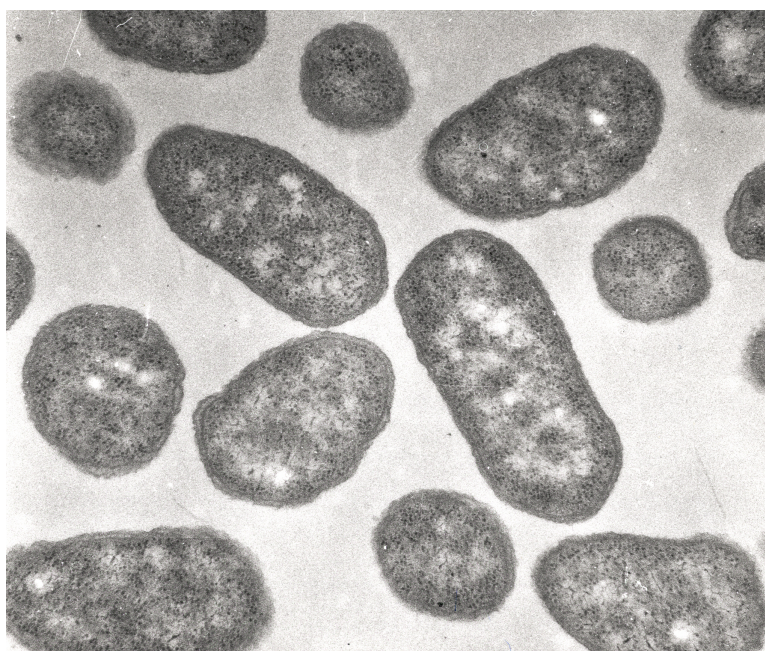




UNIVERSIDAD DE LEÓN
DEPARTAMENTO DE PATOLOGÍA ANIMAL:
SANIDAD ANIMAL

ESTUDIOS SOBRE LA IDENTIFICACIÓN Y VIRULENCIA DE
Aeromonas hydrophila



*Memoria presentada por D. Alberto Cascón Soriano
para optar al grado de Doctor en Ciencias Biológicas
León, Febrero de 2000*



UNIVERSIDAD DE LEÓN
COMISIÓN DE DOCTORADO

AUTORIZACIÓN DEL DIRECTOR DE TESIS PARA SU PRESENTACIÓN

El Dr. GERMÁN NAHARRO CARRASCO, como Director de la Tesis Doctoral: “**Estudios sobre la identificación y virulencia de *Aeromonas hydrophila***”, realizada en el Departamento de PATOLOGÍA ANIMAL: SANIDAD ANIMAL por D. ALBERTO CASCÓN SORIANO, autoriza la presentación de la citada Tesis Doctoral, dado que reúne las condiciones necesarias para su defensa.

En León a 7 de Febrero de 2000

EL DIRECTOR DE LA TESIS

Fdo. Germán Naharro Carrasco



UNIVERSIDAD DE LEÓN
COMISIÓN DE DOCTORADO

CONFORMIDAD DEL DEPARTAMENTO

El Departamento de PATOLOGÍA ANIMAL: SANIDAD ANIMAL, en su reunión del día 7 de Febrero del 2000, ha acordado dar la conformidad a la admisión a trámite de lectura de la Tesis Doctoral titulada: “**Estudios sobre la identificación y virulencia de *Aeromonas hydrophila***”, dirigida por el Dr. GERMÁN NAHARRO CARRASCO y presentada por D. ALBERTO CASCÓN SORIANO.

En León a 7 de Febrero de 2000

VºBº LA DIRECTORA DEL DEPARTAMENTO

EL SECRETARIO DEL DEPARTAMENTO

Fdo. Susana Suárez Ramos

Fdo. José Miguel Aller Gancedo

Agradezco la participación de todos los que, de un modo u otro, han colaborado con este trabajo, subrayando la importante tarea de los perseguidores de cualquier nacimiento

A Susana,
a mis amigos,
a mi familia

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. DISTRIBUCIÓN Y ECOLOGÍA	2
1.2. TAXONOMÍA DEL GÉNERO <i>Aeromonas</i>	3
1.3. IMPORTANCIA DE <i>Aeromonas</i> EN SANIDAD ANIMAL Y HUMANA	10
1.4. FACTORES DE VIRULENCIA	13
1.4.1. Adherencia y estructuras superficiales	15
1.4.1.1. <i>Fimbrias</i>	15
1.4.1.2. <i>Lámina S</i>	16
1.4.1.3. <i>Lipopolisacárido (LPS)</i>	19
1.4.1.4. <i>Otros factores superficiales</i>	21
1.4.2. Factores extracelulares de virulencia	22
1.4.2.1. <i>Hemolisinas</i>	23
1.4.2.2. <i>Enterotoxinas</i>	27

1.4.2.3. Sideróforos	28
1.4.2.4. Lipasas	30
1.4.2.5. Acetilcolinesterasa	32
1.4.2.6. Proteasas	33
1.4.3. Otros factores de virulencia	37
1.4.3.1. Plásmidos	37
1.4.3.2. Fenómeno suicida	38
2. OBJETIVOS.....	39
3. MATERIALES Y MÉTODOS	41
3.1. MATERIAL BIOLÓGICO	41
3.1.1. Microorganismos	41
3.1.1.1. Cepas de <i>Aeromonas</i>	41
3.1.1.2. Cepas de <i>E. coli</i>	44
3.1.1.3. Otras cepas	44
3.1.2. Plásmidos	44
3.2. ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN	46
3.3. MEDIOS DE CULTIVO Y REACTIVOS	47
3.3.1. Medios de cultivo.....	47
3.3.2. Materias base.....	49
3.3.3. Reactivos	49
3.4. CULTIVO DE LOS MICROORGANISMOS.....	51
3.4.1. Aislamiento de <i>Aeromonas</i> spp. a partir de muestras de agua.....	51
3.4.2. Mantenimiento de los microorganismos	51
3.5. MANIPULACIÓN DEL DNA	52

3.5.1. Obtención y purificación de DNA de alto peso molecular	52
3.5.2. Obtención y purificación de plásmidos	53
3.5.3. Procesamiento de muestras de DNA	53
3.5.3.1. <i>Extracción fenol/cloroformo</i>	53
3.5.3.2. <i>Digestión con endonucleasas de restricción</i>	54
3.5.3.3. <i>Defosforilación del DNA</i>	54
3.5.3.4. <i>Ligación del DNA</i>	55
3.5.3.5. <i>Obtención de extremos romos</i>	55
3.5.4. Electroforesis en geles de agarosa	56
3.5.5. Extracción de DNA a partir de geles de agarosa	57
3.5.6. Construcción de una genoteca de <i>A. hydrophila</i> AG2	57
3.5.7. Secuenciación del DNA	58
3.5.8. “Southern Blot” e hibridación del DNA	59
3.5.9. Amplificación de DNA por PCR	62
3.5.9.1. <i>Amplificación del gen lip</i>	63
3.5.9.2. <i>Amplificación del gen aroA</i>	66
3.5.9.3. <i>Amplificación del gen ahpA</i>	66
3.5.9.4. <i>Amplificación del gen ahpB</i>	68
3.5.10. Análisis de los RFLPs	68
3.5.11. Transformación de <i>E. coli</i>	69
3.5.11.1. <i>Choque térmico</i>	69
3.5.11.2. <i>Electrotransformación</i>	70
3.5.12. Conjugación de <i>Aeromonas</i>	71
3.6. MANIPULACIÓN DE LAS PROTEÍNAS	71
3.6.1. Precipitación de proteínas con ácido tricloroacético (TCA)	71
3.6.2. Electroforesis en geles de acrilamida (SDS-PAGE)	72

3.6.3. Electrotransferencia de proteínas (“Western Blot”).....	75
3.6.4. Inmunoensayo	76
3.6.5. Identificación del extremo N-terminal de las proteínas.....	77
3.6.6. Obtención de anticuerpos	77
3.6.7. FPLC y columnas cromatográficas	78
3.6.8. Actividades enzimáticas	80
3.6.8.1. Caseinasa	80
3.6.8.2. Elastasa	81
3.7. INFECCIONES EXPERIMENTALES Y CÁLCULO DE LA DOSIS LETAL 50 (LD₅₀) DE LAS CEPAS UTILIZADAS	82
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	85
4.1. PROCESO DE IDENTIFICACIÓN DE <i>Aeromonas</i> MEDIANTE LA AMPLIFICACIÓN DE GENES ESPECÍFICOS.....	85
4.1.1. Amplificación del gen <i>lip</i> mediante PCR	85
4.1.1.1. Desarrollo del ensayo y especificidad del mismo.....	86
4.1.1.2. Origen del fragmento amplificado	90
4.1.1.3. Actividad lipolítica de las <i>Aeromonas spp.</i> ensayadas	91
4.1.1.4. Sensibilidad del ensayo de amplificación por PCR del gen <i>lip</i>	91
4.1.1.5. Discusión.....	93
4.1.2. RFLP-PCR del gen <i>aroA</i>.....	93
4.1.2.1. Amplificación del gen <i>aroA</i>	94
4.1.2.2. Origen del fragmento amplificado	96
4.1.2.3. Sensibilidad del ensayo de amplificación por PCR del gen <i>aroA</i>	96
4.1.2.4. Análisis mediante PCR-RFLP.....	96
4.1.2.5. Discusión.....	101

4.2. CLONACIÓN DE PROTEASAS EXTRACELULARES.....	103
4.2.1. Proteasa AhpA.....	105
4.2.1.1. <i>Clonación y secuenciación del gen ahpA de A. hydrophila AG2.....</i>	105
4.2.1.2. <i>Actividad proteolítica y elastolítica de AhpA.....</i>	111
4.2.1.3. <i>Purificación y caracterización de la proteasa AhpA.....</i>	114
4.2.1.4. <i>Obtención de anticuerpos frente a AhpA</i>	116
4.2.1.5. <i>Reemplazamiento genético de ahpA.....</i>	116
4.2.1.6. <i>Inoculación en trucha arco iris.....</i>	119
4.2.1.7. <i>Discusión.....</i>	120
4.2.2. Proteasa AhpB.....	122
4.2.2.1. <i>Clonación molecular y secuenciación del gen ahpB.....</i>	122
4.2.2.2. <i>Purificación y caracterización de la proteasa AhpB.....</i>	128
4.2.2.3. <i>Actividad proteolítica y elastolítica de AhpB.....</i>	130
4.2.2.4. <i>Obtención de anticuerpos.....</i>	131
4.2.2.5. <i>Reemplazamiento genético de ahpB.....</i>	132
4.2.2.6. <i>Secreción y procesamiento de AhpB.....</i>	135
4.2.2.7. <i>Inoculación en trucha arco iris.....</i>	139
4.2.2.8. <i>Discusión.....</i>	140
5. CONCLUSIONES.....	143
6. BIBLIOGRAFÍA.....	145


ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla I. Nombres usados para describir a <i>Aeromonas</i> spp.	4
Tabla II . Genoespecies y fenoespecies del género <i>Aeromonas</i>	6
Tabla III. Cepas usadas a lo largo de este estudio.	42
Tabla III. (Continuación).	43
Tabla IV. Plásmidos utilizados en este trabajo.	46
Tabla V. Medio LB.	47
Tabla VI. Medio SOC.	48
Tabla VII. Tampones usados en la obtención de DNA.	52
Tabla VIII. Tampones usados en la electroforesis.	56
Tabla IX. Marcadores de peso molecular para DNA.	57

Tabla X. Oligonucleótidos y condiciones empleados en la secuenciación.....	59
Tabla XI. Soluciones usadas en la hibridación.	61
Tabla XII. Oligonucleótidos empleados en la amplificación del gen <i>lip</i>	63
Tabla XIII. Oligonucleótidos empleados en la amplificación del gen <i>aroA</i>	66
Tabla XIV. Oligonucleótidos empleados en la amplificación del gen <i>ahpA</i>	66
Tabla XV. Oligonucleótidos empleados en la amplificación del gen <i>ahpB</i>	68
Tabla XVI. Solución de calcio.	70
Tabla XVII. Composición de los geles de acrilamida	73
Tabla XVIII. Marcador de peso molecular para proteínas.	74
Tabla XIX. Tampón de transferencia.	75
Tabla XX. Soluciones usadas durante el inmunoensayo.	77
Tabla XXI. Adsorbentes ensayados en las cromatografías de afinidad.....	79
Tabla XXII. Gradiente cromatográfico.	80
Tabla XXIII. Ensayos proteolíticos.	82
Tabla XXIV. Actividades lipolíticas y presencia del gen <i>lip</i> en las cepas de <i>Aeromonas</i> ensayadas.....	89
Tabla XXV. Cepas de <i>Aeromonas</i> usadas para la amplificación del gen <i>aroA</i>	95
Tabla XXVI. Purificación de AhpA.	114
Tabla XXVII. Experimentos de inoculación en trucha y cálculo de la LD ₅₀	119
Tabla XXVIII . Porcentaje de homología de AhpB con varias proteasas bacterianas....	127
Tabla XXIX. Actividad proteolítica detectada en sobrenadantes de <i>Aeromonas</i>	134
Tabla XXX. Experimentos de inoculación en trucha y cálculo de la LD ₅₀	139

ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 1.** Dendrograma obtenido mediante comparación de las secuencias de aminoácidos de diferentes aerolisinas de *Aeromonas* (Khan *et al*, 1998).....25
- Figura 2.** Mapas de restricción de los plásmidos utilizados en los experimentos de hibridación. Las sondas aparecen señaladas con , el vector se muestra con trazo fino, el inserto con trazo intermedio y el gen con trazo grueso..... 61
- Figura 3.** Secuencia de nucleótidos del gen *lip* de *A. hydrophila* H3 y secuencia de aminoácidos deducida de la proteína que codifica (lipasa H3). SD: secuencia Shine Dalgarno; las secuencias reguladoras aparecen subrayadas; los oligonucleótidos empleados en la PCR aparecen coloreados. 64
- Figura 3.** (Continuación). 65
- Figura 4.** Secuencia de nucleótidos del gen *aroA* de *A. salmonicida* y secuencia de aminoácidos deducida de la proteína codificada (AroA). Los oligonucleótidos empleados en la PCR se muestran coloreados. 67
- Figura 5.** Amplificación por PCR a partir de DNA de *A. hydrophila* H3 utilizando una concentración creciente de MgCl₂: 1-8, 1,5 mM hasta 5 mM con un aumento gradual de 0,5mM; M, ϕ X174 *Hae*III. 87
- Figura 6.** Productos de PCR de las cepas pertenecientes al HG 1 realizada a partir de las cepas de este grupo presentes en la Tabla XXIV. 88.
- Figura 7.** Hibridación realizada a partir de las muestras procedentes de la amplificación por PCR de las cepas de la Tabla XXIV de acuerdo con la numeración. 90
- Figura 8.** **A:** Análisis en gel de agarosa de los productos de PCR obtenidos por amplificación de diluciones seriadas de *A. hydrophila* H3 en LB; 1-5, 10⁴ a 1 CFU respectivamente. **B:** Análisis en gel de agarosa de los productos de PCR obtenidos por amplificación de diluciones seriadas de DNA extraído a partir de *A. hydrophila* H3; 1-5, 1 ng a 0,1 pg respectivamente. M, marcador ϕ X174.....92
- Figura 9.** Electroforesis en gel de agarosa de los productos de PCR amplificados con PF1 y PR1 a partir de las cepas incluidas en la Tabla XXV siguiendo el mismo orden. **A:** 1-13, cepas de referencia. **B:** 1, *A. veronii* ATCC 35624; 2-13, cepas ambientales con el mismo orden de la tabla XXV. M, marcador ϕ X174 *Hae*III.94

- Figura 10.** Electroforesis en gel de agarosa de los fragmentos producidos mediante la digestión con *Hae*II de los genes amplificados por PCR de las cepas de referencia 1-14 incluidas en la Tabla XXV. **M**, marcador..... 97
- Figura 11.** Electroforesis en gel de agarosa de los fragmentos producidos mediante la digestión con *Hae*II de los genes amplificados por PCR de las cepas ambientales de 1-12 incluidas en la Tabla XXV junto con la cepa control *A. hydrophila* CECT 839. **M**, marcador.....97
- Figura 12.** Electroforesis en gel de agarosa de los fragmentos producidos mediante la digestión con *Hae*II de los genes amplificados por PCR de las cepas ambientales 13-20 incluidas en la Tabla XXV comparadas con cepas de referencia: 3, *A. caviae* CECT 838; 6, *A. media* CECT 4232; 7, *A. sobria* CECT 837; 9, *A. salmonicida* CECT 894. 98
- Figura 13.** Dendograma elaborado a partir de los patrones de RFLP obtenidos en la Figura 10. La escala representa la divergencia entre las especies expresada en términos de porcentaje.98
- Figura 14.** Dendograma elaborado a partir de los patrones de RFLP obtenidos en la Figura 11. La escala representa la divergencia entre las especies expresada en términos de porcentaje.99
- Figura 15.** Dendograma elaborado a partir de los patrones de RFLP obtenidos en la Figura 12. La escala representa la divergencia entre las cepas expresada en términos de porcentaje.100
- Figura 16.** Mapas de los plásmidos de clonación y subclonación del gen *ahpA*. El vector se muestra con trazo fino, el inserto con trazo intermedio y el gen con trazo grueso. En gris aparece la resistencia a kanamicina..... 107
- Figura 17.** Secuencia de nucleótidos de *ahpA* y secuencia de aminoácidos deducida de la proteína codificada (AhpA). SD: secuencia Shine Dalgarno; la flecha muestra el extremo N-terminal de la proteína; en verde aparecen los sitios activos; en amarillo los oligonucleótidos utilizados en la PCR.....108
- Figura 17.** (Continuación).....109
- Figura 18.** Alineamiento de la secuencia de aminoácidos de AhpA con la de AspA, serinproteasa de *A. salmonicida*.110
- Figura 19.** Actividad proteolítica detectada en medio sólido. **A:** placas de LB con leche descremada; 1, AG2 salvaje; 2, *A. hydrophila ahpA::Kan^r*; 3, *A. salmonicida* subsp. *masoucida* conteniendo el plásmido pJRD215; 4, *A. salmonicida* subsp. *masoucida* conteniendo el plásmido pJRDAHPA. **B:** placas de LB con elastina

- insoluble; 1, AG2 salvaje; 2, *A. hydrophila ahpA::Kan^r*; 3, *A. salmonicida* subsp. *masoucida* conteniendo el plásmido pJRDAHPA; 4, *A. salmonicida* subsp. *masoucida* conteniendo el plásmido pJRDAHPA112
- Figura 20.** Actividad proteolítica detectada en el sobrenadante de las cepas de *Aeromonas* usadas. **A:** actividad caseinolítica. **B:** actividad elastolítica.....113
- Figura 21.** Proteasa AhpA purificada y cargada en un gel de acrilamida. **1,** proteasa AhpA; **M,** marcador.....115
- Figura 22.** Electroforesis en gel de agarosa al 2% de los productos de la amplificación del gen *ahpA*. 1: cepa salvaje de *A. hydrophila* AG2. 2: cepa mutada *A. hydrophila ahpA::kan^r*. M, marcadores λ HindIII y ϕ X174 HaeIII..... 118
- Figura 23.** Mapas de los plásmidos de clonación y subclonación del gen *ahpB*. El vector se muestra con trazo fino, el inserto con trazo intermedio y el gen con trazo grueso. En gris aparece la resistencia a kanamicina.....123
- Figura 24.** Secuencia de nucleótidos del gen *ahpB* y secuencia de aminoácidos deducida para la proteína AhpB. SD: secuencia Shine Dalgarno; doblemente subrayado se encuentra una región de unión a Zinc; las flechas indican los lugares en los que se produce el procesamiento; los oligonucleótidos empleados en la PCR aparecen coloreados.....124
- Figura 24.** (Continuación).....125
- Figura 25.** Alineamiento de la secuencia de aminoácidos de AhpB con otras secuencias: HAPT, precursor hemoglutinin/proteasa de *V. cholerae*; LASB, precursor de la elastasa de *Pseudomonas aeruginosa*; HAP, hemoglutinin/proteasa de *Helicobacter pilori*. En negro se muestra la homología entre 3 o mas secuencias; en gris se muestra cuando la homología es sólo entre dos de las secuencias.126
- Figura 26.** Proteasa AhpB purificada y cargada en un gel de acrilamida. **1,** proteasa AhpA; **M,** marcador.....129
- Figura 27.** Actividad proteolítica detectada en medio sólido. **A:** placa de LB suplementada con elastina; 1, *A. salmonicida* subsp. *masoucida* conteniendo el plásmido pJRD215; 2, *A. salmonicida* subsp. *masoucida* conteniendo el plásmido pAHE6; **B:** placa de LB suplementada con caseína; 1, *A. salmonicida* subsp. *masoucida* conteniendo el plásmido pJRD215; 2, *A. salmonicida* subsp. *masoucida* conteniendo el plásmido pAHE6131

- Figura 28.** Electroforesis en gel de agarosa al 2% de los productos de la amplificación del gen *ahpB*. 1: en la cepa salvaje *A. hydrophila* AG2. 2: en el mutante *A. hydrophila ahpB::kan^r*. M, marcadores λ *Hind*III y ϕ X174 *Hae*III..... 133
- Figura 29.** Actividad proteolítica detectada en medio sólido. **A:** placa de LB suplementada con caseína; 1, *A. hydrophila ahpA::kan^r*; 2, *A. hydrophila ahpB::kan^r*; 3, *A. hydrophila* AG2. **B:** placa de LB suplementada con elastina; 1, *A. hydrophila ahpA::kan^r*; 2, *A. hydrophila ahpB::kan^r*; 3, *A. hydrophila* AG2.....134
- Figura 30.** Inmunoensayo realizado con muestras de *A. hydrophila* AG2 obtenidas durante tiempos cortos de incubación. **A:** células. **B:** sobrenadantes..... 136
- Figura 31.** Inmunoensayo realizado con sobrenadantes recogidos después de incubaciones a largo tiempo. **A:** *A. hydrophila* AG2. **B:** *A. hydrophila ahpA::kan^r*. **C:** *A. salmonicida* subsp. *salmonicida* con el plásmido pAHE6; a: sobrenadante incubado durante 48 horas, b: sobrenadante incubado 72 horas..... 137

1. INTRODUCCIÓN

El género *Aeromonas*, propuesto en 1936 por Kluver y Van Niel, engloba tanto bacilos pequeños de 1,0 a 3,5 μm de longitud como células de forma casi esférica de 0,3 a 1,0 μm de diámetro. Quimiorganotrofos y Gram-negativos con un óptimo de temperatura de crecimiento que oscila entre 22 y 28°C, estos microorganismos son catalasa y oxidasa positivos y resistentes al agente vibriostático 0/129. Suelen ser móviles gracias a la presencia de un solo flagelo polar y se encuentran ampliamente distribuidos como habitantes autóctonos de ambientes acuáticos (Holt *et al.*, 1994).

Algunas especies de *Aeromonas* son reconocidos patógenos de peces, anfibios y animales de sangre caliente, habiéndose descrito también numerosos casos de patologías en el hombre donde producen una gran variedad de infecciones gastrointestinales así como enfermedades nosocomiales en pacientes inmunodeprimidos o receptores de terapia antibiótica.

Debido a su implicación en la etiología de numerosas enfermedades humanas y de animales de renta, y a su importancia como agente infeccioso en acuicultura, el interés por

conocer las causas de su patogenicidad así como la búsqueda de nuevos métodos de identificación y diagnóstico rápido han ido en aumento a lo largo de los años.

1.1. DISTRIBUCIÓN Y ECOLOGÍA

Los miembros del género *Aeromonas* son microorganismos que aparecen asociados casi siempre a ambientes acuáticos, entre los que se encuentran aguas continentales (Parveen *et al.*, 1995), marinas (Hazen *et al.*, 1978; Krovacek *et al.*, 1994), estuarios (Kaper *et al.*, 1981; Fiorentini *et al.*, 1998), aguas termales (Hazen & Fliermans, 1979), aguas residuales (Snieszko *et al.*, 1974) y aguas de abastecimiento y consumo público (Mascher *et al.*, 1988; Moyer *et al.*, 1992; Huys *et al.*, 1997; Gavriel *et al.*, 1998; Kühn *et al.*, 1997; Schubert, 1998; Blair *et al.*, 1999), siendo la causa, en algunas ocasiones, de errores importantes en el recuento de coliformes de estas aguas. La abundancia de estos microorganismos en ambientes acuáticos está, en parte, influida por la temperatura, siendo la óptima para su crecimiento la que se da entre los meses de Mayo y Septiembre. Se han encontrado también grandes cantidades de aeromonadaceas en sedimentos acuáticos y lodos (Neilson, 1978).

Se pueden separar dos grupos dentro del género *Aeromonas*: el compuesto por aeromonadaceas psicrófilas e inmóviles pertenecientes al grupo 3 de hibridación de DNA (HG); y un segundo grupo compuesto por aeromonadaceas mesófilas y móviles dividido en 13 HGs (Joseph & Carnahan, 1994). Las especies predominantes del género son *A. hydrophila* (HG 1), *A. caviae* (HG 4) y *A. veronii* biovar *sobria* (HG 8), apareciendo las genomoespecies raras (HG 2, 3, 5, 6, 7 y 11) más frecuentemente en especímenes ambientales y veterinarios.

