son de color verde oliva con el centro más oscuro y de 0,5 a 1,5 mm de diámetro.

- Agar glutamato penicilina (AGAP) (Kielwein, 1969):

L(+)-glutamato sódico	10	g/l
Almidón hidrosoluble	20	g/l
Dihidrógeno fosfato potásico	20	g/l
Sulfato de magnesio	0,5	g/l
Rojo de fenol	0,36	g/l
Agar	12	g/l
Pimaricina	0,01	g/l
Penicilina	100.000	UI/l

pH $7,2 \pm 0,2$

Aparecen colonias amarillas de 2-3 mm de diámetro rodeadas de una zona amarillenta.

- Agar almidón ampicilina (AAA) (Palumbo *et al.* 1985a):

Almidón soluble	10	g/l
Agar con rojo de fenol:	31	g/l
Proteosa peptona nº3	10	g/l
Extracto de carne	1	g/l
Cloruro sódico	5	g/l
Rojo fenol	0,025	g/l
Agar	15	g/l

Ampicilina 0,01 g/l

pH $7,0 \pm 0,1$

Aeromonas spp. dan lugar a colonias amarillas, de 3-5 mm de diámetro, que se caracterizan porque después de añadir 5 ml de lugol (Solución yodo yodurada de Lugol: Yodo 1 g; Yoduro potásico 2 g ; Agua destilada 200 ml) en la superficie de la placa se tornan de color miel con un halo amarillo alrededor.

- Agar triptona soja con extracto de levadura (TSA+YE):
TSB+YE, suplementado con agar (1,5%)

Los antibióticos se añadieron a los medios de cultivo en forma de solución esterilizada por filtración (poro = 22 μ m).

Aguas y alimentos: agua clorada, leche cruda, carnes picadas de vacuno, cerdo y pollo, pescadilla, trucha, chirlas y gambas.

Cepas: *A. hydrophila* CECT 839, *A. hydrophila* CECT 398, *A. caviae* CECT 838 y *A. sobria* CECT 837.

Técnica: De cada alimento se obtuvieron cinco fracciones: alimentos sólidos (10 g triturados y homogeneizados en 90 ml de agua de peptona al 1%); alimentos líquidos (10 ml homogeneizados en 90 ml de agua de peptona al 1%).

Las cepas de *Aeromonas* se sembraron en TSB+YE y se incubaron a 28°C durante 18h. La concentración aproximada de los cultivos de las cuatro cepas se determinó por espectrofotometría a 600 nm, mediante la utilización de rectas patrón calculadas previamente para cada cepa (Figuras III.1, III.2, III.3 y III.4), que relacionaban la absorbancia a 600 nm con el \log_{10} de las ufc/ml de cada cultivo en fase de crecimiento exponencial.

Cuatro de las muestras obtenidas de cada alimento se inocularon con 1 ml de un cultivo de cada una de las cepas de *Aeromonas* spp., variando el volumen del alimento inoculado de modo que, la concentración final de cada cepa fuese aproximadamente de 10^7 ufc/ml de muestra de alimento. A continuación, se efectuaron los recuentos de todas las muestras en los tres medios específicos descritos. La quinta muestra de cada alimento se utilizó para realizar los recuentos de la flora natural de los alimentos, en agar triptona soja y en los tres medios de cultivo selectivos para *Aeromonas*.

Las placas se incubaron a 28°C-24h, excepto las del medio AGAP que se incubaron durante 48h. Tras realizar los recuentos, la capacidad de inhibición de los medios selectivos

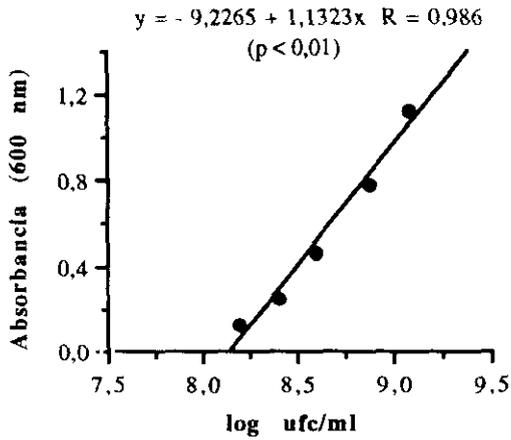


Figura III.1 - Relación entre la absorbancia (600 nm) y el log ufc/ml de un cultivo de *A. hydrophila* CECT 398

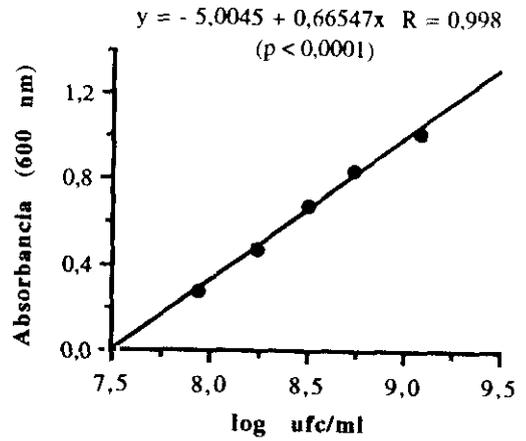


Figura III.2 - Relación entre la absorbancia (600 nm) y el log ufc/ml de un cultivo de *A. hydrophila* CECT 839

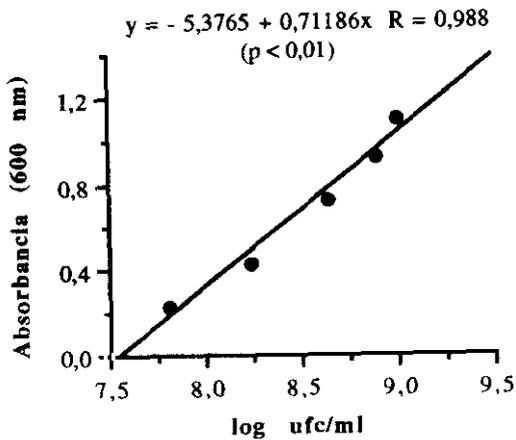


Figura III.3 - Relación entre la absorbancia (600 nm) y el log ufc/ml de un cultivo de *A. sobria* CECT 837

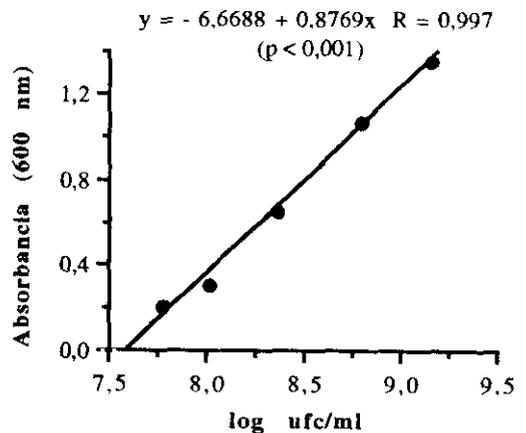


Figura III.4 - Relación entre la absorbancia (600 nm) y el log ufc/ml de un cultivo de *A. caviae* CECT 838

frente a la flora natural de los distintos alimentos se determinó comparando los recuentos de colonias en estos medios con los obtenidos en TSA+YE. Finalmente, la capacidad de recuperación de las cepas de *Aeromonas* spp. móviles se determinó comparando los recuentos en los medios específicos con el nivel de inoculación determinado por espectrofotometría.

III.4.10. - Técnica para investigar el comportamiento de *A. sobria* CECT 837 en los medios selectivos (AAA, AGAP y mA) modificados

Medios:

La concentración final de antibióticos en los medios fue la siguiente:

- AAA sin ampicilina
- AAA con 0,005 g/l de ampicilina
- mA sin ampicilina
- mA con 0,01 g/l de ampicilina
- AGAP sin penicilina ni pimaricina
- AGAP sin penicilina
- mA con 25.000 UI/l de penicilina
- mA con 50.000 UI/l de penicilina
- mA con 75.000 UI/l de penicilina
- mA con 100.000 UI/l de penicilina
- AGAP con 25.000 UI/l de penicilina
- AGAP con 50.000 UI/l de penicilina
- AGAP con 75.000 UI/l de penicilina

Para estudiar el posible efecto inhibitor del rojo fenol se prepararon los medios:

- mA con 0,025 g/l de rojo fenol
- AAA modificado sin rojo fenol y con 0,005 g/l de ampicilina:

Agar nutritivo:	31	g/l
Peptona	5	g/l
Extracto de carne	3	g/l
Cloruro sódico	5	g/l
Almidón	10	g/l
Ampicilina	0,005	g/l

- AAA modificado con rojo fenol y 0,005 g/l de ampicilina:

AAA modificado sin rojo fenol y con 0,005 g/l de ampicilina

Suplementado con 0,025 g/l de rojo fenol

Para observar la influencia de la interacción de la ampicilina con el pH, la xilosa, lisina libre, arginina libre y el extracto de levadura se prepararon los siguientes medios:

- mA pH 7
- AAA (0,005 g/l de ampicilina) pH 8
- AAA (0,005 g/l de ampicilina) con 3,75 g/l de xilosa
- AAA (0,005 g/l de ampicilina) con 3,5 g/l de L-lisina
- AAA (0,005 g/l de ampicilina) con 2 g/l de L-arginina
- AAA (0,005 g/l de ampicilina) con 3,5 g/l de L-arginina y 2 g/l de L-lisina
- AAA (0,005 g/l de ampicilina) con 3 g/l de extracto de levadura

Todos los medios se esterilizaron por calentamiento hasta ebullición y los suplementos de antibióticos y xilosa se esterilizaron por filtración.

Técnica: Los recuentos de *A. sobria* CECT 837 en los medios modificados se realizaron, a partir de un cultivo en TSA+YE, incubado a 28°C durante 18 h.

Los recuentos obtenidos en TSA+YE se utilizaron como referencia para expresar, en forma de porcentaje, la recuperación de *A. sobria* CECT 837 en los medios en estudio.

III.4.10.1. - Antibiograma

Se empleó el medio Mueller-Hinton compuesto por:

Infusión de carne	300	g/l
Acidos de casamino	17,5	g/l
Almidón	1,5	g/l
Agar	17	g/l

y discos impregnados en los siguientes antibióticos:

Acido nalidíxico (30 µg)	Lincomicina (2 µg)	Kanamicina (30 µg)
Tetraciclina (30 µg)	Ampicilina (10 µg)	Cefalotina (30 µg)
Estreptomina (10µg)	Penicilina G (10 UI)	Trimetoprim-Sulfametoxazol (25 µg)
Oxacilina (1 µg)	Cloranfenicol (30 µg)	Eritromicina (15 µg)
Neomicina (30 µg)	Sulfisoxazol (300 µg)	Bacitracina (10 UI)
Cefoxitina (30 µg)	Gentamicina (10 µg)	Novobiocina (30µg)
Polimixina B (300 UI)	Nitrofurantoina (300 µg)	

Se prepararon cultivos en TSB+YE, que se diluyeron en suero fisiológico hasta obtener una concentración aproximada de 10^7 ufc/ml. Se añadieron 5 ml de este inóculo a la superficie del medio distribuido en placas, eliminando, después de 5 minutos de reposo, el líquido sobrante.

Los discos impregnados de antibióticos se colocaron sobre la superficie del medio inoculado y, tras 15 minutos de reposo, las placas se incubaron a 28°C durante 18 horas.

La sensibilidad o resistencia de los microorganismos se determinó en función del diámetro del halo de inhibición alrededor de los discos (Tablas proporcionadas por la firma suministradora).

III.4.11. - Técnicas de enriquecimiento, aislamiento e identificación de *Aeromonas* spp. móviles en aguas y alimentos

Se utilizaron las siguientes muestras: 2 de agua potable clorada, 3 de agua potable no clorada y 7 de agua no potable; 5 muestras de carne de cerdo, 5 de cordero, 5 de vaca y 5 de pollo; 5 muestras de trucha, 5 de pescadilla, 5 de jurel, 5 de sardina y 5 de gallo; 5 muestras de chirla, 5 de gamba, 5 de cigala y 5 de mejillón; 5 muestras de leche cruda, 5 de queso fresco y 5 de ensaladas preparadas.

La presencia de *Aeromonas* se investigó, en cada muestra, el día de su adquisición y cuando aparecieron los primeros signos de alteración en esa misma muestra mantenida a 10°C.

III.4.11.1. - Enriquecimiento y aislamiento

Medio de enriquecimiento: Agua de peptona alcalina:

Peptona	10	g/l
Cloruro sódico	10	g/l
pH 8,6		
El pH se ajustó con NaOH 1N		

Medio de aislamiento: medio de *Aeromonas* (mA)

Las muestras sólidas se trituraron en condiciones asépticas. Se tomaron 25 g de los alimentos sólidos y 25 ml de las muestras líquidas que se homogeneizaron, en ambos casos, con 225 ml de agua de peptona alcalina. El homogeneizado se mantuvo a 28°C

durante 24h.

Las diluciones decimales del homogeneizado enriquecido se sembraron en la superficie del medio de *Aeromonas* (mA), previamente distribuido en placas. Después de la incubación (30°C-24h), las colonias con las características de *Aeromonas* se sembraron en tubos inclinados de TSA+YE y se mantuvieron a 4°C, para su posterior identificación bioquímica. Las cepas se revitalizaron antes de realizar las pruebas bioquímicas.

III.4.11.2. - Identificación bioquímica de género y especie

En todas las cepas consideradas como *Aeromonas* spp. móviles se comprobó su capacidad para producir citocromo oxidasa y fermentar la glucosa en el agar de Kligler. En las cepas oxidasa (+) y Kligler (+) se comprobó que cumplían las siguientes características: gram (-), ONPG (+), DNasa (+), catalasa (+), crecimiento a 37°C (+), crecimiento sin ClNa (+), resistencia al agente vibriostático O/129 (+), hidrólisis del almidón (+), fermentación del D-manitol (+) e I-inositol (-), ornitina descarboxilasa (-), arginina dihidrolasa (+), producción de H₂S del tiosulfato (-) y ureasa (-).

De acuerdo con Popoff (1984), el criterio seguido para diferenciar las especies fue:

Pruebas bioquímicas	<i>A. hydrophila</i>	<i>A. caviae</i>	<i>A. sobria</i>
Producción de gas de la glucosa	+	-	+
Hidrólisis de la esculina	+	+	-
Fermentación de la salicina	+	+	-
Voges Proskauer	+	-	±
Crecimiento con CNK	+	+	-

III.4.11.2.1. - Pruebas

III.4.11.2.1.1. - Oxidasa

Se emplearon bastones impregnados en una solución de oxalato N,N-dimetil-*p*-fenilenediamina, ácido ascórbico y α-naftol.

El bastón se pone en contacto con una colonia obtenida en agar triptona soja con extracto de levadura (0,6%) de 18-24h; la aparición de un color azul púrpura en el extremo

del bastón indica que la reacción es positiva.

III.4.11.2.1.2. - Fermentación de glucosa (Agar con hierro de Kligler)

Agar con hierro de Kligler:

"Lab-Lemco" en polvo	3	g/l
Extracto de levadura	3	g/l
Peptona	20	g/l
Cloruro sódico	5	g/l
Lactosa	10	g/l
Glucosa	1	g/l
Citrato férrico	0,3	g/l
Tiosulfato de sodio	0,3	g/l
Rojo fenol	0,05	g/l
Agar	12	g/l

Los tubos esterilizados se dejaron solidificar en posición inclinada, formando una pendiente en la parte superior del agar. A partir de un cultivo revitalizado se realizó la siembra en superficie y por picadura hasta la base del tubo. Se incubaron a 28°C durante 48h.

Una pendiente roja y un fondo amarillo, con o sin gas, indican la fermentación de la glucosa pero no de la lactosa del medio. Cuando tanto la pendiente como el fondo presentan una reacción ácida (amarillos), con o sin gas, se ha producido la fermentación de la lactosa. Cuando no se aprecian cambios de color, los microorganismos no fermentan ninguno de los dos azúcares.

III.4.11.2.1.3. - Gram

Se efectuó con cristal violeta como colorante principal y safranina como colorante de contraste.

Tras realizar la tinción, las bacterias gram-negativas se observaban de color rojo-rosa, mientras que la afinidad tintorial de la pared de las gram-positivas daba lugar a color púrpura.

III.4.11.2.1.4. - ONPG

La actividad β -galactosidasa de las cepas se determinó empleando discos impregnados en el compuesto O-nitrofenol- β -D-galactopiranosido (ONPG). Para ello, se suspendió una

colonia en un tubo de ensayo con 0,2 ml de una solución estéril de ClNa al 0,85%, añadiendo, a continuación, un disco de ONPG. Los tubos se incuban a 37°C. La lectura se realiza a los 20 minutos y a las 4 horas. La aparición de un color amarillo en el disco y en el medio indica la hidrólisis del O-nitrofenol- β -D-galactopiranosido.

III.4.11.2.1.5. - DNasa

Agar para la prueba de DNasa

Triptosa	20	g/l
Acido desoxirribonucleico	2	g/l
Cloruro sódico	5	g/l
Agar	15	g/l

Para determinar la actividad desoxirribonucleasa, se realizó una siembra en estrías sobre el agar DNasa. Estas placas se incubaron a 28°C durante 24h. A continuación, las placas se inundaron con una solución de ácido clorhídrico 0,1N. Los microorganismos que degradan el ADN del medio dan lugar a la aparición de halos transparentes alrededor de las estrías.

III.4.11.2.1.6. - Catalasa

Se realizó la siembra en TSA+YE. Las placas se incubaron a 28°C durante 24h. Se vertió sobre la superficie del cultivo 1 ml de peróxido de hidrógeno de 10 vol. La prueba se consideró positiva cuando aparecía una marcada efervescencia sobre las colonias.

III.4.11.2.1.7. - Crecimiento a 37°C

Se sembraron sobre TSA+YE. Después de incubar las placas a 37°C durante 7 días se observó la presencia o ausencia de crecimiento.

III.4.11.2.1.8. - Crecimiento sin ClNa

Los microorganismos se sembraron sobre caldo nutritivo:

Extracto de carne	3	g/l
Peptona	5	g/l

Después de incubar las tubos a 37°C durante 7 días se observó la transparencia o

turbidez del medio.

III.4.11.2.1.9. - Resistencia al agente vibriostático 0/129

Se emplearon discos impregnados con 150 µg del agente vibriostático 0/129 (fosfato 2-4-diamino- 6-7-diisopropilpteridina). La siembra se realizó en estrías sobre placas de TSA+YE, depositándose un disco sobre cada estría. Las placas se incubaron a 28°C durante 48h. Las cepas se consideraron resistentes cuando el crecimiento en la estría fue uniforme, sin observarse halos de inhibición alrededor del disco.

III.4.11.2.1.10. - Hidrólisis del almidón

Para estimar la hidrólisis del almidón se empleó una modificación del agar almidón ampicilina, descrito por Palumbo (1985), como medio específico para el aislamiento de *Aeromonas*, a partir de alimentos. Este medio se modificó, excluyendo de su composición la ampicilina, quedando constituido por:

Agar con rojo de fenol	31 g/l
Almidón	10 g/l

El medio se sembró e incubó a 28°C durante 24 h; posteriormente, se añadieron 5 ml de la solución de Lugol a cada placa. Las cepas que hidrolizaron el almidón dieron lugar a halos amarillos alrededor de las colonias. Cuando las cepas eran amilasa negativas, la superficie del agar, incluidos los límites de las colonias, tomó color violeta oscuro.

III.4.11.2.1.11. - Fermentación de azúcares (D-manitol, *i*-inositol y salicina)

Se preparó un medio base constituido por:

Agar infusión de ternera	25 g/l
Infusión de carne magra de ternera	500 g/l
Proteosa peptona nº3	10 g/l
Cloruro sódico	5 g/l
Púrpura de bromocresol	0,02 g/l

Este medio se suplementó con 10 g/l de inositol, manitol o salicina.

Los tubos se sembraron e incubaron a 28°C durante 48h. La fermentación se evidenció por el cambio de color del indicador de pH desde púrpura a amarillo.

III.4.11.2.1.12. - Descarboxilación de la ornitina y (o dihidrólisis) de la arginina

Medio base de Moeller para descarboxilasa:

Extracto de vacuno	5	g/l
Peptona	5	g/l
Glucosa	0,5	g/l
Púrpura de bromocresol	0,01	g/l
Rojo cresol	0,005	g/l
Piridoxal	0,005	g/l

Este medio se suplementó con 10 g/l de ornitina o arginina, ajustando a continuación el pH a 6. Los caldos inoculados se incubaron a 28°C, un máximo de 4 días. En este tiempo se examinó la aparición de color púrpura.

III.4.11.2.1.13. - Producción de H₂S del tiosulfato sódico

La producción de ácido sulfídrico a partir del tiosulfato se puso de manifiesto por el ennegrecimiento del agar hierro de Kligler (descrito en el apartado III.4.11.2.1.2) y del agar lisina hierro (descrito en el apartado III.4.14.3.3).

III.4.11.2.1.14. - Producción de ureasa

La producción de ureasa se detectó empleando la base de agar de urea suplementada, después de su esterilización y enfriamiento hasta 50°C, con una solución de urea estéril, obteniendo el siguiente medio:

Peptona	1	g/l
Glucosa	1	g/l
Cloruro sódico	5	g/l
Fosfato potásico monobásico	2	g/l
Urea	20	g/l
Rojo fenol	0,012	g/l
Agar	15	g/l

El medio se repartió en tubos, que solidificaron en posición inclinada, en los que se inocularon los microorganismos. Los tubos se incubaron a 28°C durante 24h. Los microorganismos que no producen ureasa no modifican el color del medio; la detección de

ureasa implica el cambio de color de amarillo a rojo púrpura.

III.4.11.2.1.15. - Producción de gas a partir de glucosa

Se preparó el medio base utilizado para detectar la fermentación de azúcares (III.4.11.2.1.11). Este medio se suplementó con 10 g/l de glucosa y se repartió en tubos, con campana Durham.

Los tubos se sembraron y se incubaron a 28°C durante 48h. La producción de gas se detectó por la aparición de una burbuja de gas en la campana.

III.4.11.2.1.16. - Hidrólisis de la esculina

Se empleó el agar con esculina y bilis.

Extracto de carne	3	g/l
Peptona	5	g/l
Bilis de buey	40	g/l
Esculina	1	g/l
Citrato férrico	0,5	g/l
Agar	15	g/l

Las placas se sembraron y se incubaron a 28°C durante 24h. La aparición de color negro alrededor de las colonias es consecuencia de la hidrólisis de la esculina.

III.4.11.2.1.17. - Voges Proskauer

Se utilizó el medio Rojo de metilo Voges Proskauer (MRVP) distribuido en tubos con 5 ml:

Peptona de carne	7	g/l
Glucosa	5	g/l
Tampón de fosfatos	5	g/l

Los tubos se inoculan y se incuban a 30°C durante 24h. A cada tubo se le añade:

- 0,5 ml de una solución de α -naftol al 6 % en etanol
- 0,5 ml de KOH al 40% en agua destilada

Después de agitar los tubos y exponerlos al aire se observa color rojo (+) en la superficie del medio, como consecuencia de la producción de acetilmetilcarbinol a partir de la glucosa del medio.

III.4.11.2.1.18. - Crecimiento con cianuro potásico

Se empleó el medio base de CNK suplementado con una solución de CNK, esterilizada por filtración, que se añadía después de la esterilización y enfriamiento del medio hasta 50°C:

Proteosa peptona n°3	3	g/l
Fosfato disódico	5,64	g/l
Fosfato monopotásico	0,225	g/l
Cloruro sódico	5	g/l
Cianuro potásico	0,075	g/l

Después de incubar las tubos, previamente sembrados a 28°C durante 7 días, se observó la transparencia o turbidez del medio.

III.4.12. - Técnica para la estimación de la resistencia al cloro

Se emplearon comprimidos esterilizantes que contenían:

Halazona	5 mg
Excipiente c. s. p.	1 comprimido

Se prepararon cultivos en 5 ml de TSB+YE, incubándolos a 28°C durante 24 horas, y diluyéndolos en suero fisiológico hasta la concentración adecuada.

Para cada cepa se prepararon 4 matraces con 1 litro de suero fisiológico estéril, inoculados con 10^3 ufc/ml, aproximadamente. Tres de estos matraces se cloraron con 2,5, 5 y 10 mg de halazona, dando lugar a niveles de 1,2, 2,5 y 5 ppm de cloro activo, respectivamente, el cuarto matraz se utilizó como control no clorado. Tras 30 minutos en agitación, se realizaron recuentos de todos los matraces en TSA+YE.

III.4.13. - Técnica para la estimación de la resistencia en distintas condiciones de cultivo (temperatura, cloruro sódico, pH y nitrito sódico)

Se empleó TSB+YE, como medio base, que se modificaba por la adición de cloruro sódico, nitrito sódico o variación del pH, esterilizándose por filtración (poro = 0,22 μ m). El medio modificado, de acuerdo con la variable en estudio, se dispensó en microplacas estériles (250 μ l por pocillo), obteniéndose cuatro pocillos con las mismas condiciones de cultivo; dos de ellos se sembraron con 10 μ l del inóculo y los otros dos se utilizaron como controles no inoculados.

Las microplacas se incubaron dentro de cajas herméticas con agua en el fondo para mantener una humedad elevada. A lo largo de la incubación y a intervalos adecuados se midió la absorbancia a 620 nm de cada pocillo en un lector de microplacas. De acuerdo con Ferreira y Lund (1987), el crecimiento se consideró positivo cuando la media aritmética de la absorbancia de los pocillos inoculados era al menos 0,025 unidades superior a la de los dos pocillos no inoculados.

Se obtuvo una curva de crecimiento para cada cepa, en cada una de las condiciones de cultivo estudiadas y, a partir de ella, se calcularon los siguientes parámetros:

D: Tiempo (horas) que tarda en detectarse el crecimiento

P: Tiempo (horas) necesario para alcanzar una tasa bacteriana de 10^9 ufc/ml

g: Tiempo de generación o duplicación de la población bacteriana

M: Máxima absorbancia detectada durante la incubación (620 nm).

La relación entre el número de bacterias viables por ml y la densidad óptica se determinó en un cultivo de *A. sobria* 13 en TSB+YE incubado a 28°C, realizando los recuentos sobre TSA+YE y midiendo la absorbancia a 620 nm en el lector de microplacas cada dos horas (Figura III.5).

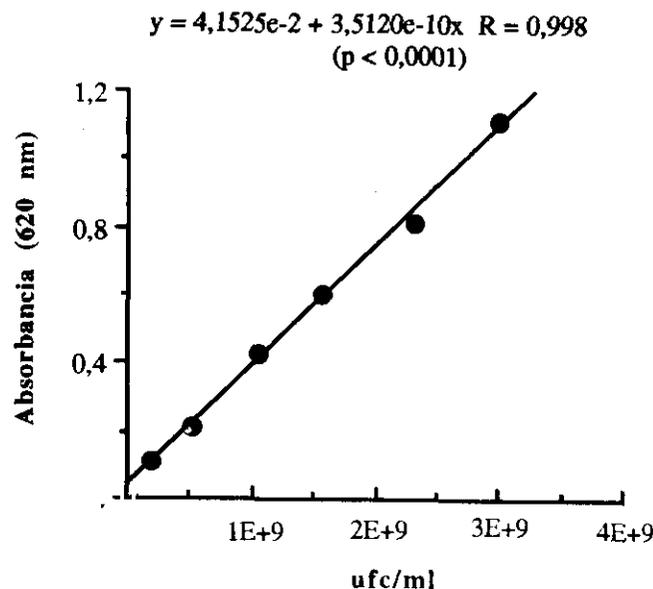


Figura III.5 - Relación entre la absorbancia (620 nm) y el número de ufc/ml de un cultivo de *A. sobria* 13

Temperatura: El efecto de la temperatura se determinó a pH 7, 0,5% de ClNa y en ausencia de nitritos; para ello las placas se incubaron a 4, 10, 28, 37 y 45°C.

Cloruro sódico: Se registró el crecimiento de las cepas a 0,5, 2,5, 4,5 y 6,5% de ClNa, manteniendo en todos los casos una temperatura de 28°C, pH 7 y ausencia de nitritos.

pH: Los parámetros constantes durante la incubación fueron la temperatura (28°C), el cloruro sódico (0,5%) y la ausencia de nitritos, comprobando en estas condiciones el efecto del pH (3,5; 4,5; 6; 7; 8,5) sobre el crecimiento.

Nitrito sódico: Para estudiar la influencia del nitrito sódico se mantuvo constante la temperatura (28°C), el cloruro sódico (0,5%) y el pH (7) y se adicionaron al medio 0, 63, 125, 250, 500 y 1000 µg/ml de nitrito sódico.

Posteriormente, se realizaron todas las combinaciones posibles entre la temperatura (4, 10, 28 y 37°C), la concentración de cloruro sódico (0,5 y 2,5%), el pH (6, 7 y 8,5) y la concentración de nitritos (0, 63, 125, 250, 500 y 1000 µg/ml). Únicamente se emplearon los valores en los que, previamente, al estudiar el efecto individual de cada parámetro sobre el desarrollo de las cepas de *Aeromonas* se había detectado crecimiento.

III.4.14. - Técnicas para la determinación de características relacionadas con la virulencia de *Aeromonas* spp. móviles

III.4.14.1. - Factores extracelulares

III.4.14.1.1. - Obtención de sobrenadantes

III.4.14.1.1.1. - A distintas temperaturas y tiempos

Las cepas de *Aeromonas* spp. se sembraron en 10 ml de TSB+YE distribuidos en matraces de 100 ml. La incubación se realizó en agitación (150 rpm) a diferentes tiempos y temperaturas:

- Para el estudio de la actividad hemolítica: 7°C-336 horas; 20°C-50 horas; 28°C-24 horas; 37°C-18 horas
- Para detectar las actividades proteolítica y lipolítica: 28°C-48 horas

- Para detectar la actividad citotóxica: 28°C-24 horas

El sobrenadante se obtuvo (Figura III.6) por centrifugación (10.000 rpm, 30^m, 4°C). Se emplearon filtros con un tamaño de poro de 0,22 µm, recogiendo el filtrado en viales estériles. El sobrenadante se almacenó a 4°C y se utilizó en las 24 h siguientes a su obtención.

III.4.14.1.1.2. - Tratados por calor

Volúmenes de 1 ml de los sobrenadantes, obtenidos a partir de los cultivos incubados a 28°C-24h, se mantuvieron en un baño termostático, a 56°C durante 10 minutos.

III.4.14.1.1.3. - Concentrados y fraccionados por diafiltración

Cada cepa se sembró en 22 matraces (de 500 ml) que contenían volúmenes de 100 ml de TSB-YE. La incubación se realizó con agitación (150 rpm) a 28°C durante 24 horas. Los cultivos se centrifugaron (10.000 rpm, 30^m, 4°C) y se filtraron (poro = 0,45 µm), obteniéndose 2 litros de sobrenadante filtrado.

La diafiltración, tal y como indica la Figura III.7, se basa en realizar dos ultrafiltraciones: en primer lugar, se realizó la ultrafiltración del sobrenadante (2 litros), obteniéndose 1,9 litros de filtrado y 100 ml de retenido, que queda en la parte superior del sistema. La segunda ultrafiltración se realizó adicionando 2 litros de agua destilada, que al atravesar el cartucho purifican el retenido y dan lugar a 2 litros de filtrado, del que se aprovechan los primeros 100 ml. Finalmente, se recogen los 100 ml de retenido.

Con cada sobrenadante se realizaron tres diafiltraciones sucesivas, a través de tres cartuchos o paquetes de membranas poliméricas de poliéster sulfona, para realizar cortes moleculares a 50, 30 y 8 kDa (Figura III.8.). Con ello se obtuvieron cuatro fracciones, tres de ellas concentradas unas 20 veces: fracción de PM > 50 kDa, fracción de PM < 50 y > 30 kDa y fracción de PM < 30 y > 8 kDa y una cuarta sin concentrar: fracción de PM < 8 kDa. Esta última fracción se concentró, aproximadamente 20 veces, por evaporación-centrifugación al vacío a temperatura inferior a 30°C.

Las fracciones se esterilizaron por filtración (poro = 0,22 µm), dispensándose en alícuotas de 1 ml en viales estériles que se conservaron a -20°C hasta su utilización.

Figura III.6 - Preparación del sobrenadante

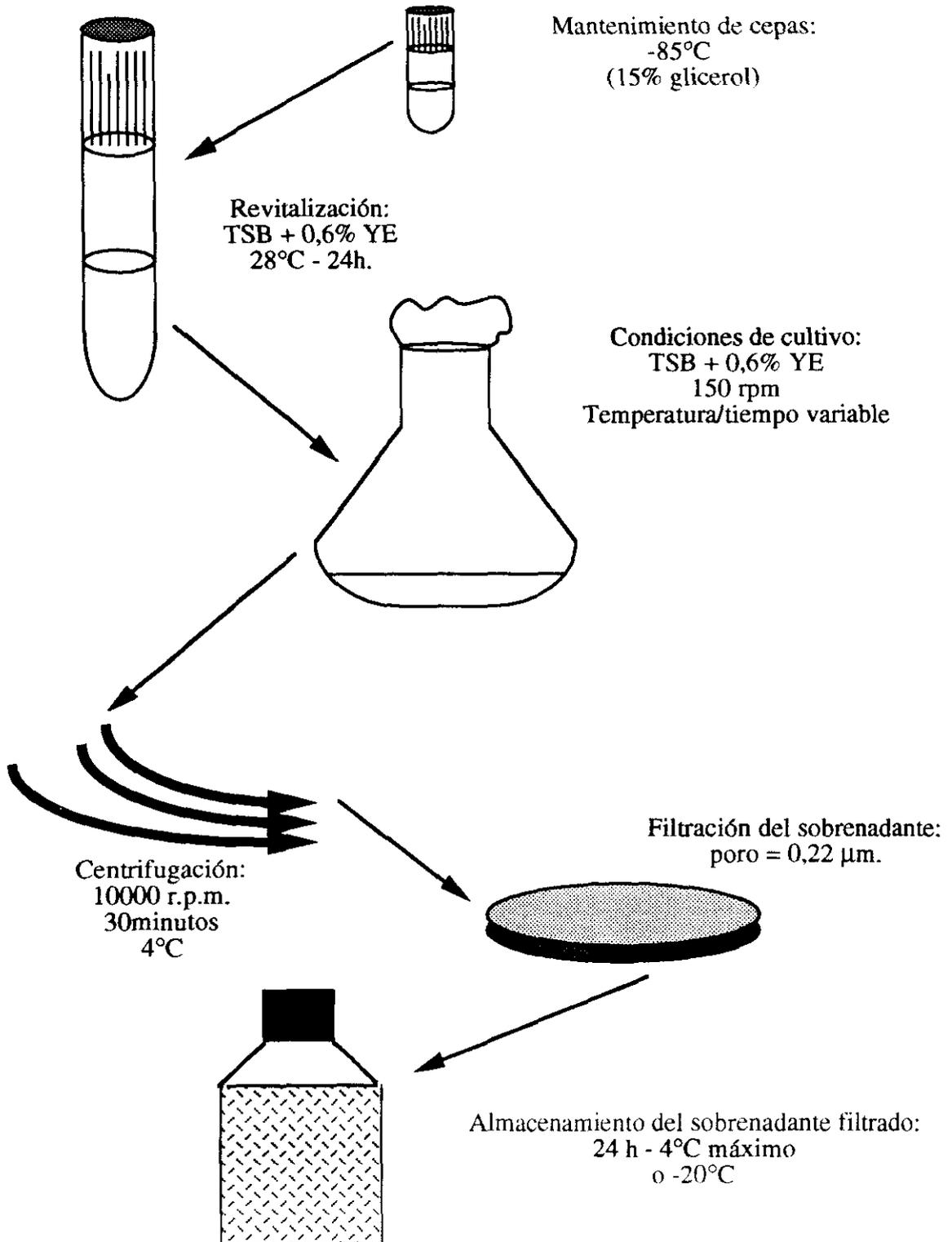


Figura III.7. - Esquema de la diafiltración

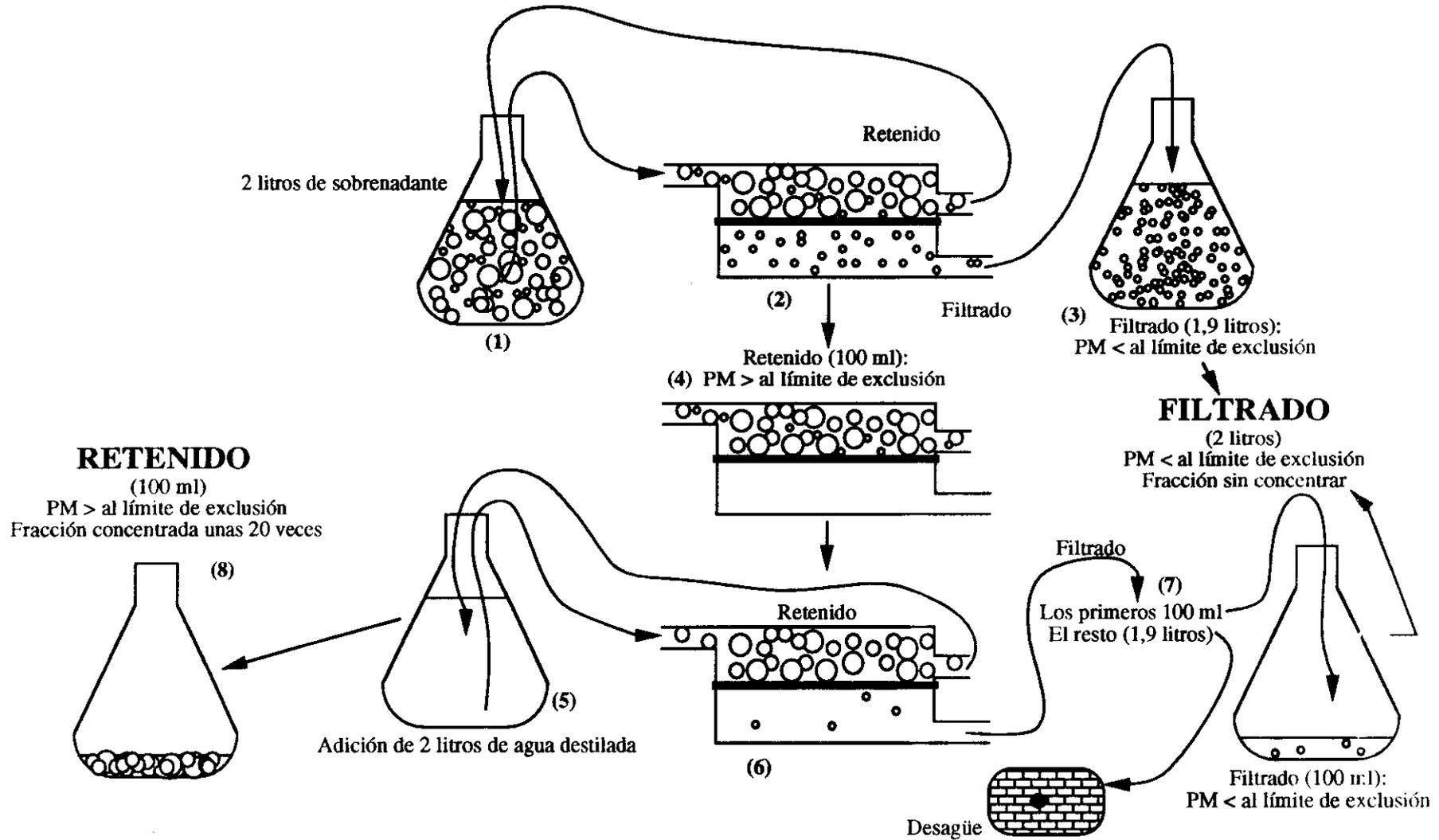
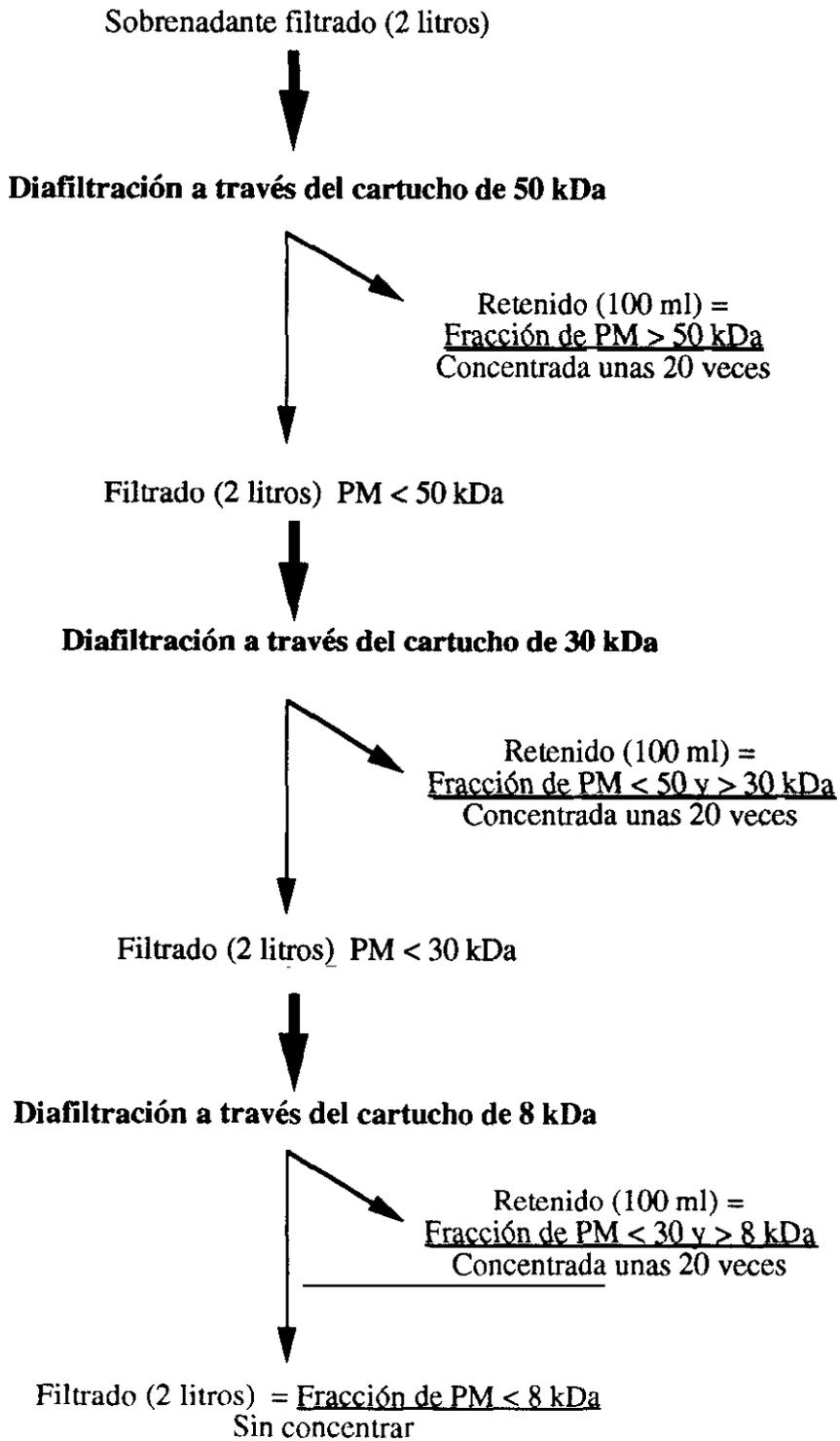


Figura III.8 - Esquema del fraccionamiento del sobrenadante por diafiltración



III.4.14.1.1.4. - Correspondientes a las distintas fases de crecimiento bacteriano

Cada cepa se sembró en 12 matraces de 50 ml que contenían 5 ml de TSB+YE. Los medios inoculados se incubaron a 28°C, en agitación (150 rpm) durante 22 horas. Cada dos horas se retiró un matraz para realizar el recuento en TSA+YE y obtener el sobrenadante tal y como se ha indicado anteriormente (Figura III.6). El sobrenadante se dividió en alícuotas de 1 ml que se mantuvieron a -20°C hasta su utilización.

III.4.14.1.2. - Pruebas hemolíticas

III.4.14.1.2.1. - En agar sangre de caballo o cordero (Burke y col., 1981a)

El medio TSA+YE, después de esterilizado, se dejó enfriar hasta 45°C, para adicionarle un 5% de sangre de caballo o cordero desfibrinada estéril. El medio se repartió en placas que se sembraron e incubaron a 20°C-50h, 28°C-24h y 37°C-18h.

La hemólisis α se detectó por la aparición de halos opacos alrededor de las colonias, mientras que la cepas β -hemolíticas dieron lugar a halos transparentes.

III.4.14.1.2.2. - En eritrocitos de conejo o cordero en suspensión (Burke y col., 1981a)

Tampón fosfato salino (PBS) pH 7,2:

ClNa	8	g/l
KH ₂ PO ₄	0,2	g/l
Na ₂ HPO ₄ .12H ₂ O	2,9	g/l
ClK	0,2	g/l

Los eritrocitos de cordero o conejo se lavaron tres veces en PBS estéril pH 7,2 antes de preparar la suspensión de eritrocitos al 1% en PBS estéril.

Se utilizaron microplacas de 96 pocillos de fondo cóncavo. En cada pocillo se añadieron 100 μ l de sobrenadante o de las correspondientes diluciones dobles del mismo, en PBS estéril, y el mismo volumen de la suspensión de eritrocitos. Cada microplaca incluía dos pocillos con TSB+YE y otros dos con PBS estéril como controles. Las placas se incubaron 1h a 37°C y, a continuación, el mismo tiempo a 4°C.

El título hemolítico representaba la inversa de la dilución más alta que producía el 100% de hemolisis. Las cepas se consideraron hemolíticas cuando mostraron títulos superiores a 2.

III.4.14.1.2.3. - En eritrocitos de conejo incluidos en agar (Ljungh y col., 1981)

Para detectar el tipo de hemolisis se preparó un gel de agar purificado (10 g/l). Una vez esterilizado se dejó enfriar hasta 45°C, añadiéndole un 5% de eritrocitos de conejo, previamente lavados en PBS estéril.

Sobre portaobjetos de 7,5 cm x 2,5 cm, situados sobre una mesa niveladora, se depositaron 5 ml del agar con eritrocitos a 45°C. Se efectuaron cortes circulares sobre el agar solidificado para obtener tres pocillos, de 5 mm de diámetro, en cada portaobjetos. En cada pocillo se depositaron, por duplicado, 50 µl de las diferentes fracciones del sobrenadante. Dos pocillos contenían TSB+YE y otros dos PBS estéril que representaban los correspondientes controles.

Los portaobjetos se mantuvieron en una cubeta, herméticamente cerrada, en cuyo fondo se había depositado una pequeña cantidad de una solución de azida de sodio al 1%. La cubeta se mantuvo a 37°C 1 día, y a 4°C 1 hora. Después de esta incubación se observó la presencia de halos de hemolisis (α o β).

III.4.14.1.3. - Pruebas proteolíticas

III.4.14.1.3.1. - Caseína (García de Fernando y Fox, 1991)

A 1 ml de sobrenadante se añadió 1 ml de azocaseína al 0,8% en tampón Tris-ClH (2M, pH 7) y se incubó a 37°C durante 2 horas, en un baño termostático.

A continuación, se adicionaron 2 ml de ácido tricloroacético (TCA) al 6% y se filtró todo el volumen a través de papel Whatman nº 42. La absorbancia del filtrado se midió a 440 nm.

Para cada cepa se realizó un control negativo mezclando, 1 ml de sobrenadante y 1 ml de azocaseína al 0,8% en tampón Tris-ClH (2M, pH 7) y añadiendo, inmediatamente, 2 ml de TCA (6%). Los tubos se incubaron a 37°C durante 2 horas y su contenido se pasó a través de papel Wathman nº 42. El filtrado obtenido se empleó para ajustar a 0 la absorbancia a 440 nm, leyendo, a continuación, la absorbancia desarrollada por las proteasas presentes en el sobrenadante de la cepa correspondiente.

Se consideró como unidad proteolítica, la actividad enzimática de 1 ml de sobrenadante que produce un incremento de 0,1 unidades de la absorbancia a 440 nm (Mateos y col., 1993).

$$\text{Unidades proteolíticas} = \frac{\text{Absorbancia a 440 nm}}{0,1}$$

III.4.14.1.3.2. - Elastina (Bjorn y col., 1979)

A 1 ml de sobrenadante se adicionaron 2 ml de tampón Tris-maleato (0,1M, pH 7), suplementado con Cl_2Ca (0,001M) y con 10 mg de Rojo Congo-elastina. Se incubó en un baño termostático a 37°C durante 2 horas en agitación (200 rpm).

La reacción cesa por la adición de 2 ml de tampón fosfato sódico (0,7M, pH 6). El Rojo Congo-elastina no hidrolizado permanece insoluble, siendo eliminado por filtración (Wathman nº42). La absorbancia del filtrado se mide a 495 nm.

Para cada cepa se preparó un blanco con 1 ml de sobrenadante, 2 ml de tampón Tris-maleato (0,1M, pH 7) suplementado con Cl_2Ca (0,001M) y con 10 mg de Rojo Congo-elastina y 2 ml de tampón fosfato sódico (0,7M, pH 6), que se incubó a 37°C en agitación (200 rpm) durante 2 horas. Después de filtrar a través de papel Wathman nº 42, se ajusta a 0 la absorbancia a 440 nm midiendo, a continuación, la actividad elastinolítica del sobrenadante correspondiente y calculando las unidades proteolíticas de acuerdo con lo descrito en el apartado III.4.14.1.3.1.

III.4.14.1.4. - Pruebas lipolíticas (McKellar, 1986)

Reactivos:

Tampón BES:

BES	10,64	g/l
Taurocolato sódico	3,2	g/l
Cloruro cálcico	0,11	g/l
Solución de timerosal al 5%	1	ml/l
El pH se ajusta a 7		

Solución de β -naftilcaprilato:

Se disuelven 0,27 g de β -naftilcaprilato en 10 ml de dimetilsulfóxido (DMSO).

Solución de "Fast Blue":

Se disuelven 0,041 g de "Fast Blue" en 1 ml de DMSO

Esta solución se prepara inmediatamente antes de su utilización.

A cada tubo y, por duplicado, se añadieron 2 ml de tampón BES, 20 μ l de la solución de β -naftil caprilato y 50 μ l de sobrenadante. Se agitó e incubó a 40°C durante 30 minutos en un baño termostático. A continuación, se añadieron 20 μ l de la solución de "Fast Blue", manteniendo los tubos a 40°C durante 5 minutos más.

Para parar la reacción se añadieron 200 μ l de TCA (0,72 N). La extracción se realizó con 5 ml de acetato de etilo, agitando fuertemente hasta observar color blanquecino en la fase inferior. La separación de fases se llevó a cabo centrifugando a 3000 rpm durante 10 minutos. Finalmente, la absorbancia de la fase superior se midió a 540 nm.

El control negativo, utilizado para ajustar a 0 el espectrofotómetro con la absorbancia seleccionada, se realizó sustituyendo los 50 μ l de sobrenadante por 50 μ l de agua destilada.

La cantidad absoluta de β -naftol liberada, como consecuencia de la actividad lipolítica de los sobrenadantes, se extrapoló de un recta patrón, previamente elaborada, que relacionaba absorbancia a 540 nm y μ g de β -naftol presentes (Figura III.9).

Para hacer la recta patrón se partió de una solución de β -naftol 3,7 mM. Los 50 μ l de los sobrenadantes se sustituyeron por 50 μ l de esta solución y sus diluciones, que representaban la adición de 26,5 μ g, 13,5 μ g, 5,3 μ g, 2,65 μ g y 0,53 μ g de β -naftol en cantidades absolutas. El proceso fue idéntico al realizado con los sobrenadantes.

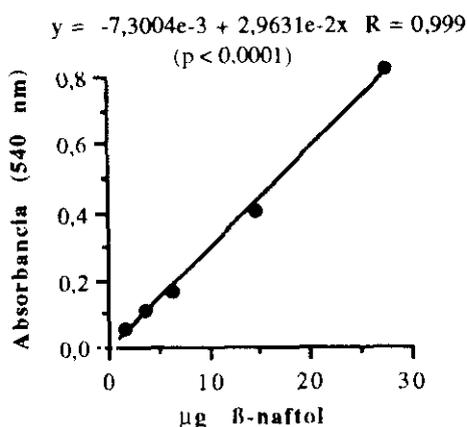


Figura III.9 - Relación entre los μ g de β -naftol liberados, como consecuencia de la actividad lipolítica, y la absorbancia a 540 nm.

III.4.14.1.5. - Pruebas de toxicidad sobre cultivos celulares

Todas las incubaciones de los cultivos celulares se realizaron a 37°C con 5% de CO₂ y humedad relativa alta. Después de utilizar los sobrenadante en los ensayos citotóxicos se comprobó su esterilidad incubándolos 1 semana a 28°C.