Son innumerables los casos de aislamientos de estos patógenos tanto en animales de sangre fría: peces, anfibios y reptiles (Gorden *et al.*, 1979); como de sangre caliente: pájaros (Shane *et al.*, 1984), perros (Andre-Fontaine *et al.*, 1995; Ghenghesh *et al.*, 1999), focas (Krovacek *et al.*, 1998), animales de granja (Gray *et al.*, 1990; Paniagua *et al.*, 1998;

Hathcock *et al.*, 1999; observación personal) y por supuesto el hombre (Ljungh *et al.*, 1977; Moyer *et al.*, 1977; Smith, 1980; Namdari & Bottone, 1990; Wilcox *et al.*, 1992; Muñoz *et al.*, 1994; Ko & Chuang, 1995; Rautelin *et al.*, 1995b; Murphy *et al.*, 1995; Wakabongo, 1995; Utsalo *et al.*, 1995; Kühn *et al.*, 1997; Komathi *et al.*, 1998; Yamada *et al.*, 1997; Ahmed *et al.*, 1997; Martino *et al.*, 1997; Lin & Cheng, 1998; Funada & Matsuda, 1997; Obi *et al.*, 1997). En la literatura aparecen también algunos casos de aislamiento en invertebrados (Kodjo *et al.*, 1997; Tsai *et al.*, 1997; Hänninen *et al.*, 1997).

Comúnmente se encuentran microorganismos del género *Aeromonas* formando parte de la flora intestinal de los peces sanos. Su presencia formando parte también de la flora intestinal de vacas, cerdos, caballos y aves de corral (Al-Mashat & Taylor, 1986; Akan *et al.*, 1998), así como en diversos productos agrícolas (García-López *et al.*, 1993; Velázquez *et al.*, 1998) y alimenticios (Kirov *et al.*, 1993; Krovacek *et al.*, 1995; Handfield *et al.*, 1996; Pin *et al.*, 1997; Ibrahim & MacRae, 1991; Hänninen, 1993; Buncic & Panin, 1994; Hänninen & Siitonen, 1995; Kirov *et al.*, 1990; Ciufecu *et al.*, 1990; Encinas *et al.*, 1999), incluida la leche pasteurizada (Denis & Veillet-Poncet, 1984), se encuentra también ampliamente documentada.

1.2. TAXONOMÍA DEL GÉNERO *Aeromonas*

Desde las primeras observaciones de *Aeromonas* realizadas por Zimmermann en 1890 en las que se las consideró como pertenecientes al género *Bacillus* (*Bacillus punctatus*), o las realizadas por Sanarelli en 1891 en las que aisló una cepa a partir de sangre de una rana infectada a la que llamó *Bacillus hydrophilus fuscus*, hasta nuestros días, la historia taxonómica de estos microorganismos ha dado muchos giros (Joseph & Carnahan, 1994). Para empezar, incluso se planteó una controversia en cuanto al nombre que el microorganismo debía recibir, usándose numerosos sinónimos para nombrar a los microorganismos identificados como *Aeromonas* spp. (Tabla I). De hecho, tanto Stanier (1943) como Miles y Miles (1951) dejaron claro que muchos microorganismos descritos

previamente como pertenecientes a los géneros *Pseudomonas*, *Proteus*, *Bacillus* y *Acetobacter* eran en realidad miembros del género *Aeromonas*.

En la séptima edición del manual Bergey (1957), Snieszko diferencia cuatro especies dentro del género, encuadrado en la familia *Pseudomonadaceae*, basándose en su patogenicidad y en varias pruebas bioquímicas: tres especies móviles, *A. hydrophila*, *A. punctata*, *A. liquefaciens* y una especie inmóvil, *A. salmonicida*.

Tabla I. Nombres utilizados para describir a *Aeromonas* spp..

<i>Nombre</i>	<i>Año</i>	<i>Referencia</i>
<i>Bacillus punctatus</i>	1890	Zimmerman
<i>Bacillus ranicida</i>	1890	Ernst
<i>Bacillus hydrophilus fuscus</i>	1891	Sanarelli
<i>Bacterium punctatum</i>	1896	Lehmann & Neumann
<i>Aerobacter liquefaciens</i>	1900	Beijerinck
<i>Bacillus hydrophilus</i>	1901	Chester
<i>Bacillus ichthyosmius</i>	1917	Hammer
<i>Achromobacter punctatum</i>	1923	Bergey <i>et al.</i>
<i>Proteus hydrophilus</i>	1923	Bergey <i>et al.</i>
<i>Bacterium hydrophilum</i>	1923	Weldin & Levine
<i>Pseudomonas punctata</i>	1930	Schäperklaus
<i>Pseudomonas fermentans</i>	1930	Kuehr & von Wolzogen
<i>Proteus melanovogenes</i>	1936	Miles & Halnan
<i>Pseudomonas caviae</i>	1936	Scherago
<i>Vibrio jamaicensis</i>	1955	Caselitz <i>et al.</i>

Más tarde Schubert en la octava edición del manual Bergey (1974) diferencia dos especies atendiendo a sus características fenotípicas dentro del grupo de las *Aeromonas*

móviles: *A. hydrophila* y *A. punctata*. Dentro de la primera especie se incluyen tres subespecies: *A. hydrophila* subsp. *hydrophila*, *A. hydrophila* subsp. *anaerogenes* y *A. hydrophila* subsp. *proteolytica*; mientras que dentro de la segunda especie se incluyen tan sólo dos subespecies: *A. punctata* subsp. *punctata* y *A. punctata* subsp. *caviae*. Las *Aeromonas* inmóviles constan, según esta clasificación, de una sola especie (*A. salmonicida*) con tres subespecies: *A. salmonicida* subsp. *salmonicida*, *A. salmonicida* subsp. *achromogenes* y *A. salmonicida* subsp. *masoucida*. En esta misma edición se sitúa al género *Aeromonas* dentro de la familia *Vibrionaceae* aunque con características intermedias entre esta familia y la *Enterobacteriaceae*.

En 1976, Popoff y Veron, tras un estudio de taxonomía numérica, concluyen que *A. punctata* es un sinónimo ilegítimo para *A. hydrophila*, y proponen un nuevo grupo taxonómico dentro del género *Aeromonas*: *A. sobria*. Asimismo sugieren que *A. hydrophila* subsp. *proteolytica* debería de ser eliminada del género.

En la primera edición del manual Bergey de bacteriología sistemática (Popoff, 1984) se diferencian, atendiendo a criterios fenotípicos (pruebas bioquímicas) y genotípicos (homologías del DNA), tres especies dentro de las *Aeromonas* mesófilas móviles: *A. hydrophila*, *A. caviae* y *A. sobria*. Por otra parte, *A. salmonicida* constituye una especie psicrófila e inmóvil con tres subespecies: *A. salmonicida* subsp. *salmonicida*, *A. salmonicida* subsp. *achromogenes* y *A. salmonicida* subsp. *masoucida*.

Estas cuatro especies ya eran reconocidas por Popoff *et al.* en 1981 quien usando el método de la nucleasa S1 realizó estudios de hibridación con DNA que resultaron en homologías interespecíficas DNA/DNA que proporcionaron la posibilidad de asignar grupos de hibridación a cada una de las especies definidas para *Aeromonas*. Mediante este método *A. hydrophila* incluiría tres grupos de hibridación (HG 1,2 y 3), otros tres *A. caviae* (HG 4,5 y 6) y tres mas *A. sobria* (HG 7,8 y 9). *A. salmonicida* contiene microorganismos pertenecientes a un sólo grupo de hibridación (HG 3).

Fanning *et al.* (1985) amplían a doce los HGs, aumentando estos a trece cuando Carnahan *et al.* (1991b) identifican un nuevo HG formado por cepas que presentan un único perfil de susceptibilidad ante ciertos agentes antimicrobianos incluida la ampicilina. En la actualidad el género *Aeromonas* comprende, al menos, 11 fenopecies y 14 HGs, 4 de ellos sin nombre: HG 2, HG 5A, HG 11 y HG 13 (Tabla II) (Joseph & Carnahan, 1994).

Tabla II. Genoespecies y fenopecies del género *Aeromonas*.

HG	Cepa de referencia	Genoespecie	Fenopecie
1	ATCC 7966	<i>A. hydrophila</i>	<i>A. hydrophila</i>
2	CDC 9533-76	<i>A. hydrophila</i>	
3	CDC 0434-84	<i>A. salmonicida</i>	<i>A. salmonicida</i>
4	ATCC 15468	<i>A. caviae</i>	<i>A. caviae</i>
5A	CDC 0862-83	<i>A. caviae</i>	
5B	CDC 0435-84	<i>A. caviae</i>	<i>A. media</i>
6	ATCC 23309	<i>A. eucrenophila</i>	<i>A. eucrenophila</i>
7	CDC 9538-76	<i>A. sobria</i>	<i>A. sobria</i>
8X	CDC 0437-84	<i>A. veronii</i>	<i>A. veronii</i> bv <i>sobria</i>
8Y	ATCC 9071	<i>A. veronii</i>	<i>A. veronii</i> bv <i>sobria</i>
9	ATCC 49568	<i>A. jandaei</i>	<i>A. jandaei</i>
10	ATCC 35624	<i>A. veronii</i>	<i>A. veronii</i> bv <i>veronii</i>
11	ATCC 35941	<i>A. veronii</i>	
12	ATCC 43700	<i>A. schubertii</i>	<i>A. schubertii</i>
13	ATCC 43946	<i>A. schubertii</i>	<i>Aeromonas</i> Grp 501
14	ATCC 49657	<i>A. trota</i>	<i>A. trota</i>

CDC: "Centers for Disease Control and Prevention".
 ATCC: "American type culture collection".

Al mismo tiempo que han ido surgiendo nuevos grupos de hibridación, nuevos taxones con categoría de especie han ido también definiéndose dentro del género: *A. media* (Allen *et al.*, 1983), *A. veronii* (Hickman-Brenner *et al.*, 1987), *A. eucrenophila* (Schubert & Hegazi, 1988), *A. schubertii* (Hickman-Brenner *et al.*, 1988), *A. enteropelogenes* (Schubert *et al.*, 1990a), *A. ichthiosmia* (Schubert *et al.*, 1990b), *A. jandaei* (Carnahan *et al.*, 1991c), *A. trota* (Carnahan *et al.*, 1991b), *A. allosaccharophila* (Martínez-Murcia *et al.*, 1992b), *A. encheleia* (Esteve *et al.*, 1995), *A. bestiarum* (Ali *et al.*, 1996) y *A. popoffii* (Huys *et al.*, 1997). En 1993 Collins *et al.* sugieren, tras un análisis de secuencias de rRNA, que *A. enteropelogenes* es idéntica a *A. trota*, y que *A. ichthiosmia* es igual que *A. veronii*. Por otra parte, Joseph y Carnahan renombran, en 1994, a *A. bestiarum* (HG 2) como una subespecie de *A. salmonicida*: *A. salmonicida* subsp. *bestiarum*.

Debido a la complejidad taxonómica inherente a estos microorganismos, la identificación y clasificación de los componentes de este género es todavía hoy un problema, siendo en muchos casos confundidos con bacterias pertenecientes al género *Vibrio*, al utilizar sistemas de identificación comerciales (Abbot *et al.*, 1998). De hecho, incluso su pertenencia a una familia concreta ha sido un punto de debate desde las primeras referencias bibliográficas encontradas al respecto. Hoy en día se considera al género *Aeromonas* como perteneciente a la familia *Aeromonadaceae* (Colwell *et al.*, 1986; Kita-Tsukamoto *et al.*, 1993; Janda & Abbot, 1998) aunque en la novena edición del manual Bergey de bacteriología determinativa (Holt *et al.*, 1994) sigue estando incluido dentro de la familia *Vibrionaceae*.

Por todo lo referido anteriormente, la identificación de las distintas especies dentro del género *Aeromonas* supone desde hace años un reto que muchos investigadores han tratado de resolver mediante la implementación de distintos protocolos. La disparidad de resultados que supone la utilización por una parte de algunos métodos moleculares y por la otra de métodos fenotípicos ha servido para que numerosos investigadores hayan tratado de dilucidar cual es el mejor procedimiento a través de varios estudios comparativos (Moissenet *et al.*, 1996; Talon *et al.*, 1998).

A lo largo de los años, se pueden encontrar numerosas referencias bibliográficas en las que la identificación y clasificación de estos microorganismos se basan en: la utilización de un elevado número de pruebas bioquímicas (Carnahan *et al.*, 1991a; Wakabongo *et al.*, 1992; Merino *et al.*, 1995; Longa *et al.*, 1997; Hänninen & Hirvela-koski, 1997; Dalsgaard *et al.*, 1998), serotipificación (Havelaar *et al.*, 1992), fagotipia (Altwegg *et al.*, 1988), resistencia a antibióticos (Overman & Janda, 1999), análisis de ácidos grasos (Huys *et al.*, 1994) ribotipificación (Moyer *et al.*, 1992; Martinetti Lucchini & Altwegg, 1992), reacción en cadena de la polimerasa o PCR (Austin *et al.*, 1998; Khan & Cerniglia, 1997; Khan *et al.*, 1999), polimorfismo en el tamaño de los fragmentos de restricción asociado a PCR o RFLP-PCR (Borrell *et al.*, 1997), hibridación DNA-DNA (Kaznowski, 1998), electroforesis en campo pulsado o PFGE (Talon *et al.*, 1996; Umelo & Trust, 1998, Moissenet *et al.*, 1996; Livesley *et al.*, 1999), amplificación por PCR de secuencias consenso intergénicas repetidas de enterobacterias o ERIC-PCR (Moissenet *et al.*, 1996; Davin-Regli *et al.*, 1998), electroforesis en geles de acrilamida (SDS-PAGE) e inmuno-transferencia (Mulla & Millership, 1993), polimorfismo en el tamaño de los fragmentos amplificados o AFLP (Huys *et al.*, 1996; Janssen *et al.*, 1996; Kuhn *et al.*, 1997a y 1997b), polimorfismos del DNA amplificado de forma aleatoria o RAPD (Davin-Regli *et al.*, 1998; Austin *et al.*, 1998; Talon *et al.*, 1998; Oakey *et al.*, 1999), hasta incluso la utilización de actividades enzimáticas o de pruebas concretas de identificación como el fenómeno suicida mediado por ácido acético (Namdari & Bottone, 1989) o la producción de factor “CAMP-like” (Figura & Guglielmetti, 1987).

Con todos estos métodos se persigue dar fin a las dificultades encontradas por los investigadores a lo largo de los últimos 20 años a la hora de situar cada cepa dentro de un taxón determinado, procurando optimizar el método en cuanto a la sencillez, especificidad, economía y rapidez del proceso se refiere. Ya no sólo importa situar a una cepa en un grupo de hibridación o en un género concreto, sino que se quiere ir más allá alcanzando en muchos casos la categoría de especie.

Identificación mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

La PCR es sin duda el procedimiento que, por la sencillez de su diseño y la rapidez y especificidad de su puesta a punto, ha tenido una mayor atención por parte de los investigadores de todo el mundo como método de identificación genotípico.

Esta técnica, imaginada en primera instancia en 1983 por el científico de Cetus Kary Mullis durante su luna de miel a través de las montañas del norte de California, fue llevada a la práctica por primera vez por Saiki *et al.* (1985). Este procedimiento está basado en la habilidad de la DNA polimerasa para copiar una hebra de DNA por elongación de hebras complementarias a partir de un par de iniciadores oligonucleotídicos próximos entre sí. De este modo, y mediante la repetición cíclica de la reacción, se obtiene un número exponencial de copias del fragmento amplificado en primera instancia, ya que los oligonucleótidos van a utilizar como molde para la síntesis de DNA cada una de las copias que se van originando.

Desde los primeros experimentos realizados utilizando este procedimiento hasta nuestros días, el proceso de amplificación se ha ido optimizando y han apareciendo nuevos protocolos (PCR: múltiple, asimétrica, inversa, *in situ*, acoplada a transcripción reversa, acoplada a RFLP, ERIC-PCR, RAPD,.....) que, basándose en la técnica original, tienen múltiples aplicaciones en el campo de la biología molecular (clonación, secuenciación, mutagénesis, identificación de microorganismos, pruebas de paternidad, estudios paleontológicos, ...).

En el campo de la identificación genotípica, cada día son más numerosos los ejemplos de trabajos en los que se emplea la PCR para la amplificación de genes específicos de determinados microorganismos así como de genes que forman parte de rutas metabólicas universales, llegándose en muchos casos a la identificación al nivel de especie.

La selección de una determinada secuencia para su utilización en un proceso de PCR se basa fundamentalmente en su especificidad para el nivel de identificación que se quiera conseguir. En este sentido, la utilización de genes asociados a la virulencia como marcadores genéticos para la amplificación nos permitiría la detección de microorganismos potencialmente patógenos. Este procedimiento ha sido utilizado, por ejemplo, con el gen que codifica para la enterotoxina termolábil (LT) de *Escherichia coli* (Olive, 1989), los genes que codifican para la proteína A, la proteína glicerofosfolípido-colesterol aciltransferasa y una serinproteasa de *A. salmonicida* (Hoie *et al.*, 1999), el gen que codifica para la aerolisina de *A. trota* (Khan *et al.*, 1999), varios genes asociados a la virulencia en *Aeromonas* (Kingombe *et al.*, 1999), los genes que codifican para las exotoxinas pirogénicas de estreptococos (Tyler *et al.*, 1992) y la adhesina A (PsaA) de *Streptococcus pneumoniae* (Morrison *et al.*, 2000) y el gen de la ureasa A de *Helicobacter pylori* (Clayton *et al.*, 1991).

Por otra parte, también se utilizan en los experimentos de amplificación genes altamente conservados como el que codifica para el rRNA de la subunidad ribosómica 16S de: *Mycobacterium* spp. (Kirschner *et al.*, 1993), *Salmonella* spp. (Van Lith & Aarts, 1994), *Neisseria gonorrhoeae* (Liebling *et al.*, 1994), *A. caviae* (Khan & Cerniglia, 1997), *Chlamydia pneumoniae* (Gaydos *et al.*, 1992); o bien genes que forman parte de rutas metabólicas universales: gen *aroA* de *Actinobacillus pleuropneumoniae* (Hernanz Moral *et al.*, 1999) y de *Staphylococcus aureus* (Marcos *et al.*, 1999), gen *rpoB* de enterobacteriaceas (Mollet *et al.*, 1997).

1.3. IMPORTANCIA DE *Aeromonas* EN SANIDAD ANIMAL Y HUMANA

Las especies móviles del género *Aeromonas* producen un síndrome hemorrágico grave en peces de agua dulce denominado septicemia hemorrágica provocando ocasionalmente lesiones en especies marinas. Esta septicemia ocasiona con frecuencia

graves pérdidas económicas en acuicultura debido al difícil control del brote epizoótico y a las elevadas tasas de mortalidad que origina (Shotts *et al.*, 1972).

En España, las infecciones producidas por *Aeromonas* móviles, representan un grave problema tanto en la producción intensiva de peces de agua dulce (truchas) como en la de especies marinas y anguilas producidas de forma intensiva en agua salobre, ocasionando generalmente mortalidades bajas, pero continuas, en asociación con otros patógenos oportunistas (Toranzo *et al.*, 1985). La enfermedad está normalmente asociada a situaciones de estrés ambiental (altas temperaturas o bajos niveles de oxígeno) o fisiológico, lo que unido a la presencia de la bacteria en el ambiente desencadena la enfermedad (Nieto *et al.*, 1985; Peters *et al.*, 1988).

Durante mucho tiempo se ha considerado a *A. hydrophila* y *A. caviae* como los agentes causantes de la enfermedad “red leg” en ranas, aunque según recientes estudios esta enfermedad tendría en realidad un origen viral, siendo la bacteria un patógeno oportunista (Cunningham *et al.*, 1996). Se ha relacionado también a las aeromonadaceas con numerosas enfermedades producidas en tortugas, cocodrilos y serpientes (Esterabadi *et al.*, 1973; Shotts *et al.*, 1972). Numerosos casos de enteritis producidos en caballos y ganado vacuno tienen también a *A. hydrophila* como agente causante de la enfermedad (Al-Mashat & Taylor, 1986; Al-Mashat & Taylor, 1983). Se han descrito asimismo septicemias en perros (Pierce *et al.*, 1973) y abortos en ganado bovino (Wohlgemuth *et al.*, 1972) causados por *A. hydrophila*, y en nuestro laboratorio incluso se han aislado *A. hydrophila* procedentes del pulmón de un pollo de avestruz.

Una de las enfermedades que con mayor intensidad asolan la producción de salmónidos en todo el mundo es desencadenada por *A. salmonicida* y se denomina forunculosis. La forunculosis debe su nombre a los forúnculos que se forman en la superficie del pez como resultado de una infección crónica con *A. salmonicida* (Vipond *et al.*, 1998). La forma aguda de la enfermedad se caracteriza por una septicemia que provoca una alta mortalidad (Ishiguro *et al.*, 1981). El microorganismo se mantiene en el riñón e

intestino del pez portador hasta que por una situación de estrés provocada por diferentes factores ambientales se produce la diseminación de la infección a toda la población. *A. salmonicida* también es el agente causal, en otras especies acuáticas como carpas y peces de acuario, de numerosas enfermedades caracterizadas casi siempre por ser crónicas y producir ulceraciones superficiales (Trust *et al.*, 1993).

Aunque las primeras referencias en las que se asocia a *Aeromonas* con enfermedades humanas datan de los años 30, el primer caso publicado de una enfermedad causada por este género lo encontramos en 1954 (Hill *et al.*), aislándose de la sangre de una mujer con septicemia. Las enfermedades más importantes causadas por *Aeromonas* en el hombre pueden clasificarse en cuatro categorías: celulitis o infecciones asociadas a heridas por exposición a tierra o a agua contaminada; septicemia (sobre todo por cepas de *A. veronii* subsp. *sobria* y *A. hydrophila*) asociada principalmente con enfermedades hepáticas (Lin *et al.*, 1996; Ko & Chuang, 1995), biliares o pancreáticas o con tumores malignos, particularmente leucemia aguda (Moyer *et al.*, 1977; Funada & Matsuda, 1997; Martino *et al.*, 1997); gastroenteritis o enfermedad diarreica aguda de corta duración (Namdari & Bottone, 1990; Ahmed *et al.*, 1997; Kühn *et al.*, 1997; Wilcox *et al.*, 1992; Utsalo *et al.*, 1995) causada por cualquier especie mesófila de *Aeromonas*, principalmente *A. veronii* y *A. hydrophila*; y varias infecciones no asociadas con ninguna condición fisiológica discernible o suceso ambiental alguno.

A pesar de lo controvertido de su papel, la mayoría de los estudios epidemiológicos realizados demuestran que las *Aeromonas* encontradas en heces son los agentes causantes de la enfermedad diarreica, más que microorganismos de la flora intestinal, aunque no se satisfagan todos los postulados de Koch (Janda *et al.*, 1995; Merino *et al.*, 1995). Su papel como patógeno en enfermedades extraintestinales, como bacteremias e infecciones de heridas, ha sido ampliamente demostrado a lo largo de las últimas décadas (Funada & Matsuda, 1997). Otras infecciones menos comunes causadas por *Aeromonas* incluyen endocarditis, meningitis (Lin & Cheng., 1998), neumonía, osteomielitis, peritonitis (Muñoz *et al.*, 1994), conjuntivitis, tromboflebitis y colecistitis. Existen también

otros sitios en los que aparecen donde su significado es cuestionable, como son el tracto respiratorio (garganta, esputos, aspirados bronquiales), el tracto genitourinario y las heridas provocadas por drenajes o catéteres.

La gastroenteritis asociada a *Aeromonas* afecta principalmente a niños de edades inferiores a 5 años (Wilcox *et al.*, 1992; Utsalo *et al.*, 1995; Ananthan & Alavandi, 1999), aunque también se han descrito casos de gastroenteritis asociada a adultos. La mayor incidencia de esta enfermedad se produce en los meses de verano durante los cuales las cálidas temperaturas provocan dosis infecciosas más altas en comidas contaminadas y fuentes de agua potable. También se ha asociado en muchas ocasiones a *Aeromonas* con la diarrea del viajero (Yamada *et al.*, 1997; Hänninen *et al.*, 1995; Rautelin *et al.*, 1995a).

Otro síndrome asociado con especies de *Aeromonas* tiene que ver con una infección a través de las heridas producidas en individuos sometidos a una terapia medicinal con sanguijuelas (*Hirudo medicinalis*), con la que, en algunos casos, se intenta tratar la congestión venosa subsecuente a una operación de cirugía plástica o microvascular (Abrutyn, 1988; Snower *et al.*, 1989; Janda, 1991; Mackay *et al.*, 1999).