III.4.14.1.5.1. - Células Vero (Jenssen, 1984)

Reactivos:

Solución salina de Hank sin Ca⁺⁺ ni Mg⁺⁺ con HEPES (HBSS⁻ / HEPES):

- Solución salina de Hank sin Ca ⁺⁺ ni Mg ⁺⁺ (HBSS ⁻)	100 ml
- Solución de Penicilina-Estreptomicina (10000 UI y 10 mg/ml, resp.)	2 ml
- Tampón HEPES 1M	2 ml

Solución salina de Hank (HBSS⁺):

CaCl ₂ .2H ₂ O	185 mg/l	NaCl	8000 mg/l
KCl	400 mg/l	NaHCO ₃	350 mg/l
KH ₂ PO ₄	60 mg/l	Na ₂ HPO ₄	48 mg/l
MgCl ₂ .6H ₂ O	100 mg/l	D-Glucosa	1 mg/l
MgSO ₄ .7H ₂ O	100 mg/l	Rojo fenol	0,01 mg/l

Solución salina de Hank sin Ca⁺⁺ ni Mg⁺⁺ (HBSS⁻):

KCl	400 mg/l	NaHCO ₃	350 mg/l
KH ₂ PO ₄	60 mg/l	D-Glucosa	1 mg/l
Na ₂ HPO ₄	48 mg/l	Rojo fenol	0,01 mg/l
NaCl	8000 mg/l		

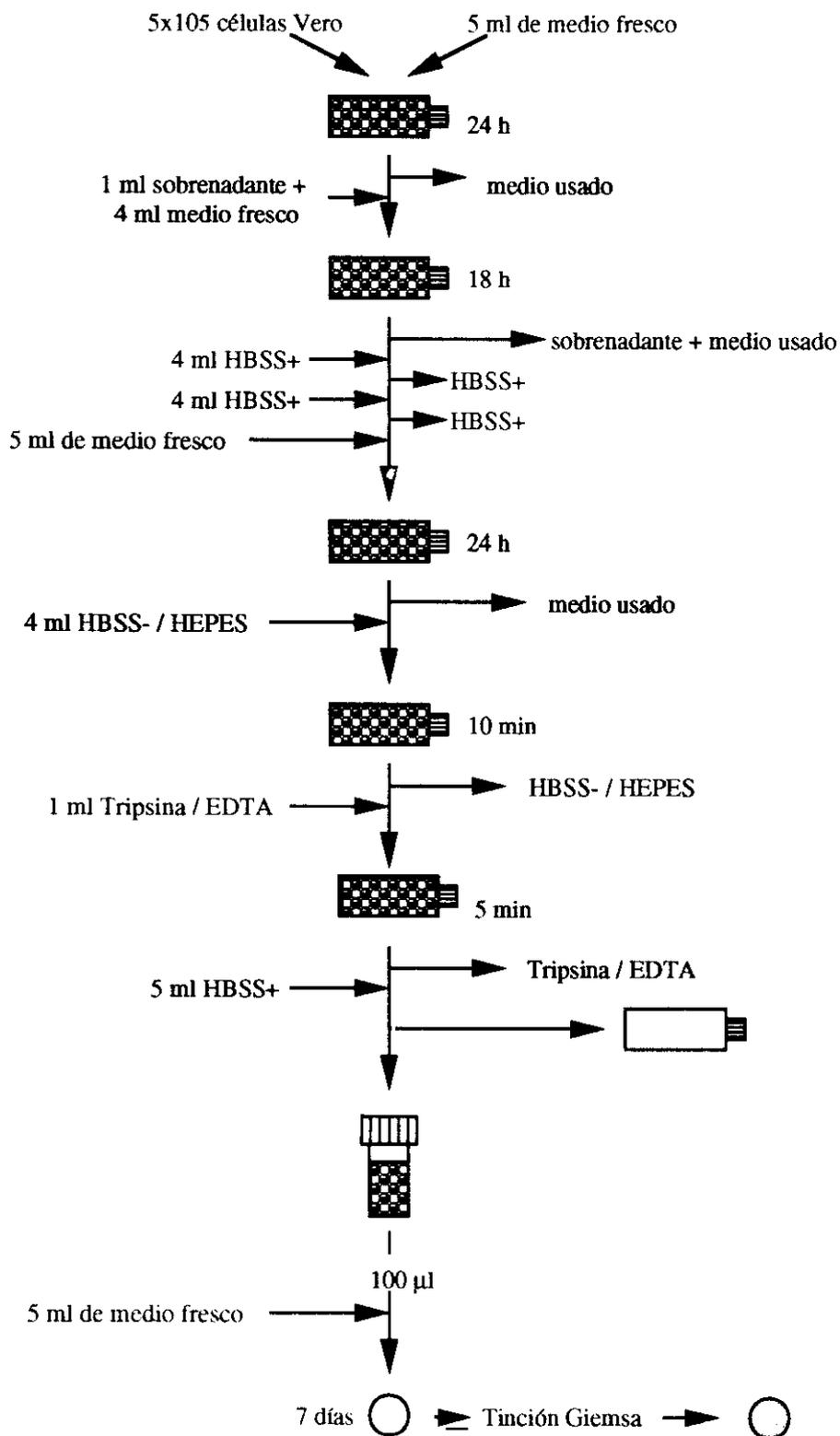
Tripsina-EDTA en solución salina:

Tripsina	0,5 g/l
EDTA	0,2 g/l

Siembra de células Vero (Figura III.10)

Se inocularon 5x10⁵ células en frascos de 25 ml con 5 ml de medio completo, incubándolos durante 24 horas, con el fin de que las células se adhirieran a la pared del frasco y comience a formarse la monocapa. Este hecho permite cambiar el medio con facilidad mediante el simple vaciado de los frascos.

Figura III. 10 - Esquema del ensayo citotóxico sobre células Vero
Jenssen (1984)



Tratamiento de las células

El medio utilizado se eliminó de los frascos, sustituyéndolo por medio completo fresco (4 ml / frasco) y 1 ml de cada sobrenadante o de sus diluciones realizadas por duplicado en medio fresco. El control positivo se obtuvo añadiendo 1 ml de una solución de etilmetanosulfonato (1,515 mg / ml). Se eligió esta concentración (equivalente a la presencia de 303 μg de etilmetanosulfonato por ml de medio en contacto con las células) porque, previamente, se había determinado que daba lugar a un 50% de supervivencia al actuar sobre células Vero (Figura III.11). Como control negativo se utilizó un frasco que contenía únicamente 5 ml de medio de cultivo fresco. También se realizó un control con TSB+YE. Los frascos se incubaron durante 18 horas y se observó el efecto de las distintas diluciones del sobrenadante sobre la morfología de las células de la monocapa. El medio con el sobrenadante se eliminó de los frascos lavando las células dos veces con 4 ml de la solución salina de Hank (HBSS⁺). Después se añadía, de nuevo, medio completo fresco (5 ml / frasco) antes de incubar los frascos otras 24 horas.

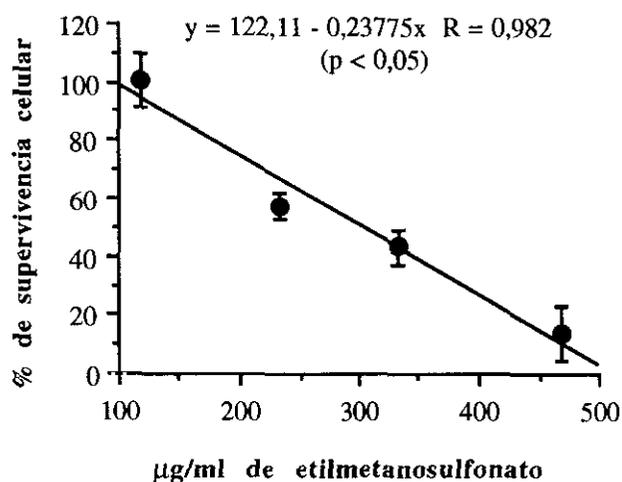


Figura II.11 - Disminución de la supervivencia de las células Vero en función del aumento en la concentración de etilmetanosulfonato

Supervivencia de las células

A partir de los frascos correspondientes a las diluciones del sobrenadante en los que se habían observado células muertas, lesionadas e intactas se efectuaron recuentos de las células viables.

Para ello, se eliminó el medio de los frascos y se añadieron, a continuación, a cada uno, 4 ml de la solución salina de Hank, sin Ca^{++} ni Mg^{++} y con HEPES (HBSS⁻/HEPES), incubándolos durante 10 minutos. Este tampón se retiró de los frascos y se adicionó tripsina-EDTA (1 ml/frasco), incubándose durante 5 minutos. A continuación, se eliminó la tripsina y se añadieron, 5 ml de tampón salino de Hank. Tras despegar las células de los frascos se realizaron recuentos, diluyendo la suspensión celular en la solución salina de Hank (HBSS⁺). Las diluciones seleccionadas se depositaban, por triplicado, en el centro de placas (6 cm de diámetro), dispersando 100 μl de la dilución de células en 5 ml de medio completo. Las placas se incubaron durante 7 días.

Tras eliminar el medio de las placas se realizó la tinción con Giemsa de las células viables que se habían desarrollado hasta formar colonias visibles a simple vista (Figura III.12). Para ello, se cubren las placas con 5 ml de metanol (100%) durante 20 minutos. A continuación, se elimina el metanol y se añaden 5 ml de colorante Giemsa al 10%. Transcurridos 20 minutos se lavan las placas con agua destilada y se cuentan las colonias celulares viables que han tomado color violeta.

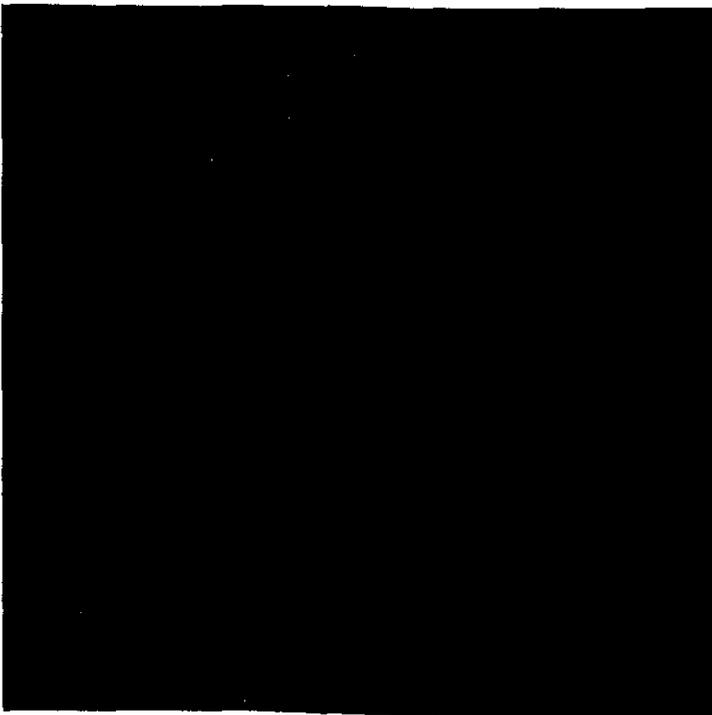


Figura III.12 -
Colonias de células Vero,
viables, teñidas con Giemsa

Para obtener el porcentaje de supervivencia correspondiente a cada dilución del sobrenadante, se compararon el número de células viables detectadas en los frascos, tratados con las diluciones del sobrenadante, y el número de células contadas en el frasco sin tratar o control negativo, que equivalía a un 100% de supervivencia. De este modo, para cada sobrenadante, se elaboró una recta (Figura III.13) que relacionaba la media aritmética de los porcentajes de supervivencia celular, obtenidos en seis ensayos distintos, con la dilución del sobrenadante. A partir de esta recta se determinó la dilución que daba lugar al 50% de supervivencia (o 50% de muerte) celular.

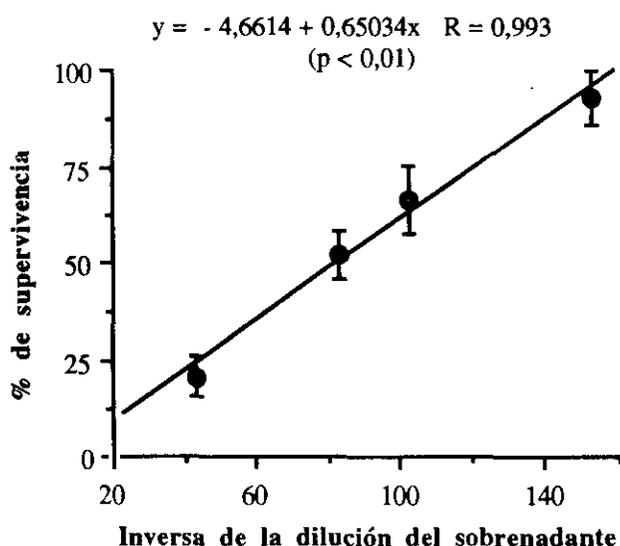


Figura III.13 - Aumento de la supervivencia de las células Vero en función de la dilución progresiva del sobrenadante de la cepa 77

III.4.14.1.5.2. - Células de mieloma (Eley y col., 1993)

Reactivos:

Solución salina de Hank con HEPES (HBSS⁺ / HEPES):

- Solución salina de Hank (HBSS⁺) 100 ml
- Solución de Penicilina-Estreptomicina (10000 UI y 10 mg/ml, resp.) 2 ml
- Tampón HEPES 1M 2 ml

Se emplearon microplacas estériles de 96 pocillos con tapa. En cada pocillo se añadieron, por duplicado, 50 µl del sobrenadante de la cepa problema de *Aeromonas* spp. y sus diluciones dobles en solución salina de Hank con HEPES (HBSS+ / HEPES). A continuación, se adicionaron 200 µl de medio fresco completo que contenía unas 5 000 células de mieloma en suspensión. Las microplacas se incubaron 18 horas.

El control positivo se realizó añadiendo a los pocillos unos 400 µg de etilmetanosulfonato por ml de suspensión celular, ya que, previamente, se había comprobado que esta era la concentración más baja de EMS que provocaba la muerte del 100% de las células. El control negativo contenía únicamente la suspensión celular. También se realizaron controles del TSB+YE y del HBSS+ / HEPES.

Se consideró que existía muerte celular cuando con el microscopio invertido se observaban células pequeñas y arrugadas, considerándose como título citotóxico la dilución más alta en la que todas las células del pocillo tenían estas características.

El ensayo se repitió tres veces y se determinó la media aritmética de los títulos obtenidos.

III.4.14.2. - Propiedades superficiales

III.4.14.2.1. - Hemaglutinación con eritrocitos de cordero y conejo (Burke y col., 1984a)

Los eritrocitos se lavaron tres veces con PBS estéril, centrifugando a 1200 rpm 10^m y 4°C, para preparar una suspensión de eritrocitos de cordero o de conejo al 5% en PBS estéril.

Las cepas se inocularon en 5 ml de TSB+YE y se incubaron a 28°C durante 18 h. Estos cultivos se vertieron sobre placas de TSA+YE, que se dejaron secar a 37°C durante 30-45 minutos y se incubaron a 28°C durante 24 horas. Las colonias desarrolladas se suspendieron en 2 ml de PBS estéril. A continuación, se hizo el recuento de las suspensiones en TSA+YE. Se consiguieron concentraciones aproximadas de 10¹² ufc/ml.

La aglutinación de eritrocitos se observó en una placa de cristal, situada sobre un foco de luz, en la que se depositaban 20 µl de la suspensión bacteriana y el mismo volumen de la de eritrocitos. En todas las placas se incluyó un control negativo, sustituyendo los 20 µl de la suspensión bacteriana por 20 µl de PBS estéril.

Las cepas fuertemente hemaglutinantes dieron lugar a una aglutinación completa e inmediata. En las cepas hemaglutinantes débiles se observó una reacción incompleta o no instantánea y en las cepas no hemaglutinantes no se observaba agregación de eritrocitos en 5

minutos.

III.4.14.2.2. - Inhibición de la hemaglutinación por D-manosa, L-fucosa y D-galactosa

Los azúcares (D-manosa, L-fucosa y D-galactosa) se prepararon al 3% en PBS estéril.

Para cada cepa hemaglutinante y sobre una misma placa de cristal se depositaron:

- 20 µl de la suspensión bacteriana + 20 µl de la solución de D-manosa, L-fucosa o D-galactosa + 20 µl de la suspensión de eritrocitos.

- 20 µl de la suspensión bacteriana + 20 µl de la suspensión de eritrocitos.

Además, se efectuaron controles del PBS y de las soluciones de azúcares (20 µl de la solución de azúcar + 20 µl de la suspensión de eritrocitos).

Se consideró que un azúcar inhibía la hemaglutinación cuando las cepas hemaglutinantes no mostraban esta propiedad o la hemaglutinación fuerte se transformaba en débil. Este ensayo se realizó por duplicado.

III.4.14.2.3. - Autoaglutinación (Janda y col., 1987)

Caldo infusión cerebro corazón (BHIB):

Infusión de cerebro de ternera	200	g/l
Infusión de corazón de vacuno	250	g/l
Proteosa peptona	10	g/l
Glucosa	2	g/l
Cloruro sódico	5	g/l
Fosfato sódico dibásico	2,5	g/l
Acido <i>p</i> -aminobenzóico	0,05	g/l

Las cepas se sembraron en tubos con 6 ml de caldo infusión cerebro corazón (BHIB) y se incubaron a 30°C durante 18 horas.

Las cepas SP+ ("self pelleting") fueron aquellas en las que se detectó precipitación espontánea durante el crecimiento, observándose un botón celular en el fondo del tubo y escasa turbidez en la parte superior. Las cepas SP- crecieron de forma homogénea en todo el tubo.

Para cuantificar la agregación celular durante el crecimiento, se midió la absorbancia a 540 nm de la parte superior del cultivo (A). A continuación, se agita el tubo para volver a medir la absorbancia del cultivo (B). Con estos datos se calculó el porcentaje de precipitación espontánea:

$$\% \text{ SP} = \frac{A_{540} \text{ de B} - A_{540} \text{ de A}}{A_{540} \text{ de B}} \times 100$$

Después, cada cultivo se agitó de nuevo y se dividió en dos fracciones de 3 ml. Una de estas fracciones se mantuvo a 100°C, en un baño de polietilenglicol, durante 1 hora (C), mientras la otra permanecía el mismo tiempo, a temperatura ambiente (D). En las cepas PAB+ ("precipitation after boiling") se observó precipitación celular (grumos) en el fondo del tubo mantenido a 100°C. Los tubos a 100°C de las cepas PAB- y los mantenidos a temperatura ambiente presentaron un aspecto homogéneo.

Para determinar el porcentaje de precipitación de los cultivos a 100°C-1h, se midió la absorbancia a 540 nm, de la fase superior de cada cultivo a 100°C y a temperatura ambiente, aplicando la siguiente fórmula:

$$\% \text{ SP} = \frac{A_{540} \text{ de D} - A_{540} \text{ de C}}{A_{540} \text{ de D}} \times 100$$

El ensayo se realizó dos veces. Se consideraron cepas autoaglutinantes (AA+) aquellas que mostraron un comportamiento SP+ y/o PAB+ (Figura III.14).

III.4.14.2.4. - Aglutinación con acriflavina (Janda y col., 1987)

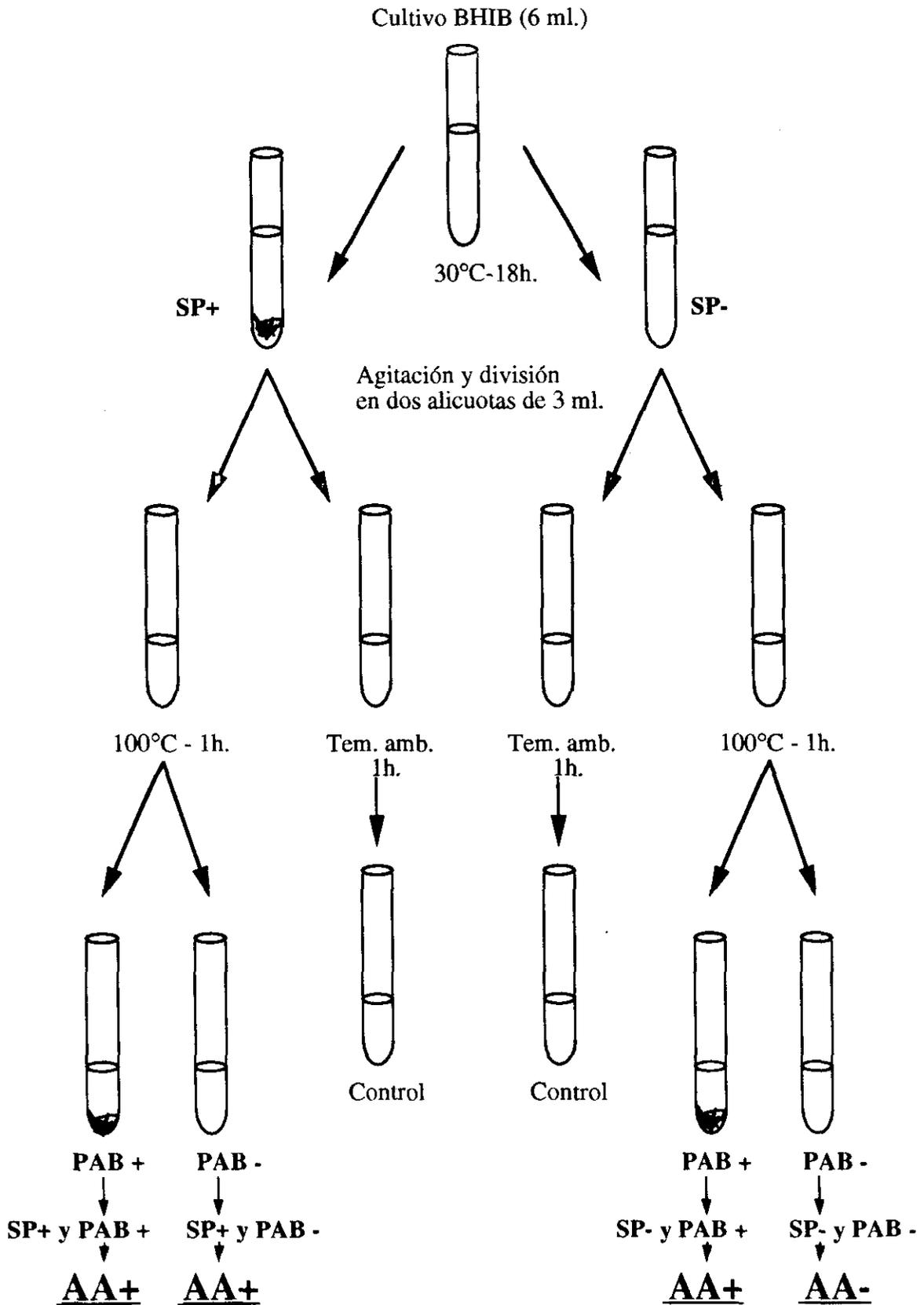
Se prepararon suspensiones bacterianas concentradas, tal y como se describe en el apartado III.4.14.2.1, y una solución de acriflavina al 0,4% en PBS estéril.

Sobre una placa de vidrio situada sobre un foco de luz, se mezcló una gota de la suspensión bacteriana y una gota de la solución de acriflavina. Se consideró que las cepas eran positivas para este carácter cuando aparecían agregados bacterianos en los cinco segundos posteriores a la mezcla. El ensayo se realizó por duplicado.

III.4.14.2.5. - Pruebas para estimar la hidrofobicidad celular

Las cepas se sembraron en TSB+YE y se incubaron a 28°C durante 16-18 horas. Los cultivos se centrifugaron (7000 rpm, 10, 4°C) y el sedimento se resuspendió en PBS (pH 7). La absorbancia a 540 nm de la suspensión bacteriana se ajustó a 1 con este mismo

Figura III.14 - Autoaglutinación (Janda y col., 1987)



tampón. La hidrofobicidad superficial se midió tres veces con cada uno de los métodos que se describen a continuación.

III.4.14.2.5.1. - Unión a filtros de nitrocelulosa (FNC) (Lachica y Zink, 1984)

Se pasaron 3 ml de cada suspensión bacteriana a través de los filtros de nitrocelulosa. A continuación, se midió la absorbancia a 540 nm del control (suspensión bacteriana sin filtrar) y del filtrado, determinándose el porcentaje de unión al filtro:

$$\% \text{ Unión al FNC} = \frac{A_{540} \text{ del control} - A_{540} \text{ del filtrado}}{A_{540} \text{ del control}} \times 100$$

Las cepas se consideraron "fuertemente hidrofóbicas" cuando este porcentaje era superior al 70%, "medianamente hidrofóbicas" si se encontraba entre el 35 y el 70% y "poco hidrofóbicas" si era inferior al 35% (clasificándolas como no hidrofóbicas cuando era cercano al 0%).

III.4.14.2.5.2. - Adsorción a hidrocarburos (*n*-hexadecano, *n*-octano y *p*-xileno) (Rosenberg y col., 1980; Sweet y col., 1987)

La suspensión bacteriana se distribuyó en volúmenes de 3 ml que se añadían a tubos con 1 ml de *n*-hexadecano, *n*-octano o *p*-xileno. Esta operación se realizó por duplicado. Como control se utilizó un tubo con 3 ml de suspensión bacteriana.

Los tubos se incubaron a 30°C durante 10 minutos. Se agitaron fuertemente durante 30 segundos y se incubaron de nuevo a 30°C durante 30 minutos. A continuación, se recogió la fase inferior acuosa, borboteándola con aire 1 minuto. Por último, se determinó la absorbancia a 540 nm de la fase acuosa y del control; estas medidas se emplearon para determinar la hidrofobicidad superficial en función de la adsorción a los hidrocarburos:

$$\% \text{ Adsorción al hidrocarburo} = \frac{A_{540} \text{ del control} - A_{540} \text{ de la fase acuosa}}{A_{540} \text{ del control}} \times 100$$

Se consideraron cepas "fuertemente hidrofóbicas" las que mostraron una adsorción

superior al 70%. Cuando la adsorción se encontraba entre el 35 y el 70% se registraron como "medianamente hidrofóbicas". Una adsorción inferior al 35% indicó que la superficie bacteriana era "poco hidrofóbica" y "no hidrofóbica" cuando los valores eran próximos al 0%.

III.4.14.2.6. - Inclusión de las muestras para la observación de las estructuras bacterianas con el microscopio electrónico de transmisión (Janda y col., 1987)

Reactivos:

Tampón Milloning pH 7,3 0,1M, para fijación y para lavado:

Solución 1 -	NaH ₂ PO ₄ .H ₂ O	22,6	g/l
Solución 2 -	NaOH	25,2	g/l
Solución 3 -	Glucosa	54	g/l
Solución 4 -	Cl ₂ Ca	10	g/l

Solución A - 830 ml de la solución 1 + 170 ml de la solución 2. Se ajusta el pH a 7,3

Tampón Milloning (para fijación):

900 ml de la solución A + 100 ml de la solución 3 + 5 ml de la solución 4

Tampón Milloning pH 7,3 0,1M (para lavado):

Tampón Milloning (para fijación) + 68,4 g/l de sacarosa.

Mezcla de Mullenhaver o Epon-Araldita:

Epon 812	15	ml
Araldita (502, 6005 epoxy resina)	55	ml
Dibutiltalato (plastificador)	2-4	ml
DMP-30 (acelerador)	1,15-3	%

Solución de citrato de plomo:

Pb(NO ₃) ₂	1,33	g
Na ₃ (C ₆ H ₅ O ₇).2H ₂ O	1,76	g
Na ₃ (C ₆ H ₅ O ₇).5 1/2H ₂ O	2,14	g
Agua destilada desmineralizada	30	ml

Antes de utilizarla se le añaden 8 ml de NaOH 1N, se centrifuga y se filtra (poro = 0,22 μm)

Técnica (*):

1) Obtención de las células bacterianas:

Cada cepa se sembró en 5 ml de TSB+YE y se incubó a 28°C durante 24h. A continuación, el cultivo se centrifugó, lavando el sedimento en tampón Milloning (para lavado). Por último, se centrifugó de nuevo.

2) Fijación de las células:

El sedimento se suspendió en 2 ml de glutaraldehído al 3% en tampón Milloning (para fijación) y se mantuvo 1 h a 4°C. Seguidamente, se centrifugó, se lavó con tampón Milloning (para lavado) durante 20 h a 4°C y se volvió a centrifugar. A continuación, el sedimento se resuspendió en 2 ml de osmio al 1% en tampón Milloning (para fijación) y se mantuvo 1 hora a temperatura ambiente. Por último, se centrifugó y se lavó, tres veces, con agua destilada, 10 minutos a temperatura ambiente.

3) Tinción del sedimento:

Después de lavar el sedimento en agua destilada se le añadieron 2 ml de una solución de acetato de uranilo al 2% en agua destilada (filtrada justo antes de su utilización; poro = 0,22 μm) y se mantuvo 1 hora a temperatura ambiente. A continuación, se lavó tres veces en agua destilada, 10 minutos a temperatura ambiente.

* Todas las centrifugaciones de la suspensión bacteriana se realizaron a 2000 rpm, 10^m y 4°C.

4) Deshidratación del sedimento:

Se realizó a temperatura ambiente con la siguiente secuencia:

- 2 ml de etanol de 30° durante 10^m
- 2 ml de etanol de 50° durante 10^m
- 2 ml de etanol de 70° durante 10^m
- 2 ml de etanol de 80° durante 10^m
- 2 ml de etanol de 96° durante 10^m
- 2 ml de etanol de 100° durante 10^m
- 2 ml de etanol de 100° durante 10^m

5) Inclusión en resina:

Al sedimento, una vez deshidratado, se le añadieron de 2 ml de óxido de propileno que se mantuvo 10 minutos a temperatura ambiente, antes de su eliminación. Esta operación se efectuó dos veces. Después se le añadieron 2 ml de la mezcla (1:1) de óxido de propileno y epon-araldita, manteniéndolo 24 h a 4°C. El sedimento, en pequeñas fracciones, se colocó en moldes que se rellenaron, posteriormente, con epon-araldita. Una vez solidificada la resina, a 60°C-24h, se obtuvieron los cortes de 60-90 nm de grosor.

6) Tinción de los cortes:

Las rejillas, portando los cortes, se sumergieron en una solución de acetato de uranilo al 2% (filtrada justo antes de su utilización; poro = 0,22 µm) durante 3 minutos y, posteriormente, en agua destilada durante 1 minuto. Después de secarlas con papel, se volvieron a sumergir en la solución de citrato de plomo, durante 4 minutos, y en agua destilada, durante un minuto. Por último, se secaron y se observaron al microscopio electrónico de transmisión a 80 kilovoltios.

III.4.14.3. - Características bioquímicas

III.4.14.3.1. - Voges Proskauer

Descrito en el apartado III.4.11.2.1.17

III.4.14.3.2. - Fermentación de la arabinosa

Se realizó como se detalla en el apartado III.4.11.2.1.11, añadiendo 10 g/l de arabinosa al medio base descrito.

III.4.14.3.3. - Descarboxilación de la lisina

Se empleó el agar lisina hierro:

Peptona de carne	5	g/l
Extracto de levadura	3	g/l
D(+)-Glucosa	1	g/l
L-Lisina monoclóhidrato	10	g/l
Tiosulfato sódico	0,04	g/l
Citrato de amónico férrico	0,5	g/l
Púrpura de bromocresol	0,02	g/l
Agar	12,5	g/l

El medio esterilizado se repartió en tubos que se dejaron enfriar en posición inclinada; la siembra se realizó sobre la pendiente y en picadura hasta la base de cada tubo. La incubación se realizó a 28°C-18h. Los microorganismos que descarboxilan la lisina producen un viraje del indicador de pH a color violeta.

III.4.15. - Análisis estadístico

Se realizaron las pruebas estadísticas de "t" de Student y de "Ji" cuadrado, utilizando el programa "Stat View", en un ordenador Macintosh.

IV. RESULTADOS Y DISCUSION

IV.1. - Medios de cultivo específicos para el aislamiento de *Aeromonas* spp. móviles

IV.1.1. - Recuperación de *Aeromonas* spp. móviles e inhibición de la flora natural de los alimentos en los medios mA, AGAP y AAA

Una vez descartados, para el aislamiento de *Aeromonas* spp. móviles, los medios de cultivo diseñados para microorganismos entéricos y vibrios marinos, se han ensayado una amplia variedad de medios específicos en todo tipo de muestras, con resultados escasamente concluyentes.

La falta de resultados significativos ha hecho necesaria la comparación de los medios disponibles, con el fin de elegir el más apropiado para el posterior aislamiento de *Aeromonas* spp. a partir de alimentos.

Se ha estudiado el comportamiento de tres medios selectivos propuestos para el aislamiento de *Aeromonas* spp. móviles: medio de *Aeromonas* o mA (Ryan, 1985, datos no publicados. Disponible comercialmente en Oxoid), agar glutamato almidón penicilina o AGAP (Kielwein, 1969) y agar almidón ampicilina o AAA (Palumbo y col., 1985a).

La selectividad de estos medios para *Aeromonas* spp. móviles se estimó estudiando su capacidad de inhibición frente a otros microorganismos presentes de forma natural en los alimentos y su capacidad de recuperación para las especies móviles de *Aeromonas*, previamente inoculadas en estos alimentos. Otra técnica propuesta para la evaluación sistemática de medios de cultivo es la "técnica ecométrica", desarrollada por Mossell y col. (1983), que fue descartada por su carácter cualitativo, falta de uniformidad en las siembras y complejidad de los resultados.

La capacidad de inhibición frente a la flora natural de los alimentos se determinó comparando los recuentos obtenidos, a partir de distintos alimentos (agua clorada, leche cruda, carnes de vaca, pollo y cerdo, pescadilla, trucha, chirlas y gambas) sobre los medios específicos en estudio, con los registrados sobre agar triptona soja (TSA). Como se observa en la Tabla IV.1 (Véase Anexo IVa, página 143), la inhibición fue superior en mA, que sólo permitió el crecimiento del 61,64% de la flora natural, mientras que en AAA y AGAP se detectaron el 75,94% y el 75,54%, respectivamente, del número total de microorganismos obtenidos sobre agar triptona soja. Este efecto fue aún más intenso en el caso particular de la leche cruda, donde se observó que el medio de mA únicamente detectó el 42,37% de la flora total, frente al 90,60% en AAA y AGAP. Posiblemente este hecho se deba a que el mA incorpora en su formulación sales biliares, que afectan muy directamente al desarrollo

de las bacterias lácticas. Los recuentos de microorganismos aerobios totales sobre agar triptona soja mostraron que la carga microbiana de los distintos alimentos oscilaba entre 10^5 y 10^7 ufc/ml o g de alimento, excepto en el agua clorada donde la carga estimada fue de 1 ufc/ml. Las amplias variaciones en las desviaciones estándar posiblemente se deban a la heterogeneidad de las muestras de alimentos.

La capacidad de recuperación para las especies móviles de *Aeromonas*, se determinó inoculando los alimentos citados con *A. hydrophila* 839, *A. hydrophila* 398, *A. caviae* 838 y *A. sobria* 837, procedentes de la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT), y comparando los recuentos obtenidos en los distintos medios específicos con los niveles de inoculación de cada alimento, determinados por espectrofotometría. Los recuentos de los diferentes alimentos contaminados con cada una de estas cepas, osciló en torno a 10^7 ufc/ml o g de alimento. Considerando las cuatro cepas conjuntamente (Tabla IV.2. Véase Anexo IVa, página 144) se observa que el medio mA alcanza un porcentaje de recuperación, para las cepas de *Aeromonas* inoculadas en los alimentos, de 94,11%, superior a AGAP y AAA (80,14% y 80,01%, respectivamente). Contrariamente, Ribas y col., (1991) no encuentran diferencias en el número de *Aeromonas* spp. aisladas, a partir de distintos tipos de aguas, utilizando varios medios: *Aeromonas* medium de Rippey y Cabelli, (1979), agar almidón ampicilina de Palumbo y col. (1985a), agar dextrina ampicilina de Havelaar y col., (1987) y agar almidón glutamato ampicilina penicilina-10C de Huguet y Ribas, (1991). Sin embargo, Fricker y Tompsett, (1989), comparan los resultados obtenidos al aislar estos microorganismos en agar MacConkey, agar sangre ampicilina y medio de *Aeromonas* (Difco), registrando los mejores resultados con este último. Knockel (1989b) destaca el mejor comportamiento del agar almidón ampicilina, frente al agar dextrina fucsina sulfito, agar sangre ampicilina (10mg/l.) y agar sangre ampicilina (30mg/l.). Stern y col. (1987) emplean agar almidón ampicilina, agar MacConkey ampicilina, agar infusión cerebro corazón, agar infusión cerebro corazón sangre ampicilina y agar cefsulodín irgasán novobiocina, consiguiendo un mayor número de aislamientos con el agar almidón ampicilina. Respecto al agar almidón ampicilina y al agar dextrina ampicilina, Varnam y Evans (1991) y Stelma (1989) advierten sobre el posible crecimiento de *Vibrios* spp. amilolíticos, principalmente, en muestras de marisco y pescado. Varnam y Evans (1991) también señalan que el medio de *Aeromonas* (Difco) es uno de los más empleados en la industria alimentaria, aunque tiene la desventaja de permitir el crecimiento de otros microorganismos que dan lugar a colonias de similar morfología a las de *Aeromonas* spp. móviles. Un estudio reciente (Holmes y Sartory, 1993) ha confirmado el buen comportamiento del medio de *Aeromonas* de Ryan (mA) para aislar estos microorganismos

a partir de aguas, al observar que presenta mayor sensibilidad y especificidad que el agar xilosa ampicilina y el medio de *Aeromonas* (Difco). Contrariamente, Bernagozzi y col. (1994) han señalado que el medio de *Aeromonas* es superior a los medios de Ryan y de Rimler-Shotts. Por otro lado, Gobat y Jemmi (1995), comparan el comportamiento de 7 medios selectivos y 2 medios de enriquecimiento para el aislamiento en alimentos, obteniendo los mejores resultados con agua de peptona alcalina, agar sangre ampicilina (30 µg) y agar sales biliares irgasán verde brillante, recomendando el empleo de más de un medio sólido.

El comportamiento superior del mA para la recuperación de *Aeromonas* spp. móviles se debe, probablemente, a la fuerte inhibición que presentan los otros dos medios sobre *A. sobria* CECT 838. Así, mientras los porcentajes de recuperación de *A. hydrophila* CECT 839, *A. hydrophila* CECT 398 y *A. caviae* CECT 838 fueron satisfactorios y bastantes similares para los tres medios, superando en todos los casos el 90% (Tablas IV.3, IV.4 y IV.5. Véase Anexo IVa, páginas 145 a 147), con *A. sobria* CECT 837 (Tabla IV.6. Véase Anexo IVa, página 148) fue mejor la recuperación sobre mA (95,48%), que sobre los otros dos medios (31,61% en AAA y 33,02% en AGAP). Estos resultados, podrían justificar, el escaso número de aislamientos de *A. sobria* detectados por Callister y Agger (1987) y Hudson y De Lacy (1991) en alimentos y Figura y col. (1986) en procesos clínicos. Del mismo modo, Stern y col., (1987), trabajando con muestras de heces previamente inoculadas con *Aeromonas* obtienen una baja recuperación de *A. sobria* y *A. caviae* en los medios que contienen antibióticos.

En definitiva, el medio de *Aeromonas* es el que presenta mayor poder de inhibición frente a la flora natural de los alimentos y más capacidad de recuperación de las especies móviles de *Aeromonas*, siendo por ello el medio más selectivo de los estudiados para el aislamiento de *Aeromonas* spp. móviles a partir de alimentos. El medio de *Aeromonas* se puede considerar el más indicado para la detección de las especies móviles de *Aeromonas* (sobre todo de *A. sobria*), en el caso de muestras de alimentos con una carga microbiana elevada. En productos con una flora moderada y cuando se pretenda aislar *A. hydrophila* y/o *A. caviae* se podría emplear el agar almidón ampicilina o el agar glutamato almidón penicilina con resultados satisfactorios.

IV.1.2. - Comportamiento de *A. sobria* CECT 837 sobre los medios mA, AGAP y AAA.

La inhibición del crecimiento de *A. sobria* CECT 837 detectada sobre AAA y AGAP,

en comparación a su comportamiento sobre el medio mA, hizo necesario considerar la composición de dichos medios con el fin de investigar las posibles causas de este hecho.

El mA contiene ampicilina (5mg./l.), el AAA también, pero en una concentración dos veces superior (10mg./l.) y el AGAP lleva penicilina G sódica (100.000U.I./l.) y pimaricina (10mg./l.). Para comprobar si estos antibióticos eran la causa de la inhibición se realizó un antibiograma (técnica de Mueller-Hinton) frente a las cuatro cepas de *Aeromonas*, empleando veinte antibióticos, entre los que se incluyeron la ampicilina y la penicilina G sódica. En la Tabla IV.7 (Véase Anexo IVa, página 149) se observa que las cuatro cepas fueron sensibles al ácido nalidíxico, tetraciclina, estreptomina, cloranfenicol, sulfisoxazol, gentamicina, nitrofurantoína, kanamicina y trimetoprim-sulfametoxazol. En este sentido, Fainstein y col. (1982) y Fass y Barnishan (1981) señalan una susceptibilidad marcada a la tetraciclina, cloranfenicol y trimetoprim-sulfometoxazol, mientras que Rahim y col. (1984) describen cepas resistentes a estos antibióticos. Por el contrario, las cuatro cepas fueron resistentes frente a la oxacilina, lincomicina, bacitracina y novobiocina. En todos los casos se observó un grado de sensibilidad medio frente a la polimixina B, mientras que el comportamiento de cada cepa fue variable frente a la neomicina, cefoxitina, ampicilina, penicilina, cefalotina y eritromicina. *A. sobria* 837 fue sensible a la ampicilina y a la penicilina, antibióticos utilizados frecuentemente en medios selectivos para el aislamiento de *Aeromonas* spp. móviles, y que podrían limitar la detección de ciertas cepas sobre estos medios. Estos resultados estarían de acuerdo con los de Seidler y col. (1980) y Rahim y col. (1984) que también han encontrado cepas susceptibles a la ampicilina. Contrariamente, Villuendas y col., (1991) señalan que todas las cepas clínicas son resistentes a la ampicilina y Morita y col. (1994) han detectado beta-lactamasas en las 182 cepas analizadas. *A. hydrophila* CECT 839, *A. hydrophila* CECT 398 y *A. caviae* CECT 838 eran resistentes a ambos antibióticos.

Estos resultados explicarían la inhibición detectada en el crecimiento de *A. sobria* CECT 837 sobre AAA y AGAP. La falta de inhibición del crecimiento de *A. sobria* CECT 837, en el medio de Ryan (mA), podría deberse a que la concentración de ampicilina en este medio es inferior a la presente en el agar almidón ampicilina. En la Tabla IV.8 (Véase Anexo IVa, página 150) se observa que el crecimiento de esta cepa se inhibió con 10 mg./l. de ampicilina, tanto en mA como en AAA, sin embargo, cuando la concentración de ampicilina era de 5 mg./l. en ambos medios, sólo se detectó inhibición en el AAA. Esta experiencia también aclaró que la inhibición de *A. sobria* CECT 837, en agar glutamato almidón penicilina, se debía a la presencia de 100.000U.I./l. de penicilina G sódica, mientras que la pimaricina, con un papel fundamentalmente antifúngico, no inhibió el

crecimiento de *A. sobria* CECT 837.

La actividad inhibidora de 5mg./l. de ampicilina sobre el crecimiento de *A. sobria* CECT 837, desaparece en el medio mA. En base a ello, se pensó que podría detectarse un efecto similar empleando distintas concentraciones de penicilina G sódica sobre el citado medio, sin embargo, se comprobó que el crecimiento de *A. sobria* CECT 837 era inhibido, prácticamente con igual intensidad, en los medios mA y AGAP, cuando la concentración de penicilina G oscilaba entre 25.000 y 100.000U.I/l.(Tabla IV.9. Véase Anexo IVa, página 151).

La inhibición del crecimiento de *A. sobria* CECT 837 sobre el medio AAA podría explicarse por una interacción sinérgica de la ampicilina con el rojo fenol, utilizado como indicador del pH en este medio. El efecto inhibidor del rojo fenol, presente en el medio AAA a una concentración de 0,25mg./l. y ausente en el mA, podría potenciar la acción de la ampicilina. La Tabla IV.10 (Véase Anexo IVa, página 152) muestra la recuperación de *A. sobria* CECT 837 en mA y AAA con y sin 0,25mg./l. de rojo fenol, incluyendo en ambos casos 5mg./l. de ampicilina. De acuerdo con estos resultados, el rojo fenol no modifica la actividad inhibidora de la ampicilina (concentración de 5 mg./l.), sobre el crecimiento de *A. sobria* CECT 837, en los medios AAA y mA.

La diferencia de pH (pH 8 en mA y 7 en AAA) también se consideró como posible causa del distinto comportamiento de la ampicilina en estos dos medios. En la Tabla IV.11 (Véase Anexo IVa, página 153) se observan los resultados obtenidos al modificar el pH, en presencia de 5mg./l. de ampicilina en ambos medios. Se concluye que la inhibición sobre el crecimiento de *A. sobria* CECT 837, detectada únicamente en el agar almidón ampicilina, es independiente del pH, al menos considerado aisladamente.

También se controlaron otros componentes, presentes exclusivamente en el medio mA, por su posible capacidad para proteger o potenciar el crecimiento de *A. sobria* CECT 837, en presencia de 5mg./l. de ampicilina. Para ello, comparamos la recuperación de este microorganismo en los medios mA y AAA, con 5mg. de ampicilina por litro y adicionados con xilosa (Tabla IV.12. Véase Anexo IVa, página 154), lisina y arginina libres (Tabla IV.13. Véase Anexo IVa, página 155) y extracto de levadura (Tabla IV.14. Véase Anexo IVa, página 156), frente a los medios originales mA y al AAA, modificados únicamente en su contenido en ampicilina (5mg./l.). En ningún caso se pudo demostrar que la falta de inhibición de la ampicilina (5mg./l.) sobre *A. sobria* CECT 837, al emplear mA se debiera a la presencia de las sustancias contrastadas.

Posiblemente, alguno o algunos de los numerosos componentes presentes en el medio mA, actuando de forma individual o asociada, acomplejen o inactiven a la ampicilina.

cuando su concentración es de 5mg./l., provocando la pérdida de su efecto inhibitor sobre el crecimiento de *A. sobria* CECT 837. En cualquier caso, una concentración de ampicilina de 10mg./l. en dicho medio provoca una notoria inhibición sobre el crecimiento de esta cepa, equiparable a la detectada en los medios AAA y AGAP, siendo por ello aconsejable no modificar la concentración de ampicilina en el medio original de Ryan (mA), con el fin de detectar aquellas cepas de *Aeromonas* spp. móviles que puedan ser sensibles a este antibiótico.

IV.2. - Aislamiento e identificación de *Aeromonas* spp. móviles

La incidencia de *Aeromonas* spp. móviles en alimentos es relativamente poco conocida, aunque se sabe que son contaminantes habituales de los mismos y que participan en la alteración de los alimentos refrigerados (Buchanan y Palumbo, 1985; Palumbo y col., 1985a). La asociación entre las especies móviles de *Aeromonas* e infecciones gastrointestinales en el hombre (Freij, 1987) justifica el interés actual por conocer el papel que puedan jugar en los alimentos.

El aislamiento de estos microorganismos se realizó sobre un total de 92 muestras de diferentes alimentos y aguas, previo enriquecimiento selectivo en agua de peptona alcalina (pH 8,6), ya que da lugar a una mayor eficacia en la detección de especies móviles de *Aeromonas* en muestras clínicas y medioambientales, sobre todo, cuando en ellas no existe un número elevado de microorganismos (Millership y Chattopadhyay, 1984).

De acuerdo con los resultados obtenidos con anterioridad, al comparar la eficacia de tres medios específicos para el aislamiento de *Aeromonas* spp. móviles de alimentos, el medio de Ryan o mA (Oxoid) se seleccionó para investigar la presencia de *Aeromonas* spp. en las muestras de alimentos.

IV.2.1. - Pruebas bioquímicas seleccionadas para su identificación y diferenciación

La identificación de *Aeromonas* spp. móviles se basó en una amplia gama de pruebas bioquímicas (oxidasa, Kligler, gram, ONPG, DNasa, catalasa, crecimiento a 37°C, crecimiento sin ClNa, hidrólisis de almidón, fermentación de D-manitol e *i*-inositol, descarboxilación de la ornitina, dihidrólisis de la arginina, producción de H₂S del tiosulfato

y ureasa), de acuerdo con Popoff (1984), Stelma (1989) y Varnam y Evans (1991). Las cepas que no fermentaron el D-manitol, descarboxilaron la ornitina o no hidrolizaron la arginina no se excluyeron, ya que Kampfner y Altwegg (1992) señalan que *A. schubertii* no fermenta el D-manitol y Hickman-Brenner y col. (1987) que *A. veronii* es ornitina descarboxilasa positiva y arginina dihidrolasa negativa. Hudson y De Lacy (1991) y Côrrea y col. (1993) utilizan, también, un esquema de identificación similar .

Otros sistemas menos laboriosos y más rápidos han sido utilizados por otros autores. Así, Overman y col. (1985), comparan los sistemas API 20E, API RE y API NFT, obteniendo los mejores resultados con el API 20E, al igual que Abeyta y col. (1986) y Stelma y col. (1986). En este sentido, Figura y Guglielmetti (1987) consideran adecuados tanto el sistema API 20E como el API 20NE. Sin embargo, Toranzo y col. (1986) afirman que la utilidad del sistema API 20E es relativa, siendo necesarias pruebas bioquímicas complementarias como fermentación de la arabinosa, gelatinasa, Voges Proskauer y utilización del citrato. Coincidiendo con estos autores, George y col. (1986) emplean el sistema API 20E complementado con gram, oxidasa, fermentación de la glucosa y resistencia al agente vibriostático O/129, mientras que Kirov y col. (1990) agregan a esta pauta de identificación la prueba de la movilidad y la reacción en el medio de Kaper (Kaper y col., 1979). Krovacek y col. (1992a) añaden estas mismas pruebas complementarias, exceptuando la reacción en el medio de Kaper, al sistema API 20NE. Recientemente, Ogden y col. (1994), al comparar la eficacia de los sistemas API 20E, API 20NE y Microbact 24E, consiguen los mejores resultados con los dos últimos citados. Otro método rápido de identificación y clasificación en especies, propuesto por Kühn y col. (1992), es el sistema PhP (Phene plate), basado en el seguimiento espectrofotométrico de la cinética de 48 pruebas bioquímicas realizadas en placas de poliestireno de 96 pocillos. Hasta el momento, parece que estos sistemas no son lo suficientemente fiables para utilizarlos, de forma exclusiva, en la identificación de las especies móviles de *Aeromonas*. En distinta línea, se han propuesto otros sistemas de identificación rápidos basados en el análisis de la secuencia de ARN_r 16S (Dorsch, y col., 1994) y en la detección inmunoenzimática de *A. hydrophila* serotipo O:11 (Merino y col., 1993).

Janda (1991) señala que la diferenciación bioquímica de los grupos de hibridación es aún confusa y requiere un número elevado de pruebas bioquímicas que conlleven un claro riesgo de identificaciones erróneas, proponiendo como alternativa a los métodos genéticos, la diferenciación fenotípica clásica de *A. hydrophila*, *A. sobria* y *A. caviae*.

Enfocando el trabajo desde un punto de vista higiosanitario y no taxonómico, la

clasificación de las especies móviles de *Aeromonas* se realizó de acuerdo con el criterio de Popoff (1984), diferenciando *A. hydrophila*, *A. caviae* y *A. sobria* en base a la producción de gas de la glucosa, hidrólisis de la esculina, fermentación de la salicina, Voges Proskauer y crecimiento con KCN. Las cepas que bioquímicamente no encajaban en ninguna de estas tres especies, se incluyeron en el grupo de *Aeromonas* spp. móviles no clasificadas. El esquema de clasificación elegido es similar al utilizado por Stern y col. (1987), Kirov y col. (1990), Hudson y De Lacy (1991) y Poffé y Op de Beeck (1991). Por otro lado, Varnam y Evans (1991) señalan que los sistemas rápidos API 20NE, ATB 32E y API 20E no son útiles, por sí solos, para la diferenciación de estas tres especies. Figura y Guglielmetti (1987) proponen el factor "CAMP-like" para este fin. Okrend y col. (1987) se basan exclusivamente en la producción de gas de glucosa y la hidrólisis de la esculina. Namdari y Bottone (1989), también utilizan un protocolo simplificado para definir estas tres especies, añadiendo el denominado "fenómeno suicida" a las dos pruebas citadas.

IV.2.2. - Influencia del almacenamiento de los alimentos a baja temperatura en su aislamiento

En la Tabla IV.15 (Véase Anexo IVa, página 157) se observa la detección de *Aeromonas* spp. en el 40,21% de las muestras de alimentos analizadas el día cero o día de su adquisición en el mercado, cifra que aumentó hasta el 53,26% (Tabla IV.16. Véase Anexo IVa, página 158) tras el almacenamiento de las muestras a 10°C, cuando se apreciaban signos leves de alteración en el alimento. El aumento del número de muestras positivas, tras la conservación de los alimentos a bajas temperaturas, coincide con los resultados obtenidos por Palumbo y col. (1985b), Callister y Agger (1987) y Hudson y Avery (1994) y podría deberse, no sólo al efecto selectivo de las bajas temperaturas, sino también al aumento general de la carga microbiana de los alimentos en función del tiempo de almacenamiento.

Es importante destacar que, con cierta frecuencia, se aisló más de una cepa o especie distinta a partir de una misma muestra de alimento.

IV.2.3. - Incidencia en aguas y alimentos

IV.2.3.1. - Aguas

En el agua de bebida, tanto clorada como no tratada, no se detectaron *Aeromonas* spp.

móviles. Moyer (1987) advierte que el agua no tratada es un factor de riesgo importante en relación con este grupo de microorganismos. La ausencia de *Aeromonas* spp. en el agua clorada ha sido justificada y demostrada por Cattabiani (1986) y van der Kooij y Hijnen (1988). Estos autores no admiten que *Aeromonas* sea resistente al cloro, a pesar de los numerosos aislamientos efectuados en aguas cloradas, (Hazen y col., 1978; Burke y col., 1984c; Schubert, 1991; Krovacek y col., 1992a), así como en agua salada de estuario (Kaper y col., 1981) e, incluso, en agua embotellada (Slade y col., 1986).

El agua no potable presentó una incidencia elevada de *Aeromonas* spp. móviles (Tabla IV.15. Véase Anexo IVa, página 157), que se aislaron en el 71,4% de las muestras, resultados que coinciden con los obtenidos por Huguet y Ribas (1991) y Poffé y Op de Beek (1991), confirmándose así la amplia distribución de este grupo bacteriano en medios acuáticos y terrestres, registrada por Austin y Austin (1985) y Abeyta y Wekell (1988).

Burke y col. (1984c), Krovacek y col. (1989) y Knöckel y Jeppesen (1990) señalan al agua de bebida como posible fuente de infección. La elevada frecuencia de aislamientos en aguas de consumo ha permitido que este grupo de microorganismos se incluya entre los tradicionales indicadores higiénicos utilizados para contrastar la calidad del agua (Rippey y Cabelli, 1980; Clark y col., 1982; Krovacek y col., 1989). Contrariamente, Nishikawa y Kishi (1988) consideran que las carnes, pescados y vegetales, pueden ser un vehículo de transmisión más significativo que el agua.

IV.2.3.2. - Carnes

En catorce de las veinte muestras de carne de pollo, cerdo, cordero y ternera analizadas se aislaron *Aeromonas* spp. móviles (Tabla IV.15. Véase Anexo IVa, página 157), alcanzando este producto el segundo puesto en incidencia, con un 60%, después del agua no potable. Estos resultados coinciden con la marcada frecuencia de aislamientos en carnes, señalada por Fricker y Tompsett (1989), Majeed y col. (1989a,b) y Krovacek y col. (1992b). La carne de pollo fue la que presentó una mayor incidencia (100%).

Stern y col. (1987) informan de la escasa detección de *Aeromonas* spp. en las heces de los animales de abasto, lo que induce a pensar que la elevada contaminación de la carne no se debe, únicamente, a contaminación fecal a nivel de matadero, sino también a una deficiente manipulación y a la amplia distribución de estos microorganismos en el entorno.

IV.2.3.3. - Pescados y mariscos

Hudson y De Lacy (1991) aíslan especies móviles de *Aeromonas* en el 34% de las muestras de pescado que analizan y Abeyta y Wekell (1988) en el 70% de las de marisco. En nuestro trabajo, la incidencia en las muestras utilizadas fue del 36% para el pescado y 45% para el marisco (Tabla IV.15. Véase Anexo IVa, página 157), llegando al 80% en alguna especie de pescado (jurel) y al 60% en chirlas y mejillones. La importancia de estos datos se incrementa al considerar que son productos susceptibles de consumirse crudos o poco cocinados y que se han establecido relaciones significativas entre cepas procedentes de alimentos de origen marino (sobre todo moluscos bivalvos) y brotes de gastroenteritis en el hombre (Altwegg y col., 1991).

IV.2.3.4. - Leche cruda y queso fresco

La presencia del citado grupo se evidenció en el 20% de las muestras lácteas analizadas (Tabla IV.15. Véase Anexo IVa, página 157). Kielwein y col. (1969) y Palumbo y col. (1985a) aíslan *Aeromonas* spp. en leche cruda. Santos y col. (1991) y Côrrea y col. (1993) encuentran una incidencia cercana al 30% en queso fresco. La detección en queso fresco elaborado con leche pasterizada, posiblemente sea debida a la recontaminación posterior al tratamiento térmico, dada la termolabilidad demostrada, al menos para *A. hydrophila*, por Palumbo y col. (1987) y Condón y col. (1992).

IV.2.3.5. - Ensaladas preparadas

En ninguna de las ensaladas preparadas se detectaron especies móviles de *Aeromonas*. Las ensaladas estaban elaboradas con distintos vegetales (lechuga, tomate, cebolla, zanahoria, escarola, col, pepino...) lavadas y listas para el consumo directo, lo cual explicaría la ausencia de microorganismos patógenos o potencialmente patógenos. Sólo un tipo de ensalada llevaba en su composición mayonesa, cuyo pH bajo podría ser un factor limitante para el desarrollo y detección de *Aeromonas*. Fricker y Tompsett (1989) encuentran una incidencia muy baja en este tipo de ensaladas, mientras Krovacek y col. (1992b) no detectan *Aeromonas* en vegetales crudos. Contrariamente, Callister y Agger (1987) informan de elevadas tasas de aislamientos en vegetales, sobre todo tras su almacenamiento en refrigeración.

IV.2.4. - Distribución en especies de las cepas aisladas en los distintos alimentos

Coincidiendo con Knöckel y Jeppesen (1990), como se observa en la Tabla IV.17 (Véase Anexo IVa, página 159), *A. hydrophila* fue la especie aislada con mayor frecuencia (39,50%). Sólo seis cepas fueron identificadas como *A. caviae*; en este sentido Krovacek y col. (1992b) obtienen resultados similares al estudiar la incidencia de *Aeromonas* en alimentos suizos. El 20,98% de las cepas correspondían al perfil bioquímico de *A. sobria* y un 32,09% no se pudieron incluir en ninguna de estas tres especies.

A. caviae se aisló principalmente en mariscos y no se detectó en carnes ni pescado, *A. hydrophila* en carnes y pescados y *A. sobria* en carnes. En este sentido, Nishikawa y Kishi (1988) observan que mientras *A. hydrophila* y *A. sobria* se aíslan más frecuentemente en carnes, *A. caviae* está presente, sobre todo, en vegetales, pescados y mariscos.

IV.3. - Resistencia al cloro de seis cepas diarreicas y seis alimentarias de *Aeromonas* spp. móviles

La resistencia al cloro de estos microorganismos se comprobó efectuando recuentos a partir de suero fisiológico estéril, contaminado con 6 cepas diarreicas y 6 alimentarias de forma independiente y, posteriormente, clorando con halazona hasta niveles de cloro activo de 1,2, 2,5 y 5 ppm.

Los controles se efectuaron con suero fisiológico contaminado y no sometido a cloración. Los resultados de los correspondientes recuentos se recogen en la Tabla IV.18 (Véase Anexo IVa, página 160).

En los sueros fisiológicos, contaminados con los mismos inóculos que los sueros controles y, posteriormente, clorados, no se detectó la presencia de las cepas de *Aeromonas* spp. móviles, previamente inoculadas, poniendo de manifiesto la sensibilidad de estos microorganismos a la cloración señalada por Cattabiani (1986). En este sentido, Burke y col. (1984c) también indican que el nivel de cloro libre afecta significativamente a la presencia de aeromonas en el agua y, Van der Kooij (1988) concluye que el aislamiento de estos microorganismos en agua clorada se debe a la insuficiente concentración de cloro libre residual y al tratamiento incorrecto. Por otro lado, Yesim y Aykut (1994) señalan que niveles de hasta 2,5 ppm de cloro no afectan a la supervivencia de *A. hydrophila*.

Por lo tanto, se puede considerar que estos microorganismos son sensibles a la cloración y que los problemas en el agua clorada se deben a recontaminaciones posteriores.

Por ello, es fundamental hacer un seguimiento de los niveles de cloro residual que, por lo general, deben ser como mínimo superiores a 0,5 ppm, aunque este límite se eleve en determinadas circunstancias.

IV.4. - Influencia de diferentes parámetros exógenos sobre el crecimiento de seis cepas diarreicas y seis alimentarias de *Aeromonas* spp. móviles

Se emplearon las siguientes cepas. De origen diarreico: *A. hydrophila* 6, *A. hydrophila* 9, *A. caviae* 16, *A. caviae* 18, *A. sobria* 11 y *A. sobria* 13. De origen alimentario: *A. hydrophila* 55, *A. hydrophila* 96, *A. caviae* 54, *A. caviae* 97, *A. sobria* 34 y *A. sobria* 92. Se consideró crecimiento positivo cuando la lectura de absorbancia en los pocillos inoculados era 0.025 unidades superior a la de cuatro pocillos equivalentes no inoculados. Dicha absorbancia era aproximadamente 0.080 y se correspondía con una carga de $5 \cdot 10^6$ ufc/ml. Igualmente, se determinó que una absorbancia de 0,394 unidades significaba una tasa bacteriana de 10^9 ufc/ml.

IV.4.1. - Temperatura

Como se observa en la Tabla IV.19 (Véase Anexo IVa, página 161), las temperaturas de incubación ensayadas corresponden a 4, 10, 28, 37 y 45°C. En este trabajo se detectó crecimiento a 4°C en 7 cepas (2 diarreicas y 5 alimentarias), alcanzando 4 de origen alimentario el nivel de 10^9 ufc/ml.

El grupo de *Aeromonas* spp. móviles ha sido considerado de naturaleza psicrótrofa por numerosos autores (Buchanan y Palumbo, 1985; Majeed y col., 1989b; Kirov y col., 1990; Beuchat, 1991; Kirov, 1993) e, incluso, con capacidad para producir exotoxinas, relacionadas con la virulencia, a temperaturas de refrigeración (Majeed y col., 1990; Eley y col., 1993).

Las cuatro cepas alimentarias que alcanzaron la tasa de 10^9 ufc/ml pueden considerarse especialmente peligrosas desde el punto de vista de la Salud Pública ya que, de acuerdo con Majeed y col. (1990), es necesario llegar a ese nivel de crecimiento para la producción y detección de enterotoxinas y hemolisinas. Por otra parte, es preciso tener presente que esta tasa de microorganismos potencialmente patógenos representa una dosis infectiva que se alcanzaría en unos 9 días a 4°C.

El desarrollo elevado de las cepas aisladas en alimentos refrigerados, en comparación con las de origen diarreico, se podría explicar por la mejor y más rápida adaptación de las

primeras a estas temperaturas bajas. Este hecho ya ha sido señalado por Knochel (1990), Hudson (1992) y Buncic y Avery (1995) que encuentran menor crecimiento a 5°C en cepas clínicas o aisladas en ambientes cálidos que en las procedentes de alimentos refrigerados y ambientes fríos.

No obstante, en ningún caso debe descartarse el crecimiento de cepas clínicas a 4°C. Esta conclusión no sólo está respaldada por los resultados de este trabajo (2 de 6), sino también por los trabajos de Kirov y col. (1990) y Eley y col. (1993) en los que se afirma que la mayoría de las cepas de origen clínico pueden crecer a 5°C y que lo hacen rápidamente a 10°C.

Cuando la temperatura de incubación se elevó a 10°C, crecieron no sólo las cepas alimentarias sino también las clínicas y no se encontraron diferencias significativas entre ellas. No obstante este incremento de temperatura supuso que el tiempo de detección de crecimiento disminuyese unas cuatro veces y que, el necesario para alcanzar la tasa de 10⁹ ufc/ml, quedase reducido a 4 días aproximadamente.

Los resultados de la Tabla IV.19 (Véase Anexo IVa, página 161), indican que el crecimiento más efectivo de *Aeromonas* spp. móviles se obtiene a 28°C, al igual que han señalado Popoff (1984) y Varnam y Evans (1991) que fijaron esta temperatura como la óptima.

Cuando la incubación se realizó a 37°C, una cepa de origen alimentario no creció. En relación con este hecho, Knochel (1990) apunta que ciertas cepas ambientales son incapaces de crecer a 37°C. Sólo una cepa de origen diarreico alcanzó el nivel de 10⁹ ufc/ml a esta temperatura, lo que podría explicar una menor producción de factores relacionados con la virulencia a 37°C. Mateos y col. (1993) indican que a 37°C las cepas ambientales disminuyen la producción de proteasas y hemolisinas aunque no de citotoxinas, mientras que, en cepas clínicas, sólo es más baja la producción de proteasas, aumentando la de citotoxinas y hemolisinas. La dificultad para crecer hasta tasas microbianas importantes a 37°C, de algunas cepas de *Aeromonas*, podría ser una de las causas que influyeran en la presentación de diferentes grados de patogenicidad en el hombre. Así, las cepas con capacidad virulenta sólo causarían gastroenteritis en el caso de coincidir con otros factores que estimularan su crecimiento y facilitaran la producción de toxinas y enzimas a 37°C.

En este trabajo no se ha detectado crecimiento, en ningún caso, cuando la incubación se efectuó a 45°C. En la bibliografía consultada, Rouf y Rigney (1971) registran cepas que se desarrollan incluso a 55°C, mientras que para Varnam y Evans (1991) la temperatura máxima de crecimiento de *Aeromonas* spp. móviles sería de 38-41°C y para Palumbo y col. (1985b) de 42°C. Esta heterogeneidad de resultados, posiblemente se deba a las diferencias

de las condiciones de cultivo y a la propia variabilidad de las cepas ensayadas.

IV.4.2. - Cloruro sódico

Como señala la Tabla IV.20 (Véase Anexo IVa, página 162), todas las cepas alcanzaron una tasa bacteriana de 10^9 ufc/ml en presencia de 0,5 y 2,5% de ClNa, aunque el crecimiento fue más rápido con 0,5% de ClNa. Knochel (1990) observa que en presencia de 0,5% de ClNa, crecen el 100% de las cepas, mientras que con un 2% de sal sólo se desarrollan el 96%. Contrariamente, Palumbo y col. (1985b) no encontraron diferencias cuando las concentraciones de ClNa eran del 0.5, 1.5 y 2.5%, detectando cepas capaces de crecer hasta con 4.5%. En nuestro caso, se registró el crecimiento de tres cepas diarreicas y tres alimentarias en presencia de 4.5% de ClNa, aunque ninguna alcanzó la tasa de 10^9 ufc/ml, por lo que esta concentración de sal podría prevenir la actividad patógena de *Aeromonas*. Sin embargo, cuando el medio de cultivo contenía 6.5% de ClNa no se detectó crecimiento en ningún caso. En este sentido, Santos y col. (1994) apuntan que mientras en presencia de 4.5% de ClNa algunas cepas crecen, un 5% de ClNa es ya suficiente para inhibir el crecimiento.

IV.4.3. - pH

Como se observa en la Tabla IV.21 (Véase Anexo IVa, página 163), tanto las cepas diarreicas como las alimentarias alcanzaron tasas superiores a 10^9 ufc/ml a pH 7, aunque los mejores niveles de crecimiento se obtuvieron a pH 8,5. Este hecho justifica la utilización de agua de peptona alcalina (pH 8,6) como medio de enriquecimiento, previo al aislamiento.

De acuerdo con nuestra experiencia todas las cepas crecieron a pH 6, alcanzando el nivel de 10^9 ufc/ml cuatro diarreicas y cinco alimentarias. Cuando el pH bajó a 4,5, sólo se detectó desarrollo en dos cepas procedentes de alimentos, con tasas de crecimiento menores. A pH 3,5, ya no se registró proliferación bacteriana de ningún tipo. En este sentido, Palumbo y col. (1985b) señalan el crecimiento de cepas a pH 4,5 y Karem y col. (1994) indican que ciertas cepas de *A. hydrophila*, en medios ácidos (pH 3,5), sintetizan proteínas protectoras de la célula bacteriana para adaptarse a estas condiciones.

Finalmente, se podría concluir que el pH óptimo de *Aeromonas* spp. móviles se encuentra alrededor de 8,5 y que, en condiciones experimentales favorables, estos microorganismos son bacterias relativamente tolerantes a la acidez o con capacidad para adaptarse a un medio de estas características.

IV.4.4. - Nitrito sódico

Como se comprueba en la Tabla IV.22 (Véase Anexo IVa, página 164), a partir de 125 µg/ml de nitritos se comenzó a detectar un efecto negativo sobre el crecimiento de *Aeromonas* spp. móviles. En presencia de concentraciones tan elevadas como 1000 µg/ml se desarrollaron seis cepas de alimentos y cuatro diarreicas, aunque precisaron tiempos de incubación superiores. Otros autores, como Palumbo y col. (1992), comprueban que la cepa K144 de *A. hydrophila* es capaz de crecer en presencia de 200 µg/ml de nitritos. En consecuencia, se puede afirmar que los nitritos, por sí solos, a las concentraciones permitidas en los alimentos, prácticamente no afectan al desarrollo de *Aeromonas* spp. móviles.

La influencia de la temperatura de incubación, cloruro sódico, pH y nitritos sobre el desarrollo de *Aeromonas* spp. móviles dependió más del origen (diarreico o alimentario) que de las especies implicadas. No obstante, se puede matizar que las cepas de *A. hydrophila* resultaron ser las más resistentes a la acción de los nitritos.

IV.4.5. - Efecto combinado de los parámetros ensayados

Los efectos individuales de los diversos parámetros no se utilizan en la conservación de los alimentos, ya que rara vez actúa un solo factor y, en cualquier caso, la actividad antimicrobiana se modifica al actuar conjuntamente varios de ellos.

A 4°C y 10°C se potenció el efecto inhibitor del pH, cloruro sódico y nitrito sódico. En la Tabla IV.23 (Véase Anexo IVa, páginas 165 y 166) se observa que un pH 6 a 4°C es capaz de impedir por completo el desarrollo de *Aeromonas* spp.. Palumbo (1988) y Palumbo y Buchanan (1988) han apuntado que la combinación de bajas temperaturas y pHs inferiores a 6 controla eficazmente estos microorganismos en los alimentos. En este sentido, Aytac y Ozbas (1994) han observado una inhibición completa del crecimiento en yogur a 4°C. Cuando el pH se eleva a 7 es preciso que la concentración de cloruro sódico sea del 2,5% y que los nitritos se incrementen hasta 250-500 µg/ml para que la inhibición sea completa.

De acuerdo con la Tabla IV.24 (Véase Anexo IVa, páginas 167 y 168), a temperaturas de 10°C y pH 6 es necesario adicionar 125 µg/ml de nitrito sódico o bien 62 µg/ml de este antimicrobiano y elevar a 2,5% la concentración de nitrito sódico para que el crecimiento de estos microorganismos no tenga lugar. El desarrollo de *Aeromonas* spp. a bajas

temperaturas es una de las razones que justifican este trabajo, ya que se ha comprobado su presencia en carnes refrigeradas (Jay, 1967; Toule y Murphy, 1978; Len, 1987), pescado y marisco (Smith y col., 1984; Gorczyca y col., 1985; Gram y col., 1987). y especialmente en platos cocinados mantenidos en refrigeración (Toule y Murphy, 1978). El empleo de temperaturas de conservación de 4°C-10°C, combinadas con la adición de nitrito sódico (125 µg/ml), cloruro sódico (2.5%) y un grado de acidez moderado (pH 6) es suficiente para controlar la proliferación de estos microorganismos en los alimentos. De acuerdo con estos resultados, Palumbo y col. (1985a), Palumbo y Buchanan (1988), Knöchel (1990), Beuchat (1991) y Palumbo y col. (1991, 1992) señalan que el desarrollo y supervivencia de *Aeromonas* en alimentos a bajas temperaturas está interrelacionado con otros factores (sal, pH, nitritos, entorno atmosférico y flora competitiva).

A 4°C y 10°C se observaron diferencias significativas ($p < 0,05$) entre cepas diarreicas y alimentarias. Estos resultados están de acuerdo con los trabajos de Knöchel (1990) y Hudson (1992) en los que se demuestra la mayor adaptación de cepas alimentarias para crecer a bajas temperaturas, al igual que su mayor tolerancia a la acidez, cloruro sódico y nitrito sódico.

En la Tabla IV.25 (Véase Anexo IVa, páginas 169 y 170) se comprueba que la temperatura óptima de crecimiento, en función del tiempo de generación, fue de 28°C como admiten de forma general diversos autores aunque y, al igual que observa Palumbo y col. (1991), la fase de latencia, en ocasiones, fue más corta a 37°C. Las diferencias entre las distintas cepas fueron escasas a esta temperatura, decantándose, en todo caso, a favor de las de origen diarreico, que fueron más resistentes a la acidez. La influencia de los nitritos a 28°C estuvo fuertemente determinada por el pH, ya que las cepas alimentarias fueron más resistentes a pH 7 y las diarreicas cuando este parámetro descendía a 6. Estos resultados podrían señalar que los pHs bajos juegan un papel importante en el control de *Aeromonas* spp. móviles en alimentos, apoyados por el hecho evidente de que, en todos los casos, el pH óptimo de crecimiento fue de 8,5.

A 37°C, como se indica en la Tabla IV.26 (Véase Anexo IVa, páginas 171 y 172), las cepas diarreicas mostraron mayor adaptación, resistiendo mejor las condiciones desfavorables de pH, cloruro sódico y nitrito sódico. De modo general, se podría concluir que el origen de las cepas (diarreicas y alimentarias) tiene cierta influencia en la resistencia frente a los diferentes agentes utilizados en la conservación de los alimentos, de los que la temperatura es el factor de mayor interés.

IV.5. - Factores de virulencia de *Aeromonas* spp. móviles

IV.5.1. - Productos exocelulares de cepas diarreicas y alimentarias

IV.5.1.1. - Hemolisinas

El ensayo hemolítico, además de ser por sí mismo indicador de virulencia, ha sido propuesto por Burke y col. (1981a) como técnica sencilla para investigar, con un 5% de error, la actividad enterotóxica de las cepas de *Aeromonas* spp., al considerar al igual que Majeed y col. (1989a), que en la gran mayoría de las cepas, las actividades hemolítica, citotóxica y enterotóxica están asociadas. En este sentido, Baloda y col. (1995) han propuesto el empleo de la reacción en cadena de la polimerasa para agilizar la detección de cepas hemolíticas de *Aeromonas* spp. Sin embargo, Okitsu y col. (1985) y Krovacek y col. (1994) no han encontrado una relación significativa entre hemolisis y enterotoxigenidad, y Todd y col. (1989) y Notermans y col. (1986) tampoco detectaron correlación entre citotoxicidad y hemolisis. No obstante, Asao y col. (1984), Stelma y col. (1986), Bunning y col. (1986) y Burke y col. (1987) han purificado una β -hemolisina citotóxica y enterotóxica, a partir del sobrenadante de un cultivo de *A. hydrophila*.

IV.5.1.1.1. - Hemólisis desarrollada por las colonias bacterianas sobre agar sangre

De acuerdo con Cahill (1990) se consideró α -hemolisis o hemolisis incompleta, cuando sobre agar sangre de caballo o cordero aparecía un halo opaco alrededor de las colonias de aeromonas. Las cepas que originaron un halo transparente, al crecer sobre agar sangre de caballo o cordero, se consideraron β -hemolíticas.

Como se observa en la Tabla IV.27 (Véase Anexo IVa, página 173) se detectó un mayor número de cepas hemolíticas cuando se empleó agar sangre de caballo que cuando se utilizó agar sangre de cordero. Todas las cepas hemolíticas, sobre agar sangre de cordero, lo fueron también sobre agar sangre de caballo y un número importante de cepas α -hemolíticas, sobre agar sangre de cordero, originaron β -hemolisis sobre agar sangre de caballo. Howard y Buckley (1986) advirtieron que la α -hemolisis, puede ser consecuencia de la actividad residual de la β -hemolisina, lo que explicaría que algunas cepas β -hemolíticas sobre sangre de caballo se comporten como α -hemolíticas sobre sangre de cordero, sin que ello implique la producción de las dos hemolisinas (α y β). Por tanto, se podría deducir que

la sangre de caballo es más inestable que la sangre de cordero o bien más sensible a las hemolisinas producidas por *Aeromonas* spp. Dado que el agar sangre de caballo resultó más eficaz para detectar cepas hemolíticas y actividad beta hemolítica se consideraron, fundamentalmente, los resultados obtenidos con este medio.

No se apreciaron diferencias importantes en el número de cepas hemolíticas o en el tipo de hemolisis observado sobre agar sangre de caballo, al incubar las placas a las distintas temperaturas y tiempos especificadas en la Tabla IV.27 (Véase Anexo IVa, página 173), sin embargo, podría señalarse que al trabajar con agar sangre de cordero a 37°C, en las cepas de origen diarreico no se detectó β -hemolisis y el número de cepas β -hemolíticas de *A. sobria* se redujo considerablemente. Contrariamente, Ljungh y col. (1981), aislaron dos hemolisinas: la α -hemolisina, cuyo pico máximo de producción aparece, aproximadamente, a las 50 horas de incubación a 20°C y no se detecta cuando la temperatura es superior a 30°C, y la β -hemolisina, cuya producción óptima se consigue a 37°C, en 18-20 horas. Cabe resaltar que el ensayo hemolítico, basado en la observación de los halos de hemolisis, que aparecen alrededor de las colonias sobre agar sangre, no permite, lógicamente, detectar la producción de α -hemolisinas en cepas productoras de ambas hemolisinas.

Los resultados de la Tabla IV.27 (Véase Anexo IVa, página 173) no permiten apreciar diferencias importantes en la actividad hemolítica de las cepas diarreicas, alimentarias o de colección sobre agar sangre de caballo y cordero, lo que coincide con los resultados obtenidos por Mateos y col. (1993) al trabajar con cepas de origen acuático y humano sobre agar sangre de cordero.

Contrariamente a los resultados observados para las demás especies, las cepas de *A. caviae*, tanto diarreicas como alimentarias, se comportaron predominantemente como α -hemolíticas.

IV.5.1.1.2. - Hemolisis desarrollada por el sobrenadante completo libre de células sobre eritrocitos en suspensión

El título hemolítico asignado a cada sobrenadante fue la inversa de la dilución más alta que producía el 100% de hemolisis (Mateos y col., 1993).

Los resultados más satisfactorios se obtuvieron con eritrocitos de conejo (Tablas

IV.28; IV.29; IV.30 y IV.31. Véase Anexo IVa, páginas 147 a 177). Así, el número de cepas hemolíticas con eritrocitos de conejo fue siempre superior y todas la cepas que lisaron los eritrocitos de cordero, hemolizaron también los de conejo alcanzando, además, títulos superiores. En este sentido, Ljungh (1987) ha señalado que los eritrocitos de roedores son los más sensibles, por poseer una glicoforina en la membrana que actúa como receptora para las hemolisinas de aeromonas. Todd y col. (1989) encontraron diferencias en los resultados obtenidos con eritrocitos de conejo y de hamster, siendo estos últimos los más sensibles o fáciles de lisar, e indican, al mismo tiempo, que la actividad hemolítica depende también del medio donde se obtiene el sobrenadante.

El empleo de ambos tipos de eritrocitos en este ensayo dio lugar a diferencias estadísticamente significativas entre los títulos hemolíticos registrados a 37°C ($p < 0,0005$), a 28°C ($p < 0,0005$), a 20°C ($p < 0,0005$), y a 7°C ($p < 0,0005$).

Dada la mayor labilidad de los eritrocitos de conejo o su más elevada sensibilidad frente a las hemolisinas de aeromonas en comparación con los de cordero, la discusión de los resultados se centra en los datos obtenidos con los primeros.

Los sobrenadantes obtenidos a partir de cultivos incubados a 7°C-336h. (Tabla IV.28. Véase Anexo IVa, página 174), dieron lugar a títulos hemolíticos sobre eritrocitos de conejo inferiores a los obtenidos a 20°C-50h., a 28°C-24h. y a 37°C-18h (Tablas IV.29, IV.30, IV.31. Véase Anexo IVa, páginas 148 a 177). Las diferencias son estadísticamente significativas en todos los casos ($p < 0,0005$) y el número de cepas hemolíticas detectadas a 7°C se redujo notablemente. Majeed y col. (1990) indican que, la mayor parte de las cepas hemolíticas a 37°C, también lo son a 5°C y señalan que la producción de exotoxinas está en función de la población bacteriana, por lo que las diferencias, que observaron a distintas temperaturas, fueron consideradas cuantitativas y dependientes de la tasa bacteriana alcanzada a esa temperatura. Complementando esta información, Mateos y col. (1993) apuntan que la producción de factores extracelulares puede depender también del efecto de la temperatura sobre su síntesis o secreción.

El mayor número de cepas hemolíticas se detectó a 28°C, sin embargo, los títulos hemolíticos obtenidos a esta temperatura fueron inferiores a los registrados a 20°C y a 37°C, ($p < 0,025$ y $p < 0,005$, respectivamente). Este hecho pone de manifiesto que la temperatura óptima de crecimiento no coincide con la temperatura óptima de producción de factores extracelulares. Al analizar el comportamiento de las cepas de origen alimentario, el mayor número de cepas hemolíticas se registra a 28°C, mientras que el número de las detectadas a 20 y 37°C es bastante similar, indicando que existen cepas hemolíticas a 37°C

que no lo son a 20°C y sí a 28°C. Algo parecido ocurre con algunas cepas hemolíticas a 20°C que no lo son a 37°C y sí a 28°C. Estos hechos hacen pensar que existen temperaturas óptimas de producción de hemolisinas inferiores o superiores a 28°C que darían lugar a títulos hemolíticos, significativamente más altos, a 20°C y 37°C que a 28°C ($p < 0,025$, en ambos casos). En el caso de las cepas diarreicas no se apreciaron diferencias en el número de cepas hemolíticas ni en los títulos registrados a distintas temperaturas. Esta mayor variabilidad en las temperaturas de producción de exotoxinas de las cepas alimentarias frente a las diarreicas ha sido también señalada por Kirov (1993).

Al comparar los títulos hemolíticos o el número de cepas hemolíticas detectadas con eritrocitos de conejo, a las distintas temperaturas, no se apreciaron diferencias importantes asociadas al origen de las cepas (Tablas IV.28, IV.29, IV.30 y IV.31. Véase Anexo IVa, páginas 147 a 177). Sin embargo, Knochel (1989a) ha señalado un número de cepas hemolíticas notablemente menor a 37°C que a 10°C, en aislamientos procedentes de ambientes fríos, concluyendo que muchas cepas productoras de toxinas a bajas temperaturas no tendrían un papel significativo *in vivo*. Contrariamente, Krovacek y col. (1994) no encontraron diferencias en el número de cepas hemolíticas diarreicas o procedentes de sedimentos marinos, detectadas a 37°C, aunque estas últimas mostraron títulos más bajos. Igualmente, Figura y col. (1986) hallan actividades hemolíticas, citotóxicas y enterotóxicas bastante similares entre cepas aisladas en pacientes con diarrea y en controles sanos.

A 7°C ninguna cepa diarreica o alimentaria de *A. caviae* fue hemolítica, mientras que en las otras especies se detectó un número considerable de cepas hemolíticas. A 20, 28 y 37°C las cepas de *A. caviae* mostraron títulos mucho más bajos que el resto de las cepas. *A. hydrophila* fue la especie en la que se detectó el mayor número de cepas hemolíticas y los títulos hemolíticos más altos. De acuerdo con estos resultados, Majeed y col. (1989a,b) y Correa y col. (1993) apuntan que la producción de hemolisinas está asociada a *A. hydrophila* y *A. sobria*, en mayor medida que a *A. caviae*. Karunakaran y Devi (1994) han señalado que la detección de hemolisinas en *A. caviae* depende de las condiciones ambientales, principalmente, del hierro. Diversos estudios sobre la actividad hemolítica han puesto de manifiesto que un 90% de cepas de *A. hydrophila* son positivas y existe una estrecha correlación entre hemólisis y citotoxicidad (Callister y Agger, 1987; Okrend y col. 1987). Sin embargo, en un trabajo realizado en Dinamarca, sólo el 37% de las cepas de *A. hydrophila* fueron hemolíticas (Knochel y Jeppesen, 1990).

Por último, conviene señalar que la actividad hemolítica de los sobrenadantes, obtenidos a 28°C-24 h, desapareció después de someterlos a 56°C durante 10 minutos, por lo que las hemolisinas detectadas se pueden considerar termolábiles.

IV.5.1.1.3. - Hemolisis desarrollada por el sobrenadante libre de células, concentrado y fraccionado por diafiltración, sobre eritrocitos de conejo

Se seleccionaron 6 cepas cuyos sobrenadantes mostraron títulos hemolíticos superiores a 200 sobre eritrocitos de conejo, cuando la incubación se realizó a 28°C (*A. hydrophila* 2 procedente de la Colección Española de Cultivos Tipo, *A. sobria* 11 de origen diarreico y *A. hydrophila* 27, *A. hydrophila* 55, *A. hydrophila* 75 y *A. hydrophila* 96 de origen alimentario). A continuación, el sobrenadante se concentró 20 veces y se dividió en cuatro fracciones por diafiltración.

Como se observa en la Figura IV.1 (Véase Anexo IVa, página 196), la fracción que contenía los componentes del sobrenadante de peso molecular superior a 50 kDa alcanzó títulos hemolíticos superiores a 2000 en todos los cepas y, además, era β-hemolítica sobre agar sangre de caballo. Estos resultados coinciden con los obtenidos por Ljungh y col. (1981) que aíslan una β-hemolisina citotóxica y no enterotóxica de 50 kDa y por Asao y col. (1984), cuya β-hemolisina citotóxica y enterotóxica mostró un peso molecular de 60 kDa. Stelma (1988) atribuye la disparidad de resultados de la enterotoxicidad al método de purificación, ya que mientras Ljungh sólo recupera el 0,6% de las unidades hemolíticas, Asao recupera el 65%, por lo que su β-hemolisina sería indudablemente más activa. Burke y col. (1987) y Stelma y col. (1986) han detectado una β-hemolisina citotóxica y enterotóxica de 63 kDa, similar a la de Asao. Esto sugiere que la actividades enterotóxica, citotóxica y hemolítica podrían radicar en la misma molécula. Contrariamente, Cahill (1990) considera que hemolisinas, enterotoxinas y citotoxinas son moléculas distintas, dada la existencia de cepas que presentan estas actividades de forma aislada e independiente y Chakraborty y col. (1984) han señalado que las moléculas responsables de estas actividades estarían codificadas en genes distintos.

Ljungh y col. (1981) describen una α-hemolisina citotónica y no enterotóxica de 63 kDa. Las técnicas empleadas en esta tesis no han permitido poner de manifiesto la posible existencia de una α-hemolisina, presente en la fracción con peso molecular superior a 50 kDa, ya que hubiera sido enmascarada por la actividad β-hemolítica.

La fracción de 30-50 kDa mostró títulos hemolíticos bajos (4-8) sobre eritrocitos de conejo y no originó hemolisis sobre agar sangre de caballo, lo que podría deberse a la

diferente sensibilidad de los eritrocitos de una y otra especie frente a las hemolisinas de aeromonas o bien a la menor difusión del sobrenadante en el agar sangre de caballo. La actividad detectada en esta fracción podría considerarse de tipo residual, ya que la capacidad de separación de la técnica empleada es únicamente del 90%.

En la fracción de peso molecular entre 8-30 kDa se registraron títulos hemolíticos variables en función de la cepa (entre 64 y 256) y permitió observar α -hemolisis sobre agar sangre de caballo. Esta fracción podría contener alguna subunidad activa de las hemolisinas descritas por Ljungh y col. (1981), Asao y col. (1984), Stelma y col. (1986) y Burke y col. (1987) o algún factor extracelular α -hemolítico de peso molecular inferior al de la α -hemolisina detectada por Ljungh y col. (1981).

En la fracción que contenía los componentes de peso molecular inferiores a 8 kDa no se detectó actividad hemolítica sobre eritrocitos de conejo, ni sobre agar sangre de caballo.

Al considerar estos resultados y para llegar a concretar la actividad de las fracciones sería preciso, previamente, purificar y caracterizar cada una de ellas.

IV.5.1.1.4. - Evolución de la producción de hemolisinas, activas sobre eritrocitos de conejo, en función del crecimiento bacteriano

Se seleccionaron ocho cepas cuyos títulos hemolíticos eran superiores a 100 cuando la incubación se realizó a 28°C (*A. sobria* 13 y *A. sobria* 14 de origen diarreico; *A. hydrophila* 24, *A. sobria* 34, *A. hydrophila* 75, *A. sobria* 92, *A. hydrophila* 94 y *A. hydrophila* 96 de origen alimentario).

La producción de hemolisinas sobre eritrocitos de conejo (sin diferenciar por tanto el tipo de hemolisis) se empezó a detectar al final de la fase logarítmica o al principio de la estacionaria de crecimiento (Figura IV.2. Véase Anexo IVa, página 197). Ljungh y col. (1981) señalan que la β -hemolisina se produce en la fase logarítmica y la α -hemolisina en la estacionaria.

En todas las cepas la actividad hemolítica se evidenció cuando la población bacteriana alcanzó niveles próximos a 10^9 ufc/ml. En este sentido, Majeed y col. (1990) ya habían indicado que la tasa bacteriana mínima necesaria para detectar la producción de factores extracelulares, aunque es específica para cada cepa, siempre es superior a 10^8 ufc/ml.

IV.5.1.2. - Enzimas (proteasas y lipasas)

IV.5.1.2.1. - Proteasas

IV.5.1.2.1.1. - Caseinólisis y elastinólisis desarrollada por el sobrenadante completo libre de células

La mayoría de las cepas, tanto diarreicas como alimentarias, hidrolizaron la caseína (Tabla IV.32. Véase Anexo IVa, página 178). El nivel de producción de proteasas de ambos grupos, expresado en unidades proteolíticas, fue similar. En este sentido, Krovacek y col. (1992b) observan que la mayoría de las cepas aisladas en alimentos suizos son caseinolíticas y, en el trabajo de Mateos y col. (1993), no se aprecian diferencias importantes en la actividades proteolíticas de los sobrenadantes de cepas clínicas y ambientales, obtenidos a 28°C.

A. caviae registró el menor porcentaje de cepas caseinolíticas, así como la más baja producción de proteasas. Igualmente, Leung y Stevenson (1988) observaron que todas las cepas de *A. hydrophila* y la mayoría de las cepas de *A. sobria* produjeron proteasas, mientras que sólo tres cepas de *A. caviae* fueron proteolíticas. Krovacek y col. (1992b) también han detectado actividad proteolítica tanto en *A. hydrophila* como en *A. sobria*.

La elastasa ha sido considerada un factor indicador de virulencia en *Pseudomonas* (Hsu y col., 1981). Como se observa en la Tabla IV.32 (Véase Anexo IVa, página 178), sólo una cepa no identificada a nivel de especie y de origen alimentario, hidrolizó la elastina. Estos resultados no concuerdan con los de Santos y col. (1988), que registran un 42,4% de las cepas de *Aeromonas* con capacidad de hidrolizar la elastina, al mismo tiempo que, en el caso de *A. hydrophila*, estos autores relacionaron la virulencia para peces no sólo con la elastinólisis sino también con la estafilólisis. Por otro lado, Mateos y col. (1993) observaron que la actividad elastinolítica es más frecuente en cepas ambientales que en clínicas.

IV.5.1.2.1.2. - Caseinólisis desarrollada por el sobrenadante libre de células, concentrado y fraccionado por diafiltración

En todas las cepas, la mayor actividad proteolítica se detectó en la fracción del sobrenadante que contenía los componentes de peso molecular superior a 50 kDa (Figura

IV.3. Véase Anexo IVa, página 198). No obstante, las tres cepas (una diarreica y dos alimentarias) que presentaron más capacidad de caseinólisis en esta fracción, también registraron una actividad proteolítica importante en la fracción de peso molecular entre 8 y 30 kDa. En todas las cepas, la fracción inferior a 8 kDa hidrolizó la azocaseína, aunque no registró una actividad tan alta como las dos fracciones ya citadas. En el tramo comprendido entre 30 y 50 kDa se puede considerar que la escasa actividad proteolítica registrada (en tan sólo dos cepas) es de carácter residual, ya que la eficacia de separación de la técnica empleada es de aproximadamente el 90%. Sin embargo, Leung y Steveson (1988) describen una metalproteasa termoestable de 35 kDa y una serinoproteasa termolábil de 68kDa, afirmando que la secreción de una o de las dos proteasas depende de la cepa de *Aeromonas*. De acuerdo con este autor, Rivero y col. (1990) han conseguido clonar una proteasa termoestable de 38kDa. Por otro lado, Thune y col. (1982) ponen de manifiesto la existencia de una proteasa termoestable en el sobrenadante crudo, que relacionan con la acción letal en peces. En la misma línea, Kanai y Wakabayashi (1984) y Shieh (1987, 1988) consideran que, en general, las proteasas tendrían acción letal sobre peces.

Podría concluirse que la actividad proteolítica se concentra principalmente en las fracciones de peso superior a 50 kDa y entre 8 y 30 kDa, aunque una cepa alimentaria mostró una proteólisis importante en la fracción de peso inferior a 8 kDa. Estos resultados ponen de manifiesto la existencia de toda una variedad de proteasas exocelulares secretadas por *Aeromonas* spp., así como de diferencias manifiestas entre las distintas cepas. En este sentido, Nieto y Ellis (1986) han descrito 5 tipos de proteasas en *Aeromonas* spp., al mismo tiempo que registran diferencias entre las aisladas de distintas cepas.

IV.5.1.2.1.3. - Evolución de la producción de caseinasa en función del crecimiento bacteriano

Se seleccionaron ocho cepas en las que se había detectado una actividad caseinolítica de 10 unidades, aproximadamente.

La producción de proteasas se detectó al final de la fase logarítmica de crecimiento o al principio de la estacionaria, cuando la población bacteriana alcanzó aproximadamente 10^9 ufc/ml (Figura IV.4. Véase Anexo IVa, página 199).

En las Figuras IV.2 y IV.4 (Véase Anexo IVa, páginas 197 y 199) se comprueba, tal y como indica Cahill (1990), que la máxima producción de hemolisinas coincide con el aumento en la elaboración de proteasas. En relación con este hecho, Howard y Buckley (1985) apuntan que las proteasas no sólo activarían las hemolisinas que se secretan

inactivas, sino que además serían capaces de facilitar el acceso de otras enzimas a sus receptores. Contrariamente a esta acción estimulante, Hardy y col. (1986) señalan que inhibiendo las proteasas extracelulares se aumentaría la estabilidad de las enterotoxinas. Otro papel atribuido a las proteasas, relacionado con su capacidad patógena para el hombre, hace referencia a la capacidad de contrarrestar el efecto bactericida del suero, además de facilitar la nutrición de la célula bacteriana, a partir de los tejidos del hospedador.

IV.5.1.2.2. - Lipasas

IV.5.1.2.2.1. - Lipólisis desarrollada por el sobrenadante completo libre de células

Las 100 cepas ensayadas se comportaron como lipolíticas, y no se pudieron detectar diferencias significativas en el nivel de producción de lipasas exocelulares (expresado como μg de β -naftol liberados) en función de su origen (Tabla IV.33. Véase Anexo IVa, página 179). Wakabayashi y col. (1981) y Santos y col. (1988) estudian la producción de enzimas en cepas ambientales, observando que la mayoría son lipolíticas, aunque en la bibliografía consultada no se relaciona la producción de lipasas con virulencia.

Las cepas de *A. hydrophila*, presentaron mayor capacidad para hidrolizar el β -naftilcaprilato, mientras que las cepas de *A. sobria* registraron menor actividad lipolítica. La fuerte producción de proteasas y lipasas extracelulares en *A. hydrophila* explica la importancia de esta especie en la conservación de los alimentos. Algunos autores, como Suhren (1989) y McKellar (1989), incluyen a las aeromonas dentro del grupo de microorganismos alterantes de alimentos refrigerados ya que crecen a bajas temperaturas y producen una gran variedad de enzimas exocelulares.

IV.5.1.2.2.2. - Lipólisis desarrollada por el sobrenadante libre de células, concentrado y fraccionado por diafiltración

La actividad lipolítica se concentró en la fracción de peso molecular superior a 50 kDa. Como se puede observar en la Figura IV.5 (Véase Anexo IVa, página 200) la lipólisis registrada en el resto de las fracciones puede considerarse un artefacto de la técnica. Estudios efectuados sobre lipasas en *P. fragi*, indican que pueden existir compuestos lipolíticos constituidos por subunidades de 25 kDa que, por agregación, darían lugar a lipasas de 250 kDa (Lawrence y col., 1967). Anguita y col. (1993), en uno de los escasos trabajos existentes sobre las lipasas de *Aeromonas*, han purificado una lipasa extracelular de

67 kDa de *A. hydrophila*.

IV.5.1.2.2.3. - Evolución de la producción de lipasas en función del crecimiento bacteriano

Se seleccionaron ocho cepas cuya actividad lipolítica daba lugar, aproximadamente, a la liberación de 8 µg de β-naftol.

La actividad lipolítica comenzó a detectarse al final de la fase logarítmica de crecimiento o principio de la estacionaria, aunque en algunas cepas no se puso de manifiesto hasta alcanzar la fase estacionaria avanzada (Figura IV.6. Véase Anexo IVa, página 201). Este hecho explicaría la variedad en el comportamiento de las cepas que, en algunos casos (Priest, 1983), coincide con la detección temprana obtenida en *P. fluorescens*, mientras que en otros (Mckellar, 1989), la máxima producción de lipasas tiene lugar en la última fase de crecimiento.

IV.5.1.3. - Citotoxinas

Como ya se afirmó al hablar de hemólisis, Burke y col. (1981a) han señalado que la actividad hemolítica, citotóxica y enterotóxica están correlacionadas, aunque otros autores, como Todd y col. (1989), no admiten esta asociación entre la producción de enterotoxinas y citotoxinas. El estudio de la citopatogenicidad puede ampliar la información obtenida en los ensayos hemolíticos, si se considera que Ljungh y col. (1981) y Chakraborty y col. (1984) han aislado una enterotoxina no hemolítica citotónica (que altera la morfología, pero no causa la muerte celular). La β-hemolisina obtenida por Asao y col. (1984) es enterotóxica y citotóxica (determina muerte celular). En cualquier caso, la detección de la enterotoxina citotónica es mucho menos frecuente que la de la enterotoxina citotóxica (Seidler y col., 1980; Johnson y Lior, 1981). Además, Burke y col. (1987) indican que, probablemente, la enterotoxina citotóxica tiene más importancia como factor de virulencia que la enterotoxina citotónica y Potomski y col. (1987a) observan que la actividad citotóxica se asocia con frecuencia a cepas aisladas en heces diarreicas. En este sentido, Buning y col. (1986) consideran que el efecto citotónico podría ser un efecto citotóxico residual, ya que, al diluir la enterotoxina citotóxica hasta dosis subletales o calentarla a 56°C, el efecto sobre las células pasa a ser citotónico. Vadively y col. (1995) han detectado, en todas las cepas aisladas de pacientes con septicemia, actividad citotóxica y hemolítica pero no enterotóxica.

IV.5.1.3.1. - Citotoxicidad desarrollada por el sobrenadante completo libre de células sobre líneas celulares estables

El título citotóxico se expresa como la inversa de la dilución más alta que provoca el 50% de muerte celular sobre células Vero o el 100% sobre células de mieloma.

La citotoxicidad sobre células de mieloma se llevó a cabo sobre las 100 cepas. Cuando se emplearon células Vero se ensayaron 28 cepas seleccionadas por su actividad hemolítica: 2 procedentes de la Colección Española de Cultivos Tipo (*A. hydrophila* 1 y *A. hydrophila* 2); 4 aisladas en heces diarreicas humanas (*A. hydrophila* 8, *A. sobria* 11, *sobria* 13 y *A. caviae* 18) y 22 aisladas en alimentos y aguas (*A. sobria* 23, *Aeromonas* no clasificada 26, *A. hydrophila* 27, *A. sobria* 37, *Aeromonas* no clasificada 40, *A. hydrophila* 43, *A. caviae* 54, *A. hydrophila* 55, *Aeromonas* no clasificada 62, *A. hydrophila* 63, *A. sobria* 68, *Aeromonas* no clasificada 70, *Aeromonas* no clasificada 72, *A. hydrophila* 75, *Aeromonas* no clasificada 77, *A. hydrophila* 78, *A. caviae* 87, *A. sobria* 91, *Aeromonas* no clasificada 95, *A. hydrophila* 96, *A. caviae* 97 y *A. hydrophila* 100)

La actividad citotóxica de *Aeromonas* spp. se ha estudiado sobre numerosas líneas celulares: Vero, Int. 407, hígado de chimpancé, CHO, HeLa (Boulanger y col., 1977; Barer y col., 1986; Kindschuch y col., 1987). Santos y col.(1988) incluso utilizan líneas celulares poiquilotermas (de peces), comparándolas con los efectos observados sobre células homeotermas (HeLa, Vero y fibroblastos), sin apreciar diferencias claras en la toxicidad. Sin embargo, en este trabajo (Tabla IV.34. Véase Anexo IVa, página 180), las células de mieloma registraron títulos citotóxicos significativamente ($p < 0,0005$) más altos que las células Vero, a pesar de que, el título obtenido sobre células de mieloma se refería a la dilución que provocaba el 100% de muerte celular y, sobre las Vero, a la que originaba el 50%. Todas las cepas citotóxicas sobre células Vero también lo fueron sobre células de mieloma y sólo una cepa citotóxica sobre células de mieloma, aunque con un título muy bajo (1,67), no lo fue sobre células Vero. Por tanto, las células de mieloma podrían ser más adecuadas para estimar la actividad citotóxica de *Aeromonas* spp., principalmente, cuando ésta es escasa. No obstante, dada la mayor proximidad filogenética de las células Vero a la especie humana, es posible que la información que proporcionan sobre la virulencia de las cepas esté más vinculada a la patogenicidad en el hombre.

El distinto comportamiento de ambas líneas celulares podría deberse a la mayor sensibilidad de las células de mieloma frente a las citotoxinas de *Aeromonas*. En este sentido, Bunnig y col. (1986) observan que las células de melanoma son unas 100 veces

más sensibles que las células CHO mientras que, Todd y col.(1989) registran una actividad similar sobre células HeLa (carcinoma epitelial de cervix humano), células Y1 (tumor de corteza adrenal en ratón) y células CHO, aunque estas últimas fueron ligeramente más sensibles. También se podría pensar que las células tumorales, al crecer más rápidamente y no alcanzar una diferenciación celular completa, serían más inestables ante cualquier agresión, sin embargo no existieron diferencias importantes en la toxicidad del etilmetanosulfonato, utilizado como control positivo, sobre células Vero (303 µg/ml provocaron el 50% de muerte celular) y células de mieloma (443 µg/ml provocaron el 100% de muerte celular).

Por otro lado, las lesiones morfológicas indicadoras de toxicidad, tal y como se observa en la Figura IV.7 (Véase Anexo IVa, página 202), consisten fundamentalmente en redondeamiento y desprendimiento, en el caso de las células Vero, pasando de una monocapa de células ligeramente elongadas adherida a la pared del frasco a células redondeadas en suspensión. Las células de mieloma lesionadas sufrieron un cambio menos espectacular, perdieron su turgencia y esfericidad, arrugándose y disminuyendo de tamaño (Figura IV.8. Véase Anexo IVa, página 203).

Veinte de las 28 cepas ensayadas sobre células Vero (71,5%) y 75 de las 100 sobre células de mieloma se comportaron como citotóxicas. Sin embargo, Fricker y Tompsett (1989) observan citotoxicidad sobre células HeLa sólo en el 30% de las cepas.

Como se muestra en la Tabla IV.34 (Véase Anexo IVa, página 180), las cepas alimentarias registraron los títulos más altos, aunque no se pudieron establecer diferencias significativas entre éstos y los obtenidos de cepas diarreicas. Krovacek y col. (1994) señalan que, aunque todas las cepas fueron citotóxicas sobre células CHO, las de origen humano alcanzaron títulos de citotoxicidad superiores a las aisladas en sedimentos marinos, mientras que Mateos y col. (1993) no encuentran diferencias entre cepas clínicas y ambientales cuando utilizan células Vero. Igualmente, Santos y col. (1988) observan que la citopatogenicidad de cepas clínicas y ambientales es similar sobre varias líneas celulares homeotermas y poiquilotermas y, contrariamente, Toranzo y col. (1983a), Morgan y col. (1985) y Cipriano y col. (1981) no encuentran asociación entre citotoxicidad y virulencia para peces o enteropatogenicidad en el hombre

Ninguna cepa de *A. caviae* resultó citotóxica sobre células Vero y sólo cuatro lo fueron sobre células de mieloma, registrando títulos considerablemente más bajos que el resto de las cepas. Eley y col. (1993), Correa y col. (1993) y Majeed y MacRae (1994) observan que la citotoxicidad se asocia, en escasas ocasiones, a *A. caviae* y.

frecuentemente, a *A. hydrophila* y *A. sobria*. Burke y col. (1984b) y Fricker y Tompsett (1989) no detectaron cepas de *A. caviae* citotóxicas y señalan que *A. sobria* es la especie que, con mayor frecuencia, muestra esta actividad. Yamamoto y col. (1994) emplean la hibridación del ADN para clasificar las cepas de *Aeromonas* y observan que la citotoxicidad se asocia, preferentemente, a *A. hydrophila*, *A. veronii* biotipo *sobria* y *A. jandai* (cuyo fenotipo coincide con *A. sobria*), y, con poca frecuencia, a *A. sobria* biotipo *sobria* y *A. caviae*. Por tanto, el grupo de cepas denominado *A. sobria*, según la clasificación bioquímica de Popoff (1984), incluye cuatro grupos de hibridación distintos, destacando *A. sobria* biotipo *sobria* de escasa virulencia y *A. veronii* biotipo *sobria* de mayor virulencia e invasividad (Janda y col., 1984b; Watson y col., 1985; Carello y col., 1988; Gray y col., 1990; Havelaar y col., 1992). Namdari y Bottone (1990b) no están de acuerdo con los autores citados, señalando que *A. caviae* es capaz de producir citotoxinas y enterotoxinas en función del tiempo y las condiciones de cultivo. Así, consideran que esta especie necesitaría 16 horas de incubación, mientras que *A. hydrophila* y *A. sobria* producirían exotoxinas a partir de las 8 horas de incubación en caldo triptona soja. Por otro lado puntualizan que, además, *A. caviae* necesitaría caldo triptona soja a doble concentración y exento de glucosa, ya que la presencia de este azúcar puede inhibir la síntesis de estas moléculas, al igual que es capaz de reprimir la ruta de los ácidos tricarbóxicos, dando lugar al acúmulo de ácido acético responsable del fenómeno suicida que se asocia principalmente a *A. caviae*. Como factor adicional, la mayor concentración de sales del medio podría favorecer la estabilidad de las exotoxinas.

IV.5.1.3.2. - Citotoxicidad desarrollada por el sobrenadante libre de células, concentrado y fraccionado por diafiltración, sobre células Vero

Los mayores títulos citotóxicos (Figura IV.9. Véase Anexo IVa, página 204) se registraron en la fracción de peso molecular superior a 50 kDa. Las cepas con más actividad citotóxica, en esta fracción, fueron las mismas que mostraron más poder hemolítico (Figura IV.1. Véase Anexo IVa, página 196). Estos resultados coinciden con los obtenidos por Ljungh y col. (1981), que detectaron una β -hemolisina citotóxica no enterotóxica de 50-51 kDa y por Asao y col. (1984) que aislaron una molécula de unos 63 kDa con actividad β -hemolítica y citotóxica, que difiere de la exotoxina de Ljungh en que, además, provoca acúmulo de fluidos al actuar sobre el asa intestinal ligada de conejo.

Igualmente se observó citotoxicidad cuando las células Vero se enfrentaron con las fracciones del sobrenadante de peso molecular entre 8 y 30 kDa, aunque la correspondiente

a *A. sobria* 11, que había obtenido uno de los títulos hemolíticos más elevados, registró el título citotóxico más bajo. A la vista de los resultados podríamos afirmar que, en esta fracción, las actividades citotóxicas y hemolíticas no estarían asociadas. A este respecto, Ljungh y col. (1981) y Chopra y col. (1994) describen una enterotoxina citotónica y no hemolítica de 15 kDa, y Potomski y col. (1987b) detectan una molécula similar, aunque de peso molecular superior (27 kDa). Estos autores únicamente registran actividad citotónica sobre cultivos celulares, pero como ya se ha señalado con anterioridad, la citotonicidad puede deberse a una escasa concentración o a la parcial desnaturalización de la citotoxina, como consecuencia del método de purificación empleado. La diafiltración prácticamente no afecta al estado nativo de las moléculas, aunque al concentrarlas propiciaría la muerte celular producida por esta fracción .