De las últimas adquisiciones del género, sólo *A. schubertii* exhibe un espectro de enfermedades inusuales. Microorganismos pertenecientes a esta especie han sido recuperados únicamente de lugares extraintestinales como sangre, heridas e incluso en algún caso de celulitis (Carnahan *et al.*, 1989).

1.4. FACTORES DE VIRULENCIA

La virulencia de un patógeno depende de cuatro capacidades básicas: la colonización de las superficies mucosas y la entrada en los tejidos del hospedador, la multiplicación en los mismos, la resistencia frente a sus mecanismos de defensa y la producción de algún daño.

Aunque la mayor parte de las investigaciones que se realizan acerca de las *Aeromonas* tienen que ver con la identificación de los factores responsables de su virulencia o de los mecanismos potencialmente operativos en las infecciones, sólo un par de factores, la lámina A de *A. salmonicida* y la aerolisina de *A. hydrophila*, han sido ligados de forma inequívoca a la patogenicidad de estas especies (Janda, 1991; Chakraborty *et al.*, 1987).

La mayor parte del resto de factores de virulencia apuntados para *Aeromonas* se han ligado a la patogenicidad por inferencia, es decir, por comparación con moléculas que juegan un papel importante en la virulencia en otras especies bacterianas como *E. coli*. Esto ocurre debido, en parte, a la escasez de modelos animales en los cuales estudiar el papel de estos factores y en los que reproducir adecuadamente la enfermedad (Janda, 1991).

El carácter multifactorial que se atribuye a la capacidad patógena de *Aeromonas*, hace que la presencia o no de algunos atributos de virulencia no implique necesariamente patogenicidad y constituye un obstáculo importante a la hora de la valoración del efecto individual de cada uno de ellos en el proceso patológico.

A pesar de todo esto, se han realizado sustanciales progresos en la identificación de características clave de tipo estructural, enzimático y asociado a la célula con un papel importante en los procesos infecciosos, tanto intestinales como extraintestinales, de humanos y animales. En este sentido, la mutagénesis por reemplazamiento alélico de los genes responsables de estos caracteres y el posterior estudio del efecto que estas mutaciones ocasionan en la virulencia constituyen armas fundamentales para dilucidar los factores responsables de la patogenicidad de una bacteria. Como ejemplos de esta identificación de factores de virulencia se pueden citar: la aerolisina de *A. hydrophila* (Chakraborty *et al.*, 1987), la neumolisina de *Streptococcus pneumoniae* (Berry & Paton, 2000), los genes que codifican para la histidina kinasa en *Candida albicans* (Yamada-Okabe *et al.*, 1999) y en *Listeria monocytogenes* (Cotter *et al.*, 1999), el gen que codifica

para un componente de un sistema de transporte de hierro en *Vibrio anguillarum* (Wertheimer *et al.*, 1999) o el gen que codifica para una permeasa en *Staphylococcus aureus* (Bayer *et al.*, 1999).

1.4.1. Adherencia y estructuras superficiales

Un primer paso en la patogénesis de un microorganismo como *A. hydrophila* debe ser la colonización del hospedador. Muchas de las propiedades que facilitan la colonización están asociadas con la superficie celular de la bacteria. Aunque se conoce muy poco acerca de los mecanismos mediante los cuales las cepas de *Aeromonas* colonizan el tracto intestinal, se han descrito algunas posibles adhesinas entre las que se cuentan el lipopolisacárido (LPS), las láminas S, las cápsulas y capas mucosas, las proteínas de membrana externa (OMPs) y las asociadas a fimbrias, pero la importancia de cada una de ellas en las infecciones aún se desconoce.

Se ha visto que para los organismos enterotoxigénicos, como algunas cepas de *E. coli* y de *Vibrio cholerae*, la capacidad de adherirse a la mucosa intestinal, así como la producción de enterotoxinas, es necesaria para el desarrollo de diarrea (Freter, 1978). Atkinson y Trust (1980) describieron patrones de hemaglutinación los cuales se correlacionaban con la capacidad de adherirse a eritrocitos humanos y a células del epitelio bucal. Estos patrones han sido también correlacionados con el biotipo y la fuente de los aislados de *Aeromonas* (Burke *et al.*, 1984).

1.4.1.1. Fimbrias

Parece ser que hay más de un mecanismo involucrado en la hemaglutinación, y uno de ellos está mediado por las fimbrias o *pili*. Se sabe que los *pili* intervienen en la unión de *E. coli* a la mucosa intestinal, lo cual se ha comprobado mediante experimentos realizados utilizando vacunas antipilinas con las cuales se ha conseguido la prevención de la diarrea enterotoxigénica en animales (Acres *et al.*, 1979; Nagy *et al.*, 1978).

Mediante un análisis ultraestructural, realizado utilizando microscopía electrónica de transmisión, se pueden observar, al menos, dos tipos morfológicos de fimbrias en las cepas de *Aeromonas* tanto clínicas como ambientales: fimbrias rectas y fimbrias flexibles (Carrelo *et al.*, 1988; Ho *et al.*, 1990; Honma & Nakasone, 1990).

Las fimbrias rectas tienen una longitud que oscila entre 0,6 y 2,0 μm y están constituidas por subunidades de 17-18 kDa. Carecen de actividad hemoaglutinante y no comparten relación antigénica con los factores de colonización I y II de *E. coli* (Sato *et al.*, 1989). Las fimbrias flexibles constan de subunidades de 4 kDa de peso molecular, no muestran homología con ninguna secuencia conocida y están reguladas por factores ambientales, expresándose de forma óptima a 22°C de temperatura, en medio líquido, y ante bajas concentraciones de hierro.

Por otra parte, desde hace unos años se ha demostrado la presencia de dos familias distintas de fimbrias del tipo IV presentes en la mayoría de especies de *Aeromonas* asociadas con gastroenteritis (*A. hydrophila*, *A. caviae*, *A. veronii* biovar *sobria* y *A. trota*), habiéndose considerado estas, tras varias evidencias *in vitro*, como factores de colonización intestinal (Hokama & Iwanaga, 1991; Hokama & Iwanaga, 1992; Iwanaga & Hokama, 1992).

1.4.1.2. Lámina S

A principios de los 80, Kay *et al.* (1981) identificaron mediante microscopía electrónica de transmisión la lámina S, una capa adicional externa a la pared celular de las cepas autoagregantes de *A. salmonicida* causantes de graves patologías en salmones jóvenes de la variedad Coho. La estructura tetragonal de esta lámina, denominada en el caso de *A. salmonicida* lámina A, se basa en el autoensamblaje de una única especie proteica con carácter hidrofóbico de 49 a 51 kDa, la proteína A. Posteriores estudios de esta estructura han dado como resultado la secuenciación del gen que la codifica (Belland &

Trust, 1987; Chu *et al.*, 1991) así como la caracterización y purificación de la proteína A (Phipps *et al.*, 1983; Kay *et al.*, 1984).

Mediante estudios de mutagénesis se han definido varios pasos en la exportación de esta proteína así como los requerimientos estructurales para el anclaje de la lámina sobre la superficie de la célula (Belland & Trust, 1985). En 1995 Garduño *et al.* demostraron, mediante mutaciones del LPS, tanto espontáneas como inducidas por transposones, que el anclaje de la lámina A a la membrana externa se debía en parte al LPS, concretamente a cadenas laterales O, ya que estos mutantes liberaban tanto unidades tetraméricas de proteína A (Griffiths & Lynch, 1990) como grandes capas de la lámina (Belland & Trust, 1985; Dooley *et al.*, 1989). Por otra parte, la estructura tridimensional de la lámina ha sido reconstruida a partir de una serie de micrografías electrónicas de las capas de proteína A (Dooley *et al.*, 1989).

La lámina A parece ser multifuncional, ya que protege a *A. salmonicida* de la actividad bactericida de suero tanto inmune como no inmune (Munn *et al.*, 1982) y desempeña labores de unión insólitas, facilitando la asociación de *A. salmonicida* con macrófagos (Trust *et al.*, 1983) y la unión de inmunoglobulinas (Phipps & Kay, 1988) y porfirinas (Kay *et al.*, 1985) así como de laminina y fibronectina (Doig *et al.*, 1992). La presencia de esta lámina predispone a la bacteria, asimismo, a consecuencias fisiológicas no relacionadas aparentemente: inhibe el crecimiento a 30°C, intensifica la formación de estructuras filamentosas a 37°C y aumenta la sensibilidad a antibióticos hidrofóbicos como estreptonigrina y cloranfenicol (Garduño *et al.*, 1994).

Esta estructura proteica parece ser crucial también para la capacidad patógena de *A. salmonicida* en peces, ya que las cepas deficientes para la síntesis de lámina A presentan una reducción considerable en su virulencia (Ishiguro *et al.* 1981), de hecho la pérdida espontánea de esta capa paracristalina redundaba en un significativo incremento de la dosis letal 50 (LD₅₀) de estas cepas al inocularlas intraperitonealmente (Janda, 1991).

El colágeno de tipo IV es una proteína específica de las membranas basales que se encuentran por debajo de las células epiteliales y alrededor de las células musculares. La capacidad para unir colágeno supone un importante factor de virulencia en muchas bacterias patógenas (Emödy *et al.*, 1989; Tarkkanen *et al.*, 1990). La lámina A, que es la responsable de la unión a colágeno de tipo IV, constituye, por tanto, un mecanismo de adherencia muy ventajoso para un microorganismo invasivo como *A. salmonicida* (Trust *et al.*, 1993).

Posteriormente a estos estudios realizados en *A. salmonicida*, varios laboratorios identificaron simultáneamente cepas de *A. hydrophila* (HG 1) y *A. veronii* biovar *sobria* (HG 8), responsables de varias infecciones en distintos animales y en el hombre (principalmente bacteremia y peritonitis), que poseían esta lámina S (Paula *et al.*, 1988; Dooley *et al.*, 1988; Kokka *et al.*, 1991). Mediante análisis electroforético se calculó el tamaño de las proteínas que componen esta lámina estando este comprendido entre 52 y 58 kDa; asimismo al comparar la secuencia de aminoácidos con la de *A. salmonicida* se vio una gran semejanza salvo para el extremo N-terminal (Dooley *et al.*, 1988).

Independientemente de la fuente anatómica o de su origen (humano, ambiental o animal) estas cepas poseían características genéticas y estructuras idénticas y al mismo tiempo mostraban unas características fenotípicas similares. Las cepas de *Aeromonas* móviles en las que se ha encontrado la lámina S, pertenecen a un grupo patógeno caracterizado por tener un fenotipo autoaglutinador común (precipitan después de hervirlas: PAB⁺; y no lo hacen espontáneamente: SP⁻) y un serogrupo común (basándose en el antígeno O del lipopolisacárido todas resultaron ser O:11), además de causar serias infecciones, normalmente invasivas, tanto en humanos como en animales (Paula *et al.*, 1988; Janda *et al.*, 1987; Dooley *et al.*, 1986). Las especies pertenecientes a este serogrupo son las más comúnmente aisladas de septicemias causadas por *Aeromonas* mesófilas (Merino *et al.*, 1998).

Thomas y Trust, por otra parte, identificaron en 1995 un gen, *spsD*, que parece ser específico para el transporte de subunidades proteicas de la lámina S a través de la membrana externa de *A. hydrophila*. La mutación de este gen por inactivación insercional dio como resultado la pérdida de la lámina de la superficie celular así como la acumulación periplásmica de proteína S, pero no parecía tener ningún efecto en la composición proteica de la membrana externa del microorganismo o en la secreción de proteínas extracelulares. El gen *spsD* parece formar parte de una rama terminal específica dentro de la ruta general de secreción (GSP) de *A. hydrophila* y muestra una gran homología con la familia de genes PulD de secreción de proteínas. Está localizado 700 pb corriente arriba del gen estructural de la proteína S, *ahsA*, y presenta una gran homología con el sistema de secreción de *Xanthomonas* tanto a nivel de su secuencia como de su organización.

1.4.1.3. Lipopolisacárido (LPS)

Los lipopolisacáridos son moléculas complejas que constituyen el componente mayoritario de la membrana externa de las bacterias Gram-negativas y varían ampliamente en cuanto a su composición química, tanto dentro de un grupo dado como entre grupos diversos de bacterias Gram-negativas.

El LPS se compone de tres regiones estructurales con distinta movilidad electroforética: el lípido A (endotoxina), la región central R (núcleo oligosacárido) y la cadena lateral O (antígeno somático). Las dos primeras regiones están altamente conservadas desde el punto de vista químico e inmunológico, siendo la cadena lateral O el principal determinante antigénico de estas bacterias, ya que su composición de azúcares varía entre las distintas especies, definiendo el serogrupo dentro de una misma especie.