Las fracciones de peso molecular inferior a 8 kDa y entre 30 y 50 kDa no afectaron a los cultivos celulares.

IV.5.2. - Propiedades superficiales de cepas diarreicas y alimentarias

IV.5.2.1. - Hemaglutinación

La hemaglutinación es una técnica sencilla que se utiliza para observar la capacidad de unión de los microorganismos a células eucariotas (Cahill, 1990). Singh y Sanyal (1993) han descrito una asociación relativa entre la capacidad hemaglutinante, la resistencia al suero y la actividad enterotóxica de cepas de *Aeromonas* spp.

De acuerdo con Burke y col. (1984a), la aglutinación de los eritrocitos de conejo o cordero, se consideró fuerte cuando la agregación era inmediata y completa (HGL++) y débil si era incompleta o no instantánea (HGL+).

En la Tabla IV.35 (Véase Anexo IVa, página 181), se observa que sólo 43 cepas aglutinaron los eritrocitos de conejo; de ellas, sólo 12 también hemaglutinaron los de cordero. Estas diferencias fueron significativas ($p < 0,001$) e indican que los glóbulos rojos de conejo son más sensibles a las hemaglutininas de *Aeromonas* spp. En este sentido, Faris y col. (1982) encuentran diferentes grados de hemaglutinación en función del tipo de eritrocitos y Vadively y col. (1995) observaron que las cepas de *Aeromonas* no hemaglutinaban los eritrocitos de cordero, aunque si los de hamster, conejo y ave. Santos y col. (1988) observaron mayor número de cepas hemaglutinantes con eritrocitos humanos que con eritrocitos de trucha, no encontrando asociación entre la hemaglutinación de

eritrocitos de trucha y la virulencia de las cepas para peces, ni entre la hemaglutinación de eritrocitos humanos y la enterotoxigenicidad en ratón. Por otra parte, Atkinson y Trust (1980) relacionan la aglutinación de eritrocitos humanos con la agregación a células del epitelio bucal aunque, en este caso, el mecanismo de adhesión es diferente.

De acuerdo con los resultados obtenidos por Burke y col. (1984a), que no señalan diferencias en la capacidad hemaglutinante entre cepas aisladas en pacientes con gastroenteritis asociada a *Aeromonas* spp. y cepas acuáticas, en la Tabla IV.35 (Véase Anexo IVa, página 181) se observa que no existió una asociación significativa entre la aglutinación de eritrocitos de conejo o cordero y las cepas diarreicas o alimentarias. Coincidiendo con estos resultados, Singh y Sanyal (1993) no observan que el origen clínico o ambiental de las cepas se relacione con una mayor o menor capacidad hemaglutinante. Contrariamente, Atkinson y Trust (1980) detectan aglutinación fuerte de eritrocitos humanos y adhesión a células del epitelio bucal de cepas aisladas en heces diarreicas humanas y de cepas enterotoxigénicas y Cahill (1990) asocia la hemaglutinación con una proteína de la membrana externa que posibilita la unión de las bacterias a los receptores antigénicos H de los eritrocitos humanos. Este antígeno H también aparece en la superficie de las células intestinales, por lo que podría intervenir en la unión a estas células antes de que tenga lugar la liberación de las enterotoxinas. Burke y col. (1984a) sugieren que las hemaglutininas y, no sólo las enterotoxinas, deberían ser consideradas factores de virulencia. Sin embargo, Jiwa (1983) y Santos y col. (1987) observaron que las hemaglutininas no son específicas de cepas aisladas en heces diarreicas humanas. Stewart y col. (1986) aíslan una hemaglutinina soluble, a partir del sobrenadante libre de células de *A. hydrophila*, *A. sobria* y *A. caviae*, que no parece relacionarse con la patogenicidad.

IV.5.2.2. - Inhibición de la hemaglutinación por D-manosa, L-fucosa y D-galactosa

La inhibición de la hemaglutinación con distintos azúcares puede aclarar, en parte, la naturaleza y especificidad de las hemaglutininas de la superficie bacteriana que interactúan con los receptores existentes en la superficie de los eritrocitos (Trust y col., 1980). Dada la sensibilidad, especificidad y probable naturaleza proteica, Cahill (1990) recuerda que las moléculas responsables de la hemaglutinación podrían ser lectinas (que reconocerían los azúcares terminales) y que se corresponderían con aquellas que inhiben las propiedades aglutinantes de los receptores de la superficie celular. Hanne y Finkelstein (1982) describen cuatro hemaglutininas en *V. cholerae* con diferente especificidad frente a eritrocitos de

distintas especies, una de ellas es inhibida por fucosa, otra por manosa, la tercera no es inhibida por manosa ni fucosa y la cuarta es una hemaglutinina soluble resistente también a ambos azúcares.

Se consideró que había existido inhibición de la hemaglutinación cuando las cepas hemaglutinantes dejaban de serlo, o bien cuando la hemaglutinación fuerte se transformaba en débil, en presencia de D-manosa, L-fucosa o D-galactosa.

La capacidad hemaglutinante frente a eritrocitos de cordero fue inhibida por uno, dos o los tres azúcares. El 23,3% de las cepas hemaglutinantes con eritrocitos de conejo presentaron hemaglutinación resistente a los tres azúcares y, en ningún caso, se detectó hemaglutinación sensible a todos ellos (Tabla IV.36. Véase Anexo IVa, página 182).

Los patrones de inhibición con eritrocitos de cordero difieren a los obtenidos con eritrocitos de conejo, por lo que podría considerarse la intervención de distintos elementos superficiales en la adhesión a uno u otro tipo de eritrocito, o bien que la unión con los de cordero es más lábil y fácil de inhibir. Morgan y col. (1985) y Santos y col. (1988) observan también distintos patrones de inhibición de la hemaglutinación en función del tipo de eritrocitos.

El patrón de inhibición más frecuente fue M+F-G-, tanto en cepas diarreicas como alimentarias y, la manosa el azúcar que más veces inhibió la hemaglutinación (Tabla IV.36. Véase Anexo IVa, página 182). El papel de la manosa como inhibidor de la hemaglutinación de *Aeromonas* spp. ha sido señalado por Morgan y col. (1985), al observar que todas las cepas mostraban hemaglutinación sensible a manosa con eritrocitos de alguna especie animal, así como por Atkinson y Trust (1980), Burke y col. (1984a) y Santos y col. (1988). Este último autor, además, añade que la hemaglutinación resistente a la manosa es más frecuente en cepas diarreicas que acuáticas.

Santos y col. (1988) observaron que el patrón de inhibición más común, frente a eritrocitos humanos y de trucha, era M+G-F+. Contrariamente, en la Tabla IV.36 (Véase Anexo IVa, página 182) se puede apreciar que sólo dos cepas de origen alimentario mostraron este patrón sobre eritrocitos de conejo. Burke y col. (1984a) indican que la inhibición de la aglutinación de eritrocitos humanos por manosa, fucosa y no por galactosa es el patrón que menos se asocia a la diarrea.

Por otro lado, Elbashir y Millership (1989) observaron que la hemaglutinación resistente a los tres azúcares (M-G-F-) predomina en cepas aisladas en heces diarreicas y en cepas citotóxicas sobre células Vero. Contrariamente, los resultados reflejados en la Tabla

IV.36 (Véase Anexo IVa, página 182) indican que ninguna cepa diarreica mostró este patrón. Majeed y MacRae (1994) han señalado que la hemaglutinación fue inhibida, en la mayoría de los casos, por uno o más azúcares.

Sólo una cepa de *A. caviae* era hemaglutinante con eritrocitos de conejo, mostrando un patrón de inhibición resistente a los tres azúcares, mientras que Burke y col. (1984a), observan el patrón M+G-F+ para esta especie.

IV.5.2.3. - Autoaglutinación

Janda y col. (1987) han asociado la capacidad autoaglutinante de *Aeromonas* spp. con distintas propiedades superficiales, proponiendo este carácter como marcador de virulencia al afirmar que el tipo SP-PAB+ se asocia a cepas altamente virulentas aisladas de procesos invasivos. En este sentido, Dooley y Trust (1988) observan que las cepas PAB+ son más virulentas para el ratón.

Las cepas autoaglutinantes mostraron precipitación espontánea (SP) al crecer en caldo infusión cerebro corazón incubado a 30°C-18h. y o precipitación después de mantener estos cultivos 1 hora a 100°C (PAB).

El porcentaje de precipitación espontánea se calculó comparando la absorbancia a 540nm. de la parte superior del cultivo, desarrollado a 30°C-18h., con la de ese mismo cultivo, después de agitarlo. El porcentaje de precipitación de las células bacterianas, mantenidas a 100°C-1h, se obtuvo comparando la absorbancia a 540nm., de la parte superior de una fracción del cultivo sometida este tratamiento térmico, con la de la fracción mantenida a temperatura ambiente el mismo tiempo.

El carácter autoaglutinante (Tabla IV.37. Véase Anexo IVa, página 183) y los porcentajes de precipitación de las cepas autoaglutinantes (Tabla IV.38. Véase Anexo IVa, página 184) no pudieron asociarse con el origen diarreico o alimentario.

En la Tabla IV.37 (Véase Anexo IVa, página 183) se puede apreciar que 5 cepas de las 15 de origen diarreico y 23 de las 81 alimentarias fueron autoaglutinantes, detectándose los tres tipos de autoaglutinación (SP-PAB+, SP+PAB+ y SP+PAB-) en ambos grupos. Dos cepas diarreicas y 8 alimentarias mostraron el fenotipo SP-PAB+. Coincidiendo con estos resultados, Janda y col. (1987) tampoco observaron diferencias entre cepas clínicas y ambientales, registrando un 30% de cepas autoaglutinantes, de las que más de la mitad fueron SP-PAB+. En esta línea, Santos y col. (1988) no apreciaron diferencias en la autoaglutinación de cepas virulentas y avirulentas para peces, ni les fue posible relacionar

autoaglutinación y enterotoxicidad.

Ninguna cepa de *A. caviae* era autoaglutinante. Como se ha indicado anteriormente, Janda y col. (1987), asociaron la autoaglutinación a cepas aisladas de procesos invasivos, por lo que estos resultados serían aceptables al considerar que *A. caviae*, rara vez, se aísla de bacteriemias y estas son siempre polimicrobianas (Janda y col., 1984b).

IV.5.2.4. - Aglutinación con acriflavina

Como se observa en la Tabla IV.39 (Véase Anexo IVa, página 185), el 53,3% de las cepas diarreicas y el 56,8% de las alimentarias no se agregaron en presencia de acriflavina (Acri-). En este sentido, Santos y col. (1988) detectaron un 50% de cepas Acri-, relacionando este carácter con la enterotoxicidad aunque no con la virulencia para peces. Janda y col. (1987) han asociado la incapacidad para agregarse en presencia de acriflavina con la letalidad para el ratón, aunque también encuentran algunas cepas Acri+ letales para el ratón

IV.5.2.5. - Hidrofobicidad superficial

La adherencia bacteriana, esencialmente, es el resultado de dos mecanismos diferentes de unión: uno de carácter específico y otro inespecífico. El primero implicaría la interacción de componentes complementarios de la superficie bacteriana y de la superficie colonizable con marcada afinidad. La unión no específica conlleva interacciones electrostáticas o hidrofóbicas de mucha menor afinidad (Sweet y col., 1987). Referente a *Aeromonas*, Bartkova y Cizner (1994) han señalado que en cepas no fimbriadas la hidrofobicidad puede ser el factor más importante responsable de la adhesión a células epiteliales.

Las interacciones hidrofóbicas juegan un papel importante en la adherencia y proliferación de los microorganismos a una amplia variedad de superficies sólidas (Marshall, 1976). La hidrofobicidad natural de la superficie externa bacteriana interviene en la distribución de los microorganismos en interfases (Marshall, 1976; Blanchard y Syzdek, 1978), en la adherencia bacteriana a superficies plásticas impermeables (Dexter y col., 1975; Fletcher y Loeb, 1979; Gerson y Scheer, 1980) y en la unión a células fagocitarias (van Oss, 1978) y otras células de mamíferos (Perers y col., 1977; Smyth y col., 1978; Beachey y col., 1980; Rosenberg y col., 1981).

Dillon y col. (1986) apuntan que los resultados obtenidos a través de una sola técnica no reflejan la hidrofobicidad superficial real. Por este motivo, la hidrofobicidad se estimó en

base a la unión a filtros de nitrocelulosa (Lachica y Zink, 1984) y a la adsorción a hidrocarburos líquidos: hexadecano, octano y xileno (Rosemberg y col., 1980; Sweet y col., 1987). Otras técnicas propuestas para estudiar la hidrofobicidad son la agregación con sal (Lindahl y col., 1981), la cromatografía de interacción hidrofóbica (Smyth y col., 1978), la aglutinación de partículas de látex, la unión al cristal violeta (Paula y col., 1988) y la adherencia a superficies de poliestireno (Rosenberg, 1981).

IV.5.2.5.1. - Unión a filtros de nitrocelulosa

Las 15 cepas de origen diarreico y las 81 de origen alimentario mostraron una capacidad de unión próxima al 75%, sin que se detectasen diferencias significativas entre ambos grupos (Tabla IV.40. Véase Anexo IVa, página 186). De acuerdo con Paula y col. (1988), la gran mayoría de las cepas de *Aeromonas* se pueden considerar "fuertemente hidrofóbicas" cuando esta propiedad se estima en función de la unión a filtros de nitrocelulosa. Estos autores consideran fuertemente hidrofóbica a *A. salmonicida* 449, que presenta un porcentaje de unión del 82% y relacionan esta propiedad con la existencia de la capa A, al considerar que la mutante 449-3, carente de capa A, muestra una capacidad de unión de sólo el 20%. Por otro lado, la hidrofobicidad de la cepa 449, estimada en función de su adsorción a hidrocarburos, es moderada con xileno y, prácticamente nula, con octano y hexadecano.

IV.5.5.2. - Adsorción a hidrocarburos líquidos

La adsorción a hidrocarburos líquidos y la unión a filtros de nitrocelulosa pueden dar lugar a resultados no concordantes, así Paula y col. (1988) indican que *Acinetobacter calcoaceticus* ATCC 31012 es fuertemente hidrofóbico en función de su adsorción al xileno (88%), al octano (90%) y al hexadecano (100%) y, moderadamente hidrofóbico, cuando se determina el porcentaje de unión a filtros de nitrocelulosa (46%).

IV.5.2.5.2.1. - Al hexadecano

Los resultados recogidos en la Tabla IV.40 (Véase Anexo IVa, página 186) muestran que tanto las cepas diarreicas como las alimentarias registraron un porcentaje de adsorción próximo al 15 %, por lo que la hidrofobicidad se puede considerar prácticamente nula. Por lo general, los resultados obtenidos con el hexadecano fueron escasamente reproducibles y,

en ocasiones, la absorbancia de la suspensión bacteriana tratada con este hidrocarburo era incluso superior a la del control. En este sentido, Sweet y col. (1987) indican que la fiabilidad de los ensayos de hidrofobicidad, en función de la adherencia a hidrocarburos líquidos, mejora con la aireación final de la suspensión bacteriana que elimina los restos del hidrocarburo, excepto en el caso de que se emplee hexadecano. Por tanto, aunque se detectaron diferencias significativas en los porcentajes de adsorción que presentaron las cepas diarreicas y alimentarias, los resultados obtenidos con el hexadecano no se consideran con el grado de fiabilidad preciso.

IV.5.2.5.2.2. - Al octano

La mayoría de las cepas mostraron hidrofobicidad media, en función de la capacidad de adsorción a este hidrocarburo, predominando los valores de adsorción próximos al 60% (Tabla IV.40. Véase Anexo IVa, página 186). Al comparar los porcentajes de adsorción de cepas diarreicas y alimentarias se observaron diferencias significativas ($p < 0,005$), resultando las cepas aisladas en alimentos más hidrofóbicas. Sin embargo, Janda y col. (1987) observaron hidrofobicidad tanto en cepas virulentas como en avirulentas para el ratón. Contrariamente, Lachica y Zink (1984) asocian la hidrofobicidad superficial de *Yersinia enterocolítica* a la existencia de un plásmido de 40-48 megadaltons, que determinaría la colonización del tracto gastrointestinal en el ratón y cambios en las propiedades físico-químicas de la superficie bacteriana.

IV.5.2.5.2.3. - Al xileno

Coincidiendo con Janda y col. (1987) y Paula y col. (1988), el xileno fue el hidrocarburo con el que se registraron los porcentajes más altos de adhesión. Las cepas de *Aeromonas* mostraron una hidrofobicidad media con una capacidad de adhesión próxima al 62%, registrándose diferencias significativas ($p < 0,01$) entre cepas diarreicas (menos hidrofóbicas) y cepas alimentarias (más hidrofóbicas) (Tabla IV.40. Véase Anexo IVa, página 186).

La superficie de las bacterias gram-negativas es normalmente hidrofílica, como consecuencia de la presencia de lipopolisacáridos o cadenas de polisacáridos (Lugtenberg y Van Alphen, 1983). El aumento de la hidrofobicidad superficial suele asociarse a mutaciones que conllevan cambios de los lipopolisacáridos hacia formas rugosas (Lugtenberg y Van Alphen, 1983), a la producción de adhesinas (Jones, 1977; Smyth y

col., 1978; Lindahl y col., 1981) que incrementarían la hidrofobicidad al facilitar la adhesión (Jones, 1977) o a la presencia de una capa extra superficial de naturaleza proteica, como la capa A de *A. salmonicida* (Trust y col., 1983). Sin embargo, la capa S de *Aeromonas* spp. móviles, similar por su naturaleza y estructura a la capa A de *A. salmonicida*, no aumenta la hidrofobicidad superficial de las células bacterianas (Dooley y col., 1988). Tal y como se ha expuesto anteriormente, la hidrofobicidad se relacionaría con la capacidad de adhesión y, por tanto, con la virulencia. Sin embargo, Merino y col. (1995) observan que las cepas de *A. hydrophila* más virulentas para peces, productoras de septicemias, poseen una cápsula de naturaleza polisacárida y, por tanto hidrofílica, que daría lugar a una disminución de la hidrofobicidad superficial en estas cepas altamente virulentas.

IV.5.2.6. - Aspectos morfológicos de la superficie bacteriana

IV.5.2.6.1. - Capa S

Una amplia variedad de bacterias presentan capas superficiales proteicas (capas S) de estructura cristalina (Sletyr y Messner, 1983). Estas estructuras, normalmente, están constituidas por monómeros proteicos o glicoproteicos ensamblados con simetría hexagonal, tetragonal o lineal (Sletyr y Messner, 1983), que forman la capa más externa de la célula y regulan, en gran medida, las interacciones entre los microorganismos y el medio externo. Una de sus funciones es de simple protección física frente a agentes líticos, como proteínas del suero (Munn y col., 1982) o bacteriófagos (Ishiguro y col., 1981). La capa S, identificada por Kay y col. (1981) en cepas autoaglutinantes de *A. salmonicida*, (originalmente denominada capa A) es uno de los principales factores determinantes de virulencia para peces, hasta el punto de que las cepas que carecen de capa A se consideran avirulentas (Evenberg y Lugtenberg, 1982; Evenberg y col., 1982; Munn y col., 1982; Parker y Munn 1984).

Posteriormente, se ha observado la presencia de capa S en cepas de *A. hydrophila* GH-1 y *A. veronii* biotipo *sobria* GH-8 (fenotípicamente se corresponde con *A. sobria*) implicadas en distintas infecciones humanas y animales (Dooley y Trust, 1988; Paula y col., 1988; Kokka y col., 1991b). La capa S de *Aeromonas* spp. móviles únicamente aumenta la resistencia a la acción bactericida del suero (Murray y col., 1988) y no es capaz, como la de *A. salmonicida*, de facilitar la adhesión a macrófagos (Trust y col., 1983) o presentar puntos específicos de unión para porfirinas (Kay y col., 1985) e inmunoglobulinas (Phipps y Kay, 1986). Dooley y col. (1988) han indicado que la capa S,

constituida por unidades proteicas de 52 kDa, es relativamente hidrofóbica, aunque cuando está unida a la célula bacteriana no le confiere mayor hidrofobicidad.

Como se aprecia en la Tabla IV.41 (Véase Anexo IVa, página 187), la capa S (Figura IV.10. Véase Anexo IVa, página 205) se detectó en 65 de las 100 cepas ensayadas observándose, indistintamente, en cepas diarreicas y alimentarias. Este resultado podría suponer la presencia de cepas potencialmente virulentas en alimentos, si se tiene en cuenta que Dooley y col. (1986) y Murray y col. (1988) han apuntado que las cepas de *A. hydrophila*, altamente virulentas para peces, poseen un antígeno somático común (O:11) y una capa proteica uniforme en la superficie externa de la célula, cuyas subunidades se denominan proteína S. Las unidades proteicas de la capa S no son idénticas a las proteínas de la capa A de *A. salmonicida* y, parece ser que, también se diferencian antigénicamente (Janda y col. 1987). Por otro lado, Janda y col. (1987) señalan que no se ha podido relacionar la existencia de la capa S con el comportamiento PAB+ de cepas de *A. hydrophila* altamente virulentas. Sin embargo, Paula y col. (1988) hacen referencia a un nuevo grupo de *Aeromonas* mesófilas patógenas, con capa S, implicadas en infecciones graves de peces y seres humanos, con un mismo fenotipo autoaglutinante (PAB+) y un antígeno somático común (O:11).

Por otro lado, la frecuencia con que se detecta la capa S entre las cepas de *Aeromonas* (Tabla IV.41. Véase Anexo IVa, página 187) tanto diarreicas como alimentarias, podría poner en duda su validez como indicador de virulencia. En este sentido, la opinión de los investigadores que han estudiado este problema no es coincidente, así Cahill (1990) señala que la capa S proteica es el mejor indicador de virulencia, mientras que, Merino y col. (1993) consideran más fiables las pruebas inmunoenzimáticas para detectar el antígeno O:11.

IV.5.2.6.2. - Pili

Los *pili* de *Aeromonas* spp. móviles pueden clasificarse, en función de su morfología, en dos tipos: *pili* cortos y rígidos, abundantes en la superficie celular que se detectan en cepas ambientales y *pili* largos y flexibles, en menor número por célula (1 a 60), que aparecen tanto en cepas clínicas como ambientales (Carrello y col., 1988; Hokama y col., 1990; Ho y col., 1990; Kirov y col., 1993b). Carrello y col. (1988) apuntan que la adhesión a células HEp-2 está relacionada con la expresión de los *pili* flexibles, aunque no existe certeza de que esta línea celular estable tenga los mismos receptores de superficie para bacterias que las células intestinales humanas *in vivo*. Nishikawa y col. (1991)

demuestran que la adhesión de las cepas de *Aeromonas* a esta línea celular es paralela a la adhesión a células intestinales de embrión humano y Rogers y col. (1990) y Grey y Kirov (1993) afirman que la adhesión de las cepas de *Aeromonas* se correlaciona con la que tiene lugar sobre tejido ileal humano formolizado.

Como se muestra en la Figura IV.11 (Véase Anexo IVa, página 206) se pudieron observar los dos tipos de *pili* en cepas diarreicas y alimentarias.

En la Tabla IV.41 (Véase Anexo IVa, página 187) se aprecia que se detectaron *pili* cortos y rígidos en 22 cepas, y largos y flexibles en 5 cepas, sin que se apreciaran diferencias significativas entre cepas diarreicas y alimentarias. Se han purificado los *pili* largos, a partir de dos cepas de *A. hydrophila* (Hokama y col., 1990; Ho y col., 1990) y de tres cepas de *A. sobria* (Hokama e Iwanaga, 1991, 1992; Iwanaga y Hokama, 1992). Cuatro de los *pili* purificados (uno de *A. hydrophila* y tres de *A. sobria*) se comportaron como factores que favorecerían la colonización (Hokama y col., 1990; Hokama e Iwanaga, 1991, 1992; Iwanaga y Hokama, 1992), habiéndose comprobado capacidad hemaglutinante en tres de ellos. También, Sato y col. (1989) aíslan un *pilus* en *A. hydrophila*, aunque no logran correlacionarlo con hidrofobicidad ni hemaglutinación. Por otro lado, parece ser que las cepas enterotoxigénicas de origen fecal (*A. veronii* biotipo *sobria*) muestran menos *pili* que las cepas ambientales de la misma especie (Kirov y col., 1986) y las bajas temperaturas de crecimiento favorecen la expresión de los *pili*, independientemente del origen de la cepa (Kirov y col., 1993a,b).

IV.5.3. - Características bioquímicas de cepas diarreicas y alimentarias

Se han propuesto como indicadores de enteropatogenicidad distintas características fenotípicas, tales como la hemólisis, la descarboxilación de la lisina, la reacción Voges Proskauer, la fermentación de la arabinosa, de la salicina y del sorbitol (Burke y col., 1984b; Abeyta y col., 1986; Kirov y col., 1986; Callister y Agger, 1987). Sin embargo, Figura y col. (1986) y Kindschuch y col. (1987) han cuestionado la validez de algunos de estos caracteres como marcadores de virulencia. Carnahan y col. (1990) señalan que la actividad pirazinamidasa puede ser indicador de virulencia en *A. sobria*. Por otro lado, Namdari y Bottone (1988) relacionan el comportamiento no suicida, al crecer en presencia de 0,5% de glucosa, con la enteropatogenicidad de *A. sobria* y *A. hydrophila*. Mateos y col. (1993) consideraron que la utilización de la ramnosa y el DL-lactato dependería del origen, de modo que, ninguna cepa clínica asimilaría la ramnosa y ninguna ambiental el DL-lactato.

IV.5.3.1. - Voges Proskauer

Como se observa en la Tabla IV.42 (Véase Anexo IVa, página 188) el 60% de las cepas diarreicas y el 71,60% de las alimentarias son positivas para esta reacción. No se apreciaron diferencias significativas en la respuesta a esta reacción en función del origen, mientras que Callister y Agger (1987) afirman que se correlaciona con la citotoxicidad. Sin embargo, Janda y col. (1983b) encontraron que sólo el 42% de 12 cepas citotóxicas de *A. hydrophila*, aisladas en niños con gastroenteritis, son Voges Proskauer positivas aunque, de acuerdo con la clasificación de Popoff (1984), las cepas Voges Proskauer negativas serían *A. caviae* o *A. sobria*. Abeyta y col. (1986), al igual que Burke y col. (1983b), observaron una fuerte relación entre el carácter Voges Proskauer positivo y la enterotoxigenicidad para el ratón.

Al aplicar el esquema de identificación bioquímica empleado en este trabajo para diferenciar las especies ninguna cepa de *A. caviae* resultó Voges Proskauer positiva.

IV.5.3.2. - Descarboxilación de la lisina

Aproximadamente, el 67% de las cepas diarreicas y el 50% de las alimentarias descarboxilaron la lisina (Tabla IV.42. Véase Anexo IVa, página 188). En consecuencia, este carácter no pudo asociarse al origen de las cepas. Callister y Agger (1987) apuntan que la producción de lisina descarboxilasa es un importante indicador de actividad citotóxica. Otros autores (Cumberbatch y col., 1979; Kaper y col., 1981; Burke y col., 1983b) observaron también correlación entre este carácter fenotípico y la producción de toxinas. Sin embargo, Abeyta y col. (1986) no han detectado asociación alguna entre la descarboxilación de la lisina y la actividad citotóxica.

IV.5.3.3. - Fermentación de la arabinosa

Un 60-70% de las cepas, tanto diarreicas como alimentarias, fermentaron este azúcar, por lo que no se han apreciado diferencias significativas en función del origen (Tabla IV.42. Véase Anexo IVa, página 188). Contrariamente, Abeyta y col. (1986) y Burke y col. (1983b) relacionan la actividad enterotóxica con la incapacidad para fermentar la arabinosa y la reacción VP-positiva. Sin embargo, Mateos y col. (1993) no encuentran diferencias en la fermentación de la arabinosa entre cepas clínicas y ambientales

Después de estudiar los factores de virulencia, independientemente, en cepas diarreicas y alimentarias, se ha investigado si las asociaciones entre estos factores, descritas por otros autores como indicadores de virulencia, son capaces de diferenciar ambos grupos de cepas. En este sentido, Mittal y col. (1980) y Lallier y col. (1981) comprueban que las cepas PAB+ y Acrid- son altamente virulentas para peces, poseen un antígeno O común y mayor resistencia a la actividad bactericida del suero. En la Tabla IV.43 (Véase Anexo IVa, página 189) se observa una mayor incidencia de patrones PAB+ Acrid- entre las cepas diarreicas (20%) que entre las alimentarias (6%), aunque esta asociación no es significativa ($p < 0,1$). Janda y Brenden (1987), Paula y col. (1988) y Kokka y col. (1991a,b) encuentran un grupo de cepas autoaglutinantes con capa S y un antígeno común (O:11) implicadas en infecciones graves de hombres y animales. La Tabla IV.43 (Véase Anexo IVa, página 189) muestra que las cepas autoaglutinantes con capa S se detectaron tanto en cepas de origen diarreico como alimentario. Burke y col. (1983b) y Abeyta y col. (1986) señalan que la reacción Voges Proskauer positiva y la incapacidad para fermentar la arabinosa se correlacionan con la enterotoxigenidad. De acuerdo con la Tabla IV.43 (Véase Anexo IVa, página 189), este criterio no permitió diferenciar cepas diarreicas de alimentarias, en las condiciones de nuestra experiencia.

IV.5.4. - Asociaciones detectadas entre los factores indicadores de virulencia

Contrariamente a lo indicado por numerosos autores (Boulanger y col., 1977; Burke y col., 1984b; Turnbull y col., 1984; Agger y col., 1985; Callister y Agger, 1987), aunque coincidiendo con otros (Figura y col., 1986; Krovacek y col., 1992a), no se detectó relación entre actividad hemolítica y citotóxica.

En la Tabla IV.44 (Véase Anexo IVa, página 190) se aprecia que las cepas hemaglutinantes muestran títulos hemolíticos significativamente más altos. Considerando que la hemólisis puede constituir un indicador de enterotoxigenidad (Burke y col., 1981a; Majeed y col., 1989a), el empleo conjunto de estas dos técnicas podría diferenciar las cepas más enterotóxicas.

Las cepas con *pili* muestran mayor actividad lipolítica (Tabla IV.45. Véase Anexo IVa, página 190). La asociación de estos dos factores podría constituir un indicador de

cepas poco virulentas ya que, otros marcadores de virulencia, como la autoaglutinación, la descarboxilación de la lisina y la fermentación de la arabinosa indican que la cepas potencialmente más patógenas se asocian con baja actividad lipolítica y ausencia de *pili*.

Las cepas que presentan capa S mostraron menor adhesión al octano (Tabla IV.46. Véase Anexo IVa, página 191), pero no se diferenciaron, en la capacidad de unión a los filtros de nitrocelulosa, de las cepas carentes de capa S. Por otro lado, las cepas descarboxiladoras de la lisina presentan menor capacidad de unión a los filtros de nitrocelulosa (Tabla IV.47. Véase Anexo IVa, página 191), aunque no se apreciaron diferencias en la adhesión al octano. De acuerdo con nuestros resultados, así como los de Dooley y col. (1988), la frecuencia de capa S en *Aeromonas* spp. móviles no aumenta la hidrofobicidad. Otros factores indicadores de virulencia como la autoaglutinación, descarboxilación de la lisina y reacción Voges Proskauer se asociaron en mayor o menor grado a la hidrofobicidad.

Las cepas no aglutinantes en presencia de acriflavina muestran mayor actividad proteolítica (sobre la caseína) y capa S (Tabla IV.48. Véase Anexo IVa, página 192). Aunque la bibliografía menciona un grupo de cepas altamente virulentas provistas de capa S, autoaglutinantes y con un antígeno común (O:11), Janda y col. (1987) no encuentran una correlación clara entre autoaglutinación y presencia de capa S. La no aglutinación con acriflavina podría constituir un indicador útil para diferenciar cepas con una capa extra de naturaleza proteica en la superficie celular y, por ello, posiblemente virulentas.

La actividad proteolítica marcada se ha relacionado también con autoaglutinación y reacción Voges Proskauer positiva. Por tanto, aunque no está muy claro el papel de estas enzimas en la patogenicidad, las cepas más virulentas parecen producir o secretar más proteasas.

Para Janda y col. (1987) la autoaglutinación es un marcador de cepas altamente virulentas, aisladas de procesos invasivos. La relación de la autoaglutinación con una actividad proteolítica elevada y una lipolítica baja (Tabla IV.49. Véase Anexo IVa, página 193) indica que estas actividades se asocian a cepas potencialmente más virulentas. Las cepas autoaglutinantes fueron más hidrofóbicas, mientras que otros indicadores de virulencia (descarboxilación de la lisina y presencia de capa S) se asocian a escasa hidrofocidad, sin olvidar que, tal y como se ha expuesto anteriormente, las cepas de

origen diarreico mostraron menor capacidad de adhesión al octano que las cepas alimentarias.

El fracaso para fermentar la arabinosa y, especialmente, la reacción Voges Proskauer positiva fueron los factores asociados a alta actividad citotóxica (sobre células de mieloma). Además, las cepas no fermentadoras de la arabinosa se asociaron a una baja actividad lipolítica, menor presencia de *pili*, capacidad hemaglutinante y descarboxilación de la lisina (Tabla IV.50. Véase Anexo IVa, página 194), indicando que la no fermentación de la arabinosa podría seleccionar las cepas con más posibilidades de ser virulentas.

La reacción Voges Proskauer positiva es la que se asocia al mayor número de factores de virulencia (Tabla IV.51. Véase Anexo IVa, página 195). Además, es el indicador más relacionado con las actividades citotóxica y hemolítica. También se asocia claramente a la actividad proteolítica, autoaglutinación, hemaglutinación, aglutinación con acriflavina, descarboxilación de la lisina e hidrofobicidad. Las cepas Voges Proskauer positivas muestran menor capacidad de unión a los filtros de nitrocelulosa y más adsorción al octano, indicando que, aunque las cepas de *Aeromonas* se pueden considerar hidrofóbicas por ambos métodos, estos no diferencian las que lo son en mayor grado.

La reacción Voges Proskauer positiva, al ser empleada en la identificación de especies, excluye las cepas de *A. caviae*. Como ya se ha indicado, esta especie es deficitaria para un importante número de factores de virulencia y se considera menos virulenta que *A. hydrophila* y *A. sobria* (Burke y col., 1984b; Callister y Agger, 1987; Correa y col., 1993).

Se puede deducir, de acuerdo con nuestros resultados, que la reacción Voges Proskauer informa, en cierta medida, sobre la patogenicidad potencial de *Aeromonas* spp. móviles, como previamente ya han señalado Burke y col. (1983b), Abeyta y col. (1986) y Callister y Agger (1987).

Sería necesario determinar la implicación real de cada uno de estos factores con la virulencia para escoger el indicador más adecuado. Hay que tener en cuenta que estos factores de virulencia se han detectado tanto en cepas diarreicas como alimentarias, por lo que, estas últimas podrían ser, potencialmente, tan peligrosas como las diarreicas.

IVa. ANEXO (Tablas y Figuras)

Tabla IV.1. - Recuento de la flora natural presente en diversos alimentos sobre los medios ensayados

Alimentos	TSA	AAA		mA		AGAP	
	(a)	(a)	(b)	(a)	(b)	(a)	(b)
Agua clorada	1	N.D.		N.D.		N.D.	
Leche cruda	5,64	5,11	(90,60)	2,39	(42,37)	5,11	(90,60)
Carne vacuno	7,51	4,17	(55,52)	3,77	(50,19)	4,11	(54,72)
Carne pollo	5,95	4,61	(77,47)	4,00	(67,22)	4,41	(74,11)
Carne cerdo	6,13	4,20	(68,51)	4,39	(71,61)	4,20	(68,51)
Pescadilla	4,88	3,90	(79,91)	3,21	(65,77)	3,93	(80,53)
Trucha	4,66	3,73	(80,04)	3,23	(69,31)	3,37	(72,31)
Chirlas	4,95	3,53	(71,31)	2,77	(55,95)	3,43	(69,29)
Gambas	6,84	5,76	(84,21)	4,84	(70,76)	5,90	(86,25)
\bar{X}	5,82	4,37	(75,94)	3,57	(61,64)	4,30	(74,54)
D.S.	1	0,75	(10,76)	0,82	(10,85)	0,84	(11,29)

N.D. - Crecimiento no detectado

(a). - Expresado en log. ufc/ml. o g. de alimento

(b). - Porcentaje de recuperación

TSA. - Agar triptona soja

AAA. - Agar almidón ampicilina

mA. - Medio de Ryan (Unipath)

AGAP. - Agar glutamato almidón penicilina

\bar{X} . - Media aritmética

D.S. - Desviación estándar

Tabla IV.2 - Recuentos obtenidos en diversos alimentos inoculados con *Aeromonas* spp. móviles (cepas 839, 398, 837 y 838) sobre los medios ensayados

<u>Alimentos</u>	<u>N.I.</u>	<u>AAA</u>		<u>mA</u>		<u>AGAP</u>	
	(a)	(a)	(b)	(a)	(b)	(a)	(b)
Agua clorada	7,62	6,24	(81,88)	7,38	(96,85)	6,26	(82,21)
Leche cruda	7,48	5,94	(79,41)	7,02	(93,85)	6,01	(80,34)
Carne vacuno	7,47	5,80	(77,64)	6,95	(93,03)	5,86	(78,44)
Carne pollo	7,2	5,85	(81,25)	6,66	(92,50)	5,70	(79,16)
Carne cerdo	7,02	5,63	(80,19)	6,64	(94,58)	5,68	(80,91)
Pescadilla	6,95	5,56	(80,00)	6,60	(94,96)	5,61	(80,71)
Trucha	6,93	5,58	(80,51)	6,34	(91,48)	5,52	(79,65)
Chirlas	7,03	5,58	(79,37)	6,63	(94,31)	5,60	(79,65)
Gambas	6,82	5,45	(79,91)	6,51	(95,45)	5,47	(80,20)
\bar{X}	7,16	5,73	(80,01)	6,74	(94,11)	5,74	(80,14)
D.S.	0,28	0,24	(1,21)	0,31	(1,62)	0,25	(1,09)

N.I. - Nivel de inoculación

(a). - Expresado en log. ufc/ml. o g. de alimento

(b). - Porcentaje de recuperación

AAA. - Agar almidón ampicilina

mA. - Medio de Ryan (Unipath)

AGAP. - Agar glutamato almidón penicilina

\bar{X} . - Media aritmética

D.S. - Desviación estándar

Tabla IV.3 - Recuentos obtenidos en diversos alimentos inoculados con *A. hydrophila* CECT 839 sobre los medios ensayados

Alimentos	N.I.	AAA		mA		AGAP	
	(a)	(a)	(b)	(a)	(b)	(a)	(b)
Agua clorada	6,93	6,76	(97,54)	6,59	(95,09)	6,66	(96,10)
Leche cruda	7,42	6,91	(93,12)	6,78	(91,37)	6,91	(93,12)
Carne vacuno	7,37	7,07	(95,92)	6,89	(93,48)	7,17	(97,28)
Carne pollo	7,3	6,90	(94,52)	6,70	(91,78)	6,85	(93,83)
Carne cerdo	7,31	7,00	(95,75)	6,72	(91,92)	7,04	(96,30)
Pescadilla	7,21	6,95	(96,39)	6,69	(92,78)	6,92	(95,97)
Trucha	7,19	7,07	(98,33)	6,61	(91,93)	6,79	(94,43)
Chirlas	7,2	6,82	(94,72)	6,64	(92,22)	6,82	(94,72)
Gambas	7,16	6,90	(96,36)	6,75	(94,27)	6,86	(95,81)
\bar{X}	7,23	6,93	(95,85)	6,70	(92,76)	6,89	(95,28)
D.S.	0,14	0,10	(1,58)	0,09	(1,26)	0,14	(1,33)

N.I. - Nivel de inoculación

(a). - Expresado en log. ufc/ml. o g. de alimento

(b). - Porcentaje de recuperación

AAA. - Agar almidón ampicilina

mA. - Medio de Ryan (Unipath)

AGAP. - Agar glutamato almidón penicilina

\bar{X} . - Media aritmética

D.S. - Desviación estándar

Tabla IV.4 - Recuentos obtenidos en diversos alimentos inoculados con *A. hydrophila* CECT 398 sobre los medios ensayados

Alimentos	N.I.	AAA		mA		AGAP	
	(a)	(a)	(b)	(a)	(b)	(a)	(b)
Agua clorada	7,94	7,65	(96,34)	7,67	(96,59)	7,69	(96,85)
Leche cruda	7,45	7,00	(93,95)	6,85	(91,94)	6,95	(93,28)
Carne vacuno	7,52	7,07	(94,01)	6,92	(92,02)	7,07	(94,01)
Carne pollo	7,06	6,66	(94,33)	6,50	(92,06)	6,57	(93,05)
Carne cerdo	6,99	6,80	(97,28)	6,82	(97,56)	6,83	(97,71)
Pescadilla	6,93	6,76	(97,54)	6,72	(96,96)	6,73	(97,11)
Trucha	6,96	6,83	(98,13)	6,34	(91,09)	6,90	(99,13)
Chirlas	7,81	7,32	(93,72)	7,23	(92,57)	7,25	(92,82)
Gambas	6,92	6,69	(96,67)	6,65	(96,09)	6,61	(95,52)
\bar{X}	7,28	6,97	(95,77)	6,85	(94,09)	6,95	(95,49)
D.S.	0,4	0,32	(1,76)	0,39	(2,61)	0,34	(2,31)

N.I. - Nivel de inoculación

(a). - Expresado en log. ufc/ml. o g. de alimento

(b). - Porcentaje de recuperación

AAA. - Agar almidón ampicilina

mA. - Medio de Ryan (Unipath)

AGAP. - Agar glutamato almidón penicilina

\bar{X} . - Media aritmética

D.S. - Desviación estándar

Tabla IV.5 - Recuentos obtenidos en diversos alimentos inoculados con *A. caviae* CECT 838 sobre los medios ensayados

Alimentos	N.I.	AAA		mA		AGAP	
	(a)	(a)	(b)	(a)	(b)	(a)	(b)
Agua clorada	7,79	7,56	(97,04)	7,68	(98,58)	7,61	(97,68)
Leche cruda	7,43	6,92	(93,13)	7,04	(94,75)	6,91	(93,00)
Carne vacuno	7,48	6,85	(91,57)	6,50	(86,89)	6,89	(92,11)
Carne pollo	6,89	6,69	(97,09)	6,43	(93,32)	6,46	(93,75)
Carne cerdo	7,26	6,88	(94,76)	6,87	(94,62)	6,89	(94,90)
Pescadilla	7,24	6,83	(94,33)	6,93	(95,71)	6,87	(94,88)
Trucha	7,18	6,63	(92,33)	6,55	(91,22)	6,57	(91,50)
Chirlas	6,82	6,64	(97,36)	6,61	(96,92)	6,71	(98,38)
Gambas	6,88	6,46	(93,89)	6,60	(95,93)	6,55	(95,20)
\bar{X}	7,21	6,82	(94,61)	6,80	(94,21)	6,82	(94,60)
D.S.	0,32	0,31	(2,14)	0,39	(3,45)	0,33	(2,32)

N.I. - Nivel de inoculación

(a). - Expresado en log. ufc/ml. o g. de alimento

(b). - Porcentaje de recuperación

AAA. - Agar almidón ampicilina

mA. - Medio de Ryan (Unipath)

AGAP. - Agar glutamato almidón penicilina

\bar{X} . - Media aritmética

D.S. - Desviación estándar

Tabal IV.6 - Recuentos obtenidos en diversos alimentos inoculados con *A. sobria* CECT 837 sobre los medios ensayados

Alimentos	N.I.	AAA		mA		AGAP	
	(a)	(a)	(b)	(a)	(b)	(a)	(b)
Agua clorada	7,85	3,01	(38,34)	7,58	(96,56)	3,10	(39,49)
Leche cruda	7,65	2,93	(38,38)	7,44	(97,25)	3,27	(42,74)
Carne vacuno	7,52	2,23	(29,65)	7,49	(99,60)	2,33	(30,98)
Carne pollo	7,55	3,16	(41,85)	7,04	(93,24)	2,94	(38,94)
Carne cerdo	6,55	1,87	(28,84)	6,17	(94,92)	1,98	(30,46)
Pescadilla	6,44	1,73	(26,94)	6,07	(94,25)	1,95	(30,27)
Trucha	6,39	1,79	(28,01)	5,86	(91,70)	1,84	(28,79)
Chirlas	6,3	1,56	(24,76)	6,04	(95,87)	1,64	(26,03)
Gambas	6,33	1,76	(27,80)	6,07	(95,98)	1,87	(29,54)
\bar{X}	6,95	2,22	(31,61)	6,64	(95,48)	2,32	(33,02)
D.S.	0,66	0,63	(6,16)	0,72	(2,31)	0,61	(5,79)

N.I. - Nivel de inoculación

(a). - Expresado en log. ufc/ml. o g. de alimento

(b). - Porcentaje de recuperación

AAA. - Agar almidón ampicilina

mA. - Medio de Ryan (Unipath)

AGAP. - Agar glutamato almidón penicilina

\bar{X} . - Media aritmética

D.S. - Desviación estándar

Tabla IV.7 - Antibiograma de las cepas CECT 839, 398, 837 y 838 de *Aeromonas* spp. móviles

Antibióticos	<i>A. caviae</i> 838		<i>A. sobria</i> 837		<i>A. hydrophila</i> 398		<i>A. hydrophila</i> 839	
	(a)	(b)	(a)	(b)	(a)	(b)	(a)	(b)
Ac. nalidíxico 30 µg.	28	S	31	S	26	S	28	S
Tetraciclina 30 µg.	21	S	24	S	21	S	21	S
Estreptomina 10 g.	16	S	24	S	17	S	20	S
Oxacilina 1 µg.	0	R	0	R	0	R	0	R
Neomicina 30 µg.	16	I	22	S	16	I	20	R
Cefoxitina 30 µg.	13	R	32	S	30	S	15	I
Polimixina B 300 U.I.	11	I	11	I	11	I	11	I
Lincomicina 2 µg.	0	R	0	R	0	R	0	R
Ampicilina 10 µg.	0	R	16	S	0	R	0	R
Penicilina G 10 U.I.	0	R	12	I	0	R	0	R
Cloranfenicol 30 µg.	26	S	35	S	28	S	32	S
Sulfisoxazol 300 µg.	19	S	29	S	21	S	19	S
Gentamicina 10 µg.	18	S	22	S	18	S	20	S
Nitrofurantoina 300 µg.	18	S	21	S	17	S	22	S
Kanamicina 30 µg.	19	S	22	S	19	S	19	S
Cefalotina 30 µg.	0	R	17	I	22	S	0	R
Trimetropim-sulfametoxazol 25 µg.	18	S	32	S	25	S	25	S
Eritromicina 15 µg.	16	I	25	S	17	I	18	S
Bacitracina 10 U.I.	0	R	0	R	0	R	0	R
Novobiocina 30 µg.	9	R	14	R	9	R	10	R

(a).- Diámetro del halo de inhibición (mm.)

(b).- Calificaciones: R-resistente; I-intermedio; S-sensible

Tabla IV.8 - Recuentos de *A. sobria* CECT 837 sobre los medios selectivos con diferentes concentraciones de antibióticos

<u>Medios</u>	<u>Antibiótico</u>	<u>Concentración</u>	<u>Recuento (log ufc/ml)</u>	<u>Porcentaje de recuperación</u>
TSA			8,01	100
AAA	Ampicilina	0 mg./l.	7,99	99,75
AAA	Ampicilina	5 mg./l.	2,91	36,32
AAA*	Ampicilina	10 mg./l.	2,74	34,2
mA	Ampicilina	0 mg./l.	7,72	96,37
mA*	Ampicilina	5 mg./l.	7,45	93
mA	Ampicilina	10 mg./l.	2,64	32,95
AGAP	Penicilina Pimaricina	0 U.I./l. 0 mg./l.	7,93	99
AGAP	Penicilina Pimaricina	0 U.I./l. 10 mg./l.	7,92	98,87
AGAP*	Penicilina Pimaricina	100.000 U.I./l. 10 mg./l.	2,96	36,95

*.- Concentraciones de antibióticos indicadas en las fórmulas originales de los medios.

TSA.- Agar triptona soja

AAA. - Agar almidón ampicilina

mA. - Medio de Ryan (Unipath)

AGAP. - Agar glutamato almidón penicilina

Tabla IV.9 - Recuperación de *A. sobria* CECT 837 sobre los medios mA y AGAP con distintas concentraciones de penicilina G sódica

<u>Medios</u>	<u>Antibiótico</u>	<u>Concentración</u>	<u>Recuento (log ufc/ml)</u>	<u>Porcentaje de recuperación</u>
TSA			8,38	100
mA	Penicilina	0	7,85	93,67
mA	Penicilina	25.000 U.I./l.	3,9	46,53
mA	Penicilina	50.000 U.I./l.	3,2	38,18
mA	Penicilina	75.000 U.I./l.	3,21	38,3
mA	Penicilina	100.000 U.I./l.	3,17	37,82
AGAP	Penicilina	0	7,84	93,55
AGAP	Penicilina	25.000 U.I./l.	3,04	36,27
AGAP	Penicilina	50.000 U.I./l.	2,9	34,6
AGAP	Penicilina	75.000 U.I./l.	2,81	33,53
AGAP	Penicilina	100.000 U.I./l.	2,93	34,96

TSA.- Agar triptona soja

mA. - Medio de Ryan (Unipath)

AGAP. - Agar glutamato almidón penicilina

Tabla IV.10 - Efecto de la interacción ampicilina-rojo fenol sobre la recuperación de *A. sobria* CECT 837 en los medios mA y AGAP

<u>Medios</u>	<u>Concentración de ampicilina</u>	<u>Concentración de rojo fenol</u>	<u>Recuento (log ufc/ml)</u>	<u>Porcentaje de recuperación</u>
TSA	0 mg/l.	0 mg/l.	9,32	100
mA	5 mg/l.	0,25 mg/l.	9,33	100,1
mA	5 mg/l.	0 mg/l.	9,2	98,71
AAA	5 mg/l.	0,25 mg/l.	3,77	40,45
AAA	5 mg/l.	0 mg/l.	3,89	41,73

TSA.- Agar triptona soja

mA. - Medio de Ryan (Unipath)

AAA. - Agar almidón ampicilina

Tabla IV.11 - Efecto de la interacción ampicilina-pH sobre la recuperación de *A. sobria* CECT 837 en los medios mA y AAA

Medios	Concentración de ampicilina	pH	Recuento (log ufc/ml)	Porcentaje de recuperación
ATS	0 mg./l.	7,2	7,38	100
mA	5 mg./l.	7	6,65	90,1
mA	5 mg./l.	8	7,98	108,13
AAA	5 mg./l.	7	3,38	45,79
AAA	5 mg./l.	8	3,6	48,78

TSA.- Agar triptona soja

mA.- Medio de Ryan (Unipath)

AAA.- Agar almidón ampicilina

Tabla IV.12 - Efecto de la interacción ampicilina-xilosa sobre la recuperación de *A. sobria* CECT 837 en los medios mA y AAA

Medios	Concentración de ampicilina	Concentración de xilosa	Recuento (log ufc/ml)	Porcentaje de recuperación
TSA	0 mg/l.	0 g/l.	7,56	100
mA	5 mg/l.	3,75 g/l.	7,49	99,07
AAA	5 mg/l.	3,75 g/l.	2,81	37,16
AAA	5 mg/l.	0 g/l.	2,8	37,03

TSA.- Agar triptona soja

mA.- Medio de Ryan (Unipath)

AAA.- Agar almidón ampicilina

Tabla IV.13 - Efecto de la interacción ampicilina-lisina libre-arginina libre sobre la recuperación de *A. sobria* CECT 837 en los medios mA y AAA

<u>Medios</u>	<u>Concentración de ampicilina</u>	<u>Concentración de lisina libre</u>	<u>Concentración de arginina libre</u>	<u>Recuento (log ufc/ml)</u>	<u>Porcentaje de recuperación</u>
TSA	0 mg./l.	0 g./l..	0 g./l.	7,88	100
mA	5 mg./l.	3,5 g./l.	2 g./l.	8,01	101,64
AAA	5 mg./l.	3,5 g./l.	0 g./l.	2,99	37,94
AAA	5 mg./l.	0 g./l.	2 g./l.	2,74	34,77
AAA	5 mg./l.	3,5 g./l.	2 g./l.	2,63	33,37
AAA	5 mg./l.	0 g./l..	0 g./l..	2,61	33,12

TSA.- Agar triptona soja

mA.- Medio de Ryan (Unipath)

AAA.- Agar almidón ampicilina

Tabla IV.14 - Efecto de la interacción ampicilina-extracto de levadura sobre la recuperación *A. sobria* CECT 837 en los medios mA y AAA

<u>Medios</u>	<u>Concentración de ampicilina</u>	<u>Concentración de extracto de levadura</u>	<u>Recuento (log ufc/ml)</u>	<u>Porcentaje de recuperación</u>
TSA	0 mg./l.	0 g./l.	7,41	100
mA	5 mg./l.	3 g./l.	7,23	97,57
AAA	5 mg./l.	3 g./l.	3,39	45,74
AAA	5 mg./l.	0 g./l.	3,39	45,74

TSA.- Agar triptona soja

mA.- Medio de Ryan (Unipath)

AAA.- Agar almidón ampicilina

Tabla IV.15 - Incidencia de *Aeromonas* spp. en diferentes alimentos analizados el día de su adquisición en el mercado

Alimentos	N° muestras examinadas	N° muestras con:				
		<i>Aeromonas</i> spp. móviles	<i>A. hydrophila</i>	<i>A. caviae</i>	<i>A. sobria</i>	<i>Aeromonas</i> no clasificadas
Agua potable clorada	2	0	0	0	0	0
Agua potable no clorada	3	0	0	0	0	0
Agua no potable	7	5 (71,42%)	3	0	2	1
Carnes (total)	20	12 (60%)	6	1	6	5
Cerdo	5	2	2	1	2	0
Cordero	5	3	1	0	1	2
Vaca	5	2	1	0	0	0
Pollo	5	5 (100%)	2	0	3	3
Pescados (total)	25	9 (36%)	6	0	2	5
Trucha	5	1	1	0	1	0
Pescadilla	5	3	2	0	0	3
Jurel	5	4	3	0	1	1
Sardina	5	1	0	0	0	1
Gallo	5	0	0	0	0	0
Mariscos (total)	20	9 (45%)	4	3	4	1
Chirla	5	3	2	0	2	0
Gamba	5	2	1	1	1	0
Cigala	5	1	0	0	0	1
Mejillón	5	3	1	2	1	0
Lácteos (total)	10	2 (20%)	1	0	0	1
Leche cruda	5	1	1	0	0	0
Queso fresco	5	1	0	0	0	1
Ensaladas preparadas	5	0 (0%)	0	0	0	0
Total	92	37 (40,21)	20 (21,73%)	4 (4,34%)	14 (15,21%)	13 (14,13%)

*. - Con frecuencia, diferentes especies se aislaron de una misma muestra

Tabla IV.16 - Incidencia de *Aeromonas* spp. en alimentos almacenados a 10°C, durante diferentes periodos de tiempo

Alimentos	Tiempo (h.) a 10°C	N° muestras examinadas	N° muestras con:				<i>Aeromonas</i> no clasificadas
			<i>Aeromonas</i> spp. móviles	<i>A. hydrophila</i>	<i>A. caviae</i>	<i>A. sobria</i>	
Agua potable clorada	168	2	0	0	0	0	0
Agua potable no clorada	168	3	0	0	0	0	0
Agua no potable	168	7	6 (86%)	3	0	2	2
Carnes (total)		20	14 (70%)	8	2	7	7
Cerdo	48-96	5	3	2	1	2	1
Cordero	96-120	5	3	1	1	2	2
Vaca	72-96	5	3	3	0	0	0
Pollo	24-96	5	5 (100%)	2	0	3	4
Pescados (total)		25	15 (60%)	10	0	2	6
Trucha	48-72	5	2	1	0	1	0
Pescadilla	48	5	4	3	0	0	3
Jurel	48-72	5	5	4	0	1	1
Sardina	48	5	2	1	0	0	1
Gallo	48-96	5	2	1	0	0	1
Mariscos (total)		20	12 (60%)	6	3	5	2
Chirla	48-96	5	4 (90%)	2	0	3	0
Gamba	48-96	5	2	1	1	1	0
Cigala	24-48	5	2	0	0	0	2
Mejillón	48-96	5	4 (90%)	3	2	1	0
Lácteos (total)		10	2 (20%)	1	0	0	1
Leche cruda	48-72	5	1	1	0	0	0
Queso fresco	72-120	5	1	0	0	0	1
Ensaladas preparadas	48-120	5	0 (0%)	0	0	0	0
Total		92	49 (53,26%)	28 (30,43%)	5 (5,43%)	16 (17,39%)	18 (19,56%)

*. - Con frecuencia, diferentes especies se aislaron de una misma muestra

Tabla IV.17 - Distribución, según especie, de las cepas aisladas en diferentes alimentos

Alimentos	<i>Aeromonas</i> spp. móviles	<i>A. hydrophila</i>	<i>A. caviae</i>	<i>A. sobria</i>	<i>Aeromonas</i> no clasificadas
Agua potable clorada	0	0	0	0	0
Agua potable no clorada	0	0	0	0	0
Agua no potable	9	5	0	2	2
Carnes (total)	33	10	2	8	13
Cerdo	10	4	1	3	2
Cordero	7	1	1	2	3
Vaca	3	3	0	0	0
Pollo	13	2	0	3	8
Pescados (total)	18	10	0	2	6
Trucha	2	1	0	1	0
Pescadilla	6	3	0	0	3
Jurel	6	4	0	1	1
Sardina	2	1	0	0	1
Gallo	2	1	0	0	1
Mariscos (total)	17	6	4	5	2
Chirla	5	2	0	3	0
Gamba	3	1	1	1	0
Cigala	2	0	0	0	2
Mejillón	7	3	3	1	0
Lácteos (total)	4	1	0	0	3
Leche cruda	1	1	0	0	0
Queso fresco	3	0	0	0	3
Ensaladas preparadas	0	0	0	0	0
Total	81	32 (39,50)	6 (7,40)	17 (20,98)	26 (32,09)

Tabla IV.18 - Recuentos de los controles de suero fisiológico, contaminados con seis cepas diarreas y seis alimentarias, no sometidos a la cloración

Cepas de <i>Aeromonas</i> spp.	Origen	Recuento (ufc/ml)
<i>A. hydrophila</i> 6	Heces diarreas	$2,26 \times 10^3$
<i>A. hydrophila</i> 9	Heces diarreas	$1,20 \times 10^3$
<i>A. sobria</i> 11	Heces diarreas	$4,30 \times 10^2$
<i>A. sobria</i> 13	Heces diarreas	$3,10 \times 10^3$
<i>A. caviae</i> 16	Heces diarreas	$8,54 \times 10^2$
<i>A. caviae</i> 18	Heces diarreas	$4,60 \times 10^2$
<i>A. hydrophila</i> 55	Carne de cerdo	$8,10 \times 10^2$
<i>A. hydrophila</i> 96	Mejillones	$2,47 \times 10^3$
<i>A. sobria</i> 34	Carne de cordero	$4,40 \times 10^3$
<i>A. sobria</i> 92	Gambas	$3,02 \times 10^3$
<i>A. caviae</i> 54	Carne de cerdo	$1,17 \times 10^2$
<i>A. caviae</i> 97	Mejillones	$3,67 \times 10^3$

Tabla IV.19 - Influencia de la temperatura en el crecimiento de seis cepas diarreicas y seis alimentarias de *Aeromonas* spp. móviles a pH 7, 0,5% de cloruro sódico y diferentes tiempos de incubación

Temperatura (°C)	Horas de Incubación	Origen	Parámetros de crecimiento					
			D		P		g	M
			Horas	Nº cepas	Horas	Nº cepas		
4	384	Diarreico	236,97	2	N.D.	0	19,235	0,179
		Alimentario	188,78	5	236,5	4	9,254	0,585
10	216	Diarreico	61,05	6	104,778	6	5,772	0,871
		Alimentario	58,76	6	94,17	6	4,678	1,024
28	48	Diarreico	8,33	6	13,296	6	0,652	0,839
		Alimentario	8,79	6	14,467	6	0,747	0,745
37	48	Diarreico	8,82	6	17,01	0	0,95	0,336
		Alimentario	10,53	5	ND	0	1,362	0,25
45	384	Diarreico	ND	0	ND	0	ND	ND
		Alimentario	ND	0	ND	0	ND	ND

D: Tiempo (horas) que tarda en detectarse crecimiento; P: Tiempo (horas) necesario para alcanzar una tasa bacteriana de 1E9 ufc/ml; g: Tiempo de generación (media de los valores registrados en las cepas que crecieron); M: Máxima absorbancia detectada durante la incubación (media de los valores registrados en las cepas que crecieron); ND: Crecimiento no detectado

Tabla IV.20 - Influencia de la concentración de cloruro sódico en el crecimiento de seis cepas diarreicas y seis alimentarias de *Aeromonas* spp. móviles a pH 7, 28°C y diferentes tiempos de incubación

ClNa (%)	Horas de Incubación	Origen	Parámetros de crecimiento					
			D		P		g	M
			Horas	N° cepas	Horas	N° cepas		
0,5	48	Diarreico	8,78	6	12,87	6	0,536	0,837
		Alimentario	9,44	6	14,368	6	0,648	0,772
2,5	48	Diarreico	12,58	6	18,08	6	0,72	0,66
		Alimentario	13,53	6	19,237	6	0,75	0,577
4,5	384	Diarreico	51,04	3	ND	0	14,995	0,199
		Alimentario	58,16	3	ND	0	14,227	0,22
6,5	384	Diarreico	ND	0	ND	0	ND	ND
		Alimentario	ND	0	ND	0	ND	ND

D: Tiempo (horas) que tarda en detectarse crecimiento; P: Tiempo (horas) necesario para alcanzar una tasa bacteriana de 1E9 ufc/ml; g: Tiempo de generación (media de los valores registrados en las cepas que crecieron); M: Máxima absorbancia detectada durante la incubación (media de los valores registrados en las cepas que crecieron); ND: Crecimiento no detectado

Tabla IV.21 - Influencia del pH en el crecimiento de seis cepas diarreicas y seis alimentarias de *Aeromonas* spp. móviles a 28°C, 0,5% de cloruro sódico y diferentes tiempos de incubación

pH	Horas de Incubación	Origen	Parámetros de crecimiento						
			D		P		g	M	
			Horas	Nº cepas	Horas	Nº cepas			
3,5	384	Diarreico	ND	0	ND	0	ND	ND	
		Alimentario	ND	0	ND	0	ND	ND	
4,5	384	Diarreico	ND	0	ND	0	ND	ND	
		Alimentario	58,53	2	ND	0	10,65	0,249	
6	48	Diarreico	10,31	6	14,15	4	0,73	0,802	
		Alimentario	11,18	6	16,63	5	0,82	0,694	
7	48	Diarreico	8,64	6	12,92	6	0,56	0,831	
		Alimentario	9,08	6	14,1	6	0,66	0,755	
8,5	48	Diarreico	8,9	6	12,66	6	0,49	0,91	
		Alimentario	8,41	6	12,77	6	0,57	0,985	

D: Tiempo (horas) que tarda en detectarse crecimiento; P: Tiempo (horas) necesario para alcanzar una tasa bacteriana de 1E9 ufc/ml; g: Tiempo de generación (media de los valores registrados en las cepas que crecieron); M: Máxima absorbancia detectada durante la incubación (media de los valores registrados en las cepas que crecieron); ND: Crecimiento no detectado

Tabla IV.22 - Influencia de la concentración de nitrito sódico en el crecimiento de seis cepas diarreicas y seis alimentarias de *Aeromonas* spp. móviles a 28°C, pH 7, 0,5% de cloruro sódico y diferentes tiempos de incubación

Nitrito sódico (µg/ml)	Horas de Incubación	Origen	Parámetros de crecimiento					
			D		P		g	M
			Horas	Nº cepas	Horas	Nº cepas		
0	48	Diarreico	8,53	6	13,05	6	0,59	0,847
		Alimentario	9,08	6	15,33	6	0,83	0,843
63	48	Diarreico	8,48	6	12,92	6	0,58	0,812
		Alimentario	9,2	6	15,34	6	0,81	0,919
125	48	Diarreico	8,55	6	13,6	5	0,66	0,815
		Alimentario	9,71	6	16,18	6	0,85	0,897
250	48	Diarreico	9,05	6	14,83	4	0,76	0,774
		Alimentario	10,05	6	17,61	6	1,00	0,683
500	168	Diarreico	12,71	6	19,81	3	0,94	0,691
		Alimentario	13,42	6	21,58	2	1,08	0,589
1000	168	Diarreico	22,93	4	42,66	2	2,61	0,415
		Alimentario	23,17	6	37,45	1	1,89	0,335

D: Tiempo (horas) que tarda en detectarse crecimiento; P: Tiempo (horas) necesario para alcanzar una tasa bacteriana de 1E9 ufc/ml; g: Tiempo de generación (media de los valores registrados en las cepas que crecieron); M: Máxima absorbancia detectada durante la incubación (media de los valores registrados en las cepas que crecieron)

Tabla IV.23 - Crecimiento de seis cepas diarreas y seis alimentarias de *Aeromonas* spp. móviles, frente a diferentes combinaciones de cloruro sódico, pH y nitrito sódico a 4°C

Condiciones de cultivo						cepas diarreas						cepas alimentarias					
N°	Temp.	ClNa (%)	pH	NO ₂ Na (µg/ml)	Horas incub.	D		P		g	M	D		P		g	M
						horas	N° cepas	horas	N° cepas			horas	N° cepas	horas	N° cepas		
1	4°C	0,5	6	0	384	ND	0/6	ND	0/6	ND	ND	ND	0/6	ND	0/6	ND	ND
2	4°C	0,5	6	62	384	ND	0/6	ND	0/6	ND	ND	ND	0/6	ND	0/6	ND	ND
3	4°C	0,5	6	125	384	ND	0/6	ND	0/6	ND	ND	ND	0/6	ND	0/6	ND	ND
4	4°C	0,5	6	250	384	ND	0/6	ND	0/6	ND	ND	ND	0/6	ND	0/6	ND	ND
5	4°C	0,5	6	500	384	ND	0/6	ND	0/6	ND	ND	ND	0/6	ND	0/6	ND	ND
6	4°C	0,5	6	1000	384	ND	0/6	ND	0/6	ND	ND	ND	0/6	ND	0/6	ND	ND
7	4°C	0,5	7	0	384	290,01	2/6	ND	0/6	22,12	0,162	221,16	5/6	255,82	4/6	7,85	0,488
8	4°C	0,5	7	62	384	ND	0/6	ND	0/6	ND	ND	224,28	5/6	274,13	4/6	9,34	0,688
9	4°C	0,5	7	125	384	ND	0/6	ND	0/6	ND	ND	241,36	5/6	287,61	3/6	10,67	0,652
10	4°C	0,5	7	250	384	ND	0/6	ND	0/6	ND	ND	270,88	4/6	316,70	2/6	14,34	0,527
11	4°C	0,5	7	500	384	ND	0/6	ND	0/6	ND	ND	342,38	1/6	ND	0/6	23,07	0,175
12	4°C	0,5	7	1000	384	ND	0/6	ND	0/6	ND	ND	ND	0/6	ND	0/6	ND	ND
13	4°C	0,5	8,5	0	384	288,11	3/6	368,60	1/6	10,15	0,394	207,34	6/6	239,43	5/6	8,54	0,755
14	4°C	0,5	8,5	62	384	318,18	3/6	377,20	1/6	13,67	0,334	214,52	6/6	247,01	5/6	9,85	0,746
15	4°C	0,5	8,5	125	384	313,80	3/6	ND	0/6	15,92	0,287	235,01	6/6	268,49	5/6	9,84	0,694
16	4°C	0,5	8,5	250	384	328,45	3/6	ND	0/6	23,42	0,223	239,98	6/6	258,87	4/6	11,56	0,645
17	4°C	0,5	8,5	500	384	330,51	3/6	ND	0/6	22,04	0,200	243,33	6/6	268,78	4/6	13,67	0,544

(continúa)

D: Tiempo (horas) que tarda en detectarse crecimiento; P: Tiempo (horas) necesario para alcanzar una tasa bacteriana de 1E9 ufc/ml.; g: Tiempo (horas) de generación (media de los valores registrados en las cepas que crecieron); M: Máxima absorbancia detectada (media de los valores registrados en las cepas que crecieron); ND: Crecimiento no detectado; En negrita las diferencias del número de cepas D y P en función de su origen (diarreico o alimentario)

Tabla IV.23 (continuación)

Condiciones de cultivo						cepas diarreicas						cepas alimentarias					
N°	Temp.	ClNa (%)	pH	NO ₂ Na (µg/ml)	Horas incub.	D		P		g	M	D		P		g	M
						horas	N° cepas	horas	N° cepas			horas	N° cepas	horas	N° cepas		
18	4°C	0,5	8,5	1000	384	338,15	1/6	ND	0/6	21,86	0,150	267,08	5/6	308,37	4/6	19,58	0,407
19	4°C	2,5	6	0	384	ND	0/6	ND	0/6	ND	ND	ND	0/6	ND	0/6	ND	ND
20	4°C	2,5	6	62	384	ND	0/6	ND	0/6	ND	ND	ND	0/6	ND	0/6	ND	ND
21	4°C	2,5	6	125	384	ND	0/6	ND	0/6	ND	ND	ND	0/6	ND	0/6	ND	ND
22	4°C	2,5	6	250	384	ND	0/6	ND	0/6	ND	ND	ND	0/6	ND	0/6	ND	ND
23	4°C	2,5	6	500	384	ND	0/6	ND	0/6	ND	ND	ND	0/6	ND	0/6	ND	ND
24	4°C	2,5	6	1000	384	ND	0/6	ND	0/6	ND	ND	ND	0/6	ND	0/6	ND	ND
25	4°C	2,5	7	0	384	325,99	2/6	ND	0/6	36,18	0,116	272,99	2/6	361,92	2/6	11,76	0,475
26	4°C	2,5	7	62	384	ND	0/6	ND	0/6	ND	ND	245,15	4/6	286,44	2/6	12,42	0,540
27	4°C	2,5	7	125	384	ND	0/6	ND	0/6	ND	ND	250,18	3/6	294,58	2/6	9,98	0,664
28	4°C	2,5	7	250	384	ND	0/6	ND	0/6	ND	ND	313,32	3/6	ND	0/6	20,51	0,236
29	4°C	2,5	7	500	384	ND	0/6	ND	0/6	ND	ND	ND	0/6	ND	0/6	ND	ND
30	4°C	2,5	7	1000	384	ND	0/6	ND	0/6	ND	ND	ND	0/6	ND	0/6	ND	ND
31	4°C	2,5	8,5	0	384	ND	0/6	ND	0/6	ND	ND	205,45	3/6	259,82	3/6	7,19	0,812
32	4°C	2,5	8,5	62	384	ND	0/6	ND	0/6	ND	ND	213,50	3/6	279,15	3/6	8,90	0,705
33	4°C	2,5	8,5	125	384	ND	0/6	ND	0/6	ND	ND	205,42	3/6	266,49	3/6	8,07	0,750
34	4°C	2,5	8,5	250	384	ND	0/6	ND	0/6	ND	ND	234,88	3/6	300,24	3/6	8,64	0,685
35	4°C	2,5	8,5	500	384	ND	0/6	ND	0/6	ND	ND	263,16	4/6	318,94	3/6	16,57	0,478
36	4°C	2,5	8,5	1000	384	ND	0/6	ND	0/6	ND	ND	253,85	3/6	308,58	1/6	19,53	0,399

D: Tiempo (horas) que tarda en detectarse crecimiento; P: Tiempo (horas) necesario para alcanzar una tasa bacteriana de 1E9 ufc/ml.; g: Tiempo (horas) de generación (media de los valores registrados en las cepas que crecieron); M: Máxima absorbancia detectada (media de los valores registrados en las cepas que crecieron); ND: Crecimiento no detectado; En negrita las diferencias del número de cepas D y P en función de su origen (diarreico o alimentario)

Tabla IV.24 - Crecimiento de seis cepas diarreas y seis alimentarias de *Aeromonas* spp. móviles, frente a diferentes combinaciones de cloruro sódico, pH y nitrito sódico a 10°C

Condiciones de cultivo						cepas diarreas						cepas alimentarias					
N°	Temp.	ClNa (%)	pH	NO ₂ Na (µg/ml)	Horas incub.	D		P		g	M	D		P		g	M
						horas	N° cepas	horas	N° cepas			horas	N° cepas	horas	N° cepas		
1	10°C	0,5	6	0	216	95,14	6/6	123,94	2/6	7,78	0,583	72,87	6/6	102,68	2/6	7,52	0,634
2	10°C	0,5	6	62	216	165,40	3/6	183,25	2/6	8,16	0,529	114,68	5/6	146,37	2/6	10,65	0,591
3	10°C	0,5	6	125	216	ND	0/6	ND	0/6	ND	ND	161,47	2/6	191,26	1/6	6,81	0,472
4	10°C	0,5	6	250	216	ND	0/6	ND	0/6	ND	ND	ND	0/6	ND	0/6	ND	ND
5	10°C	0,5	6	500	216	ND	0/6	ND	0/6	ND	ND	ND	0/6	ND	0/6	ND	ND
6	10°C	0,5	6	1000	216	ND	0/6	ND	0/6	ND	ND	ND	0/6	ND	0/6	ND	ND
7	10°C	0,5	7	0	216	58,97	6/6	99,92	3/6	6,52	0,667	69,06	6/6	104,25	6/6	4,65	1,036
8	10°C	0,5	7	62	216	70,51	6/6	109,44	3/6	6,63	0,7	71,84	6/6	112,17	5/6	5,33	1,011
9	10°C	0,5	7	125	216	78,79	6/6	140,86	2/6	10,39	0,563	85,61	6/6	119,95	5/6	7,38	0,81
10	10°C	0,5	7	250	216	104,23	6/6	164,52	2/6	13,75	0,487	85,43	5/6	128,37	2/6	9,64	0,623
11	10°C	0,5	7	500	216	170,59	3/6	ND	0/6	22,26	0,164	139,07	5/6	193,97	1/6	13,98	0,327
12	10°C	0,5	7	1000	216	ND	0/6	ND	0/6	ND	ND	197,14	1/6	ND	0/6	15,38	0,209
13	10°C	0,5	8,5	0	216	73,11	6/6	109,95	6/6	4,87	0,989	56,19	6/6	83,26	6/6	3,58	1,092
14	10°C	0,5	8,5	62	216	74,84	6/6	108,88	6/6	4,50	1,001	56,15	6/6	84,65	6/6	3,77	1,052
15	10°C	0,5	8,5	125	216	74,94	6/6	113,07	6/6	5,04	0,984	59,36	6/6	102,12	6/6	5,65	1,017
16	10°C	0,5	8,5	250	216	73,24	6/6	128,39	6/6	7,29	0,833	60,39	6/6	100,50	5/6	8,18	0,883
17	10°C	0,5	8,5	500	216	73,41	6/6	148,04	6/6	9,87	0,68	58,38	6/6	119,21	6/6	10,79	0,754

(continúa)

D: Tiempo (horas) que tarda en detectarse crecimiento; P: Tiempo (horas) necesario para alcanzar una tasa bacteriana de 1E9 ufc/ml.; g: Tiempo (horas) de generación (media de los valores registrados en las cepas que crecieron); M: Máxima absorbancia detectada (media de los valores registrados en las cepas que crecieron); ND: Crecimiento no detectado; En negrita las diferencias del número de cepas D y P en función de su origen (diarreico o alimentario); Se han enmarcado los valores D, P, g y M cuando coincidiendo el número de cepas D y P, existían diferencias significativas ($p < 0,05$) entre cepas clínicas y alimentarias

Tabla IV.24 (continuación)

Condiciones de cultivo						cepas diarreicas				cepas alimentarias							
N°	Temp.	ClNa (%)	pH	NO ₂ Na (µg/ml)	Horas Incub.	D		P		g	M	D		P		g	M
						horas	N° cepas	horas	N° cepas			horas	N° cepas	horas	N° cepas		
18	10°C	0,5	8,5	1000	216	76,27	6/6	170,57	6/6	12,47	0,546	60,55	6/6	129,32	5/6	12,95	0,659
19	10°C	2,5	6	0	216	158,23	6/6	216,02	1/6	12,29	0,293	103,36	6/6	157,87	3/6	7,91	0,498
20	10°C	2,5	6	62	216	ND	0/6	ND	0/6	ND	ND	150,84	6/6	174,76	4/6	21,35	0,305
21	10°C	2,5	6	125	216	ND	0/6	ND	0/6	ND	ND	ND	0/6	ND	0/6	ND	ND
22	10°C	2,5	6	250	216	ND	0/6	ND	0/6	ND	ND	ND	0/6	ND	0/6	ND	ND
23	10°C	2,5	6	500	216	ND	0/6	ND	0/6	ND	ND	ND	0/6	ND	0/6	ND	ND
24	10°C	2,5	6	1000	216	ND	0/6	ND	0/6	ND	ND	ND	0/6	ND	0/6	ND	ND
25	10°C	2,5	7	0	216	131,31	6/6	197,37	3/6	11,89	0,371	90,79	6/6	125,13	5/6	6,20	0,639
26	10°C	2,5	7	62	216	127,58	6/6	190,72	5/6	9,40	0,44	92,76	6/6	136,82	6/6	5,83	0,663
27	10°C	2,5	7	125	216	128,20	6/6	198,97	4/6	10,85	0,437	94,05	6/6	138,52	5/6	7,63	0,597
28	10°C	2,5	7	250	216	153,22	6/6	253,53	2/6	14,61	0,306	114,17	6/6	157,68	3/6	10,96	0,466
29	10°C	2,5	7	500	216	174,28	3/6	ND	0/6	22,43	0,187	150,31	5/6	211,74	2/6	11,10	0,341
30	10°C	2,5	7	1000	216	ND	0/6	ND	0/6	ND	ND	169,44	3/6	213,95	1/6	9,97	0,308
31	10°C	2,5	8,5	0	216	109,97	6/6	149,59	6/6	5,24	0,686	77,41	6/6	119,90	6/6	5,59	0,834
32	10°C	2,5	8,5	62	216	114,15	6/6	157,96	6/6	5,79	0,652	80,22	6/6	122,95	6/6	5,66	0,797
33	10°C	2,5	8,5	125	216	110,30	6/6	156,25	6/6	6,07	0,716	79,41	6/6	127,26	6/6	6,33	0,818
34	10°C	2,5	8,5	250	216	111,94	6/6	174,38	6/6	8,26	0,606	79,75	6/6	124,61	6/6	8,12	0,723
35	10°C	2,5	8,5	500	216	114,79	6/6	177,27	3/6	9,59	0,431	76,45	6/6	122,62	4/6	10,10	0,628
36	10°C	2,5	8,5	1000	216	130,75	6/6	318,41	1/6	18,27	0,270	77,60	6/6	137,30	4/6	13,18	0,503

D: Tiempo (horas) que tarda en detectarse crecimiento; P: Tiempo (horas) necesario para alcanzar una tasa bacteriana de 1E9 ufc/ml.; g: Tiempo (horas) de generación (media de los valores registrados en las cepas que crecieron); M: Máxima absorbancia detectada (media de los valores registrados en las cepas que crecieron); ND: Crecimiento no detectado; En negrita las diferencias del número de cepas D y P en función de su origen (diarreico o alimentario); Se han enmarcado los valores D, P, g y M cuando coincidiendo el número de cepas D y P, existían diferencias significativas ($p < 0,05$) entre cepas clínicas y alimentarias

Tabla IV.25 - Crecimiento de seis cepas diarreicas y seis alimentarias de *Aeromonas* spp. móviles, frente a diferentes combinaciones de cloruro sódico, pH y nitrito sódico a 28°C

Condiciones de cultivo						cepas diarreicas					cepas alimentarias						
N°	Temp.	ClNa (%)	pH	NO ₂ Na (µg/ml)	Horas incub.	D		P		g	M	D		P		g	M
						horas	N° cepas	horas	N° cepas			horas	N° cepas	horas	N° cepas		
1	28°C	0,5	6	0	48	10,47	6/6	14,06	4/6	0,70	0,823	11,33	6/6	16,04	5/6	0,80	0,686
2	28°C	0,5	6	62	48	12,58	6/6	15,58	4/6	0,91	0,813	13,78	6/6	20,63	4/6	1,11	0,614
3	28°C	0,5	6	125	48	15,74	6/6	20,31	2/6	1,39	0,620	17,38	6/6	27,73	2/6	1,39	0,445
4	28°C	0,5	6	250	48	31,46	6/6	40,19	2/6	2,72	0,299	29,56	5/6	43,23	1/6	3,10	0,233
5	28°C	0,5	6	500	48	ND	0/6	ND	0/6	ND	ND	ND	0/6	ND	0/6	ND	ND
6	28°C	0,5	6	1000	48	ND	0/6	ND	0/6	ND	ND	ND	0/6	ND	0/6	ND	ND
7	28°C	0,5	7	0	48	8,60	6/6	12,93	6/6	0,57	0,844	9,38	6/6	14,71	6/6	0,70	0,743
8	28°C	0,5	7	62	48	8,82	6/6	13,26	6/6	0,58	0,906	9,69	6/6	14,67	6/6	0,66	0,870
9	28°C	0,5	7	125	48	8,98	6/6	13,78	5/6	0,69	0,900	9,89	6/6	15,63	6/6	0,76	0,922
10	28°C	0,5	7	250	48	9,54	6/6	15,37	4/6	0,81	0,747	10,70	6/6	17,43	5/6	0,90	0,638
11	28°C	0,5	7	500	48	11,48	6/6	17,56	3/6	1,12	0,586	13,22	6/6	23,24	2/6	1,14	0,461
12	28°C	0,5	7	1000	48	24,11	4/6	40,54	2/6	1,40	0,378	21,52	6/6	41,20	1/6	2,10	0,279
13	28°C	0,5	8,5	0	48	8,85	6/6	12,38	6/6	0,46	0,977	8,94	6/6	12,99	6/6	0,53	0,969
14	28°C	0,5	8,5	62	48	8,88	6/6	12,31	6/6	0,45	1,022	9,00	6/6	12,69	6/6	0,48	1,113
15	28°C	0,5	8,5	125	48	9,39	6/6	13,00	6/6	0,47	1,015	9,02	6/6	12,95	6/6	0,52	1,132
16	28°C	0,5	8,5	250	48	9,41	6/6	13,37	6/6	0,52	0,982	9,11	6/6	13,58	6/6	0,59	1,063
17	28°C	0,5	8,5	500	48	9,93	6/6	14,57	6/6	0,60	0,895	9,28	6/6	14,27	6/6	0,66	0,879

(continúa)

D: Tiempo (horas) que tarda en detectarse crecimiento; P: Tiempo (horas) necesario para alcanzar una tasa bacteriana de 1E9 ufc/ml.; g: Tiempo (horas) de generación (media de los valores registrados en las cepas que crecieron); M: Máxima absorbancia detectada (media de los valores registrados en las cepas que crecieron); ND: Crecimiento no detectado; En negrita las diferencias del número de cepas D y P en función de su origen (diarreico o alimentario); Se han enmarcado los valores D, P, g y M cuando coincidiendo el número de cepas D y P, existían diferencias significativas ($p < 0,05$) entre cepas clínicas y alimentarias

Tabla IV.25 (continuación)

Condiciones de cultivo						cepas diarreicas						cepas alimentarias					
N°	Temp.	ClNa (%)	pH	NO ₂ Na (µg/ml)	Horas incub.	D		P		g	M	D		P		g	M
						horas	N° cepas	horas	N° cepas			horas	N° cepas	horas	N° cepas		
18	28°C	0,5	8,5	1000	48	10,30	6/6	15,78	6/6	0,72	0,745	9,41	6/6	15,45	5/6	0,80	0,709
19	28°C	2,5	6	0	48	15,65	6/6	22,73	5/6	1,07	0,556	17,43	5/6	20,49	3/6	2,32	0,471
20	28°C	2,5	6	62	48	17,93	6/6	25,01	4/6	1,13	0,556	20,35	6/6	24,17	3/6	1,66	0,524
21	28°C	2,5	6	125	48	22,40	6/6	33,47	3/6	2,02	0,514	24,17	6/6	32,89	3/6	1,97	0,487
22	28°C	2,5	6	250	48	26,16	1/6	36,84	1/6	1,41	0,581	30,58	1/6	ND	0/6	4,03	0,196
23	28°C	2,5	6	500	48	ND	0/6	ND	0/6	ND	ND	ND	0/6	ND	0/6	ND	ND
24	28°C	2,5	6	1000	48	ND	0/6	ND	0/6	ND	ND	ND	0/6	ND	0/6	ND	ND
25	28°C	2,5	7	0	48	13,86	6/6	19,02	6/6	0,68	0,618	14,46	6/6	19,60	6/6	0,68	0,604
26	28°C	2,5	7	62	48	14,06	6/6	18,59	6/6	0,60	0,654	14,47	6/6	19,05	6/6	0,60	0,647
27	28°C	2,5	7	125	48	15,00	6/6	17,75	5/6	0,82	0,705	15,02	6/6	19,94	6/6	0,65	0,668
28	28°C	2,5	7	250	48	16,45	6/6	19,83	4/6	0,97	0,706	15,57	6/6	22,28	6/6	0,88	0,636
29	28°C	2,5	7	500	48	18,19	6/6	22,51	4/6	1,04	0,615	18,20	6/6	26,48	3/6	1,29	0,449
30	28°C	2,5	7	1000	48	23,46	5/6	35,33	3/6	1,51	0,484	27,91	6/6	ND	0/6	2,98	0,282
31	28°C	2,5	8,5	0	48	13,35	6/6	16,98	6/6	0,48	0,733	13,63	6/6	17,65	6/6	0,53	0,684
32	28°C	2,5	8,5	62	48	14,00	6/6	18,82	6/6	0,64	0,698	13,88	6/6	18,16	6/6	0,56	0,648
33	28°C	2,5	8,5	125	48	13,93	6/6	18,93	6/6	0,66	0,803	14,22	6/6	18,71	6/6	0,59	0,757
34	28°C	2,5	8,5	250	48	15,77	6/6	22,85	6/6	0,78	0,772	14,95	6/6	21,39	6/6	0,85	0,685
35	28°C	2,5	8,5	500	48	14,05	5/6	23,41	5/6	1,24	0,719	14,95	6/6	22,91	6/6	1,05	0,629
36	28°C	2,5	8,5	1000	48	14,80	4/6	25,56	4/6	1,41	0,695	15,51	6/6	26,06	5/6	1,65	0,507

D: Tiempo (horas) que tarda en detectarse crecimiento; P: Tiempo (horas) necesario para alcanzar una tasa bacteriana de 1E9 ufc/ml.; g: Tiempo (horas) de generación (media de los valores registrados en las cepas que crecieron); M: Máxima absorbancia detectada (media de los valores registrados en las cepas que crecieron); ND: Crecimiento no detectado; En negrita las diferencias del número de cepas D y P en función de su origen (diarreico o alimentario)

Tabla IV.26 - Crecimiento de seis cepas diarreas y seis alimentarias de *Aeromonas* spp. móviles, frente a diferentes combinaciones de cloruro sódico, pH y nitrito sódico a 37°C

N°	Condiciones de cultivo					cepas diarreas						cepas alimentarias					
	Temp.	ClNa (%)	pH	NO ₂ Na (µg/ml)	Horas incub.	D		P		g	M	D		P		g	M
	37°C					horas	N° cepas	horas	N° cepas			horas	N° cepas	horas	N° cepas		
1	37°C	0,5	6	0	48	13,18	6/6	ND	0/6	1,38	0,189	11,59	3/6	ND	0/6	2,58	0,213
2	37°C	0,5	6	62	48	12,87	6/6	ND	0/6	1,51	0,214	16,33	5/6	ND	0/6	2,09	0,199
3	37°C	0,5	6	125	48	15,04	6/6	ND	0/6	1,50	0,215	16,44	4/6	ND	0/6	2,04	0,187
4	37°C	0,5	6	250	48	29,03	3/6	ND	0/6	5,61	0,137	34,76	2/6	ND	0/6	5,14	0,150
5	37°C	0,5	6	500	48	ND	0/6	ND	0/6	ND	ND	ND	0/6	ND	0/6	ND	ND
6	37°C	0,5	6	1000	48	ND	0/6	ND	0/6	ND	ND	ND	0/6	ND	0/6	ND	ND
7	37°C	0,5	7	0	48	9,30	6/6	16,89	1/6	0,91	0,326	10,32	5/6	ND	0/6	1,43	0,195
8	37°C	0,5	7	62	48	9,05	6/6	13,60	1/6	0,92	0,330	11,80	6/6	24,17	1/6	1,38	0,247
9	37°C	0,5	7	125	48	8,96	6/6	ND	0/6	0,96	0,301	11,99	6/6	22,50	1/6	1,14	0,342
10	37°C	0,5	7	250	48	9,16	6/6	ND	0/6	1,11	0,275	11,10	6/6	24,22	1/6	1,27	0,311
11	37°C	0,5	7	500	48	10,62	6/6	ND	0/6	1,45	0,239	12,68	6/6	ND	0/6	1,60	0,271
12	37°C	0,5	7	1000	48	15,49	6/6	ND	0/6	2,28	0,179	20,66	6/6	ND	0/6	2,36	0,200
13	37°C	0,5	8,5	0	48	8,49	6/6	13,27	6/6	0,63	0,541	9,12	5/6	13,82	5/6	0,62	0,523
14	37°C	0,5	8,5	62	48	9,09	6/6	14,52	6/6	0,72	0,466	9,30	5/6	14,61	4/6	0,72	0,443
15	37°C	0,5	8,5	125	48	8,85	6/6	ND	0/6	0,79	0,364	9,83	5/6	14,36	4/6	0,64	0,526
16	37°C	0,5	8,5	250	48	8,97	6/6	13,72	1/6	0,91	0,397	9,87	5/6	14,70	4/6	0,69	0,488
17	37°C	0,5	8,5	500	48	9,41	6/6	13,40	1/6	1,01	0,371	10,05	5/6	17,88	3/6	0,95	0,389

(continúa)

D: Tiempo (horas) que tarda en detectarse crecimiento; P: Tiempo (horas) necesario para alcanzar una tasa bacteriana de 1E9 ufc/ml.; g: Tiempo (horas) de generación (media de los valores registrados en las cepas que crecieron); M: Máxima absorbancia detectada (media de los valores registrados en las cepas que crecieron); ND: Crecimiento no detectado; En negrita las diferencias del número de cepas D y P en función de su origen (diarreico o alimentario)

Tabla IV.26 (continuación)

Condiciones de cultivo						cepas diarreicas						cepas alimentarias					
N°	Temp.	ClNa (%)	pH	NO ₂ Na (µg/ml)	Horas incub.	D		P		g	M	D		P		g	M
						horas	N° cepas	horas	N° cepas			horas	N° cepas	horas	N° cepas		
18	37°C	0,5	8,5	1000	48	9,80	6/6	ND	0/6	1,11	0,333	11,35	5/6	ND	0/6	1,28	0,321
19	37°C	2,5	6	0	48	15,99	5/6	ND	0/6	2,09	0,251	12,43	1/6	20,13	1/6	1,01	0,397
20	37°C	2,5	6	62	48	18,41	6/6	26,87	4/6	2,17	0,466	25,11	3/6	18,92	1/6	2,34	0,296
21	37°C	2,5	6	125	48	20,07	5/6	27,41	3/6	2,98	0,385	40,23	2/6	20,78	1/6	12,00	0,344
22	37°C	2,5	6	250	48	ND	0/6	ND	0/6	ND	ND	ND	0/6	ND	0/6	ND	ND
23	37°C	2,5	6	500	48	ND	0/6	ND	0/6	ND	ND	ND	0/6	ND	0/6	ND	ND
24	37°C	2,5	6	1000	48	ND	0/6	ND	0/6	ND	ND	ND	0/6	ND	0/6	ND	ND
25	37°C	2,5	7	0	48	12,41	6/6	15,65	1/6	1,20	0,338	15,27	5/6	15,57	1/6	1,39	0,358
26	37°C	2,5	7	62	48	11,27	6/6	17,60	5/6	0,91	0,479	14,48	5/6	19,04	3/6	1,23	0,461
27	37°C	2,5	7	125	48	11,27	6/6	17,28	4/6	0,86	0,487	14,03	5/6	17,48	2/6	1,38	0,456
28	37°C	2,5	7	250	48	11,83	6/6	18,49	4/6	0,94	0,496	14,89	5/6	22,74	1/6	1,59	0,357
29	37°C	2,5	7	500	48	13,34	6/6	21,80	2/6	1,39	0,408	17,72	5/6	ND	0/6	2,67	0,278
30	37°C	2,5	7	1000	48	19,80	6/6	ND	0/6	3,24	0,235	21,49	4/6	ND	0/6	3,58	0,238
31	37°C	2,5	8,5	0	48	9,82	6/6	15,20	6/6	0,71	0,494	12,99	5/6	16,38	3/6	0,70	0,460
32	37°C	2,5	8,5	62	48	9,87	6/6	15,72	6/6	0,77	0,457	12,62	5/6	16,64	3/6	0,82	0,381
33	37°C	2,5	8,5	125	48	9,92	6/6	15,41	6/6	0,72	0,535	12,97	5/6	17,97	4/6	0,69	0,489
34	37°C	2,5	8,5	250	48	10,74	6/6	17,08	5/6	0,89	0,441	12,58	5/6	18,99	3/6	1,18	0,387
35	37°C	2,5	8,5	500	48	10,74	6/6	16,61	3/6	0,97	0,412	12,82	5/6	20,76	4/6	1,18	0,417
36	37°C	2,5	8,5	1000	48	12,54	6/6	ND	0/6	1,93	0,285	12,98	5/6	ND	0/6	1,47	0,324

D: Tiempo (horas) que tarda en detectarse crecimiento; P: Tiempo (horas) necesario para alcanzar una tasa bacteriana de 1E9 ufc/ml.; g: Tiempo (horas) de generación (media de los valores registrados en las cepas que crecieron); M: Máxima absorbancia detectada (media de los valores registrados en las cepas que crecieron); ND: Crecimiento no detectado; En negrita las diferencias del número de cepas D y P en función de su origen (diarreico o alimentario)

Tabla IV.27 - Tipos de hemólisis de las cepas de *Aeromonas* spp. móviles sobre agar sangre de caballo y de cordero a distintas temperaturas y tiempos de incubación

Origen	Nº cepas probadas	Nº de cepas hemolíticas (%)											
		Agar sangre de caballo						Agar sangre de cordero					
		20°C-50h.		28°C-24h.		37°C-18h.		20°C-50h.		28°C-24h.		37°C-18h.	
α	β	α	β	α	β	α	β	α	β	α	β		
Diarreicas	15	1 (6,7)	12 (80,0)	3 (20,0)	12 (80,0)	4 (26,6)	11 (73,3)	7 (46,7)	4 (26,7)	9 (60,0)	4 (26,7)	11 (73,3)	0 (0,0)
Alimentarias	81	14 (17,3)	63 (77,8)	15 (18,5)	62 (76,5)	16 (19,8)	62 (76,5)	35 (43,2)	31 (38,3)	33 (40,7)	34 (42,0)	31 (38,3)	37 (45,7)
CECT	4	1 (25,0)	3 (75,0)	0 (0,0)	4 (100,0)	0 (0,0)	4 (100,0)	4 (100,0)	0 (0,0)	4 (100,0)	0 (0,0)	4 (100,0)	0 (0,0)
Total	100	16 (16,0)	78 (78,0)	18 (18,0)	78 (78,0)	20 (20,0)	77 (77,0)	46 (46,0)	35 (35,0)	46 (46,0)	38 (38,0)	46 (46,0)	37 (37,0)

CECT - Colección Española de Cultivos Tipo

Tabla IV.28 - Actividad hemolítica, sobre eritrocitos de conejo y cordero, del sobrenadante completo de las cepas de *Aeromonas* spp., incubadas a 7°C durante 336 h.

Origen	Eritrocitos de conejo						Eritrocitos de cordero					
	Nº de cepas		Título hemolítico				Nº de cepas		Título hemolítico			
	probadas	hemolíticas	\bar{X}	D. S.	Max.	Min.	probadas	hemolíticas	\bar{X}	D. S.	Max.	Min.
Diarreicas	15	9	84,00	100,40	256	4	15	2	6,00	2,83	8	4
Alimentarias	81	40	113,40	227,38	1024	4	81	12	20,00	26,59	64	4
CECT	4	3	37,33	24,44	64	16	4	0	ND	—	—	—
Total	100	52	103,92	203,82	1024	4	100	14	18,00	24,99	64	4

Título hemolítico - Inversa de la dilución más alta en la que se observa 100% de hemolisis

CECT - Colección Española de Cultivos Tipo

\bar{X} - Media aritmética; D. S. - Desviación estándar; Max - Valor máximo; Min - Valor mínimo

ND - Actividad hemolítica no detectada

Tabla IV.29 - Actividad hemolítica, sobre eritrocitos de conejo y cordero, del sobrenadante completo de las cepas de *Aeromonas* spp., incubadas a 20°C durante 50 h.

Origen	Eritrocitos de conejo						Eritrocitos de cordero					
	Nº de cepas		Título hemolítico				Nº de cepas		Título hemolítico			
	probadas	hemolíticas	X	D. S.	Max.	Min.	probadas	hemolíticas	X	D. S.	Max.	Min.
Diarreicas	15	14	92,86	139,69	512	4	15	6	8,00	6,20	16	4
Alimentarias	81	66	341,58	589,95	4096	4	81	37	24,76	45,75	256	4
CECT	4	4	161,00	235,70	512	4	4	1	16,00	—	16	16
Total	100	84	291,52	535,81	4096	4	100	44	22,27	42,33	256	4

Título hemolítico - Inversa de la dilución más alta en la que se observa 100% de hemólisis

CECT - Colección Española de Cultivos Tipo

X - Media aritmética; D. S. - Desviación estándar; Max - Valor máximo; Min - Valor mínimo

Tabla IV.30 - Actividad hemolítica, sobre eritrocitos de conejo y cordero, del sobrenadante completo de las cepas de *Aeromonas* spp., incubadas a 28°C durante 24 h.

Origen	Eritrocitos de conejo						Eritrocitos de cordero					
	Nº de cepas		Título hemolítico				Nº de cepas		Título hemolítico			
	probadas	hemolíticas	\bar{X}	D. S.	Max.	Min.	probadas	hemolíticas	\bar{X}	D. S.	Max.	Min.
Diarreicas	15	14	87,43	83,03	256	4	15	5	16,80	13,97	32	4
Alimentarias	81	77	151,95	173,90	1024	4	81	49	20,49	22,15	128	4
CECT	4	4	224,00	192,00	512	128	4	4	20,00	8,00	32	16
Total	100	95	145,47	165,46	1024	4	100	58	20,14	20,76	128	4

Título hemolítico - Inversa de la dilución más alta en la que se observa 100% de hemolisis

CECT - Colección Española de Cultivos Tipo

\bar{X} - Media aritmética; D. S. - Desviación estándar; Max - Valor máximo; Min - Valor mínimo

Tabla IV.31 - Actividad hemolítica, sobre eritrocitos de conejo y cordero, del sobrenadante completo de las cepas de *Aeromonas* spp., incubadas a 37°C durante 18 h.

Origen	Eritrocitos de conejo						Eritrocitos de cordero					
	Nº de cepas		Título hemolítico				Nº de cepas		Título hemolítico			
	probadas	hemolíticas	\bar{X}	D. S.	Max.	Min.	probadas	hemolíticas	\bar{X}	D. S.	Max.	Min.
Diarreicas	15	14	112,86	133,69	512	4	15	1	4,00	—	4	4
Alimentarias	81	65	365,66	637,45	4096	4	81	37	47,68	89,47	512	4
CECT	4	4	290,00	490,04	1024	8	4	2	4,00	0,00	4	4
Total	100	83	319,37	581,19	4096	4	100	40	44,40	86,75	512	4

Título hemolítico - Inversa de la dilución más alta en la que se observa 100% de hemólisis

CECT - Colección Española de Cultivos Tipo

\bar{X} - Media aritmética; D. S. - Desviación estándar; Max - Valor máximo; Min - Valor mínimo

Tabla IV.32 - Actividad proteolítica sobre azocaseína y elastina de las cepas de *Aeromonas* spp.

Origen	sobre azocaseína						sobre elastina					
	Nº de cepas		Unidades proteolíticas				Nº de cepas		Unidades proteolíticas			
	probadas	proteolíticas	\bar{X}	D. S.	Max.	Min.	probadas	proteolíticas	\bar{X}	D. S.	Max.	Min.
Diarreicas	15	14	6,04	3,15	10,59	1,79	15	0	ND	—	—	—
Alimentarias	81	72	5,48	3,16	13,56	0,93	81	1	3,57	—	—	—
CECT	4	2	2,42	1,46	3,45	1,39	4	0	ND	—	—	—
Total	100	88	5,50	3,15	13,56	0,93	100	1	3,57	—	—	—

Unidad proteolítica: Actividad enzimática que produce un incremento en la absorbancia a 440 nm de 0,1, por ml de sobrenadante

CECT: Colección Española de Cultivos Tipo

\bar{X} : Media aritmética; D.S.: Desviación estándar; Max.: Valor máximo; Min.: Valor mínimo

ND: Actividad proteolítica no detectada

Tabla IV.33 - Actividad lipolítica sobre β -naftilcaprilato de las cepas de *Aeromonas* spp.

Origen	Nº de cepas		μg de β-naftol liberados			
	probadas	lipolíticas	X	D. S.	Max.	Min.
Diarreicas	15	15	9,22	4,38	16,87	
Alimentarias	81	81	13,15	9,60	46,46	1,82
CECT	4	4	11,39	2,52	14,04	8,08
Total	100	100	12,49	8,91	46,46	1,82

CECT: Colección Española de Cultivos Tipo

X: Media aritmética; D. S.: Desviación estándar; Max.: Valor máximo; Min.: Valor mínimo

Tabla IV.34 - Actividad citotóxica, sobre células de mieloma y células Vero, del sobrenadante completo de las cepas de *Aeromonas* spp., incubadas a 28°C durante 24 h.

Origen	Células de mieloma						Células Vero					
	Nº de cepas		Título citotóxico				Nº de cepas		Título citotóxico			
	probadas	citotóxicas	\bar{X}	D. S.	Max.	Min.	probadas	citotóxicas	\bar{X}	D. S.	Max.	Min.
Diarreicas	15	9	428,52	360,64	960	1,67	4	3	91,67	71,51	174	45
Alimentarias	81	61	621,83	487,69	2133,3	1,67	22	15	173,07	84,06	319	31
CECT	4	4	592,08	763,69	1706,7	8,33	2	2	198,50	86,97	260	137
Total	100	75	592,31	485,76	2133,3	1,67	28	20	163,40	84,61	319	31

Título citotóxico - Inversa de la dilución más alta en la que se observa 100% de muerte en células de mieloma o el 50% de muerte en células Vero

CECT - Colección Española de Cultivos Tipo

\bar{X} - Media aritmética; D. S. - Desviación estándar; Max - Valor máximo; Min - Valor mínimo

Tabla IV.35 - Actividad hemaglutinante de las cepas de *Aeromonas* spp., con eritrocitos de conejo y cordero

Cepas		Eritrocitos de conejo			Eritrocitos de cordero		
Origen	N° probadas	HGL-	HGL+	HGL++	HGL-	HGL+	HGL++
Diarreico	15	8 (53,3%)	2 (13,3%)	5 (33,3%)	10 (66,7%)	3 (20,0%)	2 (13,3%)
Alimentario	81	47 (58,0%)	11 (13,6%)	23 (28,4%)	75 (92,6%)	3 (3,7%)	3 (3,7%)
CECT	4	2 (50,0%)	1 (25,0%)	1 (25,0%)	3 (75,0%)	0 (0,0%)	1 (25,0%)
Total	100	57 (57,0%)	14 (14,0%)	29 (29,0%)	88 (88,0%)	6 (6,0%)	6 (6,0%)

CECT - Colección Española de Cultivos Tipo

HGL- : Hemaglutinación negativa

HGL+ : Hemaglutinación débil (agregación de eritrocitos incompleta o no instantánea)

HGL++ : Hemaglutinación fuerte (agregación de eritrocitos completa e inmediata)

Tabla IV.36 - Inhibición de la hemaglutinación de las cepas de *Aeromonas* spp., en presencia de D-manosa, L-fucosa y D-galactosa

	Origen			Total
	Diarreico	Alimentario	CECT	
Cepas hemaglutinantes (Eritrocitos de conejo)	7	34	2	43
Patrones de inhibición	M+ F+ G+	0 (0,0%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)
	M+ F+ G-	0 (0,0%)	2 (5,9%)	0 (0,0%)
	M+ F- G+	1 (14,3%)	4 (11,8%)	0 (0,0%)
	M+ F- G-	5 (71,4%)	13 (38,2%)	1 (50,0%)
	M- F- G-	0 (0,0%)	9 (26,5%)	1 (50,0%)
	M- F- G+	1 (14,3%)	6 (17,6%)	0 (0,0%)
	M- F+ G-	0 (0,0%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)
	M- F+ G+	0 (0,0%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)
Cepas hemaglutinantes (Eritrocitos de cordero)	5	6	1	12
Patrones de inhibición	M+ F+ G+	3 (60,0%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)
	M+ F+ G-	0 (0,0%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)
	M+ F- G+	0 (0,0%)	3 (50,0%)	0 (0,0%)
	M+ F- G-	2 (40,0%)	1 (16,7%)	1 (100,0%)
	M- F- G-	0 (0,0%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)
	M- F- G+	0 (0,0%)	2 (33,3%)	0 (0,0%)
	M- F+ G-	0 (0,0%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)
	M- F+ G+	0 (0,0%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)

CECT - Colección Española de Cultivos Tipo

M: Manosa; F: Fucosa; G: Galactosa

Se consideró que existía inhibición de la hemaglutinación, cuando las cepas perdieron su capacidad hemaglutinante o cuando la hemaglutinación fuerte se transformó en débil, en presencia de manosa (M+), fucosa (F+) o galactosa (G+)

Tabla IV.37 - Autoaglutinación de las cepas de *Aeromonas* spp.

Origen	N° de cepas probadas	Fenotipos de autoaglutinación			
		SP+ PAB+	SP+ PAB-	SP- PAB+	SP- PAB-
Diarreico	15	2 (13,3%)	1 (6,7%)	2 (13,3%)	10 (66,6%)
Alimentario	81	3 (3,7%)	12 (14,8%)	8 (9,9%)	58 (72%)
CECT	4	2 (50,0%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	2 (50,0%)
Total	100	7 (7,0%)	13 (13,0%)	10 (10,0%)	70 (70,0%)

CECT - Colección Española de Cultivos Tipo

SP - Precipitación espontánea durante la incubación del cultivo a 30°C-18h.

PAB - Precipitación al mantener a 100°C-1h., cultivos previamente crecidos

Tabla IV.38 - Estimación de la precipitación de las cepas autoaglutinantes (PAB+ y o SP+) de *Aeromonas* spp.

Origen	Precipitación espontánea (SP)						Precipitación a 100°C-1h. (PAB)					
	Nº de cepas		% de precipitación				Nº de cepas		% de precipitación			
	Probadas	SP+	\bar{X}	D. S.	Max.	Min.	Probadas	PAB+	\bar{X}	D. S.	Max.	Min.
Diarreicas	15	3	49,69	10,87	58,15	37,43	15	4	51,00	17,56	66,09	26,36
Alimentarias	81	15	57,35	6,99	69,36	48,56	81	11	54,67	14,11	69,86	27,79
CECT	4	2	52,40	2,44	54,12	50,67	4	2	64,13	11,52	72,27	55,98
Total	100	20	55,70	7,60	69,36	37,43	100	17	54,92	14,32	72,27	26,36

CECT - Colección Española de Cultivos Tipo

SP - Precipitación espontánea durante la incubación del cultivo a 30°C-18h.

PAB - Precipitación al mantener a 100°C-1h., cultivos previamente crecidos

\bar{X} - Media aritmética; D. S. - Desviación Estándar; Max. - Valor máximo; Min. - Valor mínimo

Tabla IV.39 - Aglutinación en presencia de acriflavina de las cepas de *Aeromonas* spp.