La serotipificación ha sido utilizada en investigaciones epidemiológicas para definir las rutas precisas de transmisión del organismo causante de la enfermedad y para dilucidar algunos aspectos de sus mecanismos de virulencia (Thomas *et al.*, 1990). Este aspecto está ampliamente demostrado en *E. coli*, el cual causa diarrea por diferentes

mecanismos que a menudo se relacionan con serotipos determinados (Rowe, 1979). Leblanc *et al.* (1981) describieron 12 serogrupos dentro de las *Aeromonas* móviles en un primer intento de seroagrupar a estos microorganismos. En 1984, Sakazaki y Shimada desarrollaron un esquema de serotipificación para las *Aeromonas* móviles mesófilas que incluía 44 serogrupos distintos, a los que Thomas *et al.* (1990) añadieron posteriormente 52 grupos más.

El lípido A es la región hidrófoba de anclaje del LPS a la membrana citoplasmática y, en vez de tener los ácidos grasos típicos de un fosfolípido, tiene seis o siete ácidos grasos saturados unidos a un dímero fosforilado de glucosamina. Se le han asignado varios efectos patológicos a este lípido entre los que se cuentan el shock endotóxico, la pirogenicidad y los cambios hemodinámicos (Takayama *et al.*, 1984). El núcleo oligosacárido, por su parte, contribuye a la resistencia al complemento (Merino *et al.*, 1991).

El crecimiento de cepas de *A. hydrophila* pertenecientes al serogrupo O:34 a 37°C, a baja y alta osmolaridad, dio como resultado cambios en el LPS y en la virulencia de las cepas probadas (Merino *et al.*, 1992). Mientras que el LPS de las cepas crecidas a 20°C era liso, el de estas mismas células crecidas a 37°C era rugoso, siendo más virulentas las cepas crecidas a baja temperatura. La totalidad de los lípidos de *A. hydrophila* exhiben un tipo de termoadaptación clásica que consiste en el incremento del contenido de ácidos grasos insaturados con la disminución de la temperatura, a expensas de los saturados. Esta adaptación homoviscosa ha sido también observada en otras especies como *E. coli* (Marr & Ingraham, 1962) y cepas psicrófilas de *Vibrio* (Bhakhoo & Herbert, 1979).

Estos resultados muestran claramente que la temperatura juega un papel importante en la regulación de la química de la superficie celular de las cepas de *A. hydrophila* (serogrupo O:34), y los cambios en la superficie celular explican las diferencias en cuanto a la virulencia observadas en las cepas probadas. No se puede concluir no obstante si la alta virulencia de las cepas crecidas a 20°C con respecto a la de las cepas

crecidas a 37°C es debida a los cambios sufridos en la subpoblación de moléculas del LPS o si estos cambios del LPS permiten una mayor actividad extracelular de algunos productos que hacen que las células sean más virulentas a 20°C.

El efecto de la osmolaridad puede observarse cuando las células son crecidas a 37°C y a alta osmolaridad, ya que a diferencia de las crecidas a baja osmolaridad, estas células presentaban un LPS liso. El LPS de las células crecidas a esa temperatura pero con una osmolaridad baja era, sin embargo, rugoso. De nuevo las células que poseían este fenotipo liso del LPS eran más virulentas en peces y ratones. Estas células presentaban un incremento en las actividades extracelulares frente a aquellas incubadas a baja osmolaridad, presentaban una mejor adhesión a células Hep-2 y eran resistentes a la actividad bactericida del suero no inmune (Aguilar *et al.*, 1997).

Cepas de *A. hydrophila* mutadas de tal manera que no podían producir el LPS eran incapaces de colonizar el intestino de pollo libre de bacterias, demostrando que resulta un factor fundamental de colonización en este modelo animal (Merino *et al.*, 1996). Asimismo se ha visto que las moléculas de la glicerofosfolípido-colesterol aciltransferasa (GCAT), toxina extracelular producida por *A. salmonicida*, demuestran una mayor toxicidad y termoestabilidad cuando se hallan unidas al LPS formando el complejo GCAT/LPS, jugando el LPS, por tanto, un papel importante en la toxicidad (Lee & Ellis, 1990).

1.4.1.4. Otros factores superficiales

La **Membrana Externa** de las bacterias Gram-negativas está compuesta por un grupo pequeño de proteínas que actúan a modo de lectinas (OMPs) algunas de las cuales se encuentran en un gran número de unidades. A las OMPs se las considera en algunos casos como factores de virulencia, ya que participan en la colonización del hospedador mediante la adherencia, invasividad y evasión del sistema inmune. Por otra parte, las OMPs han sido utilizadas en diversos estudios desde el punto de vista taxonómico (Kuijper *et al.*, 1989).

Existe una gran homogeneidad dentro de un mismo serogrupo (Dooley & Trust, 1988) a pesar de las diferencias que se pueden encontrar al estudiar cepas de la misma especie pero de distinto serogrupo (Aoki & Holland, 1985). Mediante mutaciones realizadas en el gen *exeE*, responsable de la exportación extracelular así como del ensamblaje correcto de la membrana externa (Jiang & Howard, 1992), se consiguieron no sólo defectos en la secreción de las proteínas, sino también reducciones en las cantidades de proteínas mayoritarias de estas membranas como son las porinas, proteínas reguladas por hierro, proteínas estructurales y diversas proteínas con actividad enzimática (Jiang & Howard, 1991).

La **Quimiotaxis** parece ser uno de los muchos mecanismos que controlan la interacción de las bacterias con las superficies mucosas, como las del intestino, cuyas paredes poseen sustancias quimiotácticamente activas que pueden promover o inhibir este movimiento en las bacterias.

1.4.2. Factores extracelulares de virulencia

La mayor parte de las aeromonadaceas elaboran un gran número de productos extracelulares, tanto tóxicos como enzimáticos, que degradan de una forma activa, en el caso de estos últimos, una gran variedad de complejos proteicos, polisacarídicos, mucopolisacarídicos y moléculas lipídicas. Aunque en muchos casos se han caracterizado bioquímicamente estas sustancias, clonándose y secuenciándose los genes que las codifican, el papel que desempeñan algunas de ellas dentro de las funciones fisiológicas o en la virulencia de las bacterias es aún un misterio.

Aunque se piensa que la mayor parte de estos productos extracelulares producidos por *Aeromonas* juegan un papel importante en la enfermedad gastrointestinal, la ausencia de modelos adecuados impide que esto se pueda asegurar de forma tajante. El carácter multifuncional de muchos de estos productos extracelulares contribuye también a que sea difícil comprender su papel.

1.4.2.1. Hemolisinas

Ya que las hemorragias son uno de los rasgos más conspicuos de las infecciones llevadas a cabo por las cepas del género *Aeromonas*, es lógico pensar en las hemolisinas como uno de los factores de virulencia a tener en cuenta a la hora de determinar los agentes implicados en la patogénesis de estas bacterias.

La capacidad demostrada por muchas especies de *Aeromonas* de lisar los eritrocitos presentes en medios de cultivo suplementados con sangre se debe a la presencia, entre los productos extracelulares de estos microorganismos, de citolisinas formadoras de poros que, mediante la destrucción de la integridad de la membrana celular, provocan la pérdida del contenido citoplasmático, causando como resultado final la muerte celular tanto por una lisis osmótica como no osmótica. (Bhakdi & Tranum-Jensen, 1988).

Las primeras actividades hemolíticas de sobrenadantes de *Aeromonas* fueron encontradas por Caselitz & Günter en 1960. Desde entonces estas enzimas han sido objeto de numerosos estudios a partir de los cuales se han podido establecer dos clases fundamentales de hemolisinas expresadas por cepas de *Aeromonas*: la beta-hemolisina que produce halos claros de hemólisis en placas de agar-sangre y la alfa-hemolisina que da lugar a una hemólisis turbia e incompleta fácilmente diferenciable de la anterior.

Beta-hemolisina. Esta enzima fue denominada aerolisina en 1974 por Bernheimer y Avigad y sus propiedades biológicas incluyen: letalidad en ratones (Chakraborty *et al.*, 1987), enterotoxicidad en segmentos lisados del íleon de conejos (Asao *et al.*, 1984), liberación de mediadores inflamatorios de granulocitos y mastocitos a concentraciones subletales (Scheffer *et al.*, 1988), y citotoxicidad en una larga variedad de líneas celulares *in vitro* (Ljungh & Wadström, 1983).

La aerolisina es una exotoxina producida como una única cadena polipeptídica con un peso molecular que oscila entre 49 y 54 kDa (Buckley *et al.*, 1981; Asao *et al.*, 1984; Howard *et al.*, 1987) cuyo gen ha sido clonado y secuenciado (Howard & Buckley, 1986; Chakraborty *et al.*, 1986; Howard *et al.*, 1987).

La toxina se expresa en forma de precursor inactivo (preprotoxina) que es conducido hacia el exterior celular a través de la pared bacteriana con un paso intermedio por el espacio periplásmico, en dónde se acumula la protoxina en los mutantes pleiotrópicos para el transporte (Wong *et al.*, 1990). Durante este tránsito de la preprotoxina del interior celular al espacio periplásmico se produce la eliminación de 23 aminoácidos que constituyen una secuencia señal. La protoxina se convierte finalmente en su forma activa mediante la digestión proteolítica en su extremo carboxilo de un péptido de 25 aminoácidos (Howard & Buckley, 1985).

La aerolisina actúa mediante su unión específica a la membrana de las células diana (a través de una glicoproteína) con la consiguiente oligomerización y formación del poro, el cual permite el paso de iones y moléculas de pequeño tamaño como la glucosa (Howard & Buckley, 1982) y provoca la destrucción de la membrana eritrocitaria produciéndose la lisis osmótica de la célula (Garland & Buckley, 1988).

Asao *et al.* (1986) compararon dos hemolisinas obtenidas de microorganismos aislados de distintas fuentes (ambiental y humana) observando que eran inmunológica y fisicoquímicamente distintas. Esta apreciación fue más tarde corroborada por Rose *et al.* (1989) quienes coincidían con Asao en que existían diferencias apreciables entre las toxinas procedentes de distintas cepas de *A. hydrophila* a pesar de ser biológicamente similares.

En *A. salmonicida* se diferencian dos tipos de actividades hemolíticas según Titball y Munn (1985): H-lisina que es una hemolisina de amplio espectro con un máximo de actividad frente a eritrocitos de caballo; y T-lisina que sólo es activa frente a eritrocitos de trucha y que requiere la actividad combinada de una caseinasa autógena y de otro factor

asociado con la membrana (Titball & Munn, 1983). Titball *et al.* (1985) demostraron que los mutantes caseinasa-negativos de la bacteria producen un precursor inactivo de la hemolisina que es activado por una caseinasa autógena y por otras serinproteasas.

También ha sido purificada y caracterizada una hemolisina en *A. caviae* (Karunakaran & Devi, 1994), habiéndose clonado el gen responsable, cuya actividad está regulada por factores ambientales y a la que se ha asociado con la virulencia de esta cepa (Singh & Sanyal, 1992). Del mismo modo se han conseguido caracterizar hemolisinas en *A. sobria* (Potomski *et al.*, 1987; Husslein *et al.*, 1988; Chakraborty *et al.*, 1990; Hirono *et al.*, 1992) y *A. trota* (Khan *et al.*, 1998).

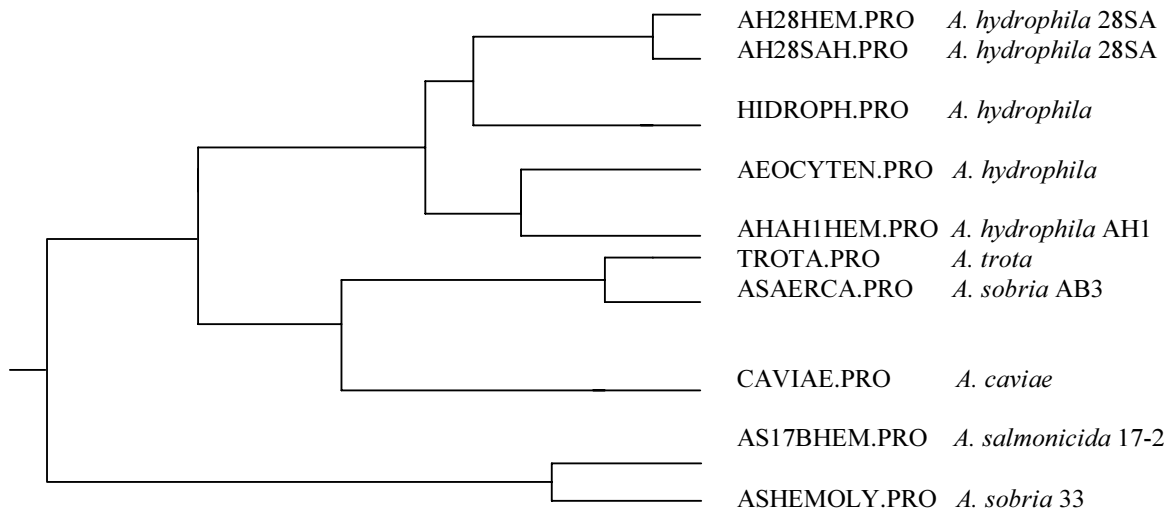


Figura 1. Dendrograma obtenido mediante comparación de las secuencias de aminoácidos de diferentes aerolisinas de *Aeromonas* (Khan *et al.*, 1998).