Cepas		Aglutinación con acriflavina	
Origen	N° probadas	Acri+	Acri-
Diarreico	15	7 (46,7%)	8 (53,3%)
Alimentario	81	35 (43,2%)	46 (56,8%)
CECT	4	0 (0,0%)	4 (100,0%)
Total	100	42 (42,0%)	58 (58,0%)

CECT - Colección Española de Cultivos Tipo

Acri+ : Agregación bacteriana en presencia de acriflavina

Acri- : No detección de agregación bacteriana en presencia de acriflavina

Tabla IV.40 - Hidrofobicidad superficial de las cepas de *Aeromonas* spp.

		Origen				
		Diarreicas	Allimentarias	CECT	Total	
N° de cepas probadas:		15	81	4	100	
Unión a filtros de nitrocelulosa:						
	Cepas*	F	11	50	2	63 (63%)
		M	4	31	1	36 (36%)
		P	0	0	1	1 (1%)
		T	15 (100%)	81 (100%)	4 (100%)	100 (100%)
Porcentaje de unión	\bar{X}	78,68	74,35	64,30	74,59	
	D. S.	13,77	14,59	24,47	14,96	
	Max.	94,67	95,67	83,59	95,67	
	Min.	51,33	40,28	32,24	32,24	
Adsorción a hidrocarburos:						
Hexadecano	Cepas*	F	0	0	0	0 (0%)
		M	1	3	0	4 (5,19%)
		P	6	66	1	73 (94,80%)
		T	7 (46,67%)	69 (85,19%)	1 (25%)	77 (77%)
	Porcentaje de adsorción	\bar{X}	15,67	15,87	4,06	15,70
		D. S.	14,43	11,45	—	11,64
		Max.	36,33	56,49	—	56,49
		Min.	1,24	1,27	—	1,24
Octano	Cepas*	F	1	13	0	14 (14%)
		M	13	67	4	84 (84%)
		P	1	1	0	2 (2%)
		T	15 (100%)	81 (100%)	4 (100%)	100 (100%)
	Porcentaje de adsorción	\bar{X}	52,02	60,57	56,70	59,14
		D. S.	11,07	11,04	8,81	11,30
		Max.	74,57	80,83	66,50	80,83
		Min.	27,96	9,75	45,58	9,75
Xileno	Cepas*	F	0	17	1	18 (18%)
		M	15	64	3	82 (82%)
		P	0	0	0	0 (0%)
		T	15 (100%)	81 (100%)	4 (100%)	100 (100%)
	Porcentaje de adsorción	\bar{X}	57,90	63,52	62,73	62,65
		D. S.	5,57	8,55	7,47	8,32
		Max.	65,90	83,95	70,08	83,95
		Min.	50,20	43,07	53,84	43,07

CECT - Colección Española de Cultivos Tipo

* - F: Cepas fuertemente hidrofóbicas; M: Medianamente hidrofóbicas; P: Poco hidrofóbicas; T: Totales

\bar{X} , D.S., Max. y Min.: - Media aritmética, Desviación estándar, Valor máximo y Valor mínimo, respectivamente, de las cepas totales (T)

Tabla IV.41 - Capa S, *pili* cortos y rígidos (C/R) y *pili* largos y flexibles (L/F) observados en la superficie de las cepas de *Aeromonas* spp.

Cepas		Cepas con:		
Origen	Nº probadas	Capa S	<i>pili</i> C/R	<i>pili</i> L/F
Diarreicas	15	10 (66,67%)	3 (20,00%)	0 (0,00%)
Alimentarias	81	54 (66,67%)	17 (20,99%)	4 (4,94%)
CECT	4	1 (25,00%)	2 (50,00%)	1 (25,00%)
Total	100	65 (65,00%)	22 (22,00%)	5 (5,00%)

CECT - Colección Española de Cultivos Tipo

Tabla IV.42 - Actividad bioquímica (Voges Proskauer, descarboxilación de la lisina y fermentación de la arabinosa) de las cepas de *Aeromonas* spp.

Cepas		Voges-Proskauer	Descarboxilación de la lisina	Fermentación de la arabinosa
Origen	Nº probadas	Cepas positivas	Cepas positivas	Cepas negativas
Diarreicas	15	9 (60,00%)	10 (66,67%)	6 (40,00%)
Alimentarias	81	58 (71,60%)	40 (49,38%)	26 (32,09%)
CECT	4	3 (75,00%)	2 (50,00%)	2 (50,00%)
Total	100	70 (70,00%)	52 (52,00%)	34 (34,00%)

CECT - Colección Española de Cultivos Tipo

Tabla IV.43 - Marcadores de alta virulencia de *Aeromonas* spp., en cepas diarreicas y alimentarias

Cepas	Autoaglutinación (AA+) / Presencia de capa S	No aglutinación con acriflavina (Acri-) / autoaglutinación tras 1h. a 100°C (PAB+)	No fermentación de la arabinosa / Voges Proskauer positivo
	(% de cepas)	(% de cepas)	(% de cepas)
Diarréicas	26,66	20,00	33,33
Alimentarias	20,98	6,17	24,69

Tabla IV.44 - Asociación de factores de virulencia: hemaglutinación y hemolisis

Cepas		Actividad hemolítica
Carácter	Nº	(Título hemolítico)*
Hemaglutinantes	41	174,93 (±154,86)
No hemaglutinantes	55	104,60 (±164,37)
<i>p</i>		< 0,025

* - Media aritmética (± Desviación estándar)

Título hemolítico - Inversa de la dilución más alta en la que se observa 100% de hemólisis

Tabla IV.45 - Asociación de factores de virulencia: presencia de *pili* y lipólisis

Cepas		Actividad lipolítica
Carácter	Nº	(µg. de β-naftol)*
con <i>pili</i>	25	15,314 (±12,459)
sin <i>pili</i>	71	11,561 (±7,417)
<i>p</i>		< 0,05

* - Media aritmética (± Desviación estándar)

Tabla IV.46 - Asociación de factores de virulencia: Capa S e hidrofobicidad

Cepas		Hidrofobicidad
Carácter	Nº	(% de adsorción al octano)*
con capa S	64	57,746 (±12,029)
sin capa S	32	62,22 (±9,058)
<i>p</i>		< 0,05

* - Media aritmética (± Desviación estándar)

Tabla IV.47 - Asociación de factores de virulencia: descarboxilación de la lisina e hidrofobicidad

Cepas		Hidrofobicidad
Carácter	Nº	(% de unión a FNC)*
Descarboxiladoras	50	71,535 (±15,17)
No descarboxiladoras	46	78,795 (±12,81)
<i>p</i>		< 0,001

FNC - Fitos de nitrocelulosa

* - Media aritmética (± Desviación estándar)

Tabla IV.48 - Factores de virulencia (proteolisis y presencia de capa S) asociados a la no aglutinación en presencia de acriflavina

Cepas		Actividad proteolítica	Capa S
Carácter	Nº	(Unidades proteolíticas)*	(% de cepas con capa S)
No aglutinantes con acriflavina	54	5,599 (±3,61)	78,26
Aglutinantes con acriflavina	42	4,204 (±3,05)	56
<i>p</i>		< 0,025	< 0,05

* - Media aritmética (± Desviación estándar)

Unidad proteolítica - Actividad enzimática que produce un incremento de la absorbancia a 440 nm de 0,1 por ml de sobrenadante

Tabla IV.49 - Factores de virulencia (proteolisis, lipolisis e hidrofobicidad) asociados a la autoaglutinación

Cepas		Actividad proteolítica	Actividad lipolítica	Hidrofobicidad	
Carácter	Nº	(Unidades proteolíticas)*	(µg. de β-naftol)*	(% unión a FNC)*	(% adsorción al octano)*
Autoaglutinantes	28	7,497 (±3,81)	7,816 (±5,38)	79,739 (±14,42)	62,558 (±9,87)
No autoaglutinantes	58	3,956 (±2,67)	14,483 (±9,60)	73,082 (±14,15)	57,883 (±11,82)
<i>p</i>		< 0,0005	< 0,0005	< 0,025	< 0,05

FNC - Filtros de nitrocelulosa

* - Media aritmética (± Desviación estándar)

Unidad proteolítica - Actividad enzimática que produce un incremento de la absorbancia a 440 nm de 0,1 por ml de sobrenadante

Tabla IV.50 - Factores de virulencia (lipólisis, citotoxicidad, hemaglutinación, presencia de *pili* y descarboxilación de la lisina) asociados a la no fermentación de la arabinosa

Cepas		Actividad lipolítica	Actividad citotóxica	Hemaglutinación	<i>Pili</i>	DC de la lisina
Carácter	Nº	(µg. de β-naftol)*	(Título citotóxico)*	(% de cepas hemaglutinantes)	(% de cepas con <i>pili</i>)	(% de cepas descarboxiladoras)
No fermentadoras	32	9,021 (±3,57)	556,146 (±528,52)	67,74	14,63	81,25
Fermentadoras	64	14,297 (±10,43)	379,039 (±451,98)	31,25	34,55	37,5
<i>p</i>		< 0,005	< 0,05	< 0,001	< 0,05	< 0,001

DC - Descarboxilación

* - Media aritmética (± Desviación estándar)

Título citotóxico - Inversa de la dilución más alta en la que se observa 100% de muerte celular

Tabla IV.51 - Factores de virulencia (proteólisis, citotoxicidad, hemólisis, hidrofobicidad, autoaglutinación, hemaglutinación, descarboxilación de la lisina y no aglutinación con acriflavina) asociados a a la reacción Voges Proskauer

Cepas		Actividad proteolítica	Actividad citotóxica	Actividad hemolítica	Hidrofobicidad	
Carácter	Nº	(Unidades proteolíticas)*	(Título citotóxico)*	(Título hemolítico)*	(% de adsorción al octano)*	(% de unión a FNC)*
Voges Proskauer +	67	6,137 (±3,31)	554,008 (±475,41)	171,955 (±174,39)	61,581 (±8,65)	71,429 (±14,82)
Voges Proskauer -	29	2,335 (±1,87)	170,230 (±391,89)	48,414 (±88,33)	53,719 (±15,20)	83,329 (±9,57)
<i>p</i>		< 0,0005	< 0,0005	< 0,0005	< 0,005	< 0,0005

Cepas	Autoaglutinación	Hemaglutinación	DC de la lisina	No aglutinación con acriflavina
	(% de cepas autoaglutinantes)	(% de cepas hemaglutinantes)	(% de cepas descarboxiladoras)	(% de cepas no aglutinantes)
Voges Proskauer +	35,82	55,22	62,69	64,18
Voges Proskauer -	13,79	13,79	27,59	37,93
<i>p</i>	< 0,05	< 0,001	< 0,01	< 0,02

FNC - Filtros de nitrocelulosa

* - Media aritmética (± Desviación estándar)

Título hemolítico - Inversa de la dilución más alta en la que se observa 100% de hemólisis

Título citotóxico - Inversa de la dilución más alta en la que se observa el 100% de muerte celular

Unidad proteolítica - Actividad enzimática que produce un incremento de la absorbancia a 440 nm de 0,1 por ml de sobrenadante

DC - Descarboxilación

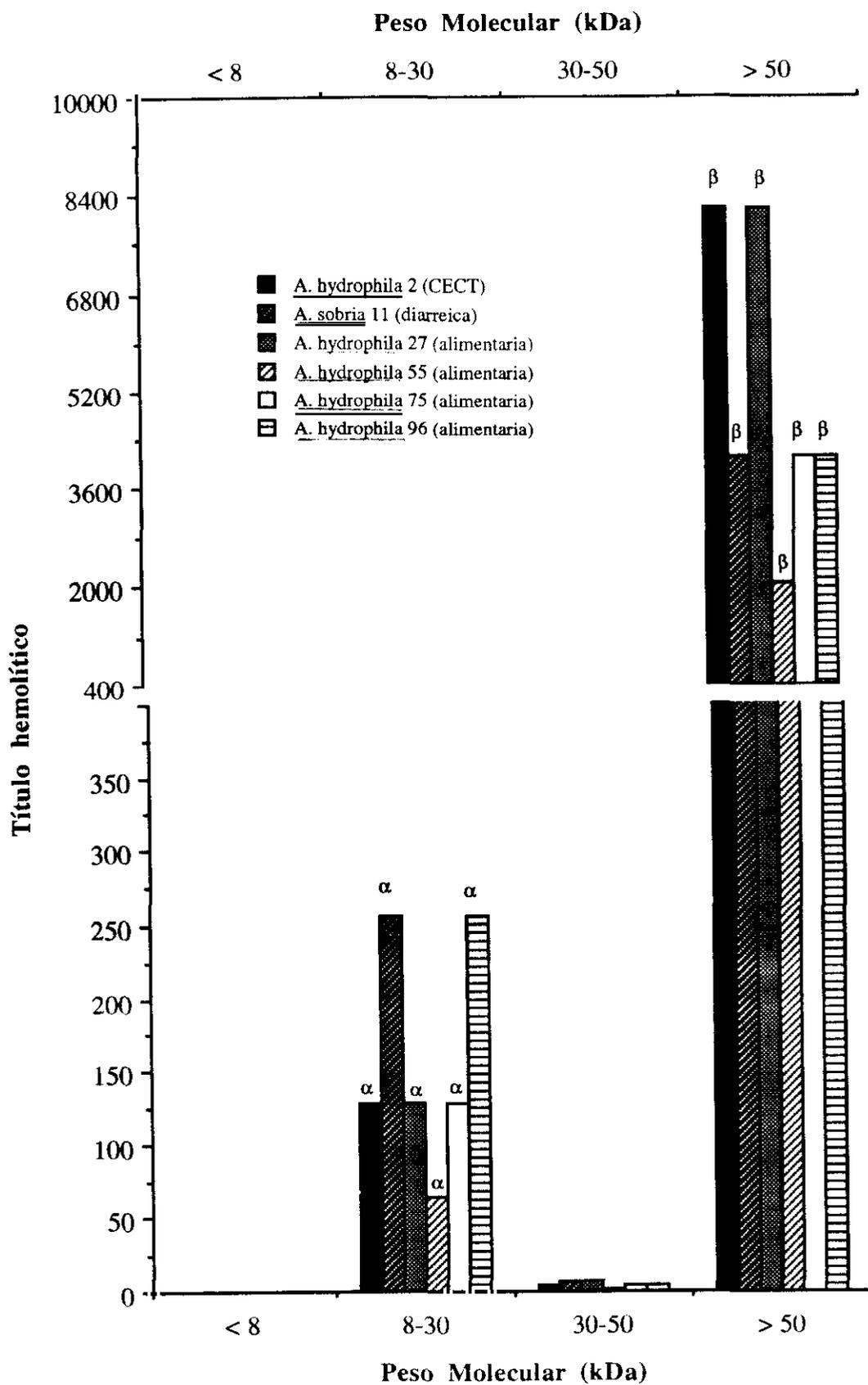


Figura IV.1 - Actividad hemolítica detectada en las fracciones del sobrenadante, obtenidas por diafiltración, de seis cepas de *Aeromonas* spp. móviles α -hemolisis o hemolisis incompleta y β -hemolisis o hemolisis completa
 Título hemolítico - Inversa de la dilución más alta en la que se observa 100% de hemolisis

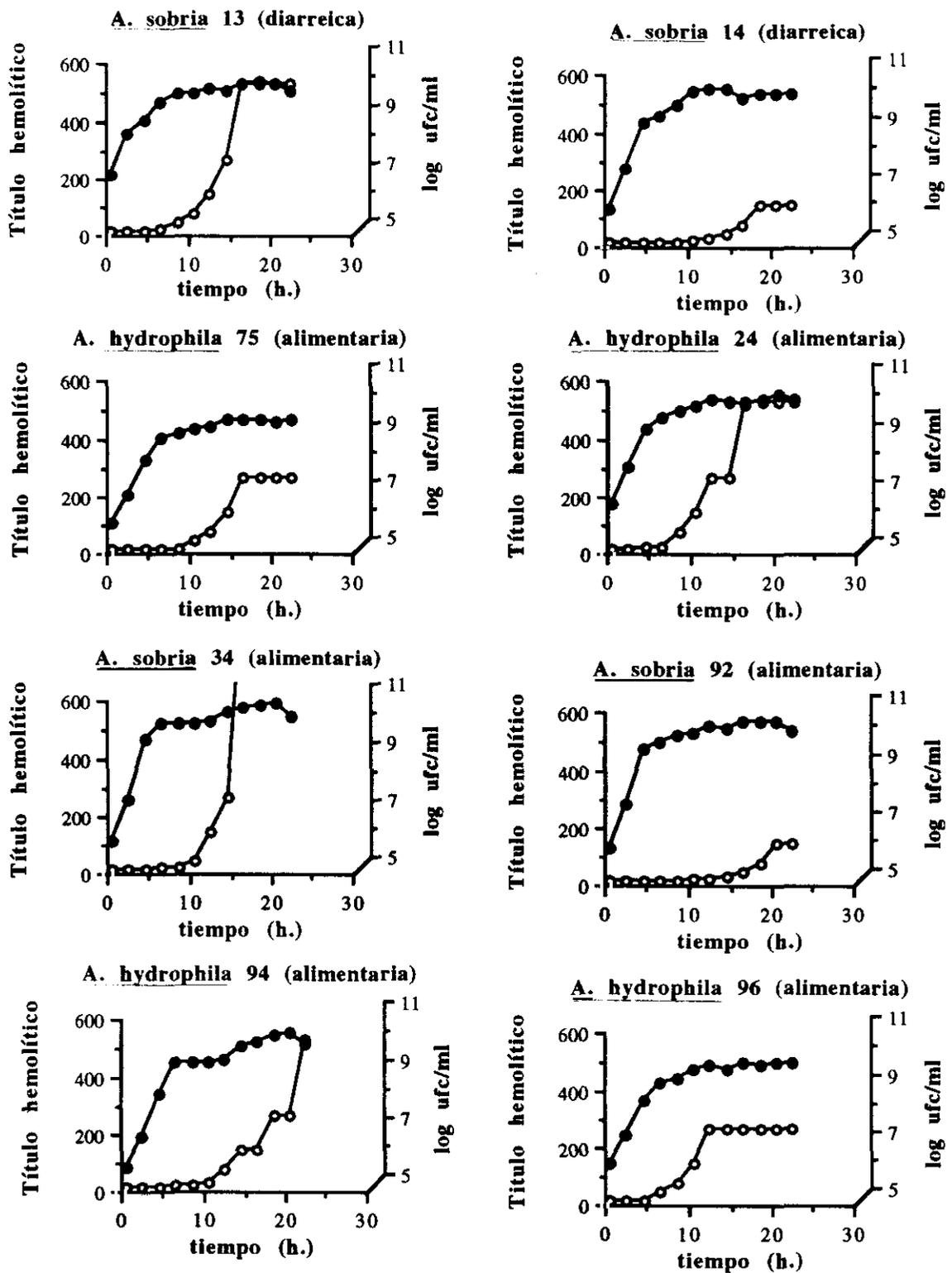


Figura IV.2 - Evolución de la producción de hemolisinas con respecto a la población bacteriana de ocho cepas de *Aeromonas* spp. móviles. (○) Título hemolítico. (●) Log ufc/ml
 Título hemolítico - Inversa de la dilución más alta en la que se observa 100% de hemólisis

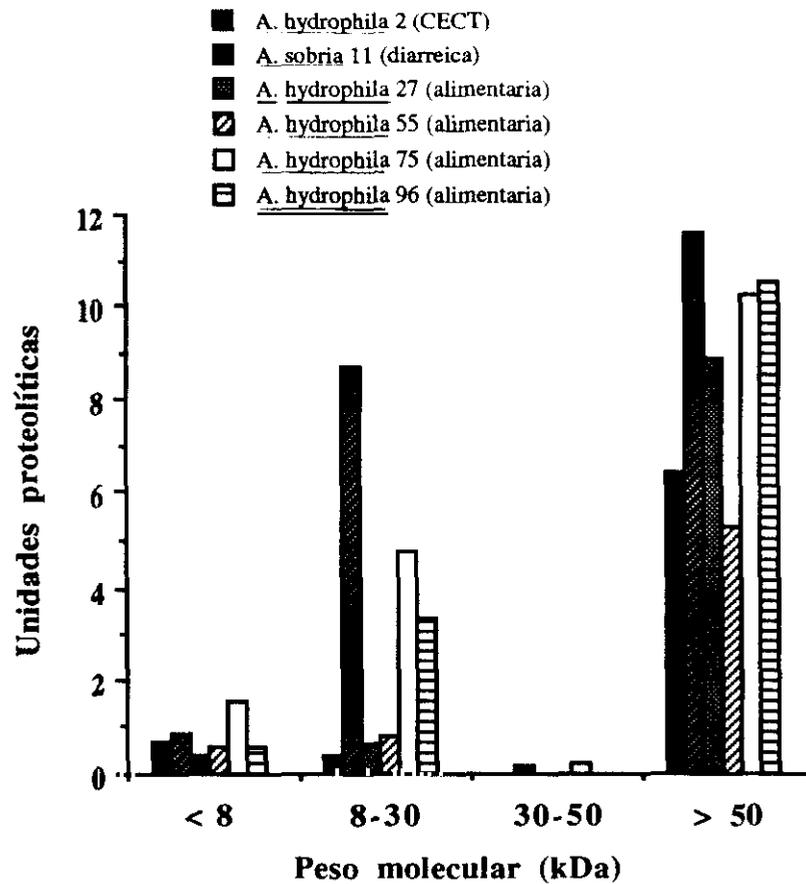


Figura IV.3 - Actividad proteolítica detectada en las fracciones del sobrenadante, obtenidas por diafiltración, de seis cepas de *Aeromonas* spp. móviles

Unidad proteolítica - Actividad enzimática que produce un incremento en la absorbancia a 440 nm de 0,1, por ml de sobrenadante

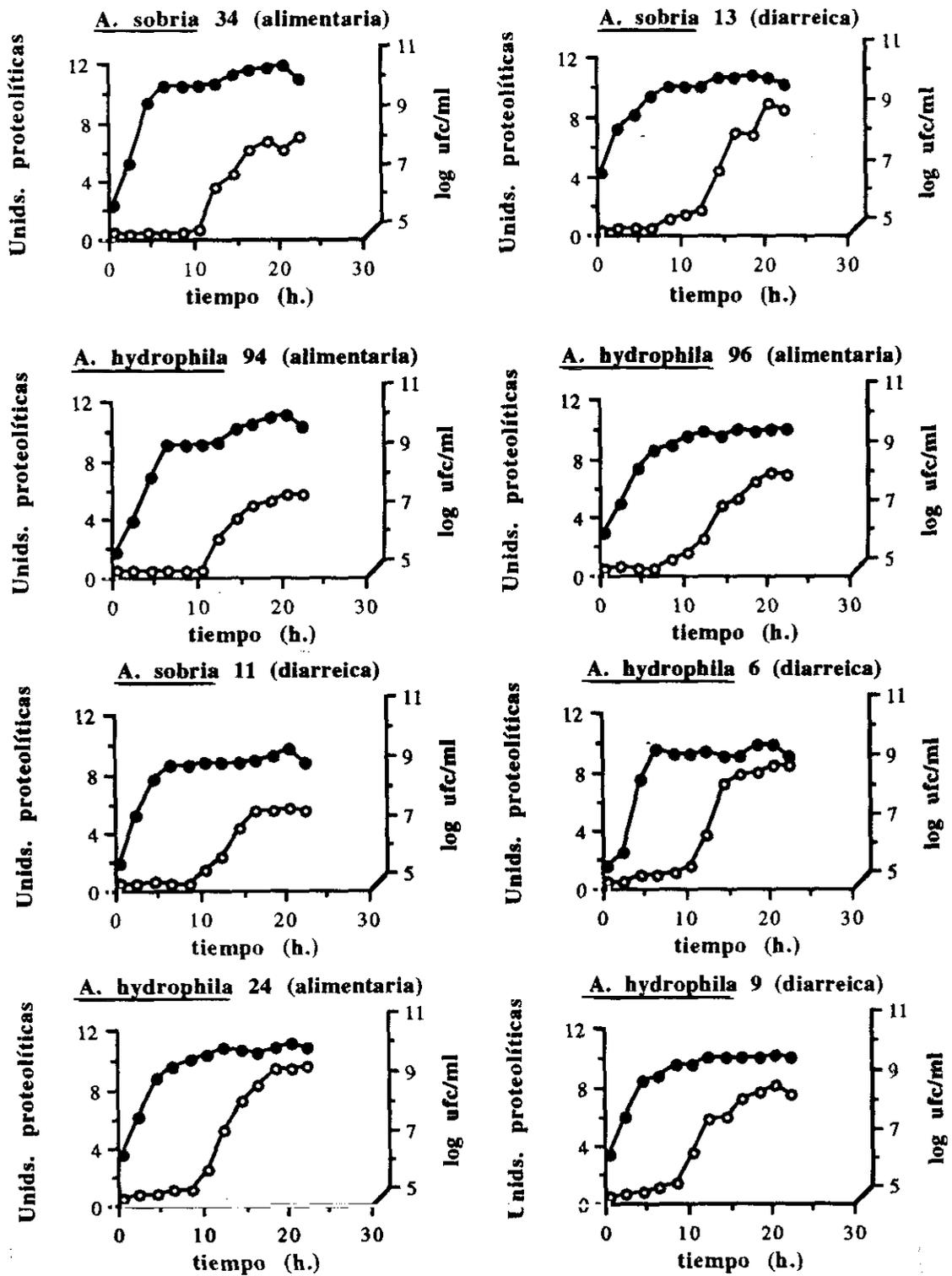


Figura IV.4 - Evolución de la producción de proteasas con respecto a la población bacteriana de ocho cepas de *Aeromonas* spp. móviles. (○) Unidades proteolíticas. (●) Log ufc/ml
 Unidad proteolítica - Actividad enzimática que produce un incremento en la absorbancia a 440 nm de 0,1 por ml de sobrenadante

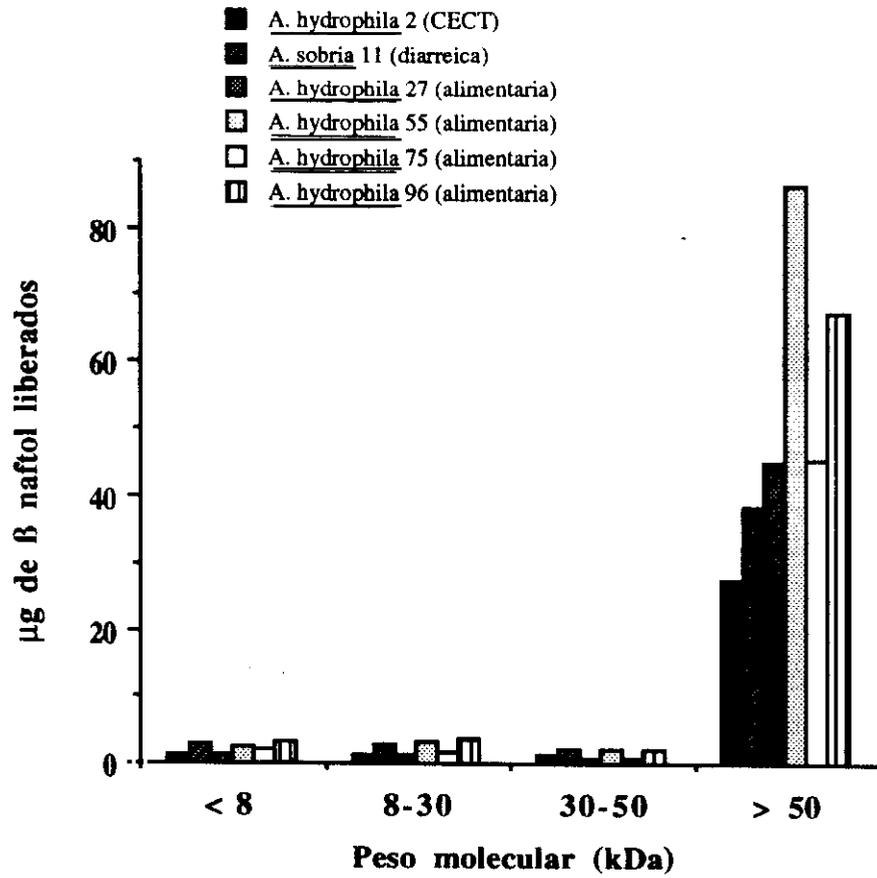


Figura IV.5 - Actividad lipolítica (expresada como μg de β -naftol liberados) detectada en las fracciones del sobrenadante, obtenidas por diafiltración, de seis cepas de *Aeromonas* spp. móviles

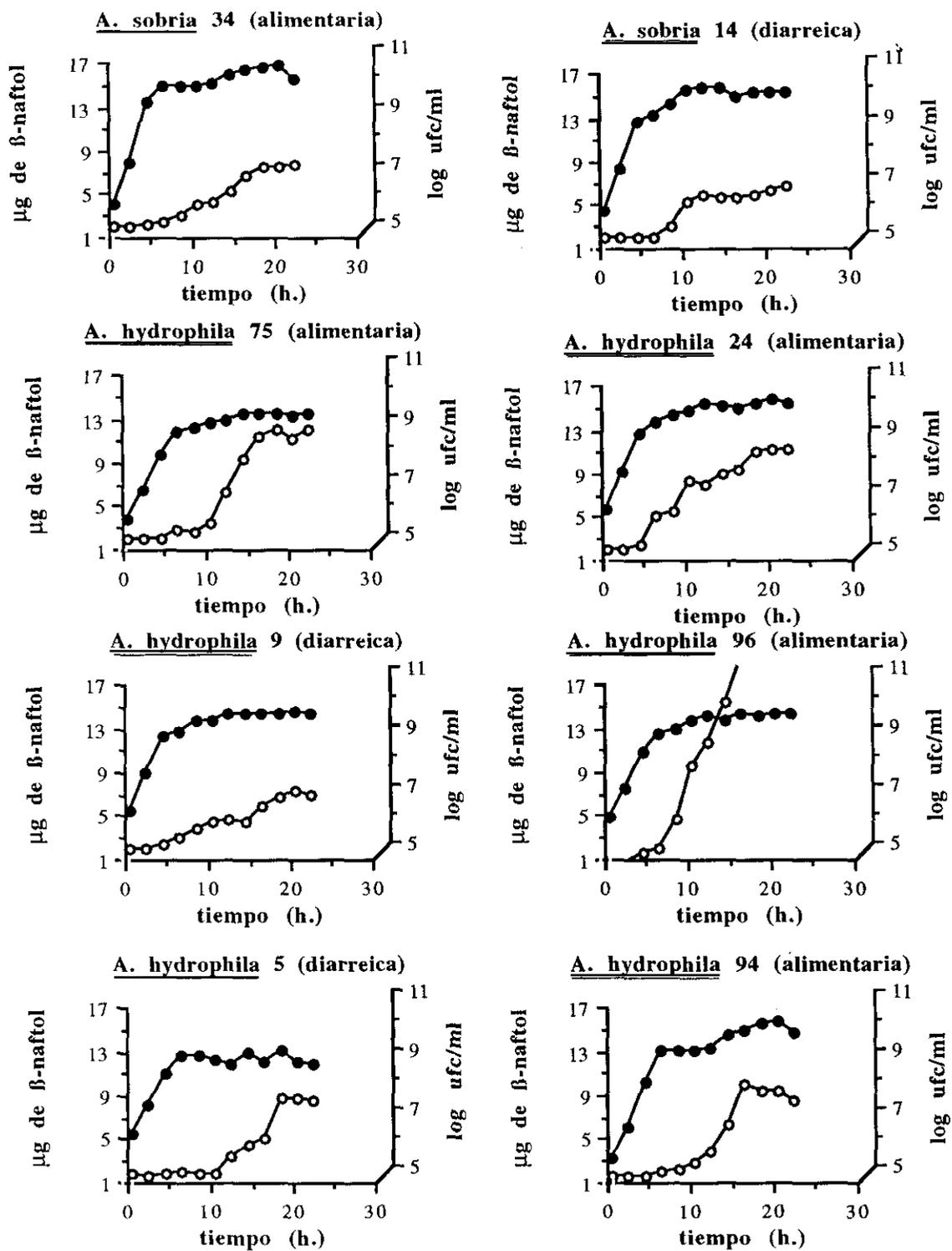


Figura IV.6 - Evolución de la producción de lipasas con respecto a la población bacteriana de ocho cepas de *Aeromonas* spp. móviles. (○) µg de β-naftol liberados. (●) Log ufc/ml



(a)

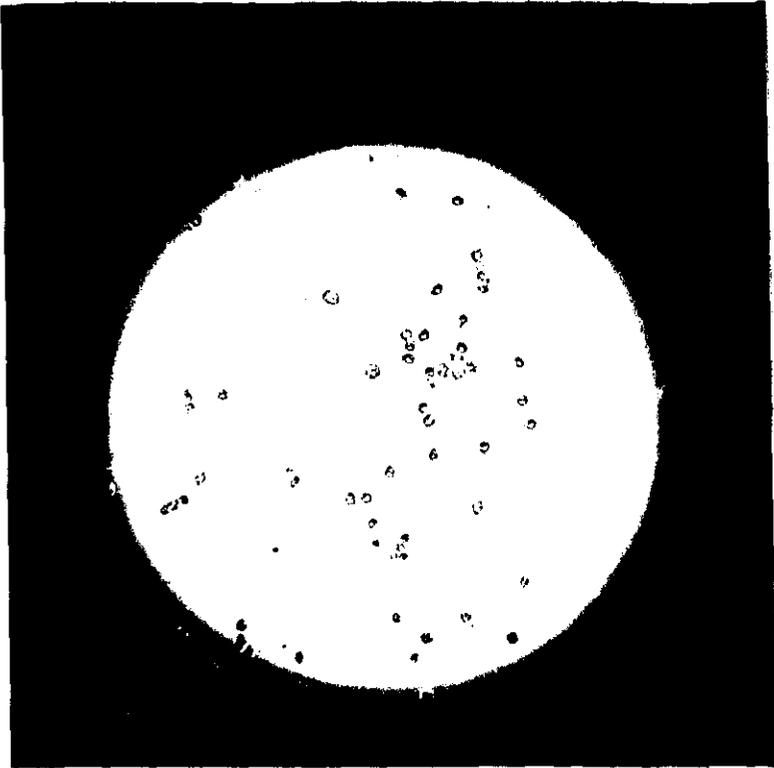


(b)

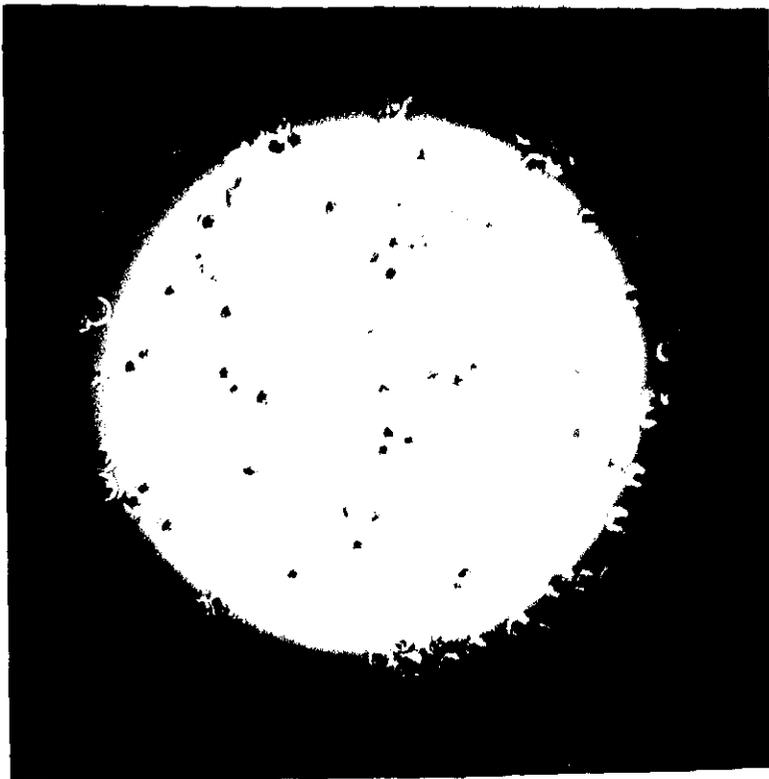


(c)

Figura IV.7 - Efecto citotóxico de distintas diluciones de los sobrenadantes de *Aeromonas* spp. sobre la monocapa de células Vero. (a y b): Diferentes grados de citotoxicidad, en función de la dilución empleada. (c): Monocapa no lesionada (control)



(a)



(b)

Figura IV.8 - Efecto citotóxico de los sobrenadantes de *Aeromonas* spp. sobre células de mieloma. (a): Células lesionadas. (b): Células no lesionadas (control)

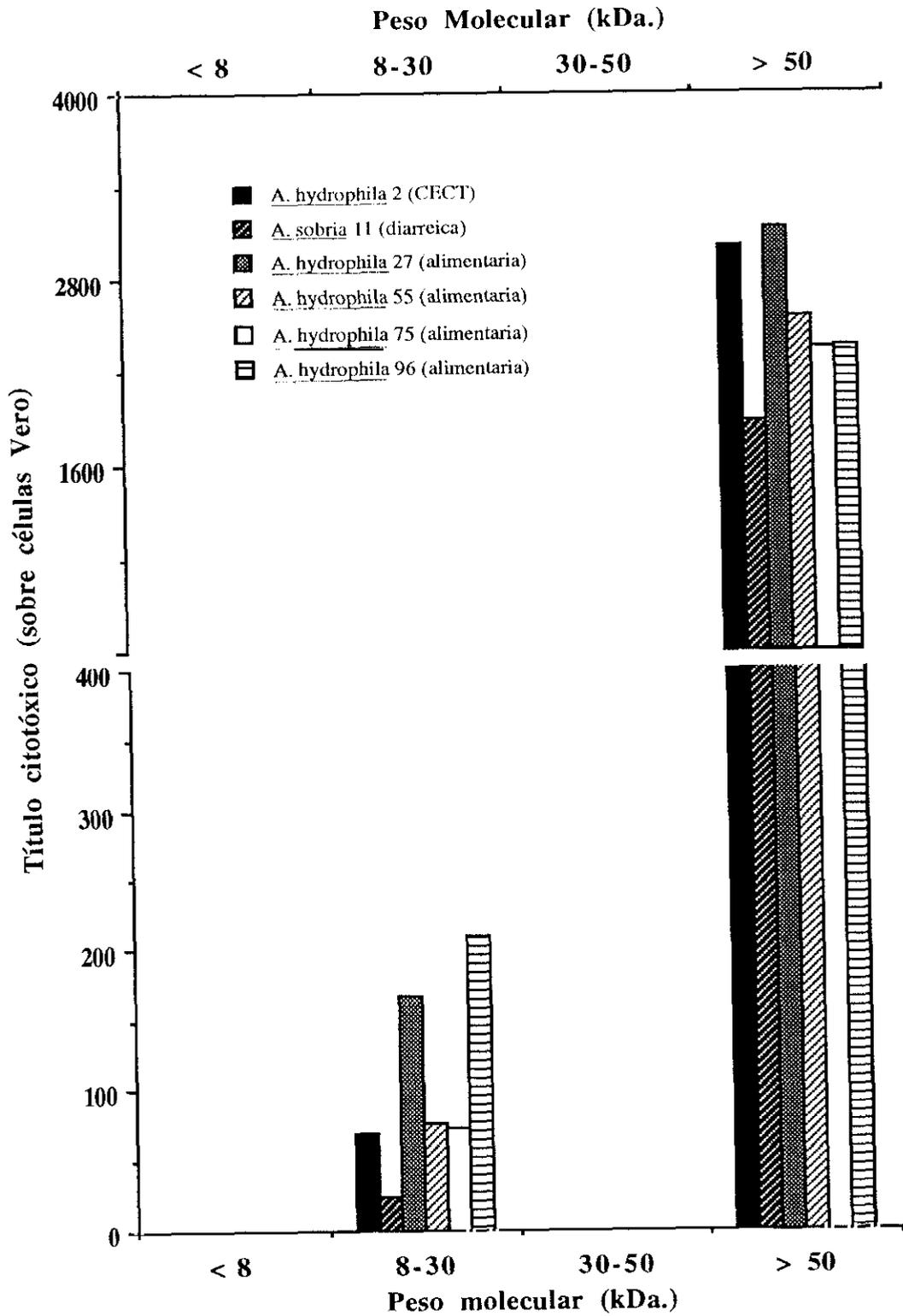


Figura IV.9 - Actividad citotóxica sobre células Vero detectada en las fracciones del sobrenadante, obtenidas por diafiltración, de seis cepas de *Aeromonas* spp. móviles
 Título citotóxico - Inversa de la dilución más alta en la que se observa 50% de muerte celular



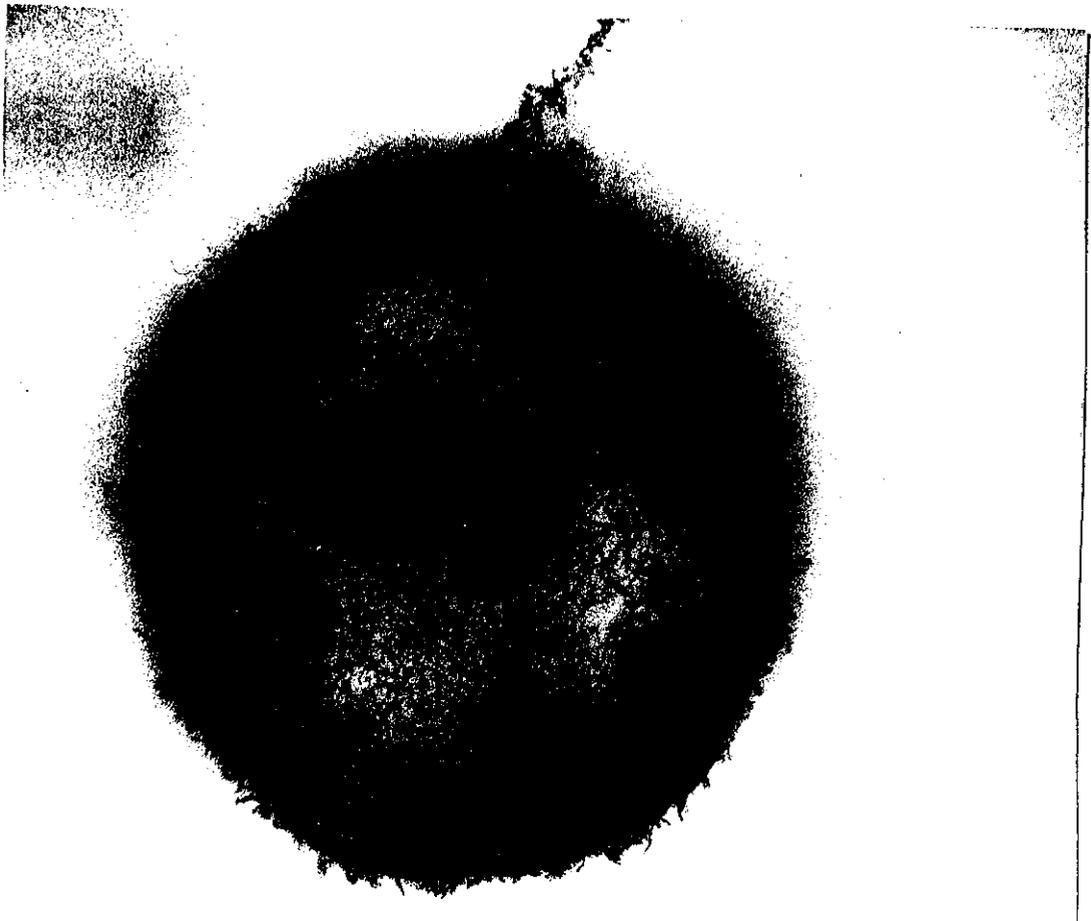
(a)



(b)

Figura IV.10 - Microscopía electrónica de *Aeromonas* 70, provista de capa S (a) y de *Aeromonas* 64 desprovista de capa S (b)

(a)



(b)



Figura IV.11 - Microscopía electrónica de *Aeromonas* 32 con numerosos *pili* cortos y rígidos (a) y de *A. hydrophila* 25 con *pili* largos y flexibles (b)

V. CONCLUSIONES

1. - El medio selectivo más adecuado para el aislamiento de *Aeromonas* spp. móviles, a partir de alimentos y aguas, es el medio de Ryan. La proporción de ampicilina y los componentes presentes en el medio de Ryan permiten el crecimiento de *A. sobria* CECT 837, a pesar de ser la cepa con mayor sensibilidad frente a este antibiótico.
2. - *Aeromonas* spp. móviles están ampliamente distribuidas en alimentos españoles (carnes de aves y mamíferos, pescados y mariscos, leche cruda, etc.). Su incidencia es muy elevada en aguas no potables de ríos y arroyos.
3. - Aunque *Aeromonas* spp. móviles son, en general, psicrótrofas, las cepas de origen alimentario crecen mejor a temperaturas de refrigeración que las diarreicas. Tanto unas como otras son incapaces de proliferar a 4°C, si el pH es inferior a 6. El nitrito sódico y el cloruro sódico afectan, notablemente, al crecimiento de estos microorganismos que, además, son sensibles al cloro.
4. - El mayor número de cepas hemolíticas se detecta cuando la incubación se realiza a 28°C, aunque la producción máxima de hemolisinas se puede conseguir tanto a temperaturas inferiores como superiores. Los eritrocitos de conejo son más sensibles a las hemolisinas y hemaglutininas de *Aeromonas* spp. que los de cordero.
5. - La producción de hemolisinas, proteasas y lipasas se detecta al final de la fase logarítmica de crecimiento y principio de la estacionaria de *Aeromonas* spp..
6. - Las actividades hemolítica, lipolítica, proteolítica y citotóxica se asocian, principalmente, con los componentes del sobrenadante de PM superior a 50 kDa y, en ningún caso, han permitido establecer diferencias significativas entre cepas alimentarias y diarreicas.
7. - Las células de mieloma son más susceptibles a las citotoxinas producidas por *Aeromonas* spp. que las células Vero.
8. - Se han detectado cepas hemaglutinantes, autoaglutinantes, no aglutinantes en presencia de acriflavina, hidrofóbicas, con capa S y con *pili*, tanto en *Aeromonas* spp. de origen alimentario como diarreico, aunque la hidrofobicidad es significativamente superior en las

cepas de alimentos.

9. - Se han seleccionado tres pruebas (Voges Proskauer positiva, no fermentación de la arabinosa y no aglutinación en presencia de acriflavina) que, consideradas conjuntamente, permiten su asociación con la totalidad de los factores de virulencia estudiados. De ellas, la reacción de Voges Proskauer puede constituir una prueba sencilla y de utilidad para seleccionar cepas potencialmente patógenas, ya que se relaciona, significativamente, con la hemólisis, proteólisis, citotoxicidad, hemaglutinación, autoaglutinación y no aglutinación en presencia de acriflavina.

10. - La amplia distribución de *Aeromonas* spp. en alimentos y en los medios acuáticos y terrestres, el escaso número de brotes declarados en los países desarrollados, así como las dificultades para confirmar esta etiología en los mismos, nos inclinan a pensar que este grupo de microorganismos debe ser considerado, al menos, como patógeno potencial para el hombre.

VI. BIBLIOGRAFIA

- ABBOTT, S.L.; CHEUNG, W.K.W.; KROSKE-BYSTROM, S.; MALEKZADEH, T. Y JANDA, M.J. (1992). Identification of *Aeromonas* strains to the genospecies level in the clinical laboratory. *J. Clin. Microbiol.* **30**, 1262-1266.
- ABBOTT, S.L.; SERVE, H. Y JANDA, J.M. (1994). Case of *Aeromonas veronii* (DNA group 10) bacteremia. *J. Clin. Microbiol.* **32**, 3091-3093.
- ABEYTA, C.JR.; KAYSNER, C.A.; WEKELL, M.M.; SULLIVAN, J.J. Y STELMA, G.N. (1986). Recovery of *Aeromonas hydrophila* from oysters implicated in a outbreak of foodborne illness. *J Food. Protect.* **49**, 643-646.
- ABEYTA, C.JR. Y WEKELL, M.M. (1988). Potencial sources of *Aeromonas hydrophila*. *J. Food Safety.* **9**, 1-22.
- ABRUTYN, E. (1988). Hospital-associated infection from leeches. *Ann. Intern. Med.* **109**, 356-358.
- AGBONLAHOR, D.E., SHONEKAN, R.A.O.; KAZAK, W.H. Y COKER, A.O. (1982). *Aeromonas* food poisoning in Nigeria: a case report. *Cent. Afr. J. Med.* **28**, 36-38.
- AGGER, W.A. (1986). Diarrhea associated with *Aeromonas hydrophila*. *Pediatr. Infect. Dis. Suppl.* **5**, S106-S108.
- AGGER, W.A.; MCCORMICK, J.D. Y GURWITH, M.J. (1985). Clinical and microbiological features of *Aeromonas hydrophila* associated disease. *J. Clin. Microbiol.* **21**, 909-913.
- ALLEN, D.A.; AUSTIN, B. Y COLWELL, R.R. (1983). *Aeromonas media*, a new species isolated from river water. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **33**, 599-604.
- ALTORFER, R.; ALTWEGG, M. Y ZOLLINGER, J. (1985). Item and A. von Graevenitz growth of *Aeromonas* spp. on cefsulodin-irgasan-novobiocin agar selective for *Yersinia enterocolitica*. *J. Clin. Microbiol.* **22**, 478-480.
- ALTWEGG, M. (1985). *Aeromonas caviae*: an enteric pathogen?. *Infection.* **13**, 228-230.
- ALTWEGG, M. Y GEISS, H.K. (1989). *Aeromonas* as a human pathogen. *CRC Crit. Rev. Microbiol.* **16**, 253-286.
- ALTWEGG, M.; STEIGERWALT, A.G.; ALTWEGG-BISSIG, R.; LUTHY-HOTTENSTEIN, J. Y BRENNER, D.J. (1990). Biochemical identification of *Aeromonas* genospecies isolated from humans. *J. Clin. Microbiol.* **27**, 258-264.
- ALTWEGG, M.; MARTINETTI LUCHINI, G.; LUTHY-HOTTENSTEIN, J. Y ROHRBACH, M. (1991). *Aeromonas*-associated gastroenteritis after consumption of contaminated shrimp. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **10**, 44-45.

- ALTWEGG, M. Y KERSTERS, K. (1994). Cellular fatty acid composition as a chemotaxonomic marker for the differentiation of phenospecies and hybridization groups in the genus *Aeromonas*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **44**, 651-658.
- ANGUITA, J.; RODRIGUEZ APARICIO, L.B. Y NAVARRO, G. (1993). Purification gene cloning aminoacid sequence analysis, and expression of an extracelular lipase from an *Aeromonas hydrophila* human isolate. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**, 2411-2417.
- AOKI, T. Y HOLLAND, B.I. (1985). The outer membrane proteins of the fish pathogens *Aeromonas hydrophila*, *Aeromonas salmonicida* and *Edwardsiella tarda*. *FEMS Microbiol. Lett.* **27**, 299-305.
- ARDUINO, M.J.; HICKMAN-BRENNER, F.W. Y FARMER III J.J. (1988). Phenotypic analysis of 132 *Aeromonas* strains representing 12 DNA hybridization groups. Abstr. P-3. 2nd Int. Workshop *Aeromonas Plesiomonas*.
- ASAO, T.; KINASKITZ, Y.; KOZAKI, S.; VEMURA, T. Y SACAGUCHI, G. (1984). Purification and some properties of *Aeromonas hydrophila* haemolysin. *Infect. Immun.* **46**, 122-127.
- ASAO, T.; KOZAKI, S.; KATO, K.; KINOSHITA, Y.; OTSU, K.; VEMURA, T. Y SAKAGUCHI, G. (1986). Purification and characterization of an *Aeromonas hydrophila* hemolysin. *J. Clin. Microbiol.* **24**, 228-232.
- ASH, C.; MARTINEZ-MURCIA, A.J. Y COLLINS, M.D. (1993). Identification of *Aeromonas schubertii* and *Aeromonas jandaei* by using a polymerase chain reaction-probe test. *FEMS Microbiol. Lett.* **108**, 151-155.
- ASHDOWN, L.R. Y KOEHLER, J.M. (1993). The spectrum of *Aeromonas*-associated diarrhea in tropical Queensland, Australia. *Southeast Asian J. Trop. Med. Public. Health.* **24**, 347-353.
- ATKINSON, H.M. Y TRUST, T.J. (1980). Hemagglutination properties and adherence ability of *Aeromonas hydrophila*. *Infect. Immun.* **27**, 938-946.
- ATKINSON, H.M.; ADAMS, D.; SAVVAS, R.S. Y TRUST, T.J. (1987). *Aeromonas* adhesin antigens. *Experientia.* **43**, 372-374.
- AUSTIN, B. Y AUSTIN, D.A. (1985). Bacterial pathogens of fish. *J. Appl. Bacteriol.* **58**, 483-506.
- AUSTIN, B. Y AUSTIN, D.A. (1987). Bacterial fish pathogens: disease in farmed and wild fish. Ellis Horwood Ltd. Chichester West Sussex England.
- AYTAC, S.A. Y OZBAS, Z.Y. (1994). Survey of the growth and survival of *Yersinia enterocolitica* and *Aeromonas hydrophila* in yogurt. *Milchwissenschaft.* **49**, 322-325.