El árbol filogenético (Figura 1) basado en las secuencias de aminoácidos de los genes de las aerolisinas secuenciadas en *Aeromonas* nos muestra que existen tres grupos de genes distintos y nos da una idea de las semejanzas genéticas que existen entre las distintas

especies de este género y de las dificultades con que nos encontramos a la hora de diferenciarlas (Khan *et al.*, 1998).

A pesar de los experimentos realizados por Allan y Stevenson (1981) en los cuales inoculaban sobrenadantes libres de células, procedentes de mutantes sin actividad proteolítica pero con actividad hemolítica, reproduciéndose los signos patológicos asociados con la infección producida por *A. hydrophila*, y los realizados por Asao *et al.* (1986) en los que demostraban una actividad citotóxica y enterotóxica de la aerolisina inoculada en ratones por vía intravenosa, en muchos casos no se ha encontrado una correlación entre patogenicidad y actividad hemolítica.

Sin embargo, mediante el uso de mutantes isogénicos se ha demostrado que la aerolisina constituye un factor importante de virulencia requerido tanto para el establecimiento como para el subsecuente mantenimiento de las infecciones sistémicas asociadas con *Aeromonas* (Chakraborty *et al.*, 1987). Por otra parte, Wong *et al.* (1998) obtuvieron una significativa reducción en la virulencia de una cepa de *A. hydrophila* en ratones al mutar dos genes responsables de la producción de hemolisinas, uno de los cuales correspondía a la aerolisina.

Alfa-hemolisina. Esta actividad hemolítica de 65 kDa da lugar a una hemólisis incompleta en placas de agar-sangre y se expresa durante la fase estacionaria del crecimiento a temperaturas inferiores a 30°C.

Cabe destacar que Rodríguez *et al.* (1992) describieron una hemolisina nueva en *A. hydrophila* con características distintas de las de alfa y beta-hemolisinas, al poseer una actividad hemolítica incompleta pero al mismo tiempo tener actividad esterasa y ser termoestable.

1.4.2.2. Enterotoxinas

Existen varios estudios que sugieren que la aerolisina de *A. hydrophila* está muy relacionada con su enterotoxicidad, habiendo incluso una profunda discrepancia entre los investigadores que opinan que esta actividad enzimática sólo es citotóxica y los que opinan que también es enterotóxica.

Ferguson *et al.* (1997) describieron la purificación y el mecanismo de acción de una enterotoxina citotóxica de *A. hydrophila*, clonada y secuenciada con anterioridad (Chopra *et al.*, 1993), relacionada con la aerolisina que, según Buckley & Howard (1999) es sin duda por su secuencia y sus propiedades la aerolisina. Buckley y Howard consideran que al no alterar directamente los niveles de nucleótidos cíclicos, la aerolisina no satisface la definición de enterotoxina. Chopra y Houston (1999), sin embargo, opinan que si eso es cierto entonces la enterotoxina termoestable de *E. coli* (STb) no debería considerarse como tal ya que tampoco cumple esa premisa.

Además de la enterotoxina citotóxica (aerolisina) se ha encontrado al menos otro factor enterotoxigénico descrito en primera instancia por Ljungh *et al.* (1982) como una toxina citotónica de unos 15 kDa de peso molecular que produce acumulación de fluido en asas del íleon de conejo y provoca un redondeamiento de las células adrenales Y1, secreción de esteroides y un incremento en los niveles de AMPc intracelular. Los primeros experimentos realizados indicaron que no existían relaciones antigénicas entre esta enterotoxina citotónica producida por *Aeromonas* y las enterotoxinas de *V. cholerae* y *E. coli* (Ljungh *et al.*, 1982; Chakraborty *et al.*, 1984).

Rose *et al.* (1989) lograron caracterizar una enterotoxina citolítica que presentaba reacción cruzada con la toxina colérica, y aunque tenía un extremo N-terminal idéntico al de la aerolisina descrita por Howard, a partir del análisis completo de su secuencia de aminoácidos vieron que se trataba de una proteína distinta.

Experimentos posteriores indicaron que un 5-20% de las cepas de *Aeromonas* producen un factor enterotoxigénico relacionado inmunológicamente con la toxina colérica (Shimada *et al.*, 1984; Honda *et al.*, 1985; Chopra *et al.*, 1986; Potomski *et al.*, 1987). De todas maneras hay quien piensa en la posibilidad de que la toxina citotónica y el factor que reacciona con la toxina del cólera constituyan una única molécula con un determinante antigénico termolábil que reaccionaría con la toxina colérica, y una región enterotoxigénica termoestable que no reaccionaría con la toxina de *Vibrio* (Chopra *et al.*, 1986; Janda, 1991).

1.4.2.3. Sideróforos

La mayor parte de las bacterias crecen pobremente, y a veces no lo logran, en medios que contienen una concentración de hierro libre menor de 10^{-8} M, por ello muchos microorganismos patógenos poseen mecanismos especiales para adquirir este metal. Los sideróforos son compuestos de bajo peso molecular (de 400 a 1000 Da) que poseen una alta afinidad por distintas formas orgánicas e inorgánicas del hierro en condiciones de estrés provocado por una baja concentración férrica. El transporte del hierro al interior celular está mediado por receptores específicos de membrana y sistemas de transporte que reconocen el complejo hierro-sideróforo (Crosa, 1989).

La primera referencia sobre la producción de sideróforos por parte de cepas de *A. hydrophila* aparece en 1982 (Andrus & Payne, 1982). La mayoría de las *Aeromonas* mesófilas producen algún sideróforo, bien amonabactina (predominante en especies de *A. hydrophila* y *A. caviae*) o bien enterobactina (más abundante en especies de *A. sobria*). La mayoría de estas especies además producen fenolatos. La amonabactina se sintetiza en dos formas que contienen lisina y glicina: una de ellas contiene además triptófano (amonabactina T) y la otra contiene fenilalanina (amonabactina P).

Ambos tipos de sideróforos, amonabactina y enterobactina, contienen ácido 2,3-dihidroxibenzoico (2,3-DHB) conjugado con aminoácidos. La síntesis del ácido 2,3-DHB

está codificada por dos grupos de genes distintos: uno de ellos (*amoA*) se encuentra presente en los productores de amonabactina, mientras que el otro (*aeb*) aparece en los que producen enterobactina. Cada uno de estos sistemas difiere del operón descrito para *E. coli* (*entC*) que codifica uno de los pasos de la ruta de biosíntesis del 2,3-DHB, aunque se encuentran funcionalmente relacionados, lo que lleva a pensar en un origen común a partir de un grupo ancestral de genes (Barghouthi *et al.*, 1991; Massad *et al.*, 1994).

Las cepas que producen amonabactina no pueden utilizar enterobactina y viceversa, lo cual indica que el uso de amonabactina (como el uso de enterobactina y otros sideróforos) requiere un sistema específico que probablemente incluya un receptor en la membrana externa para la amonabactina (Barghouthi *et al.*, 1989). La presencia de un sideróforo u otro ha servido también como base para la identificación de especies del género *Aeromonas*: HG 7 no produce ningún sideróforo, HGs 1-5 y 12 producen amonabactina y HGs 8-10 producen enterobactina (Zywno *et al.*, 1992).

Por otra parte, cabe comentar que la producción de sideróforos es mayor en cepas de *A. hydrophila* aisladas de casos clínicos que en aquellas obtenidas de fuentes ambientales, sin que la temperatura de incubación o la presencia de determinados plásmidos afecte a esta producción (Naidu & Yadav, 1997).

En *A. salmonicida* existen, al menos, dos mecanismos de adquisición de hierro: uno constitutivo que requiere el contacto celular con el complejo hierro-transferrina o hierro-lactoferrina, y el otro debido a sideróforos inducibles de bajo peso molecular los cuales se presentan de una forma bastante homogénea en todas las cepas de esta especie (Chart & Trust, 1983; Fernández *et al.*, 1998).

La adquisición de hierro a partir de un hospedador es esencial para el crecimiento de un patógeno durante la infección, y la producción de amonabactina confiere a las aeromonadaceas la capacidad de obtener hierro del complejo hierro-transferrina presente en el suero, sugiriendo pues que la amonabactina podría ser un factor de virulencia. Este

sideróforo funcionaría intensificando el crecimiento de la bacteria en un medio deficiente en hierro (Barghouthi *et al.*, 1991) habiéndose descrito un caso clínico en el que la administración de deferoxamina (quelante de hierro), como parte de la terapia a un enfermo con hemosiderosis, provocó la muerte del paciente por una bacteremia debida a *A. hydrophila* (Lin *et al.*, 1996). Se cree que estos compuestos pueden tener una importancia relativa en el establecimiento de la infección habiéndose asociado los sideróforos de la clase hidroximato con la producción de enfermedades invasivas por parte de bacterias Gram-negativas como *E. coli* (Payne, 1988).

Mientras que la virulencia de algunas bacterias, como *Vibrio anguillarum*, se ve reducida al obtenerse mutantes isogénicos para la producción de sideróforos, en otras no parece que estas sustancias sean de una importancia vital para la patogenia (Crosa, 1980; Payne & Lawlor, 1990).

1.4.2.4. Lipasas

Las lipasas se incluyen dentro de las proteínas que pueden constituir factores de virulencia ya que son enzimas extracelulares que interaccionan con los leucocitos humanos (Rollof *et al.*, 1988) y pueden afectar a diversas funciones del sistema inmune mediante la generación de ácidos grasos libres (Buttke & Cuchens, 1984).

Aeromonas secreta una enzima lipolítica, de 35 kDa de tamaño, denominada glicerofosfolípido-colesterol aciltransferasa (GCAT) que se diferencia de la mayoría de las lipasas por su capacidad para catalizar la transferencia de grupos acilo de los fosfolípidos a los aceptores como el colesterol (Brumlik *et al.*, 1997). Por esta propiedad, y por otras, esta enzima se asemeja a una enzima del plasma de mamíferos denominada lecitina-colesterol aciltransferasa (LCAT).

La GCAT, cuyo gen ha sido clonado y secuenciado tanto en *A. hydrophila* como en *A. salmonicida* (Thornton *et al.*, 1988; Eggset *et al.*, 1994), forma parte de un nuevo

grupo o subfamilia de proteínas que incluye otras lipasas bacterianas así como un gran número de proteínas de plantas. Estas proteínas difieren de otras lipasas, incluyendo las enzimas de mamíferos y muchas lipasas bacterianas, en el modo en que se encuentran distribuidos los residuos que contienen los sitios activos y en la secuencia consenso que rodea a la serina nucleofílica. Se ha visto también que la GCAT se secreta por medio de la GSP (sistema responsable del transporte de la mayor parte de los polipéptidos secretados por las bacterias) siendo incapaces para su secreción aquellos mutantes con genes *exe* defectivos (Brumlik *et al.*, 1997).

Como ha quedado reflejado al hablar del LPS, se ha visto que las moléculas de GCAT de *A. salmonicida* demuestran una mayor toxicidad y termoestabilidad cuando se hallan unidas al LPS formando el complejo GCAT/LPS (Lee & Ellis, 1990), aunque posteriores estudios apuntan a que la mayor parte del polisacárido que interviene en la formación de este complejo proviene de la cápsula mas que del LPS (Bricknell *et al.*, 1997).

Por otra parte se han purificado y caracterizado dos lipasas de peso molecular relativamente alto (aproximadamente 70 kDa): una lipasa extracelular altamente termoestable aislada a partir de una cepa clínica de *A. hydrophila* (Anguita *et al.*, 1993) así como otra lipasa, con una cierta homología con la anterior, que posee también un óptimo de actividad a 50°C (Ingham & Pemberton, 1995) lo que sugiere que podrían tener algún papel en la patogenicidad de animales de sangre caliente. La mayor diferencia entre estas dos lipasas estriba en que la segunda posee actividad fosfolipasa (determinante patogénico en muchas bacterias Gram-negativas) y no así la primera.