- BALODA, S.B.; KROVACEK, K.; ERIKSSON, I.; LINNE, T. Y MANSSON, I. (1995). Detection of aerolysin gene in *Aeromonas* strains isolated from drinking water, fish and foods by the polymerase chain reaction. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* **18**, 17-26.
- BARER, M.R.; MILLERSHIP, S.E. Y TABAQCHALI, S. (1986). Relationship of toxin production to species in the genus *Aeromonas*. *J. Med. Microbiol.* **22**, 303-309.
- BARGHOUTHI, S.; YOUNG, R.; OLSON, M.O.J.; ARCENEUX, J.E.L.; CLEM, L.W. Y BYERS, B.R. (1989). Amonabactin, a novel tryptophan- or phenylalanine-containing phenolate siderophore in *Aeromonas hydrophila*. *J. Bacteriol.* **171**, 1811-1816.
- BARTKOVA, G. Y CIZNER, I. (1994). Adherence pattern of non-piliated *Aeromonas hydrophila* strains to tissue cultures. *Microbios.* **77**, 47-55.
- BEACHEY, E.H.; SIMPSON, W.A. Y OFEK, I. (1980). Interaction of surface polymers of *Streptococcus pyogenes* with animal cells. In *Microbial adhesion to surfaces*. eds. Berkeley, R.C.W.; Lynch, J.M.; Melling, J. Rutter, P.R. y Vincent, B. pp. 389-405. London: Society of Chemical Industry.
- BEEBE, J.L. (1986). Blood-borne bacteria as reflectors and indicators of cancer. *Lab. Man.* **May**, 45-50
- BELLAND, R.J. Y TRUST, T.J. (1985). Synthesis, export, and assembly of *Aeromonas salmonicida* A-layer analyzed by transposon mutagenesis. *J. Bacteriol.* **163**, 877-881.
- BELLAND, R.J. Y TRUST, T.J. (1989). *Aeromonas salmonicida* plasmids: plasmid-directed synthesis of proteins in vitro and in *Escherichia coli* minicells. *J. Gen. Microbiol.* **135**, 513-524.
- BERNAGOZZI, M.; BIANUCCI, F.; SARRE, E. Y SACCHETTI, R. (1994). Assessment of some selective media for the recovery of *Aeromonas hydrophila* surface waters. *Zentralbl. Hyg. Umweltmed.* **195**, 121-134.
- BERNHEIMER, A.W. Y AVIGAD, L.S. (1974). Partial characterization of aerolysin, a lytic exotoxin from *Aeromonas hydrophila*. *Infect. Immun.* **9**, 1016-1021.
- BERRANG, M.E.; BRACKETT, R.E. Y BEUCHAT, L.R. (1989). Growth of *Aeromonas hydrophila* on fresh vegetables stored under a controlled atmosphere. *Appl. Environ. Microbiol.* **55**, 2167-2171.
- BEUCHAT, L.R. (1991). Behaviour of *Aeromonas* species at refrigeration temperatures. *Int. J. Food Microbiol.* **13**, 217-224.
- BEVERIDGE, T.J. (1978). The response of cell walls of *Bacillus subtilis* to metals and to electron-microscopic strains. *Can. J. Microbiol.* **24**, 89-104.

- BEVERIDGE, T.J. (1979). Surface arrays on the wall of *Sporosarcina ureae*. *J. Bacteriol.* **139**, 1039-1048.
- BEVERIDGE, T.J. Y MURRAY, R.G.E. (1975). Surface arrays on the cell wall of *Spirillum metamorphum*. *J. Bacteriol.* **124**, 1529-1544.
- BHAKDI, S. Y TRANUM-JENSEN, J. (1988). Damage to cell membranes by pore-forming bacterial cytolisins. *Prog. Allergy.* **40**, 1-43.
- BIAMON, E.J. Y HAZEN, T.C. (1983). Survival and distribution of *Aeromonas hydrophila* in near-shore coastal waters of Puerto Rico receiving rum distillery effluent. *Water Res.* **17**, 319-326.
- BICKEL, K.D.; LINEAWEAVER, W.C.; FOLLANSBEE, S.; FEIBEL, R.; JACKSON, R.; BUNCHE, H.J. (1994). Intestinal flora of the medicinal leech *Hirudinaria manillensis*. *J. Reconstr. Microsurg.* **10**, 83-85.
- BJORN, M.J.; SOKOL, P.A. Y IGLEWSKI, B.H. (1979). Influence of iron on yields of extracellular products in *Pseudomonas aeruginosa* cultures. *J. Bacteriol.* **138**, 193-200.
- BLACK, R.E. (1986). Pathogens that cause traveler's diarrhea in Latin America and Africa. *Rev. Inf. Dis.* **8** (Suppl.), 131-135.
- BLANCHARD, D.C. Y SYZDEK, L.D. (1978). Seven problems in bubble and jet drop researches. *Limnol. Oceanogr.* **23**, 389-400.
- BLAUSTEIN, A.R. Y WAKE, D.B. (1995). Declive de las poblaciones de anfibios. *Investigación y Ciencia.* **Junio**, 8-13.
- BLICKSTAND, E. Y MOLIN, G. (1983). Carbon dioxide as a controller of the spoilage flora of pork, with special reference to temperature and sodium chloride. *J. Food Protect.* **46**, 756-763.
- BLOCH, S. Y MONTEIL, H. (1989). Purification and characterization of *Aeromonas hydrophila* beta-hemolysin. *Toxicon.* **27**, 1279-1287.
- BOULANGER, Y.; LALLIER, R. Y COUSINEAU, G. (1977). Isolation of enterotoxigenic *Aeromonas* from fish. *Fish Can. J. Microbiol.* **23**, 1161-1164.
- BRENDEN, R.A. Y JANDA, J.M. (1986). The interaction of complement components with *Aeromonas* species. *Can. J. Microbiol.* **32**, 1-3.
- BUCHANAN, R.L. Y PALUMBO, S.A. (1985). *Aeromonas hydrophila* and *Aeromonas sobria* as potential food poisoning species: a review. *J. Food Safety.* **7**, 15-29.
- BUNCIC, S. Y AVERY, S.M. (1995). Effect of pre-incubation pH on the growth characteristics of *Aeromonas hydrophila* at 5°C. as assessed by two methods. *Lett. Appl. Microbiol.* **20**, 7-10.

- BUNNING, V.K.; CRAWFORD, R.G.; STELMA, G.N.JR.; KAYLOR, L.O. Y JOHNSON, C.H. (1986). Melanogenesis in murine B16 cells exposed to *Aeromonas hydrophila* citotoxic enterotoxin. *Can. J. Microb.* **32**, 814-819.
- BURKE, V.; ROBINSON, J.; ATKINSON, H.M.; DIBLEY, M.; BERRY, R.J. Y GRACEY, M. (1981a). Exotoxins of *Aeromonas hydrophila*. *Aust. J. Exp. Biol. Med. Sci.* **59**, 753-761.
- BURKE, V.; ROBINSON, J.; BERRY, R.J. Y GRACEY, M. (1981b). Detection of enterotoxins of *Aeromonas hydrophila* by suckling mouse test. *J. Med. Microbiol.* **14**, 401-408.
- BURKE, V.; GRACEY, M.; ROBINSON, J.; PECK, D.; BEAMAN, J. Y BUNDELL, C. (1983a). The microbiology of childhood gastroenteritis: *Aeromonas* species and other infective agents. *J. Infect. Dis.* **148**, 68-74.
- BURKE, V.; ROBINSON, J.; BEAMAN, J.; GRACEY, M.; LESMANA, M.; ROCKHILL, R.; ECHEVERRIA, P. Y JANDA, J.M. (1983b). Correlation of enterotoxigenicity with biotype in *Aeromonas* spp. *J. Clin. Microbiol.* **18**, 1196-1200.
- BURKE, V.; COOPER, M.; ROBINSON, J.; GRACEY, M.; LESMANA, M.; ECHEVERRIA, P. Y JANDA, J.M. (1984a). Hemagglutination patterns of *Aeromonas* spp. in relation to biotype and source. *J. Clin. Microbiol.* **19**, 39-43.
- BURKE, V.; ROBINSON, J.; COOPER, M.; BEAMAN, J.; PARTRIDGE, K.; PETERSON, D. Y GRACEY, M. (1984b). Biotyping and virulence factors in clinical and environmental isolates of *Aeromonas* species. *Appl. Environ. Microbiol.* **47**, 1146-1149.
- BURKE, V.; ROBINSON, J.; GRACEY, M.; PETERSON, D. Y PARTRIDGE, K. (1984c). Isolation of *Aeromonas hydrophila* from metropolitan water supply: seasonal correlation with clinical isolates. *Appl. Environ. Microbiol.* **48**, 361-366.
- BURKE, V.; ROBINSON, J. Y GRACEY, M. (1987). Enterotoxins of *Aeromonas* species. *Experientia.* **43**, 368-369.
- CAHILL, M.M. (1990). Virulence factors in motile *Aeromonas* species. *J. Appl. Bacteriol.* **69**, 1-16.
- CALLISTER, S.M. Y AGGER, W.A. (1987). Enumeration and characterization of *Aeromonas hydrophila* and *caviae* isolated from grocery store produce. *Appl. Environ. Microbiol.* **53**, 249-253.
- CAMPBELL, J.D. Y HOUSTON, C.W. (1985). Effect of cultural conditions on the presence of a cholera-toxin cross-reactive factor in culture filtrates of *Aeromonas hydrophila*. *Curr. Microbiol.* **12**, 101-106.

- CAREY, P.E.; ELEY, A. Y WILCOX, M.H. (1994). Assessment of a chemiluminescent universal probe for taxonomical and epidemiological investigations of *Aeromonas* sp. isolates. *J. Clin. Pathol.* **47**, 642-646.
- CARNAHAN, A.M.; JOSEPH, S.W. Y JANDA, J.M. (1989a). Species identification of *Aeromonas* strains based on carbon substrate oxidation profiles. *J. Clin. Microbiol.* **27**, 2128-2129.
- CARNAHAN, A.M.; MARI, M.A.; FANNING, G.R.; PASS, M.A. Y JOSEPH, S.W. (1989b). Characterization of *Aeromonas schubertii* strains recently isolated from traumatic wound infections. *J. Clin. Microbiol.* **27**, 1826-1830.
- CARNAHAN, A.M.; HAMMONTREE, L.; BOURGEOIS, L. Y JOSEPH, S.W. (1990). Pyrazinamidase activity as a phenotypic marker for several *Aeromonas* species isolated from clinical specimens. *J. Clin. Microbiol.* **28**, 391-394.
- CARNAHAN, A.M.; BEHRAM, S. Y JOSEPH, S.W. (1991a). Aerokey II: a flexible key for identifying clinical *Aeromonas* species. *J. Clin. Microbiol.* **29**, 2843-2849.
- CARNAHAN, A.M.; CHAKRABORTY, T.; FANNING, G.R.; VERMA, D.; ALI, A.; JANDA, M. Y JOSEPH, S.W. (1991b). *Aeromonas trota* sp. nov., an ampicillin susceptible species isolated from clinical specimens. *J. Clin. Microbiol.* **29**, 1206-1210.
- CARNAHAN, A.M.; FANNING, G.R. Y JOSEPH, S.W. (1991c). *Aeromonas jandaei* (formerly genospecies DNA group 9 *Aeromonas sobria*) a new sucrose-negative species isolated from clinical specimens. *J. Clin. Microbiol.* **29**, 506-564.
- CARNAHAN, A.M.; WATSKY, D. Y PEELER, R. (1992). A three year retrospective study of clinical *Aeromonas* isolated using Aerokey II. Abstr. C-295. 92nd General Meeting of the American Society for Microbiology.
- CARRELLO, A.; SILBURN, K.A.; BUDDEN, J.R. Y CHANG, B.J. (1988). Adhesion of clinical and environmental *Aeromonas* isolated to HEp-2 cells. *J. Med. Microbiol.* **26**, 19-27.
- CATTABIANI, F. (1986). Sensibilita di disinfettari di *Aeromonas hydrophila* e di *Vibri fluvialis*. *Arch. Vet. Ital.* **37**, 65-72.
- CHAKRABORTY, T.; MONTENEGRO, M.A.; SANYAL, S.C.; HELMUTH, R.; BULLING, E. Y TIMMIS, K.N. (1984). Cloning of enterotoxin gene from *Aeromonas hydrophila* provides of a cytotoxic enterotoxin. *Infect. Immun.* **46**, 435-441.
- CHAKRABORTY, T.; HUHLE, B.; BERGBAUER, H. Y GOEBEL, W. (1986). Cloning expression and mapping of the *Aeromonas hydrophila* aerolysin gene determinant in *Escherichia coli* K12. *J. Bacteriol.* **167**, 368-374.

- CHAKRABORTY, T.; HUHLE, B.; HOF, H.; BERGBAUER, H. Y GOEBEL, W. (1987). Marker exchange mutagenesis of the aerolysin determinant in *Aeromonas hydrophila* demonstrates the role of aerolysin in *A. hydrophila* associated systemic infections. *Infec. Immun.* **55**, 2274-2280.
- CHAMPSAUR, H.; ANDREMONT, A.; MATHIEU, D.; ROTTMAN, E. Y AUZEPY, P. (1982). Cholera-like illness due to *Aeromonas sobria*. *J. Infect. Dis.* **145**, 248-254.
- CHANG, B.J. Y BOLTON, S.M. (1987). Plasmids and resistance to antimicrobial agents in *Aeromonas sobria* and *Aeromonas hydrophila* clinical isolates. *Antimicrob. Agents Chemoter.* **31**, 1281-1282.
- CHART, H. Y TRUST, T.J. (1983). Acquisition of iron by *Aeromonas salmonicida*. *J. Bacteriol.* **156**, 758-764.
- CHOPRA, A.K.; HOUSTON, C.W.; GENAUX, C.T.; DIXON, J.D. Y KUROSKY, A. (1986). Evidence for production of an enterotoxin and cholera toxin cross-reactive factor by *Aeromonas hydrophila*. *J. Clin. Microbiol.* **24**, 661-664.
- CHOPRA, A.K.; HOUSTON, C.W.; PETERSON, J.W. Y JIN, G.F. (1993). Cloning, expression and sequence analysis of a cytolytic enterotoxin gene from *Aeromonas hydrophila*. *Can. J. Microbiol.* **39**, 513-523.
- CHOPRA, A.K.; PHAM, R. Y HOUSTON, C.W. (1994). Cloning and expression of putative citotoxic enterotoxin-encoding genes from *Aeromonas hydrophila*. *Gene.* **139**, 87-91.
- CIPRIANO, R.C.; GRIFFIN, B.R. Y LIDGERDING, B.C. (1981). *Aeromonas salmonicida*: relationship between extracellular growth products and isolate virulence. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* **38**, 1322-1326.
- CLARK, J.A.; BURGER, G.A. Y SABATINOS, L.E. (1982). Characterization of indicator bacteria in municipal raw water, drinking water and new main water samples. *Can. J. Microbiol.* **28**, 1002-1013.
- COLLINS, M.D.; MARTINEZ-MURCIA, A.J. Y CAI, J. (1993). *Aeromonas enteropelogenes* and *Aeromonas ichthiosmia* are identical to *Aeromonas trota* and *Aeromonas veronii*, respectively, as revealed by small-subunit rRNA sequence analysis. *Int. J. Food Microbiol.* **43**, 855-856.
- COLWELL, R.R.; MACDONELL, M.T. Y DE LEY, J. (1986). Proposal to recognize family *Aeromonadaceae* fam. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **36**, 473-477.
- CONDON, S.; GARCIA, M.L.; OTERO, A. Y SALA, F.J. (1992). Effect of culture age, pre-incubation at low temperature and pH on the thermal resistance of *Aeromonas hydrophila*. *J. Appl. Bacteriol.* **72**, 322-326.

- CORREA, A.; PAIVA, M.; MOREIRA, A. Y DELGADO, I. (1993). Occurrence and characterization of *Aeromonas* species in pasteurized milk and white cheese in Rio de Janeiro Brazil. *J. Food Protect.* **56**, 62-65.
- CROSA, J. (1989). Genetics and molecular biology of siderophore-mediated iron transport in bacteria. *Microbiol. Rev.* **53**, 517-530.
- CUMBERBATCH, N.; GURWITH, M.J.; LANGSTON, C.; SACK, R.B. Y BRUNTON, J. (1979). Cytotoxic enterotoxin produced by *Aeromonas hydrophila*: relationship of toxigenic isolates to diarrhoeal disease. *Infect. Immun.* **23**, 829-837.
- DAILY, D.P.; JOSEPH, S.W.; COOLBAUGH, J.C.; WALKER, R.I.; MERRELL, B.R., ROLLINS, D.M.; SEIDLER, R.J.; COLWELL, R.R. Y LISSNER, C.R. (1981). Association of *Aeromonas sobria* with human infections. *J. Clin. Microbiol.* **24**, 661-664.
- DAVIS, W.A.; KANE, J.G. Y GARAGUSI, V.F. (1978). Human *Aeromonas* infection: a review of the literature and a case report of endocarditis. *Medicine.* **57**, 267-277.
- DE LA MORENA, M.L.; VAN, R.; SINGH, K.; BRIAN, M.; MURRAY, M.E.; PICKERING, L.K. (1993). Diarrhea associated with *Aeromonas* species in children in day care centers. *J. Infect. Dis.* **168**, 215-218.
- DESMOND, E. Y JANDA, J.M. (1986). Growth of *Aeromonas* species on enteric agars. *J. Clin. Microbiol.* **23**, 1065-1067.
- DEXTER, S.C.; SULLIVAN, J.D. JR.; WILLIAMS, J. III Y WATSON, S.W. (1975). Influence of substrate wettability on the attachment of marine bacteria to various surfaces. *Appl. Microbiol.* **30**, 298-308.
- DICKSON, W.A.; BOOTHMAN, P. Y HARE, K. (1984). An unusual source of hospital wound infection. *Brit. Med. J.* **289**, 1727-1728.
- DILLON, J.K.; FUERST, J.A.; HAYWARD, A.C. Y DAVIS, G.H.G. (1986). A comparison of five methods for assaying bacterial hydrophobicity. *J. Microbiol. Meth.* **6**, 13-19.
- DOBRESCU, L. (1978). Enterotoxigenic *Aeromonas hydrophila* from a case of piglet diarrhea. *Zentrabl. Veteunaermed. (B)* **25**, 713-718.
- DOMAN, D.B.; GOLDING, M.I.; GOLDBERG, H.J. Y DOYLE, R.B. (1989). *Aeromonas hydrophila* colitis presenting as medically refractory inflammatory bowel disease. *Am. J. Gastroenterol.* **84**, 83-85.
- DOOLEY, J.S.G.; LALLIER, R.; SHAW, D.H. Y TRUST, T.J. (1985). Electrophoretic and immunochemical analysis of the lipopolysaccharides from various strains of *Aeromonas hydrophila*. *J. Bacteriol.* **164**, 263-269.
- DOOLEY, J.S.G.; LALLIER, R. Y TRUST, T.J. (1986). Surface antigens of virulent strains of *Aeromonas hydrophila*. *Vet. Immunol. Immunopathol.* **12**, 339-344.

- DOOLEY, J.S.G.; MCCUBBIN, W.D.; KAY, C.M. Y TRUST, T.J. (1988). Isolation and biochemical characterization of the S-layer protein from a pathogenic *Aeromonas hydrophila* strain. *J. Bacteriol.* **170**, 2631-2638.
- DOOLEY, J.S.G. Y TRUST, T.J. (1988). Surface protein composition of *Aeromonas hydrophila* strains virulent for fish: identification of a surface array protein. *J. Bacteriol.* **170**, 499-506.
- DORSCH, M.; ASHBOLT, N.J.; COX, P.T. Y GOOMAN, A.E. (1994). Rapid identification of *Aeromonas* species using 16S rDNA targeted oligonucleotide primers: a molecular approach based on screening of environmental isolates. *J. Appl. Bacteriol.* **77**, 722-726.
- DUBEY, R.S.; SANYAL, S.C. Y MALHORTA, D.P. (1980). Purification of *Aeromonas hydrophila* enterotoxin and its mode of action in experimental model. In *Nature Toxins*. eds. Eaker, D. y Wadston, T. Oxford: Pergamon Press.
- ECHEVERRIA, P.; SACK, R.B. Y BLACKLOW, N.R. (1984). Prophylactic doxycycline for traveler's diarrhea in Thailand: further supportive evidence of *Aeromonas hydrophila* as an enteric pathogen. *Am. J. Epidemiol.* **120**, 912-921.
- EDDY, B.P. (1960). The use and meaning of the term "psychrophilic". *J. Appl. Bacteriol.* **23**, 189.
- EDDY, B.P. Y KITCHELL, A.G. (1959). Cold-tolerant fermentative gram-negative organisms from meat and other sources. *J. Appl. Bacteriol.* **22**, 57-63.
- ELBASHIR, A.M. Y MILLERSHIP, S.E. (1989). Haemagglutinating activity of *Aeromonas* spp. from different sources; attempted use as a typing system. *Epidemiol. Infect.* **102**, 221-229.
- ELEY, A.; GEARY, I. Y WILCOX, M.H. (1993). Growth of *Aeromonas* spp. at 4°C and related toxin production. *Lett. Appl. Microbiol.* **16**, 36-39.
- ELLISON, R.T. Y MOSTOW, S.R. (1984). Pyogenic meningitis manifestations during therapy for *Aeromonas hydrophila* sepsis. *Arch. Inter. Med.* **144**, 2078-2079.
- ENFORS, S.O.; MOLIN, G. Y TERNSTROM, A. (1979). Effect of packaging under carbon dioxide, nitrogen or air on the microbial flora of pork stored at 4°C. *J. Appl. Bacteriol.* **47**, 197-208.
- ERICKSON, J.P. Y JENKINS, P. (1992). Behaviour of psychrotrophic pathogens *Listeria monocytogenes*, *Yersinia enterocolitica* and *Aeromonas hydrophila* in commercially pasteurized eggs held at 2, 6.7 and 12.8°C. *J. Food Protect.* **55**, 8-12.

- ESTEVE, C.; AMARO, C. Y TORANZO, A.E. (1994). O-serogrouping and surface components of *Aeromonas hydrophila* and *Aeromonas jandaei* pathogenic for eels. *FEMS Microbiol. Lett.* **117**, 85-90.
- ESTEVE, C.; AMARO, C.; GARAY, E.; SANTOS, Y. Y TORANZO, A.E. (1995). Pathogenicity of live bacteria and extracellular products of motile *Aeromonas* isolated from eels. *J. Appl. Bacteriol.* **78**, 555-562.
- EVENBERG, D. Y LUGTENBERG, B. (1982). Cell surface of the fish pathogenic bacterium *Aeromonas salmonicida*. I. Purification and characterization of a major cell envelope protein related to autoagglutination, adhesion, and virulence. *Biochim. Biophys. Acta.* **684**, 249-254.
- EVENBERG, D.; VAN BOXTEL, R.; LUGTENBERG, B. Y SCHURER, F. (1982). Cell surface of the fish pathogenic bacterium *Aeromonas salmonicida*. I. Relationship between autoagglutination and the presence of a major cell envelope protein. *Biochim. Biophys. Acta.* **684**, 241-248.
- FAINSTEIN, V.; WEAVER, S. Y BODEY, G.P. (1982). In vitro susceptibility of *Aeromonas hydrophila* against new antibiotics. *Antimicrob. Agents Chemother.* **22**, 513-514.
- FANNING, G.R.; HIKMAN-BRENNER, F.W.; FARMER, J.J.III. Y BRENNER, D.J. (1985). DNA relatedness and phenotypic analysis of the genus *Aeromonas*. Abstr. C-116. Annual Meeting of the American Society for Microbiology.
- FARIS, A.; LINDAHL, M. Y WADSTROM, T. (1982). High surface hydrophobicity of hemagglutinating *Vibrio cholerae* and other Vibrios. *Curr. Microbiol.* **7**, 357-362.
- FARMER, J.J.III.; HIKMAN-BRENNER, F.W.; FANNING, G.R.; ARDUINO, M.J. Y BRENNER, D.J. (1986). Analysis of *Aeromonas* and *Plesiomonas* by DNA-DNA hybridization and phenotype. Abstr. P-1. 1st Int. Workshop *Aeromonas Plesiomonas*.
- FARRAYE, F.A.; PEPPERCORN, M.A.; CIANO, P.S. Y KAVESH, W.N. (1989). Segmental colitis associated with *Aeromonas hydrophila*. *Am. J. Gastroenterol.* **84**, 436-438.
- FASS, R.J. Y BARNISHAN, J. (1981). In vitro susceptibility of *Aeromonas hydrophila* to 32 antibiotics. *Antimicrob. Agents Chemother.* **19**, 357-358.
- FERREIRA, M.A.S.S. Y LUND B.M. (1987). The influence of pH and temperature on initiation of growth of *Salmonella* spp. *Lett. Appl. Microbiol.* **5**, 67-70.
- FIGURA, N. Y GUGLIELMETTI, P. (1987). Differentiation of motile and mesophilic *Aeromonas* strains into species by testing for CAMP-LIKE factor. *J. Clin. Microbiol.* **25**, 1341-1342.

- FIGURA, N.; MARRI, L.; VERDIANI, S.; CECCHERINI, C. Y BARBENI, A. (1986). Prevalence, species differentiation and toxigenicity of *Aeromonas* strains in cases of childhood gastroenteritis and in controls. *J. Clin. Microbiol.* **23**, 595-599.
- FINLAY, B.B. Y FALKOW, S. (1989). Common themes in microbial pathogenicity. *Microbiol. Rev.* **53**, 210-230.
- FLETCHER, M. Y LOEB, G.I. (1979). Influence of substratum characteristics on the attachment of a marine pseudomonad to solid surfaces. *Appl. Environ. Microbiol.* **37**, 67-72.
- FRANCKI, K.T. Y CHANG, B.J. (1994). Variable expression of O-antigen and the role of lipopolysaccharide as an adhesin in *Aeromonas sobria*. *FEMS Microbiol. Lett.* **122**, 97-100.
- FREIJ, B.J. (1987). Extraintestinal *Aeromonas* and *Plesiomonas* infections of humans. *Experientia.* **43**, 359-360.
- FRICKER, C.R. (1987). Serotyping of mesophilic *Aeromonas* spp. on the basis of lipopolysaccharide antigens. *Lett. Appl. Microbiol.* **4**, 113-116.
- FRICKER, C.R. Y TOMPSETT, S. (1989). *Aeromonas* spp. in foods: a significant cause of food poisoning ?. *Int. J. Food Microbiol.* **9**, 17-23.
- GARCIA DE FERNANDO, G.D. Y FOX, P.F. (1991). Extracellular proteinases from *Micrococcus* GF: I. Factors affecting growth and production. *Lait.* **71**, 359-370.
- GARCIA-LOPEZ, M.L.; OTERO, A.; GARCIA-FERNANDEZ, M.C. Y SANTOS J.A. (1993). Incidencia, comportamiento y control de *Aeromonas hydrophila* en productos cárnicos y lácteos. *Microbiología.* **9**, 49-56.
- GARCIA-RODRIGUEZ, J.A. (1987). Elementos facultativos: cápsula, glicocálix, flagelos y fimbrias. El esporo. En *Microbiología y Parasitología Médica*. pp. 47-55. Barcelona: Salvat.
- GARDNER, G.A. (1965). The aerobic flora of stored meat with particular reference to the use of selective media. *J. Appl. Bacteriol.* **28**, 252-264.
- GARLAND, W.J. Y BUCKLEY, J.T. (1988). The cytolytic toxin aerolysin must aggregate to disrupt erythrocytes, and aggregation is stimulated by human glycophorin. *Infect. Immun.* **56**, 1249-1253.
- GEORGE, W.L.; NAKATA, M.M.; THOMPSON, J. Y WHITE, M.L. (1985). *Aeromonas*-related diarrhea in adults. *Arch. Intern. Med.* **145**, 2207-2211.
- GEORGE, W.L.; JONES, M.J. Y NAKATA, M.M. (1986). Phenotypic characteristics of *Aeromonas* species isolated from adult human. *J. Clin. Microbiol.* **23**, 1026-1029.

- GERSON, D.F. Y SCHEER, D. (1980). Cell surface energy, contact angles and phase partition. III. Adhesion of bacterial cells to hydrophobic surfaces. *Biochim. Biophys. Acta.* **602**, 506-510.
- GHANEM, E.H.; MUSSA, M.E. Y ERAKI, H.M. (1993). *Aeromonas* associated gastroenteritis in Egypt. *Zentralbl. Mikrobiol.* **148**, 441-447.
- GILL, C.O. Y REICHEL, M.P. (1989). Growth of the cold-tolerant pathogens *Yersinia enterocolitica*, *Aeromonas hydrophila* and *Listeria monocytogenes* on high-pH beef packaged under vacuum or carbon dioxide. *Food Microbiol.* **6**, 223-230.
- GLUSKIN, I.; BATASH, D.; SHOSEYOV, D.; MOR, A.; KAZAK, R.; AZIZI, E. Y BOLDUR, I. (1992). A 15-year study of the role of *Aeromonas* spp. in gastroenteritis in hospitalized children. *J. Med. Microbiol.* **37**, 315-318.
- GOBAT, P.F. Y JEMMI, T. (1993). Distribution of mesophilic *Aeromonas* species in raw and ready to eat fish and meat products in Switzerland. *Int. J. Food Microbiol.* **20**, 117-120.
- GOBAT, P.F. Y JEMMI, T. (1995). Comparison of seven selective media for the isolation of mesophilic *Aeromonas* species in fish and meat. *Int. J. Food Microbiol.* **24**, 375-384.
- GOLD, W.L. Y SALIT, I.E. (1993). *Aeromonas hydrophila* infections of skin and soft tissue: report of 11 cases and review. *Clin. Infect. Dis.* **16**, 69-74.
- GOLDEN, D.A.; EYLES, M.J. Y BEUCHAT, L.R. (1989). Influence of modified-atmosphere storage on the growth of uninjured and heat-injured *Aeromonas hydrophila*. *Appl. Environ. Microbiol.* **55**, 3012-3015.
- GOODWIN, C.S.; HARPER, W.E.S.; STEWART, J.K.; GRACEY, M.; BURKE, V. Y ROBINSON, J. (1983). Enterotoxigenic *Aeromonas hydrophila* and diarrhea in adults. *Med. J. Aust.* **1**, 25-26.
- GORCZYCA, E.; SUMNER, J.L.; COHEN, D. Y BRADY, P. (1985). Mesophilic fish spoilage. *Food Technol. Aust.* **37**, 24-26.
- GOSLING, P.J.; TURNBULL, P.C.; LIGHTFOOT, N.F.; PETHER, J.V.; LEWIS, R.J. (1993). Isolation and purification of *Aeromonas sobria* cytotoxic enterotoxin and beta haemolysin. *J. Med. Microbiol.* **38**, 227-234.
- GRABOW, W.O.K. Y DUPREEZ, M. (1979). Comparison of m-Endo LES, McConkey, and Teepol media for membrane filter counting at total coliform bacteria in water. *Appl. Environ. Microbiol.* **38**, 351-358.
- GRACEY, M.; BURKE, V. Y ROBINSON, J. (1982). *Aeromonas* subspecies in traveller's diarrhoea. *Brit. Med. J.* **289**, 658.

- GRACEY, M.; BURKE, V. Y ROBINSON, J. (1984). *Aeromonas*-associated gastroenteritis. *Lancet*. **ii**, 1304-1306.
- GRAM, L. (1991). Inhibition of mesophilic spoilage *Aeromonas* spp. on fish by salt, potassium sorbate, liquid smoke, and chilling. *J. Food Protect.* **54**, 436-442.
- GRAM, L.; TROLLE, G. Y HUSS, H.H. (1987). Detection of specific spoilage bacteria from fish stored at low (0°C) and high (20°C) temperatures. *Int. J. Food Microbiol.* **4**, 65-72.
- GRAU, F.H. (1981). Role of pH, lactate and anaerobiosis in controlling the growth of some fermentative gram-negative bacteria on beef. *Appl. Environ. Microbiol.* **42**, 1043-1050.
- GRAY, P.A. Y KIROV, S.M. (1993). Adherence to HEp-2 cells and enteropathogenic potential of *Aeromonas* spp. *Epidemiol. Infect.* **110**, 279-287.
- GRAY, S.J. (1984). *Aeromonas hydrophila* in livestock: incidence, biochemical characteristics and antibiotic susceptibility. *J. Hyg.* **92**, 365-375.
- GRAY, S.J.; STICKER, D.J. Y BRYANT, T.N. (1990). The incidence of virulence factors in mesophilic *Aeromonas* species isolated from farm animals and their environment. *Epidemiol. Infect.* **105**, 275-294.
- GREENAWAY, C. (1988). *Aeromonas*: a future concern for the dairy and food industries. In *The Dairy Technologist*. pp. 73-75. Victoria, Australia: Food Research Institute.
- GREY, P.A. Y KIROV, S.M. (1993). Adherence to HEp-2 cells and enteropathogenic potential of *Aeromonas* spp. *Epidemiol. Infect.* **110**, 279-287.
- HANES, D.E. Y CHANDLER, D.K. (1993). The role of a 40-megadalton plasmid in the adherence and hemolytic properties of *Aeromonas hydrophila*. *Microb. Pathog.* **15**, 313-317.
- HANNE, L.F. Y FINKELSTEIN, R.A. (1982). Characterization and distribution of the hemagglutinins produced by *Vibrio cholerae*. *Infect. Immun.* **36**, 209-214.
- HANNINEN, M.L. (1993). Occurrence of *Aeromonas* spp. in samples of ground meat and chicken. *Int. J. Food microbiol.* **18**, 339-342.
- HANNINEN, M.L. (1994). Phenotypic characteristics of the three hybridation groups of *Aeromonas hydrophila* complex isolated from different sources. *J. Appl. Bacteriol.* **76**, 455-462.
- HARDY, J.C.; TODD, L.S. Y STRINGER, M.F. (1986). Toxin production by *Aeromonas hydrophila* in bacteriological media and foods. *Zentralbl. Bakteriol. Mikrobiol. Hyg. I. Abetellung Suppl.* **15**, 175-176.

- HARRIS, R.L.; FAINSTEIN, V. Y ELTING, L. (1985). Bacteriemia caused by *Aeromonas* species in hospitalized cancer patients. *Rev. Inf. Dis.* **7**, 314-320.
- HAVELAAR, A.H.; DURING, M. Y VERSTEEGH, J.F.M. (1987). Ampicillin-dextrin agar medium for the enumeration of *Aeromonas* species in water by membrane filtration. *J. Appl. Bacteriol.* **62**, 279-287.
- HAVELAAR, A.H. Y VONK, M. (1988). The preparation of ampicillin dextrin agar for the enumeration of *Aeromonas* in water. *Lett. Appl. Microbiol.* **7**, 169-171.
- HAVELAAR, A.H.; SCHETS, F.M.; VAN SILFHOUT, A.; JANSEN, W.H.; WIETEN, G. Y VAN DER KOOJ, D. (1992). Typing of *Aeromonas* strains from patients with diarrhea and from drinking water. *J. Appl. Bacteriol.* **72**, 435-444.
- HAZEN, T.C. (1983). A model for the density of *Aeromonas hydrophila* in Albemarle Sound North Carolina. *Microbiol. Ecol.* **9**, 137-153.
- HAZEN, T.C.; FLIERMANS, C.B.; HIRSCH, R.P. Y ESCH, G.W. (1978). Prevalence and distribution of *Aeromonas hydrophila* in the United States. *Appl. Environ. Microbiol.* **36**, 731-738.
- HEDGES, R.W.; SMITH, P. Y BRAZIL, G. (1985). Resistance plasmids of aeromonads. *J. Gen. Microbiol.* **131**, 2091-2095.
- HEYWOOD, R. (1968). *Aeromonas* infections in snakes. *Cornell Vet.* **58**, 236-241.
- HIKMAN-BRENNER, F.W.; MACDONALD, K.L.; STEINGERWALT, A.G.; FANNING, G.R.; BRENNER, D.J. Y FARMER, J.J.III. (1987). *Aeromonas veronii*, a new ornithine decarboxylase-positive species that may cause diarrhea. *J. Clin. Microbiol.* **25**, 900-906.
- HIKMAN-BRENNER, F.W.; FANNING, G.R.; ARDUINO, M.J.; BRENNER, D.J. Y FARMER, J.J. III. (1988). *Aeromonas schubertii*, a new mannitol-negative species found in human clinic specimens. *J. Clin. Microbiol.* **26**, 1561-1564.
- HO, A.S.Y.; MIETZNER, T.A.; SMITH, A.J. Y SCHOOLNIK, G.K. (1990). The pili of *Aeromonas hydrophila*: identification of an environmentally regulated "mini pilin". *J. Exp. Med.* **172**, 795-806.
- HOLMBERG, S.D. Y FARMER, J.J. (1984). *Aeromonas hydrophila* and *Plesiomonas shigelloides* as causes of intestinal infections. *Rev. Inf. Dis.* **6**, 633-639.
- HOLMES, P. Y SARTORY, D.P. (1993). An evaluation of media for the membrane filtration enumeration of *Aeromonas* from drinking water. *Lett. Appl. Microbiol.* **17**, 58-60.
- HOKAMA, A.; HONMA, Y. Y NAKASONE, N. (1990). Pili of an *Aeromonas hydrophila* strain as a possible colonization factor. *Microbiol. Immunol.* **34**, 901-915.

- HOKAMA, A. Y IWANAGA, M. (1991). Purification and characterization of *Aeromonas sobria* pili, a possible colonization factor. *Infect. Immun.* **59**, 3478-3483.
- HOKAMA, A. Y IWANAGA, M. (1992). Purification and characterization of *Aeromonas sobria* Ae24 pili: a possible new colonization factor. *Microb. Pathog.* **13**, 325-334.
- HONMA, Y. Y NAKASONE, N. (1990). Pili of *Aeromonas hydrophila*: purification, characterization, and biological role. *Microbiol. Immunol.* **34**, 83-98.
- HOSTACKA, A.; CIZNAR, J.; KORYCH, B. Y KAROLCEH, J. (1982). Toxic factors of *Aeromonas hydrophila* and *Plesiomonas shigelloides*. *Zentralbl. Bakteriolog. Hyg.* **252**, 525-534.
- HOUSTON, C.W.; CHOPRA, A.K.; ROSE, J.M. Y KUROSKY, A. (1991). Review of *Aeromonas* enterotoxins. *Experientia.* **47**, 424-426.
- HOWARD, S.P. Y BUCKLEY, J.T. (1985). Activation of the hole-forming toxin aerolysin by extracellular processing. *J. Bacteriol.* **163**, 336-340.
- HOWARD, S.P. Y BUCKLEY, J.T. (1986). Molecular cloning and expression in *Escherichia coli* of the structural gene for the hemolytic toxin aerolysin from *Aeromonas hydrophila*. *Mol. Gen. Genet.* **204**, 289-295.
- HSU, T.C.; WALTMAN, W.B. Y SHOTTS E.B. (1981). Correlation of extracellular enzymatic activity and biochemical characteristics with regard to virulence of *Aeromonas hydrophila*. *Dev. Biol. Stand.* **49**, 101-111.
- HUDSON, J.A. (1992). Variation in growth kinetics and phenotype of *Aeromonas* spp. from clinical, meat processing and fleshfood sources. *Int. J. Food Microbiol.* **16**, 131-139.
- HUDSON, J.A. Y DE LACY, K.M. (1991). Incidence motile *Aeromonads* in New Zeland retail foods. *J. Food Protec.* **54**, 696-699.
- HUDSON, J.A. Y MOTT, S.J. (1993). Presence de *Listeria monocytogenes*, motile aeromonads and *Yersinia enterocolitica* in environmental samples taken from a supermarket delicatessen. *Int. J. Food Microbiol.* **18**, 333-337.
- HUDSON, J.A. Y AVERY, S.M. (1994). Growth of *Listeria monocytogenes*, *Aeromonas hydrophila* y *Yersinia enterocolitica* on cooked mussel tissue under refrigeration and mild temperature abuse. *J. Food Safety.* **14**, 41-52.
- HUGUET, J.M. Y RIBAS, F. (1991). SGAP-10C agar for the isolation and qualification of *Aeromonas* from water. *J. Appl. Bacteriol.* **70**, 81-88.
- HUNTER, P.R. Y BURGE, S.H. (1987). Isolation of *Aeromonas caviae* from ice-cream. *Lett. Appl. Microbiol.* **4**, 45-46.

- HUSSLEIN, V.; BERGBAUER, H. Y CHAKRABORTY, T. (1991). Studies on aerolysin and serine protease from *Aeromonas trota* sp. nov. *Experientia*. **47**, 420-421.
- HUSSLEIN, V.; CHAKRABORTY, T.; CARNAHAN, A. Y JOSEPH, S.W. (1992). Molecular studies on the aerolysin gene of *Aeromonas* species and discovery of species-specific probe for *Aeromonas trota* species nova. *Clin. Infect. Dis.* **14**, 1061-1068.
- HUYS, G.; VANCANNEYT, M.; COOPMAN, R.; JANSSEN, P.; FALSEN, E.; ALTWEGG, M. Y KERSTERS, K. (1994). Cellular fatty acid composition as a chemotaxonomic marker for the differentiation of phenospecies and hybridization groups in the genus *Aeromonas*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **44**, 651-658.
- HUYS, G.; KERSTERS, I.; VANCANNEYT, M.; COOPMAN, R.; JANSSEN, P. Y KERSTERS, K. (1995). Diversity of *Aeromonas* sp. in Flemish drinking water production plants as determined by gas-liquid chromatographic analysis of cellular fatty acid methyl esters (FAMES). *J. Appl. Bacteriol.* **78**, 445-455.
- IBRAHIM, A. Y MACRAE, I.C. (1991). Incidence of *Aeromonas* and *Listeria* spp. in red meat and milk samples in Brisbane, Australia. *Int. J. Food Microbiol.* **12**, 263-270.
- INGHAM, S.C. Y POTTER, N.N. (1988). Growth of *Aeromonas hydrophila* and *Pseudomonas fragi* on mince and surimis made from Atlantic pollock and stored under air or modified aymosphere. *J. Food Protect.* **51**, 966-970.
- INGHAM, S.C. (1990). Growth of *Aeromonas hydrophila* and *Plesiomonas shigelloides* on cooked crayfish tails during cold storage under air, vacuum, and modified atmosphere. *J. Food Protect.* **53**, 665-667.
- ISHIGURO, E.E.; KAY, W.W.; AINSWORTH, T.; CHAMBERLAIN, J.B.; AUSTEN, R.A.; BUCKLEY, J.T. Y TRUST, T.J. (1981). Loss of virulence during culture of *Aeromonas salmonicida* at high temperature. *J. Bacteriol.* **148**, 333-340.
- ISHIGURO, E.E.; AINSWORTH, T.; TRUST, T.J. Y KAY, W.W. (1985). Congo red agar, a differential medium for *Aeromonas salmonicida*, detects the presence of the cell surface protein array involved in virulence. *J. Bacteriol.* **164**, 1233-1237.
- IWANAGA, M. Y HOKAMA, A. (1992). Characterization of *Aeromonas sobria* TAP 13 pili: a possible new colonization factor. *J. Gen. Microbiol.* **138**, 1913-1919.
- JANDA, J.M. (1991). Recent advances in the study of the taxonomy, pathogenicity and infectious syndromes associated with the genus *Aeromonas*. *Clin Microbiol. Rev.* **4**, 397-410.
- JANDA, J.M.; BOTTONE, E.J. Y REITANO, M. (1983a). *Aeromonas* species in clinical microbiology: significance, epidemiology, and speciation. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* **1**, 221-228.

- JANDA, J.M.; BOTTONE, E.J.; SKINNER, C.V. Y CALCATERRA, D. (1983b). Phenotypic markers associated with gastrointestinal *Aeromonas hydrophila* isolates from symptomatic children. *J. Clin. Microbiol.* **17**, 588-591.
- JANDA, J.M.; BRENDEN, R. Y BOTTONE, E.J. (1984a). Differential susceptibility to human serum by *Aeromonas* spp. *Curr. Microbiol.* **11**, 325-328.
- JANDA, J.M.; REITANO, M. Y BOTTONE, E.J. (1984b). Biotyping of *Aeromonas* isolates as a correlate to delineating a species-associated disease spectrum. *J. Clin. Microbiol.* **19**, 44-47.
- JANDA, J.M. Y MOTYL, M.R. (1985). Cephalothin susceptibility as a potential marker for the *Aeromonas sobria* group. *J. Clin. Microbiol.* **22**, 854-855.
- JANDA, J.M. Y BRENDEN, R. (1987). Importance of *Aeromonas sobria* in *Aeromonas* bacteriemia. *J. Infect. Dis.* **155**, 589-591.
- JANDA, J.M.; OSHIRO, L.S.; ABBOTT, S.L. Y DUFFEY, P.S. (1987). Virulence markers of mesophilic aeromonads: association of the autoagglutination phenomenon with mouse pathogenicity and the presence of a peripheral cell-associated layer. *Infect. Immun.* **55**, 3070-3077.
- JANDA, J.M. Y DUFFEY, P.S. (1988). Mesophilic aeromonads in human disease: current taxonomy, laboratory identification and infectious disease spectrum. *Rev. Infect. Dis.* **10**, 980-997.
- JANDA, J.M.; GUTHERTZ, L.S.; KOKKA, R.P. Y SHIMADA, T. (1994a). *Aeromonas* species in septicemia: laboratory characteristics and clinical observations. *Clin Infect. Dis.* **19**, 77-83.
- JANDA, J.M.; KOKKA, R.P. Y GUTHERTZ, L.S. (1994b). The susceptibility of S-layer-positive and S-layer-negative *Aeromonas* strains to complement-mediated lysis. *Microbiology.* **140**, 2899-2905.
- JANOSSY, G. Y TARJAN, V. (1980). Enterotoxigenicity of *Aeromonas* strains in suckling mice. *Acta Microbiol. Acad. Sci. Hung.* **27**, 63-69.
- JAY, J.M. (1967). Natura, characteristics, and proteolytic properties of beef spoilage bacteria at low and high temperatures. *Appl. Environ. Microbiol.* **15**, 943-944.
- JENSSEN, D. (1984). A quantitative test for mutagenicity in V79 chinese hamster cells. In *Handbook of Mutagenicity Test Procedures*. eds. Kilbey, B.J.; Legator, M.; Nichols, W. y Ramel, C. pp.269-290. Amsterdam: Elsevier Science Publishers BV.

- JIANG, Z.D.; NELSON, A.C.; MATHEWSON, J.J.; ERICSSON, C.D. Y DUPONT, H.L. (1991). Intestinal secretory immune response to infection with *Aeromonas* species and *Plesiomonas shigelloides* among students from the United States in Mexico. *J. Infect. Dis.* **164**, 979-982.
- JTWA, S.F.H. (1983). Enterotoxigenicity, haemagglutination and cell-surface hydrophobicity in *Aeromonas hydrophila*, *A. sobria* and *A. salmonicida*. *Vet. Microbiol.* **8**, 17-34.
- JOHNSON, W.M. Y LIOR, H. (1981). Citotoxicity and suckling mouse reactivity of *Aeromonas hydrophila* isolated from human sources. *Can. J. Microbiol.* **27**, 1019-1027.
- JONES, G.W. (1977). The attachment of bacteria to the surfaces of animal cells. ed. Reissig, J.L. In *Receptors and recognition, series B, vol. 3. Microbial Interactions*. pp. 139-176. London: Chapman y Hall.
- JOSEPH, S.W.; COLWELL, R.R. Y MACDONELL, M.T. (1987). *Aeromonas* taxonomy. *Experientia*. **43**, 349-350.
- KALINA, G.P. (1977). Aeromonads in food products and their possible role as causative agents of food poisoning. *Gigiena I Sanitariia* (Moskva). **8**, 97-100.
- KAMPFER, P. Y ALTWEGG, M. (1992). Numerical classification and identification of *Aeromonas* genospecies. *J. Appl. Bacteriol.* **72**, 341-351.
- KAMPFER, P.; BLASCZYK, K. Y AULING, G. (1994). Characterization of *Aeromonas* genomic species by using quinone, polyamine, and fatty acid patterns. *Can. J. Microbiol.* **40**, 844-850.
- KANAI, K. Y WAKABAYASHI, H. (1984). Purification and some properties of protease from *Aeromonas hydrophila*. *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.* **50**, 1367-1374.
- KAREM, K. L.; FOSTER, J.W. Y BEJ, A.K. (1994). Adaptative acid tolerante response (ATR) in *Aeromonas hydrophila*. *Microbiology*. **140**, 1731-1736.
- KAPER, J.; SEIDLER, R.J.; LOCKMAN, H. Y COLWELL, R.R. (1979). Medium for the presumptive identification of *Aeromonas hydrophila* and *Enterobacteriaceae*. *Appl. Envir. Microbiol.* **38**, 1023-1026.
- KAPER, J.B.; LOCKMAN, H. Y COLWELL, R.R. (1981). *Aeromonas hydrophila*: Ecology and toxigenicity of isolates from an estuarie. *J. Appl. Bacteriol.* **50**, 359-377.
- KARUNAKARAN, T. Y DEVI, B.G. (1994). Characterization of haemolytic activity from *Aeromonas caviae*. *Epidemiol. Infect.* **112**, 291-298.
- KAY, W.W.; BUCKLEY, J.T.; ISHIGURO, E.E.; PHIPPS, B.M.; MONETTIE, J.P.L. Y TRUST, T.J. (1981). Purification and dispoition of a surface protein associated with virulence of *Aeromonas salmonicida*. *J. Bacteriol.* **147**, 1077-1084.

- KAY, W.W.; PHIPPS, B.M.; ISHIGURO, E.E.; OLAFSON, R.W. Y TRUST, T.J. (1984). Surface layer virulence A-proteins from *Aeromonas salmonicida* strains. *Can. J. Biochim. Cell Biol.* **62**, 1064-1071.
- KAY, W.W.; PHIPPS, B.M.; ISHIGURO, E.E. Y TRUST, T.J. (1985). Porphyrin binding by the surface array virulence protein of *Aeromonas salmonicida*. *J. Bacteriol.* **164**, 1332-1336.
- KIELWEIN, G. (1969). Ein nährboden zur selektiven zuchtung von *Pseudomonaden* und *Aeromonaden*. *Arch. Lebensmittelhyg.* **20**, 131-133.
- KIELWEIN, G.; GERLACH, R. Y JOHNE, H. (1969). Prevalence of *Aeromonas hydrophila* in raw milk. *Arch. Lebensmittelhyg.* **20**, 34-38.
- KINDSCHUCH, M.; PICKERING, L.K.; CLEARY, T.G. Y RUIZ PALACIOS, G. (1987). Clinical and biochemical significance of toxin production by *Aeromonas hydrophila*. *J. Clin. Microbiol.* **25**, 916-921.
- KIROV, S.M. (1993). The public health significance of *Aeromonas* spp. in foods. *Int. J. Food Microbiol.* **20**, 179-198.
- KIROV, S.M.; REES, B.; WELLOCK, R.C.; GOLDSMID, J.M. Y VAN GALEN, A.D. (1986). Virulence characteristics of *Aeromonas* spp. in relation to source and biotype. *J. Clin. Microbiol.* **24**, 827-834.
- KIROV, S.M.; ANDERSON, M.J. Y MCMEEKIN, T.A. (1990). A note on *Aeromonas* species from chickens as possible food-borne pathogens. *J. Appl. Bacteriol.* **68**, 327-334.
- KIROV, S.M. Y BRODRIBB, F. (1993). Exotoxin production by *Aeromonas* spp. in foods. *Lett. Appl. Microbiol.* **17**, 208-211.
- KIROV, S.M. Y HAYWARD, L.J. (1993). Virulence traits of *Aeromonas* in relation to species and geographic region. *Aust. J. Med. Sci.* **14**, 54-58.
- KIROV, S.M.; ARDESTANI, E.K. Y HAYWARD, L.J. (1993a). The growth and expression of virulence factors at refrigeration temperatures by *Aeromonas* strains isolated from foods. *Int. J. Food Microbiol.* **20**, 159-168.
- KIROV, S.M.; HUDSON, J.A.; HAYWARD, L.J. Y MOTT, S.J. (1993b). Distribution of *Aeromonas hydrophila* hybridization groups and their virulence properties in Australasian clinical and environmental strains. *Lett. Appl. Microbiol.* **18**, 71-73.
- KIROV, S.M.; HUI, D.S. Y HAYWARD, L.J. (1993c). Milk as a potential source of *Aeromonas* gastrointestinal infection. *J. Food Protect.* **56**, 306-312.
- KIROV, S.M.; HUDSON, J.A.; HAYWARD, L.J. Y MOTT, S.J. (1994). Distribution of *Aeromonas hydrophila* hybridization groups and their virulence properties in Australasian clinical and environmental strains. *Lett. Appl. Microbiol.* **18**, 71-73.

- KLEEGERGER, A. (1975). Taxonomy of *Aeromonads* from milk and other foods. *Milchwissenschaft*. **30**, 602-603.
- KNOCHEL, S. (1989a). Effect of temperature on hemolysin production in *Aeromonas* species isolated from warm and cold environments. *Int. J. Food Microbiol.* **9**, 225-235.
- KNOCHEL, S. (1989b). The suitability of four media for enumerating *Aeromonas* species from environmental samples. *Lett. Appl. Microbiol.* **9**, 67-69.
- KNOCHEL, S. (1990). Growth characteristics of motile *Aeromonas* spp. isolated from different environments. *Int. J. Food Microbiol.* **10**, 235-244.
- KNOCHEL, S. Y JEPPESEN, C. (1990). Distribution and characteristics of *Aeromonas* in food and drinking water in Denmark. *Int. J. Food Microbiol.* **10**, 317-322.
- KOBAYASHI, K. Y OHNAKA, T. (1989). Food poisoning due to newly recognized pathogens. *Asian Med. J.* **32**, 1-12.
- KOKKA, R.P.; VEDROS, N.A. Y JANDA J.M. (1990). Electrophoretic analysis of the surface components of autoagglutinating surface array protein-positive and surface array protein-negative *Aeromonas hydrophila* and *Aeromonas sobria*, *J. Clin. Microbiol.* **28**, 2240-2247.
- KOKKA, R.P.; JANDA J.M.; OSHIRO, L.S.; ALTWEGG, M.; SHIMADA, T.; SAKAZAKI, R. Y BRENNER, D.J. (1991a). Biochemical and genetic characterization of autoagglutinating phenotypes of *Aeromonas* associated with invasive and noninvasive disease. *J. Infect. Dis.* **161**, 890-894.
- KOKKA, R.P.; VEDROS, N.A. Y JANDA J.M. (1991b). Characterization of classic and atypical serogroup O:11 *Aeromonas*: evidence that the surface array in protein is not directly involved in mouse pathogenicity. *Microb. Pathog.* **10**, 71-79.
- KOKKA, R.P.; VEDROS, N.A. Y JANDA J.M. (1992). Immunochemical analysis and possible biological role of an *Aeromonas hydrophila* surface array protein in septicaemia. *J. Gen. Microbiol.* **138**, 1229-1236.
- KOZAKI, S.; KATO, K.; ASAO, T.; KAMATA, Y. Y SAKAGUCHI, G. (1987). Activities of *Aeromonas hydrophila* hemolysins and their interaction with erythrocyte membranes. *Infect. Immun.* **55**, 1594-1599.
- KOZAKI, S.; KATO, K.; KUROKAWA, A.; KAMATA, Y.; ASAO, T. Y SAKAGUCHI, G. (1988). Production of monoclonal antibody against *Aeromonas hydrophila* hemolysin. *J. Med. Microbiol.* **25**, 187-190.

- KROVACEK, K.; PETERZ, M.; FARIS, A. Y MANSSON, I. (1989). Enterotoxigenicity and sensitivity of *Aeromonas hydrophila* isolated from well water in Sweden: a case study. *Int. J. Food Microbiol.* **8**, 149-154.
- KROVACEK, K.; FARIS, A. Y MANSSON, I. (1991). Growth and toxin production by *Aeromonas hydrophila* and *Aeromonas sobria* at low temperatures. *Int. J. Food Microbiol.* **13**, 165-175.
- KROVACEK, K.; FARIS, A.; BALODA, S.B.; LINDBERG, T.; PETERZ, M. Y MANSSON, I. (1992a). Isolation and virulence profiles of *Aeromonas* spp. from different municipal drinking water supplies in Sweden. *Food Microbiol.* **9**, 215-222.
- KROVACEK, K.; FARIS, A.; BALODA, S.B.; PETERZ, M.; LINDBERG, T. Y MANSSON, I. (1992b). Prevalence and characterization of *Aeromonas* species isolated from foods in Uppsala Sweden. *Food Microbiol.* **9**, 29-36.
- KROVACEK, K.; CONTE, M.; GALDERISI, P.; MOELLI, G.; POSTIGLIONE, A. Y DUMONTET, S. (1993). Fatal septicaemia caused by *Aeromonas hydrophila* in a patient with cirrhosis. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* **16**, 267-272.
- KROVACEK, K.; PASQUALE, V.; BALODA, S.; SOPRANO, V.; CONTE, M. Y DUMONTET, S. (1994). Comparison of putative virulence factors in *Aeromonas hydrophila* strains isolated from the marine environment and human diarrheal cases in Southern Italy. *Appl. Environ. Microbiol.* **60**, 1379-1382.
- KUHN, I.; LINDBERG, T.; OLSSSEN, K. Y STENSTROM, T.A. (1992). Biochemical fingerprinting for typing of *Aeromonas* strains from food and water. *Lett. Appl. Microbiol.* **15**, 261-265.
- KUIJPER, E.J.; BOL, P.; PEETERS, M.F.; STEIGERWALT, A.G.; ZANEN, H.C. Y BRENNER, D.J. (1989a). Clinical and epidemiologic aspects of members of *Aeromonas* DNA hybridization groups isolated from human feces. *J. Clin. Microbiol.* **27**, 1531-1537.
- KUIJPER, E.J.; STEIGERWALT, A.G.; SCHOENMAKERS, B.S.C.I.M.; PEETERS, M.F.; ZANEN, H.C. Y BRENNER, D.J. (1989b). Phenotypic characterization and DNA relatedness in human fecal isolates of *Aeromonas* species. *J. Clin. Microbiol.* **27**, 132-138.
- KUIJPER, E.J.; VAN ALPHEN, L.; LEENDERS, E. Y ZANEN, H.C. (1989c). Typing of *Aeromonas* strains by DNA restriction endonuclease analysis and polyacrylamide gel electrophoresis of cell envelopes. *J. Clin. Microbiol.* **27**, 1280-1285.
- KUIJPER, E.J.; VAN ALPEN, L.; PEETERS, M.F. Y BRENNER D.J. (1990). Human serum antibody response to the presence of *Aeromonas* spp. in the intestinal tract. *J. Clin. Microbiol.* **28**, 584-590.

- LACHICA, R.V. Y ZINK, D.L. (1984). Plasmid-associated cell surface charge and hydrophobicity of *Yersinia enterocolitica*. *Infect. Immun.* **44**, 540-543.
- LALLIER, R.; MITTAL, K.R.; LEBLANC, D.; LALONDE, G. Y OLIVIER, G. (1981). Rapid methods for the differentiation of virulent and nonvirulent *Aeromonas hydrophila* strains, p. 119-123. International Symposium on Fish Biologics.
- LAWRENCE, R.C.; FRYER, T.F. Y REITER, B. (1967). The production and characterization of lipase from a micrococcus and pseudomonad. *J. Gen. Microbiol.* **48**, 401.
- LAWSON, M.A.; BURKE, V. Y CHANG, B.J. (1985). Invasion of HEp-2 cells by fecal isolates of *Aeromonas hydrophila*. *Infect. Immun.* **47**, 680-683.
- LE CHEVALLIER, M.W.; SEIDLER, R.J. Y EVANS, T.M. (1980). Enumeration and characterization of standar plate count bacteria in chlorinated and raw water supplies. *Appl. Environ. Microbiol.* **40**, 922-930.
- LE CHEVALLIER, M.W.; EVANS, T.M.; SEIDLER, R.J.; DAILY, O.P.; MEARELL, B.R.; ROLLINS, D.M. Y JOSEPH, S.W. (1982). *Aeromonas sobria* in chlorinated drinking water supplies. *Microbiol. Ecol.* **8**, 325-333.
- LEN, P.P. (1987). Mesophilic fish spoilage of marine fish: bay trout (*Arripis trutta*), bream (*Acanthopagrus butcheri*) and millet (*Aldrichetta forsteri*). *Food Technol. Aust.* **39**, 277-282.
- LEUNG, K.Y. Y STEVENSON, R.M.W. (1988). Characteristics and distribution of extracellular proteases from *Aeromonas hydrophila*. *J. Gen. Microbiol.* **134**, 151-160.
- LEVETT, P.N. Y DANIEL, R.R. (1981). Adhesion of vibrios and aeromonads to isolated rabbit brush borders. *J. Gen. Microbiol.* **125**, 167-172.
- LINDAHL, M.; FARIS, A.; WADSTROM, T. Y HJERTEN, S. (1981). A new test based on "salting out" to measure relative surface hydrophobicity of bacterial cells. *Biochim. Biophys. Acta.* **677**, 471-476.
- LJUNGH, A. (1987). *Aeromonas*-toxins and other virulence factor. *Experientia.* **43**, 347-472.
- LJUNGH, A.; WRETTLING, B. Y MOLLBY, R. (1981). Separation and characterization of enterotoxin and two haemolysins from *Aeromonas hydrophila*. *Acta Path. Microbiol. Scand.* **89**, 387-397.
- LJUNGH, A.; ENROTH, P. Y WADSTROM, T. (1982). Cytotoxic enterotoxin from *Aeromonas hydrophila*. *Toxicon.* **20**, 787-794.
- LOEWY, A.G.; SANTER, U.V.; WIECZOREK, M.; BLODGETT, J.K.; JONES, S.W. Y CHERONIS, J.C. (1993). Purification and characterization of a novel zinc-proteinase from cultures of *Aeromonas hydrophila*. *J. Biol. Chem.* **268**, 9071-9078.

- LUGTENBERG, B Y VAN ALPHEN, L. (1983). Molecular architecture and functioning of the outer membrane of *Escherichia coli* and other Gram negative bacteria. *Biochim. Biophys. Acta.* **737**, 51-115.
- MACKENZIE, K.A. Y SKERMAN, V.B.D. (1982). Microbial spoilage in unpasteurized liquid whole egg. *Food Technol. Aust.* **34**, 524-528.
- MAJEED, K.N.; EGAN, A.F. Y MACRAE, I.C. (1989a). Enterotoxigenic aeromonads on retail lamb meat and offal. *J. Appl. Bacteriol.* **67**, 165-170.
- MAJEED, K.N.; EGAN, A.F. Y MACRAE, I.C. (1989b). Incidence of aeromonads in samples from an abattoir processing lambs. *J. Appl. Bacteriol.* **67**, 597-604.
- MAJEED, K.N.; EGAN, A.F. Y MACRAE, I.C. (1990). Production of exotoxins by *Aeromonas* spp. at 5°C. *J. Appl. Bacteriol.* **69**, 332-337.
- MAJEED, K.N. Y MACRAE, I.C. (1991). Experimental evidence for toxin production by *Aeromonas hydrophila* and *Aeromonas sobria* in a meat extract at low temperatures. *Int. J. Food Microbiol.* **12**, 181-188.
- MAJEED, K.N. Y MACRAE, I.C. (1994). Cytotoxic and haemagglutinating activities of motile *Aeromonas* species. *J. Med. Microbiol.* **40**, 188-193.
- MANO, S. Y GARCIA DE FERNANDO, G.D. (1995). Comunicación personal.
- MARSHALL, K.D. (1976). Interfaces in Microbiol Ecology. Cambridge, Mass: Harvard University Press.
- MARTINEZ-MURCIA, A.J.; RSTEVE, C.; GARAY, E. Y COLLINS, M.D. (1992). *Aeromonas allosaccharophila* sp. nov., a new mesophilic member of the genus *Aeromonas*. *FEMS. Microbiol. Lett.* **70**, 199-205.
- MASSAD, G.; ARCENEUX, J.E.L. Y BYERS, B.R. (1991). Acquisition of iron from host sources by mesophilic *Aeromonas* species. *J. Gen. Microbiol.* **137**, 237-241.
- MASSAD, G.; ARCENEUX, J.E.L. Y BYERS, B.R. (1994). Diversity of siderophore genes encoding biosynthesis of 2,3-dihydroxybenzoic acid in *Aeromonas* spp. *Biometals.* **7**, 227-236.
- MATEOS, D.; ANGUITA, J.; NAVARRO, G. Y PANIAGUA, C. (1993). Influence of growth temperature on the production of extracellular virulence factors and pathogenicity of environmental and human strains of *Aeromonas hydrophila*. *J. Appl. Bacteriol.* **74**, 111-118.
- MATTILA, L.; PELTOLA, H.; SIITONEN, A.; KYRONSEPPA, H.; SIMULA, I. Y KATAYA, M. (1993). Short-term treatment of traveler's diarrhea with norfloxacin: a double-blind, placebo-controlled study during two seasons. *Clin. Infect. Dis.* **17**, 779-782.

- MCCOY, R.H. Y PILCHER, K.S. (1974). Peptone beef extract glycogen agar, a selective and differential *Aeromonas* medium. *J. Fish. Res. Board Can.* **31**, 1153-1155.
- MCKELLAR, R.C. (1986). A rapid colorimetric assay for the extracellular lipase of *Pseudomonas fluorescens* B52 using β -naphthyl caprylate. *J. Dairy Res.* **57**, 117-127.
- MCKELLAR, R.C. (1989). Regulation and control of synthesis. In *Enzymes of psychrotrophs in raw food*. ed. Robin C. Mackellar. pp. 153-172. Florida: CRC Press, Inc.
- MERCER, N.S.G.; BERRE, D.M.; BORNEMISZA, A.J. Y THOMAS P. (1987). Medical leeches as sources of infection. *Brit. Med. J.* **294**, 937.
- MERINO, S.; CAMPRUBI, S. Y TOMAS, J.M. (1993). Detection of *Aeromonas hydrophila* in food with an enzyme-linked immunosorbent assay. *J. Appl. Bacteriol.* **74**, 149-154.
- MERINO, S.; ALVAREZ, D.; HERNANDEZ-ALLES, S. Y TOMAS, J.M. (1994). Effect of growth temperature on complement-mediated killing of mesophilic *Aeromonas* spp. serotype O:34. *FEMS Microbiol. Lett.* **118**, 163-166.
- MERINO, S.; RUBIRES, X. Y TOMAS, J.M. (1995). The presence of capsular polysaccharide in mesophilic *Aeromonas hydrophila* serotypes O:11 and O:34. Abstr. AAIR-PL920630. 5th Meeting of "Physiology of Food Poisoning Microorganisms".
- MILLERSHIP, S.E.; CURNOW, S.R. Y CHATTOPADHYAY, B. (1983). Faecal carriage rate of *Aeromonas hydrophila*. *J. Clin. Microbiol.* **36**, 920-923.
- MILLERSHIP, S.E. Y CHATTOPADHYAY, B. (1984). Methods for the isolation of *Aeromonas hydrophila* and *Plesiomonas shigelloides* from faeces. *J. Hyg.* **92**, 145-152.
- MILLERSHIP, S.E. Y WANT, S.V. (1989). Typing of *Aeromonas* species by protein fingerprinting: comparison of radiolabelling and silve staining for labelling proteins. *J. Med. Microbiol.* **29**, 29-32.
- MILLERSHIP, S.E. Y WANT, S.V. (1993). Characterization of strains of *Aeromonas* spp. by phenotype and whole-cell protein fingerprint. *J. Med. Microbiol.* **39**, 107-113.
- MITTAL, K.R.; LALONDE, G.; LEBLANC, D.; OLIVIER, G. Y LALLIER, R. (1980). *Aeromonas hydrophila* in rainbow trout: relation between virulence and surface characteristics. *Can. J. Microbiol.* **26**, 1501-1503.
- MONTENEGRO, M.A.; BITTER-SUERMAN, D.; TIMMIS, J.K.; AGUERO, M.E.; CABELLO, F.C.; SANYAL, S.C. Y TIMMIS, K.N. (1985). TraT gene sequences, serum resistance and pathogenicity related factors in clinical isolates of *Escherichia coli* and other gram-negative bacteria. *J. Gen. Microbiol.* **131**, 1511-1521.

- MORGAN, D.R.; JOHNSON, P.C.; DUPONT, H.L.; SATTERWHITE, T.K. Y WOOD, L.V. (1985). Lack of correlation between known virulence properties of *Aeromonas hydrophila* and enteropatogenicity for humans. *Infect. Immun.* **50**, 62-65.
- MORGAN, D.R. Y WOOD, L.V. (1985). Is *Aeromonas* sp. a foodborne pathogen? Review of the clinical data. *J. Food Safety.* **9**, 59-72.
- MORITA, K.; WATANABE, N.; KURATA, S. Y KANAMORI, M. (1994). Beta-lactam resistance of motile *Aeromonas* isolates from clinical and environmental sources. *Antimicrob. Agents Chemoter.* **38**, 353-355.
- MORSE, J.W. Y HIND, D.W. (1984). Bacteria isolated from lymph nodes of California slaughter swine. *Am. J. Vet. Res.* **45**, 1648-1649.
- MOSSEL, D.A.A.; BONATS-VAN LAARHOVEN, T.M.G.; LIGTEMBERG-MERCUS, A.M.TH. Y WERDLER, M.E.B. (1983). Quality assurance of selective culture media for bacteria, moulds and yeast: an attempt at standarization at the international level. *J. Bacteriol.* **54**, 313-327.
- MOYER, N.P. (1987). Clinical significance of *Aeromonas* species isolated from patients with diarrhea. *J. Clin. Microbiol.* **25**, 2044-2048.
- MOYER, N.P.; GEISS, H.K.; MARINESCU, M.; RIGBY, A.; ROBINSON, J. Y ALTWEGG, M. (1991). Media and methods for isolation of aeromonads from fecal specimens. A multilaboratory study. *Experientia.* **47**, 409-412.
- MULLA, R. Y MILLERSHIP, S. (1993). Typing of *Aeromonas* spp. by numerical analysis of immunoblotted SDS-PAGE gels. *J. Med. Microbiol.* **39**, 325-333.
- MUNN, C.B.; ISHIGURO, E.E.; KAY, W.W. Y TRUST, T.J. (1982). Role of surface components in serum resistance of virulent *Aeromonas salmonicida*. *Infect. Immun.* **36**, 1069-1075.
- MUÑOZ, P.; FERNANDEZ-BACA, V.; PELAEZ, T.; SANCHEZ, R.; RODRIGUEZ-CREIXEMS, M. Y BOUZA, E. (1994). *Aeromonas* peritonitis. *Clin. Infect. Dis.* **18**, 32-37.
- MURRAY, R.G.E.; DOOLEY, J.S.G.; WHIPPEY, P.W. T TRUST, T.J. (1988). Structure of an S layer on a pathogenic strain of *Aeromonas hydrophila*. *J. Bacteriol.* **170**, 2625-2630.
- MYERS, B.R.; MARSHALL, R.T.; EDMONDSON, J.E. Y STRINGER, W.C. (1982). Isolation of pectinolytic *Aeromonas hydrophila* and *Yersinia enterocolitica* from vacuum-packaged pork. *J. Food Protect.* **45**, 33-37.
- NAMDARI, H. Y BOTTONE, E.J. (1988). Correlation of the suicide phenomenon in *Aeromonas* species with virulence and enteropathogenicity. *J. Clin. Microbiol.* **26**, 2615-2619.

- NAMDARI, H. Y BOTTONNE, E.J. (1989). Suicide phenomenon in mesophilic aeromonads as a basis for species identification. *J. Clin. Microbiol.* **27**, 788-789.
- NAMDARI, H. Y BOTTONNE, E.J. (1990a). Microbiologic and clinical evidence supporting the role of *Aeromonas caviae* as a pediatric enteric pathogen. *J. Clin. Microbiol.* **28**, 837-840.
- NAMDARI, H. Y BOTTONNE, E.J. (1990b). Cytotoxin and enterotoxin production as factors delineating enteropathogenicity of *Aeromonas caviae*. *J. Clin. Microbiol.* **28**, 1796-1798.
- NAMDARI, H. Y BOTTONNE, E.J. (1991). *Aeromonas caviae*: Ecologic adaptation in the intestinal tract of infants coupled to adherence and enterotoxin production as factors in enteropathogenicity. *Experientia.* **47**, 434-436.
- NEVES, M.S.; NUNES, M.P. Y MILHOMEN, A.M. (1994). *Aeromonas* species exhibit aggregative adherence to HEp-2 cells. *J. Clin. Microbiol.* **32**, 1130-1131.
- NEWTON, J.A.JR. Y KENNEDY, C.A. (1993). Wound infection due *Aeromonas sobria*. *Clin. Infect. Dis.* **17**, 1082-1083.
- NIETO, T.P. Y ELLIS, A.E. (1986). Characterization of extracellular metallo- and serine-proteases of *Aeromonas hydrophila* strain B₅₁. *J. Gen. Microbiol.* **132**, 1975-1979.
- NISHIKAWA, Y. Y KISHI, T. (1988). Isolation and characterization of mobile *Aeromonas* from human food and environmental specimens. *Epidemiol. Infect.* **101**, 213-223.
- NISHIKAWA, Y.; KIMURA, T. Y KISHI, T. (1991). Mannose-resistant adhesion of motile *Aeromonas* to INT407 cells and the differences among isolates from humans, food and water. *Epidemiol. Infect.* **107**, 171-179.
- NISHIKAWA, Y.; OGAWASARA, J. Y KIMURA, T. (1993). Heat and acid sensitivity of motile *Aeromonas*: a comparison with other food poisoning bacteria. *Int. J. Food Microbiol.* **18**, 271-278.
- NISHIKAWA, Y.; HASE, A.; OGAWASARA, J.; SCOTLAND, S.M.; SMITH, H.R. Y KIMURA, T. (1994). Adhesion to and invasion of human colon carcinoma Caco-2 cells by *Aeromonas* strains. *J. Med. Microbiol.* **40**, 55-61.
- NOTERMANS, S.; HAVELAR, A.; JANSEN, W.; KOZAKI, S. Y GUINEE, P. (1986). Production of "Asao Toxin" by *Aeromonas* strains isolated from feces and drinking water. *J. Clin. Microbiol.* **23**, 1140-1142.
- OGDEN, I.D.; MILLAR, I.G.; WATT, A.J. Y WOOD, L. (1994). A comparison of three identification kits for the confirmation of *Aeromonas* species. *Lett. Appl. Microbiol.* **18**, 97-99.

- OKITSU, T.; ASAI, Y.; YASUDA, T. Y TAKIZAWA, K. (1985). Studies of *Aeromonas* spp. isolated from patients with sporadic diarrhoea. *Kansenshogaku Zasshi*. **59**, 977-983.
- OKREND, A.J.G.; ROSE, B.E. Y BENNETT, B. (1987). Incidence and toxigenicity of *Aeromonas* species in retail poultry beef and pork. *J. Food Protect.* **50**, 509-513.
- ORDOÑEZ, J.A. (1979). Random number sampling method for estimation of lactic acid bacteria. *J. Appl. Bacteriol.* **46**, 351-353.
- OVERMAN, T.L.; KESSLER, J.F. Y SEABOLT, J.P. (1985). Comparison of API 20E, API Rapid E, and API Rapid NFT for identification of members of the family *Vibrionaceae*. *J. Clin. Microbiol.* **22**, 778-781.
- PALUMBO, S A. (1986). Is refrigeration enough to restrain foodborne pathogens? *J. Food Protect.* **49**, 1003-1009.
- PALUMBO, S A. (1988). The growth of *Aeromonas hydrophila* K144 in ground pork at 5°C. *Int. J. Food Microbiol.* **7**, 41-48.
- PALUMBO, S A.; MAXIMO, F.; WILLIAMS, A.C.; BUCHANAN, R.L. Y THAYER, D.W. (1985a). Starch ampicillin agar for the quantitative detection of *Aeromona hydrophila*. *Appl. Environ. Microbiol.* **50**, 1027-1030.
- PALUMBO, S A.; MORGAN, D.R. Y BUCHANAN, R.L. (1985b). Influence of temperature, NaCl , and pH on the growth of *Aeromonas hydrophila*. *J. Food Protect.* **50**, 1417-1421.
- PALUMBO, S A.; JENKINS, R.K.; BUCHANAN, R.L. Y THAYER, D.W. (1986). Determination of irradiation D-values for *Aeromonas hydrophila*. *J. Food Protect.* **49**, 189-191.
- PALUMBO, S A.; WILLIAMS, A.C.; BUCHANAN, R.L. Y PHILLIPS, J.G. (1987). Thermal resistance of *Aeromonas hydrophila*. *J. Food Protect.* **50**, 761-764.
- PALUMBO, S A. Y BUCHANAN, R.L. (1988). Factors affecting growth or survival of *Aeromonas hydrophila* in foods. *J. Food Safety.* **9**, 37-51.
- PALUMBO, S A.; BENCIVENGO, M.M.; DEL CORRAL, F.; WILLIAMS, A.C. Y BUCHANAN, R.L. (1989). Characterization of the *Aeromonas hydrophila* group isolated from retail foods of animal origin. *J. Clin. Microbiol.* **27**, 854-859.
- PALUMBO, S A.; WILLIAMS, A.C.; BUCHANAN, R.L. Y PHILLIPS, J.G. (1991). Model for the aerobic growth of *Aeromonas hydrophila* K144. *J. Food Protect.* **54**, 260-265.
- PALUMBO, S A.; WILLIAMS, A.C.; BUCHANAN, R.L. Y PHILLIPS, J.G. (1992). Model for the anaerobic growth of *Aeromonas hydrophila* K144. *J. Food Protect.* **55**, 429-435.
- PARRAS, F.; DIAZ, M.D.; REINA, J.; MORENO, S.; GUERRERO, G. Y BOUZA, E. (1993). Meningitis due *Aeromonas* species: case report and review. *Clin. Infect. Dis.* **17**, 1058-1060.

- PARKER, N.D. Y MUNN, C.B. (1984). Increased cell surface hydrophobicity associated with possession of an additional surface protein by *Aeromonas salmonicida*. *FEMS Microbiol. Lett.* **21**, 233-237.
- PASQUALE, V.; BALODA, S.B.; DUMONTET, S. Y KROVACEK, K. (1994). An outbreak of *Aeromonas hydrophila* infection in turtles (*Pseudemys scripta*). *Appl. Environ. Microbiol.* **60**, 1678-1680.
- PAULA, S.J.; DUFFEY, P.S.; ABBOTT, S.L.; KOKKA, R.P.; OSHIRO, L.S.; JANDA, J.M.; SHIMADA, T. Y SAKAZAKI, R. (1988). Surface properties of autoagglutinating mesophilic aeromonads. *Infect. Immun.* **56**, 2658-2665.
- PAYNE, S.M. (1988). Iron and virulence in the family *Enterobacteriaceae*. *Crit. Rev. Microbiol.* **16**, 81-111.
- PAZZAGLIA, G.; WINOTO, I. Y JENNINGS, G. (1994). Oral challenge with *Aeromonas* in protein-malnourished mice. *J. Diarrhoeal Dis. Res.* **12**, 108-112.
- PERERS, L.; ANDAKER, L. EDEBO, L.; STENDAHL, O. Y TAGESSON, C. (1977). Association of some enterobacteria with the intestinal mucosa of mouse in relation to their partition in aqueous polymer two-phase systems. *Acta Pathol. Microbiol. Scand. Sect. B* **85**, 308-316.
- PHIPPS, B.M. Y KAY, W.W. (1986). Immunoglobulin binding by the surface array virulence protein of *Aeromonas salmonicida*. Abstr. K225. Annual Meeting of the American Society for Microbiology.
- PIETU, G.; LETENNEUR, J. Y SCHWOERER, D. (1993). Infection osseuses a *Aeromonas hydrophila* - a propos of 2 case reports. *Acta Orthop. Belg.* **59**, 390-393.
- PITARANGSI, C.; ECHEVARRIA, P.; WHITMIRE, R.; TIRAPAT, C.; FORMAL, S.; DAMMIN, G.J. Y TINGTALAPONG, M. (1982). Enteropathogenicity of *Aeromonas hydrophila* and *Plesiomonas shigelloides*: Prevalence among individuals with and without diarrhoea in Thailand. *Infect. Immun.* **35**, 666-673.
- POFFE, R. Y OP DE BEECK, E. (1991). Enumeration of *Aeromonas hydrophila* from domestic waste water treatment plants surface waters. *J. Appl. Bacteriol.* **71**, 366-370.
- POIRIER, T.; LAURENS, E.; VIAND, J.V.; POUJOL, B. Y LORRE, G. (1993). Nosocomial *Aeromonas hydrophila* pneumonia complicating toxic coma. *Ann. Fr. Anesth. Reanim.* **12**, 72-74.
- POPOFF, M. (1984). *Aeromonas*. En *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. ed. Krieg N.R. Y Holt, J.G. pp. 545-548. Vol. 1. Baltimore: Williams and Wilkins.

- POPOFF, M.; COYNAULT, C.; KIREDJIAN, M. Y LEMELIN, M. (1981). Polynucleotide sequence relatedness among motile *Aeromonas* species. *Curr. Microbiol.* **5**, 109-114.
- POPOFF, M. Y VERON, M. (1976). A taxonomic study of the *Aeromonas hydrophila*-*Aeromonas punctata* group. *J. Gen. Microbiol.* **94**, 11-22.
- POTOMSKI, J.; BURKE, V.; WATSON, I. Y GRACEY, M. (1987a). Purification of cytotoxic enterotoxin of *Aeromonas sobria* by use of monoclonal antibodies. *J. Med. Microbiol.* **23**, 171-177.
- POTOMSKI, J.; BURKE, V.; ROBINSON, J.; FUMAROLA, D. Y MIRAGLIOTA, G. (1987b). *Aeromonas* cytotoxic enterotoxin cross reactive with cholera toxin. *J. Med. Microbiol.* **23**, 179-186.
- PRIEST, F.G. (1983). Enzyme synthesis: regulation and process of secretion by microorganisms. In *Microbial Enzymes and Biotechnology*. ed. Fogarty, W.M. London: Applied Science.
- PUMAROLA, A. (1987a). Factores determinantes de la acción patógena: capacidad lesional. Modelos de infección. En *Microbiología y Parasitología Médica*. pp. 178-188. Barcelona: Salvat.
- PUMAROLA, A. (1987b). Factores determinantes de la acción patógena: penetración, multiplicación e invasión. En *Microbiología y Parasitología Médica*. pp. 171-177. Barcelona: Salvat.
- PUMAROLA, A. (1987c). Infección. Poder patógeno y virulencia. Factores determinantes de la acción patógena: colonización. En *Microbiología y Parasitología Médica*. pp. 161-170. Barcelona: Salvat.
- QADRI, S.M.H.; GORDON, L.P.; WENDE, R.D. Y WILLIAMS, R.C. (1976). Meningitis due to *Aeromonas hydrophila*. *J. Clin. Microbiol.* **3**, 102-104.
- QUINN, D.M.; ATKINSON, H.M.; BRETAG, A.M.; TESTER, M.; TRUST, T.J.; WONG, C.Y.F. Y FLOWER, R.L.P. (1994). Carbohydrate-reactive pore-forming outer membrane proteins of *Aeromonas hydrophila*. *Infect. Immun.* **62**, 4054-4058.
- RAHIM, Z.; SANYAL, S.C.; AZIZ, K.M.S.; HUQ, M.I. Y CHOWDHURY, A.A. (1984). Isolation of enterotoxigenic, hemofílic, and antibiotic-resistant *Aeromonas hydrophila* strains from infected fish in Bangladesh. *Appl. Environ. Microbiol.* **48**, 865-867.
- REINA, J. (1992). Situación taxonómica actual de las especies incluidas en el grupo *Aeromonas* spp. aisladas en seres humanos. *Rev. Esp. Microbiol. Clin.* **Octubre**, 371-377.
- RHAMON, A.F.M.S. Y WILLOUGHBY, J.M.T. (1980). Dysentery-like syndrome associated with *Aeromonas hydrophila*. *Brit. Med. J.* **281**, 976.

- RIBAS, F.; ARAUJO, R.; FRIAS, J.; HUGUET, J.M.; RIBAS, F.R. Y LUCENA, F. (1991). Comparison of different media for the identification and quantification of *Aeromonas* species in water. *Antonie van Leeuwenhoek*. **59**, 225-228.
- RIPPEY, S.R. Y CABELLI, V.J. (1979). Membrane filter procedure for enumeration of *Aeromonas hydrophila* in fresh waters. *Appl. Environ. Microbiol.* **38**, 108-113.
- RIPPEY, S.R. Y CABELLI, V.J. (1985). Growth characteristics of *Aeromonas hydrophila* in limnetic water of varying trophic state. *Arch. Microbiol.* **104**, 311-319.
- RIVERO, O.; ANGUITA, J.; PANIAGUA, C. Y NAHARRO, G. (1990). Molecular cloning and characterization of an extracellular protease gene from *Aeromonas hydrophila*. *J. Bacteriol.* **172**, 3905-3908.
- ROBERTS, I.M.; PARENTI, D.M. Y ALBERT, M.B. (1987). *Aeromonas hydrophila*-associated colitis in a male homosexual. *Arch. Intern. Med.* **147**, 1502-1503.
- ROGERS, S.; MATHIAS, G.M.; WILLIAMS, R.M. Y PARK, R.W.A. (1990). The attachment of food and clinical *Aeromonas* isolates to the surface of formalised human intestinal epithelium. Abstr. Int. Symp. *Aeromonas* and *Plesiomonas*.
- ROGOL, M.; SECHTER, I.; GRINBERG, L. Y GERICHTER, C.B. (1979). Pril-xylosa-ampicillin agar, a new selective medium for the isolation of *Aeromonas hydrophila*. *J. Med. Microbiol.* **12**, 229-231.
- ROLAND, F.P. (1977). Salt-starch xylose lysine deoxycholate agar. A single medium for the isolation of sodium and non-sodium dependent enteric gram-negative bacilli. *Med. Microbiol. Immunol.* **163**, 241-249.
- ROSE, J.M.; HOUSTON, C.W.; COPPERHAVER, D.H.; DIXON, J.D. Y KUBOSKY, A. (1989a). Purification and chemical characterization of a cholera toxin-cross-reactive cytolytic enterotoxin produced by a human isolate of *Aeromonas hydrophila*. *Infect. Immun.* **57**, 1165-1169.
- ROSE, J.M.; HOUSTON, C.W. Y KUROSKY, A. (1989b). Bioactivity and immunological characterization of a cholera toxin-cross-reactive cytolytic enterotoxin from *Aeromonas hydrophila*. *Infect. Immun.* **57**, 1170-1176.
- ROSENBERG, M. (1981). Bacterial adherence to polystyrene: a replica method for screening the bacterial hydrophobicity. *Appl. Environ. Microbiol.* **42**, 375-377.
- ROSENBERG, M.; GUTNICK, D. Y ROSENBERG, E. (1980). Adherence of bacteria to hydrocarbons: a simple method for measuring cell-surface hydrophobicity. *FEMS Microbiol. Lett.* **9**, 29-33.

- ROSENBERG, M.; PERRY, A.; BAYER, E.A.; GUTNICK, D.L.; ROSENBERG, E. Y OFEK, I. (1981). Adherence of *Acinetobacter calcoaceticus* RAG-1 to human epithelial cells and to hexadecane. *Infect. Immun.* **33**, 29-33.
- ROUF, M.A. Y RIGNEY, M.M. (1971). Growth temperatures and temperature characteristics of *Aeromonas*. *Appl. Microbiol.* **22**, 503-506.
- RUIMY, R.; BREITTMAYER, V.; ELBAZE, P.Q.; LAFAY, B.; BOUSSEMART, O.; GAUTHIER, M. Y CHRISTEN, R. (1994). Phylogenetic analysis and assessment of the genera *Vibrio*, *Photobacterium*, *Aeromonas* and *Plesiomonas* deduced from small-subunit rRNA sequences. *Int. J. Food Microbiol.* **44**, 416-426.
- SACK, R.B.; LANATA, C. Y KAY, B.A. (1987). Epidemiological studies of *Aeromonas*-related diarrheal diseases. *Experientia.* **43**, 364-365.
- SAKAI, D.K. (1985). Loss of virulence in a protease-deficient mutant of *Aeromonas salmonicida*. *Infect. Immun.* **48**, 146-152.
- SAN JOAQUIN, V.H. Y PICKETT, D.A. (1988). *Aeromonas*-associated gastroenteritis in children. *Pediatr. Infect. Dis. J.* **7**, 53-57.
- SANTOS, I.; TORANZO, A.E.; DOPAZO, C.P.; NIETO, T.P. Y BARJA, J.L. (1987). Relationships among virulence for fish, enterotoxigenicity, and phenotypic characteristics of motile *Aeromonas*. *Aquaculture.* **67**, 29-39.
- SANTOS, I.; TORANZO, A.E.; BARJA, J.L.; NIETO, T.P. Y VILLA, T.G. (1988). Virulence properties and toxin production of *Aeromonas* strains isolated from fish. *Infect. Immun.* **56**, 3285-3293.
- SANTOS, J.A.; SANZ, J.; LOPEZ, T.M.; GARCIA, M.C. Y OTERO, A. (1991). Aislamiento y caracterización de *Aeromonas* móviles obtenidas de distintos alimentos. Res. XII Congreso Nacional de Microbiología Español.
- SANTOS, J.; LOPEZ, T.M.; GARCIA, M.L.; GARCIA, M.C. Y OTERO, A. (1994). Minimum water activity for the growth of *Aeromonas hydrophila* as affected by strain, temperature and humectant. *Lett. Appl. Microbiol.* **19**, 76-78.
- SATO, M.; ARITE, M. ; HONDA, T. Y MIWATANI, T. (1989). Characterization of a pilus produced by *Aeromonas hydrophila*. *FEMS Microbiol. Lett.* **59**, 325-330.
- SCHEFFER, J.; KONIG, W.; BRAUN, V. Y GOEBEL, W. (1988). Comparison of four haemolysin-producing organisms (*Escherichia coli*, *Serratia marcescens*, *Aeromonas hydrophila* and *Listeria monocytogenes*) for release of inflammatory mediators from various cells. *J. Clin. Microbiol.* **26**, 544-551.
- SCHIEHMANN, D.A. (1979). Synthesis of a selective agar medium for *Yersinia enterocolitica*. *Can. J. Microbiol.* **25**, 1298-1304.

- SCHUBERT, R.H.W. (1967). Das vorkommen der aeromonaden in oberirdischen Gewassein. *Arch. Hyg.* **150**, 688-708.
- SCHUBERT, R.H.W. (1977). Veber den Nachweis von *Plesiomonas shigelloides* Habs and Schubert, 1962, und ein elektivmedium, den inositol-brillant grum-gallesolz- agar. *E. Rodenwaldt. Arch.* **4**, 97-103.
- SCHUBERT, R.H.W. (1991). Aeromonads and their significance as potential pathogens in water. *J Appl. Bacteriol.* **70** (Suppl.), 131S-135S.
- SCHUBERT, R.H.W. Y HEGAZI, M. (1988). *Aeromonas eucrenophila* species nova *Aeromonas caviae* a later and ilegitimate synonym of *Aeromonas punctata*. *Zentralbl. Bakteriolo. Hyg. Abt. I origin Reihe A.* **268**, 34-39.
- SCHUBERT, R.H.W. Y HEGAZI, M. Y WAHLING, W. (1990a). *Aeromonas enteropelogenes* species nova. *Hygiene Medizin.* **15**, 471-472.
- SCHUBERT, R.H.W. Y HEGAZI, M. Y WAHLING, W. (1990b). *Aeromonas ichthiosmia* species nova. *Hygiene Medizin.* **15**, 477-479.
- SCHULTZ, A.J. Y MCCARDELL, B.A. (1988). DNA homology and immunological cross-reactivity between *Aeromonas hydrophila* cytotoxic toxin and cholera toxin. *J. Clin. Microbiol.* **26**, 57-61.
- SEIDLER, R.J.; ALLEN, D.A.; LOCKMAN, H.; COLWELL, R.R.; JOSEPH, S.W. Y DAILY, O.P. (1980). Isolation, enumeration and characterization of *Aeromonas* from polluted waters encountered in diving operations. *Appl. Environ. Microbiol.* **39**, 1010-1018.
- SHERAGO, M. (1936). An epizootic septicemia of young guinea pigs caused by *Pseudomonas caviae* nov. sp. *J. Bacteriol.* **31**, 83.
- SHIEH, H.S. (1987). Toxicity of *Aeromonas hydrophila* protease to Atlantic salmon. *Microbios Lett.* **36**, 17-21.
- SHIEH, H.S. (1988). Lethal toxicity of *Aeromonas sobria* protease to Atlantic salmon. *Microbios Lett.* **37**, 65-68.
- SHOTTS, E.B.JR. Y RIMLER, R. (1973). Medium for the isolation of *Aeromonas hydrophila*. *Appl. Microbiol.* **26**, 550-553.
- SHREAD, P.; DONOVAN, T.J. Y LEE, J.V. (1981). A survey of the incidence of *Aeromonas* in human faeces. *Soc. Gen. Microbiol. Q.* **8**, 184.
- SIMARD, R.E.; ZEE, J. Y L'HEUREUX, L. (1984). Microbial growth in carcasses and boxed beef during storage. *J. Food Protect.* **47**, 773-777.
- SINGH, D.V. Y SANYAL, S.C. (1992a). Enterotoxicity of clinical and environmental isolates of *Aeromonas* spp. *J. Med. Microbiol.* **36**, 269-272.

- SINGH, D.V. Y SANYAL, S.C. (1992b). Haemolysin and enterotoxin production by *Aeromonas caviae* isolated from diarrhoeal patients, fish and environmental. *J. Diarrhoeal Dis. Res.* **10**, 16-20.
- SINGH, D.V.; DUBEY, R.S. Y SANYAL, S.C. (1993). Adherence of haemagglutinating and non-haemagglutinating clinical and environmental isolates of *Aeromonas*. *J. Diarrhoeal Dis. Res.* **11**, 157-160
- SINGH, D.V. Y SANYAL, S.C. (1993). Haemagglutinating activity serum sensitivity and enterotoxigenicity of *Aeromonas* spp. *J. Med. Microbiol.* **38**, 49-53.
- SLADE, P.J.; FALAH, M.A. Y AL-GRADY, A.M.R. (1986). Isolation of *Aeromonas hydrophila* from bottled waters and domestic water supplies in Saudi Arabia. *J. Food Protect.* **49**, 471-476.
- SLEYTR, U.B. (1978). Regular arrays of macromolecules on bacterial cell walls: structure, chemistry, assembly, and function. *Int. Rev. Cytol.* **53**, 1-64.
- SLEYTR, U.B. Y MESSNER, P. (1983). Crystalline surface layers on bacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* **37**, 311-319.
- SLOTNICK, I.J. (1970). *Aeromonas* species isolates. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **174**, 503-510.
- SMIT, J.; GRANO, D.A.; GLAESER, R.M. Y AGABIAN, N. (1981). Periodic surface array in *Caulobacter crescentus*: Fine structure and chemical analysis. *J. Bacteriol.* **146**, 1135-1150.
- SMITH, H. (1990). Pathogenicity and the microbe in vivo. *J. Gen. Microbiol.* **136**, 377-383.
- SMITH, R.; NICKELSON, R.; MARTIN, R. Y FINNE, G. (1984). Bacteriology of indole production in shrimp homogenates held at different temperatures. *J. Food Protect.* **47**, 861-864.
- SMYTH, C.J.; JONSSON, P.; OLSSON, E.; SODERLIND, O.; ROSENGREN, J.; HJERTEN, S. Y WADSTROM, T. (1978). Differences in hydrophobic surface characteristics of porcine enteropathogenic *Escherichia coli* with or without K88 antigen as revealed by hydrophobic interaction chromatography. *Infect. Immun.* **22**, 462-472.
- SNOWER, D.P.; RUEF, C.; KURITZA, A.P. Y EDBERG, S.C. (1989). *Aeromonas hydrophila* infection associated with the use of the medicinal leeches. *J. Clin. Microbiol.* **27**, 1421-1422.
- STELMA, G.N.JR. (1988). Virulence factors associated with pathogenicity of *Aeromonas* isolated. *J. Food Safety.* **9**, 1-9.
- STELMA, G.N.JR. (1989). *Aeromonas hydrophila*. In *Foodborne Bacterial Pathogens*. ed. Doyle, M.P. pp. 1-20. New York: Marcel Dekker.

- STELMA, G.N.JR.; JONHSON, C.H. Y SPAULDING, P. (1986). Evidence for the direct involvement of β -hemolysin in *Aeromonas hydrophila* enteropathogenicity. *Curr. Microbiol.* **14**, 71-77.
- STEPHENSON, J.R.; MILLERSHIP, S.E. Y TABAQCHALI, S. (1987). Typing of *Aeromonas* species by polyacrylamide gel electrophoresis of radiolabelled cell proteins. *J. Med. Microbiol.* **208**, 980-984.
- STERN, N.J.; DRAZEK, E.S. Y JOSEPH, S.W. (1987). Low incidence of *Aeromonas* sp. in livestock feces. *J. Food Protect.* **50**, 66-69.
- STEWART, G.A.; BUNDELL, C.S. Y BURKE, V. (1986). Partial characterization of a soluble haemagglutinin from human diarrhoeal isolates of *Aeromonas*. *J. Med. Microbiol.* **21**, 319-324.
- STEWART, M. Y BEVERIDGE, T.J. (1980). Structure of the regular surface layer of *Sporosarcina ureae*. *J. Bacteriol.* **142**, 302-309.
- STEWART, M. Y MURRAY, R.G.E. (1982). Structure of the regular surface layer of *Aquaspirillum serpens* MW5. *J. Bacteriol.* **150**, 348-357.
- SUGITA, H.; NAKAMURA, T.; TANAKA, K. Y DEGUCHI, Y. (1994). Identification of *Aeromonas* species isolated from freshwater fish with the microplate hybridization Method. *Appl. Environ. Microbiol.* **60**, 3036-3038.
- SUHREN, G. (1989). Producer microorganisms. In *Enzymes of psychrotrophs in raw food*. ed. Robin C. Mackellar. pp. 3-34. Florida: CRC Press, Inc.
- SWEET, S.P.; MACFARLANE, T.W. Y SAMARANAYAKE, L.P. (1987). Determination of the cell surface hydrophobicity of oral bacteria using a modified hydrocarbon adherence method. *FEMS Microbiol. Lett.* **48**, 159-163.
- TELFORD, J.R.; LEARY, J.A.; TUNSTAD, L.M.G.; BYERS, B.R. Y RAYMOND, K.N. (1994). Amonabactin: characterization of a series of siderophores from *Aeromonas hydrophila*. *J. Am. Chem. Soc.* **116**, 4499-4500.
- THOMAS, L.V.; GROSS, R.J.; CHEASTY, T. Y ROWE, B. (1990). Extended serogrouping scheme for motile mesophilic *Aeromonas*. *J. Clin. Microbiol.* **208**, 980-984.
- THOMAS, S.R. Y TRUST, T.J. (1995). Tyrosinase phosphorylation of the tetragonal para crystalline array of *Aeromonas hydrophila*: molecular cloning and high-level expression of the S-layer protein gene. *J. Mol. Biol.* **245**, 568-581.
- THORNE, K.J.I.; OLIVER, R.C. Y GLAUERT, A.M. (1976). Synthesis and turnover of the regularly arranged surface protein of *Acinetobacter* sp. relative to the other components of the cell envelope. *J. Bacteriol.* **127**, 440-450.

- THUNE, R.L.; GRAHAM, T.E.; RIDDLE, L.M. Y AMBORSKI, R.L. (1982). Extracellular proteases from *Aeromonas hydrophila*: Partial purification and effects on age-O channel catfish. *Trans. Am. Fish. Soc.* **3**, 404-408.
- TODD, L.S.; HARDY, J.C.; STRINGER, M.F. Y BARTHOLOMEW, A. (1989). Toxin production by strains of *Aeromona hydrophila* grown in laboratory media and prawn puree. *Int. J. Food Microbiol.* **9**, 145-156.
- TORANZO, A.E.; BARJA, J.L.; COLWELL, R.R. Y HETRICK, F.M. (1983a). Characterization of plasmids in bacterial fish pathogens. *Infect. Immun.* **39**, 184-192.
- TORANZO, A.E.; BARJA, J.L.; COLWELL, R.R.; HETRICK, F.M. Y CROSA, J.H. (1983b). Haemagglutinating haemolytic and related vibrios isolated from striped bass on the atlantic coast. *FEMS Microbiol Lett.* **18**, 257-262.
- TORANZO, A.E.; SANTOS, Y.; NIETO, T.P. Y BORJA, J.L. (1986). Evaluation of different assay systems for identification of environmental *Aeromonas* strains. *Appl. Environ. Microbiol.* **51**, 652-656.
- TOULE, G. Y MURPHY, O. (1978). A study of bacteria contaminating refrigerated cooked chicken; their spoilage potential and possible origin. *J. Hyg. Cambridge.* **81**, 161-169.
- TRUST, T.J.; HOWARD, P.S.; CHAMBERLAIN, J.B.; ISHIGURO, E.E. Y BUCKLEY, J.T. (1980). Additional surface protein in autoaggregating strains of atypical *Aeromonas salmonicida*. *FEMS Microbiol Lett.* **9**, 35-38.
- TRUST, T.J.; KAY, W.W. Y ISHIGURO, E.E. (1983). Cell surface hydrophobicity and macrophage association of *Aeromonas salmonicida*. *Curr. Microbiol.* **9**, 315-318.
- TSUBOI, A.; TSUKAGOSHI, N. Y UDAKA, S. (1982). Reassembly in vitro of hexagonal surface arrays in a protein-producing bacterium, *Bacillus brevis* 47. *J. Bacteriol.* **151**, 1485-1497.
- TURNBULL, P.C.B.; LEE, J.V.; MILIOTIS, M.D.; VAN DER WALLE, S.; KOORNHOF, H.J.; JEFFREY, L. Y BRYANT, T.N. (1984). Enterotoxin production in relation to taxonomic grouping and source of isolation of *Aeromonas* species. *J. Clin. Microbiol.* **19**, 175-180.
- VADIVELY, J.; PUTHUCHEARY, S.D.; PHIPPS, M. Y CHEE, Y.W. (1995). Possible virulence factors involved in bacteraemia caused by *Aeromonas hydrophila*. *J. Med. Microbiol.* **42**, 171-174.
- VAN DER GOOT, F.G.; AUSIO, J.; WONG, K.R.; PATTUS, F. Y BUCKLEY, J.T. (1993). Dimerization stabilizes the pre-forming toxin aerolysin in solution. *J. Biol. Chem.* **268**, 18272-18279.

- VAN DER GOOT, F.G.; PATTUS, F.; PARKER, M. Y BUCKLEY, J.T. (1994a). The cytolytic toxin aerolysin: from the soluble form to the transmembrane channel. *Toxicology*. **87**, 19-28.
- VAN DER GOOT, F.G.; HARCHE, K.R.; PARKER, M. Y BUCKLEY, J.T. (1994b). The C-terminal peptide produced upon proteolytic activation of the cytolytic toxin aerolysin is not involved in channel formation. *J. Biol. Chem.* **269**, 30496-30501.
- VAN DER KOOLJ, D. (1988). Properties of aeromonads and their occurrence and hygienic significance in drinking water. *Zentralbl. Bacteriol. Hyg. B* **187**, 1-17.
- VAN DER KOOLJ, D. y HILJEN, W.A.M. (1988). Nutritional versatility and growth kinetics of *Aeromonas hydrophila* strain isolated from drinking water. *Appl. Environ. Microbiol.* **54**, 2842-2851.
- VAN OSS, C.J. (1978). Phagocytosis as a surface phenomenon. *Annu. Rev. Microbiol.* **32**, 19-39.
- VARNAM, A.H. Y EVANS, M.G. (1991). *Aeromonas*. In *Foodborne Pathogens: An illustrated text*. pp. 185-200. London: Wolfe publishing Ltd.
- VILLUENDAS, M.C.; ESTEBAN, A.; LOPEZ-GOMEZ, C.; FORTUÑO, B.; SERRANO, M. Y MOLES, B. (1991). *Aeromonas* en infecciones extraintestinales. *Rev. Esp. Microbiol. Clin.* **9**, 4446-4450.
- VON GRAEVENITZ, A. (1985). *Aeromonas* and *Plesiomonas*. In *Manual of Clinical Microbiology*. ed. Lennette, E.H.; Balows, A.; Hausler, W.J.JR. y Shadomy, H.J. pp. 278-281. Washington DC: American Society for Microbiology.
- VON GRAEVENITZ, A. (1987). Research on *Aeromonas* and *Plesiomonas*. *Experientia*. **43**, 348-349.
- VON GRAEVENITZ, A. Y MENSCH, A.H. (1968). The genus *Aeromonas* in human bacteriology, report of 30 cases and review of the literature. *N. Engl. J. Med.* **278**, 245-249.
- VON GRAEVENITZ, A. Y ZINTERHOFER, L. (1970). The detection of *Aeromonas hydrophila* in stools specimens. *Health Lab. Sci.* **7**, 124-126.
- VON GRAEVENITZ, A. Y BUCHER, C. (1983). Evaluation of differential and selective media for isolation of *Aeromonas* and *Plesiomonas* spp. from human feces. *J. Clin. Microbiol.* **17**, 16-21.
- WADSTROM, T. Y LJUNGH, A. (1991). *Aeromonas* y *Plesiomonas* as food- and waterborne-pathogens. *Int. J. Food Microbiol.* **12**, 303-312.

- WAKABAYASHI, H.; KANAI, K.; HSU, T.C. Y EGUSA, S. (1981). Pathogenic activities of *Aeromonas hydrophila* biovar. *hydrophila* (Chester) Popoff and Veron, 1976 to fishes. *Fish Pathol.* **15**, 319-325.
- WALKER, S.J. Y STRINGER, M.F. (1987). Growth of *Listeria monocytogenes* and *Aeromonas hydrophila* at chill temperatures. Technical Memorandum N° 462. Campden Food Preservation Research Association, England.
- WANDERSMAN, C. (1989). Secretion, processing, and activation of bacterial extracellular proteases. *Mol. Microbiol.* **3**, 1825-1831.
- WARBURTON, D.W.; MCCORMICK, J.K. Y BOWEN, B. (1994). Survival and recovery of *Aeromonas hydrophila* in water: development of methodology for testing bottled water in Canada. *Can. J. Microbiol.* **40**, 145-148.
- WATSON, I.M.; ROBINSON, J.O.; BURKE, V. Y GRACEY, M. (1985). Invasiveness of *Aeromonas* spp. in relation to biotype, virulence factors, and clinical features. *J. Clin. Microbiol.* **22**, 48-51.
- WILCOX, M.H.; COOK, A.M.; ELEY, A. Y SPENCER, R.C. (1992). *Aeromonas* spp. as a potencial cause of diarrhoea in children. *J. Clin. Pathol.* **45**, 959-963.
- WILCOX, M.H.; COOK, A.M.; GEARY, I. Y ELEY, A. (1994). Toxin production, adherence and protein expression by clinical *Aeromonas* spp. isolates in broth and human pooled ileostomy fluid. *Epidemiol. Infect.* **113**, 235-245.
- WILKEN, G.B. Y APPLETON, C.C. (1993). Bacteriological investigation of the occurrence and antibiotic sensitivities to the gut-flora of the potential southern African medical leech *Asiaticobdella buntonensis* (Hirudinidae). *J. Hosp. Infect.* **23**, 223-228.
- WILLIAMS, L.A. Y LAROCHE, P.A. (1985). Temporal occurrence of *Vibrio* species and *Aeromonas hydrophila* in estuarine sediments. *Appl. Environ. Microbiol.* **50**, 1490-1495.
- WILLOUGHBY, J.M.T.; RAHMAN, A.F.M.S. Y GREGORY, M.M. (1989). Chronic colitis after *Aeromonas* infection. *Gut.* **30**, 686-690.
- WOHLEGEMUTH, K.; PIERCE, R.L. Y KIRKBRIDGE, C.A. (1972). Bovine abortions associated with *Aeromonas hydrophila*. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* **160**, 1001-1002.
- WOLFF, R.L.; WISEMAN, S.L. Y KITCHENS, S.C. (1980). *Aeromonas hydrophila* bacteremia in ambulatory immunocompromised hosts. *Am. J. Med.* **68**, 238-242.
- YAMADA, H.; TSUKAGOSHI, N. Y UDAKA, S. (1981). Morphological alterations of cell wall concomitant with protein release in a protein-producing bacterium, *Bacillus brevis* 47. *J. Bacteriol.* **148**, 322-332.

- YAMAMOTO, K.; NAGAMINE, S.; KAMIYA, T.; MURAKAMI, R.; KIKUCHI, J. Y SATO, H. (1994). Identification to the genospecies level of *Aeromonas* strains isolated from raw meat and carp, and evaluation of their biological activities. *J. Food Hyg. Soc. Jap.* **35**, 187-194.
- YESIM OZBAS, Z. Y AYKUT AYTAC, S. (1994). Effect of chloride on growth and survival of *Aeromonas hydrophila* and *Yersinia enterocolitica* in water. *Chem. Mikrobiol. Technol. Lebensmittel.* **16**, 146-150,
- ZYWNO, S.; BAILEY, C.; ARCENEUX, J. Y BYERS, R. (1989). Siderophore distribution in isolates of the *Aeromonas* species. Abstr. D91. Annual Meeting of the American Society for Microbiology.