Por último, Merino *et al.* (1999) han clonado y secuenciado dos fosfolipasas: PLA1 y PLC (esta última con actividad lecitinasa) a partir de una cepa de *A. hydrophila*. Aunque la PLA1 no muestra ninguna actividad citolítica, la PLC si que parece tener una clara actividad citotóxica, además, esta enzima posee una ligera actividad hemolítica similar a la hemolisina clonada por Hirono y Aoki (1993) en *A. salmonicida*. La PLC

podría constituir, asimismo, un factor de virulencia importante en la patogénesis de las *Aeromonas* mesófilas ya que la LD₅₀ de las bacterias mutantes en el gen responsable de su expresión muestra un gran incremento con respecto a la cepa salvaje. Estos datos están de acuerdo con el posible papel que se ha asignado a las fosfolipasas en diferentes procesos patogénicos (Diener *et al.*, 1991), habiéndose relacionado con frecuencia con daños intestinales (Titball, 1993).

1.4.2.5. Acetilcolinesterasa

En 1991 Nieto *et al.* describieron una toxina, procedente de los productos extracelulares de *A. hydrophila*, la cual era con diferencia la más tóxica de las sustancias descritas para este microorganismo con una dosis letal de 0,05 µg de toxina pura por gramo de pez. Más tarde se ha podido ver que también aparece esta toxina en los sobrenadantes de *A. caviae* (Rodríguez *et al.*, 1993).

La toxina posee una alta actividad acetilcolinesterasa y aparece en los productos extracelulares como un polipéptido monomérico, de 15,5 kDa, presente de forma general en los sobrenadantes de esta especie. Por su naturaleza enzimática, baja dosis letal, falta de daño tisular y su aparente efecto narcótico se cree que podría actuar sobre el sistema nervioso central de los peces (Nieto *et al.*, 1991).

Experimentos realizados con la toxina indican que en principio se expresaría como una proteína de elevado peso molecular degradada hasta su tamaño final por otras actividades enzimáticas presentes en los sobrenadantes de *A. hydrophila* y *A. caviae*. Esta toxina produce una acumulación de actividad acetilcolinesterasa en el cerebro de los peces tratados con ella, incrementándose en función de la dosis empleada (Rodríguez *et al.*, 1993).

1.4.2.6. Proteasas

Las proteasas son enzimas capaces de producir la ruptura de los enlaces peptídicos que se establecen entre los aminoácidos de una proteína. Existen varias proteasas extracelulares producidas por microorganismos Gram-negativos de las que se piensa que pueden tener importantes funciones en la virulencia. Entre ellas se encuentran: la elastasa de *Pseudomonas aeruginosa* de 33 kDa (Goldberg & Ohman, 1987) y las proteasas de 50 y 56 kDa de *Serratia marcescens* (Wandersman, 1989).

Aeromonas produce una gran actividad proteolítica extracelular a la que se atribuye daño tisular, contribución a la invasión y establecimiento de la infección mediante la superación de las defensas del hospedador y suministro de nutrientes para la proliferación celular (Leung & Stevenson 1988a; Pemberton *et al.*, 1997).

Existen dos proteínas mayoritarias producidas por cepas de *A. hydrophila* y que han sido descritas por Leung & Stevenson (1988b): una de ellas es una proteasa termoestable de 35 kDa inactivada por EDTA (Ljungh & Wadstrom, 1983) y que pertenece a la clase general de metaloproteasas termoestables; la otra proteasa es termolábil, de 68 kDa y pertenece a la familia de las serinproteasas termolábiles (descrita también por Rivero *et al.*, 1991). La mayoría de las cepas de *Aeromonas* analizadas mediante métodos inmunológicos secretan ambas proteasas extracelulares, aunque algunas de ellas poseen sólo una.

Rivero *et al.* (1990) han caracterizado una proteasa termoestable de 38 kDa de *A. hydrophila* que, aunque era semejante a las proteasas termoestables descritas por Leung & Stevenson (1988b), difería en aspectos tales como inactivación por temperatura e inhibición por agentes químicos (era estable en presencia de EDTA). Rodríguez *et al.* (1992) describieron una serinproteasa termoestable de 22 kDa, mientras que Loewy *et al.* (1993) purificaron una metaloproteasa de 19 kDa presente en el medio de cultivo de una cepa de *A. hydrophila* aislada del tracto intestinal de una sanguijuela (*Hirudo medicinalis*) cuya

actividad no era inhibida por EDTA. Ambas actividades enzimáticas diferían de las anteriormente descritas para *A. hydrophila*.

Esta disparidad sugiere que existen algunas diferencias entre proteasas de la misma clase producidas por distintas cepas de *Aeromonas*, y que es imposible generalizar acerca del tipo y número de actividades proteolíticas excretadas por este microorganismo (Rivero *et al.*, 1990; Nieto & Ellis 1991).

Existen además aminopeptidasas en varias especies de *Aeromonas* que juegan un papel importante en el catabolismo de péptidos suministrados de forma exógena (Pemberton *et al.*, 1997). Otras aminopeptidasas tienen papeles específicos como son: la activación extracelular de la aerolisina, la ruptura de la metionina del extremo N-terminal de cadenas peptídicas recién sintetizadas (metionina aminopeptidasas) y la estabilización de plásmidos multicopia como el ColE1 (aminopeptidasa A). Nirasawa *et al.* (1999a) han caracterizado, por otra parte, una aminopeptidasa en *A. caviae* para cuyo procesamiento interviene una metaloproteasa clonada y secuenciada también por este grupo de investigadores (Nirasawa *et al.*, 1999b).

Las cepas de *A. salmonicida* secretan un gran número de proteasas (Dahle, 1971; Shieh & Maclean, 1975; Sheeran & Smith, 1981; Mellergaard, 1983; Tajima *et al.*, 1984; Sakai, 1985; Fyfe *et al.*, 1986, Fyfe *et al.*, 1987; Price *et al.*, 1989), pero sin duda la que mejor caracterizada está es la enzima AspA, producto del gen *aspA* que codifica una serinproteasa de 65 kDa de peso molecular (Whitby *et al.*, 1992). Una de las principales funciones de la serinproteasa AspA es la activación de la GCAT (Eggset *et al.*, 1994) así como de otras toxinas y enzimas secretadas por *A. salmonicida* (Vipond *et al.*, 1998).

Existen varios estudios que sugieren que la actividad proteolítica no tiene un papel esencial en la forunculosis desencadenada por *A. salmonicida* en salmón ya que se han logrado mutar genes responsables de la producción de proteasas (Drinan & Smith, 1985; Vipond *et al.*, 1998) sin verse afectada la capacidad del patógeno para desarrollar la

enfermedad. Estos resultados sugieren que los obtenidos por Sakai (1985), que insinuaban justo lo contrario, se pudieron deber a la variabilidad entre las cepas o bien a que el mutante obtenido químicamente hubiera sufrido varias mutaciones (Vipond *et al.*, 1998).

Por otra parte se ha observado que la producción de la proteasa AspA se encuentra afectada por un sistema de regulación (*quorum sensing*) que actúa a altas densidades celulares *in vitro* (Swift *et al.*, 1997), habiéndose detectado esta actividad en los furúnculos *in vivo* (Ellis *et al.*, 1997). Esto parece indicar que la importancia de esta proteasa se centraría en el mantenimiento de la viabilidad bacteriana y su multiplicación antes de la liberación de la bacteria del pez hacia el agua donde los nutrientes son limitados y la viabilidad de *A. salmonicida* se ve fuertemente reducida (Vipond *et al.*, 1998).

Swift *et al.* (1999) han conseguido recientemente mutantes mediante la inactivación de los dos genes (*ahyI* y *ahyR*) que componen el *quorum sensing* de *A. hydrophila*, en los cuales la producción de exoproteasas se veía reducida en el caso de mutación de *ahyI* o desaparecía por completo si la mutación se producía en *ahyR*.

Elastasa

Para poder desempeñar su función, tejidos como la piel, los vasos sanguíneos y los pulmones requieren elasticidad además de resistencia a la tracción. Una extensa red de fibras elásticas en la matriz extracelular de estos tejidos les proporciona la capacidad para recuperarse tras una distensión transitoria.

La elastina, principal constituyente de estas fibras elásticas, es una proteína que presenta una estructura del todo inusual al estar constituida por un esqueleto de desmoisina con uniones cruzadas y una alta concentración de pequeños aminoácidos hidrofóbicos como glicina, alanina y valina. A causa de esta estructura tan poco común, y gracias a su insolubilidad, sólo unas pocas proteasas tienen actividad elastásica, sin embargo las

elastasas tienen frecuentemente actividades proteolíticas frente a una gran variedad de sustratos (Rust *et al.*, 1994).

La elastasa de *P. aeruginosa* ha sido relacionada en varias ocasiones con la patogénesis de este microorganismo (Homma *et al.*, 1975; Kawaharajo & Homma, 1977; Wretling & Pavlovskis, 1983; Morihara & Homma, 1985). En este sentido, se han visto incrementos en el título de anticuerpos frente a elastasa en pacientes con infecciones pulmonares de esta bacteria (Klinger *et al.*, 1978), y cuando se inocula la elastasa de *P. aeruginosa* de forma intravenosa produce hemorragias pulmonares en conejo similares a las que se ven en las infecciones naturales (Gray & Kreger, 1979). Asimismo, la administración de elastasa purificada a conejos causa serios daños en la córnea (Morihara & Homma, 1985). Cabe destacar por último que la elastasa aumenta el crecimiento bacteriano *in vivo* (Cicmanec & Holder, 1979).

La elastasa de *P. aeruginosa* ha sido ampliamente estudiada desde hace varios años debido a su implicación en la virulencia de esta bacteria, y prácticamente se han caracterizado todos los genes que intervienen en su secreción, procesamiento y regulación. En primer lugar se clonó y secuenció el gen *lasA* responsable de forma directa o indirecta de la secreción de la elastasa así como de la activación de un precursor de la enzima, la proelastasa (Goldberg & Ohman, 1987; Schad & Iglewski, 1988). Más tarde se purificó y caracterizó este precursor de la enzima que se hallaba localizado en el periplasma de la bacteria (Kessler & Safrin, 1988) y que ya había sido mencionado por Jensen *et al.* (1980).

Casi al mismo tiempo, se clonó y secuenció el gen estructural de la elastasa, *lasB*, lográndose expresar la actividad elastolítica en *E. coli* (Schad *et al.*, 1987; Bever & Iglewski, 1988; Fukushima *et al.*, 1989). Peters y Galloway (1990) caracterizaron un fragmento de la proteína LasA que intensificaba por sí solo, sin el resto de la molécula, la actividad de la elastasa, pudiendo ser un producto final del procesamiento de esta proteína. Mas tarde se llevó a cabo la clonación, secuenciación y caracterización de un gen regulador

del gen *lasB*, el gen *lasR* (Gambello & Iglewski, 1991). Por otra parte Toder *et al.* (1991) sugirieron que tanto *lasB* como *lasA* eran actividades elastolíticas dependientes del producto del gen *lasR* para su regulación. Por último, se asignó también un papel importante en la regulación del gen *lasB* a un autoinductor perteneciente a la familia de las N-acilhomoserin lactonas (Passador *et al.*, 1996).

A pesar de haberse relacionado la actividad elastolítica con la virulencia de *Aeromonas* en múltiples ocasiones (Santos *et al.*, 1988; Hasan *et al.*, 1992), todavía no se ha logrado caracterizar la enzima responsable de dicha actividad.

1.4.3. Otros factores de virulencia

1.4.3.1. Plásmidos

La mayor parte de los determinantes de virulencia descritos para las especies de *Aeromonas* están codificados cromosómicamente, aunque se ha sugerido que algunos de estos factores podrían estar codificados o bien regulados por plásmidos.

La presencia o no de plásmidos en *Aeromonas* es independiente de la especie y su tamaño es muy variable (Toranzo *et al.*, 1983; Chang & Bolton, 1987; San Joaquin *et al.*, 1989, Ho *et al.*, 1992). La mayor parte de los plásmidos descritos hasta la fecha para *Aeromonas* son crípticos (sin otra función mas que la de su propia replicación), aunque existen algunos que codifican para genes de resistencia a antibióticos. Dentro de estos últimos se encuentran un par de plásmidos relacionados con plásmidos R (Aoki *et al.*, 1986; Bradley, 1989), un plásmido con una resistencia a tetraciclina (Toranzo *et al.*, 1983), un plásmido conjugativo con 8 genes de resistencia a distintos antibióticos (Chang & Bolton, 1987), un plásmido con resistencia a cloranfenicol y tetraciclina (Belland & Trust, 1989), varios plásmidos transferibles con resistencia a numerosos antibióticos como ampicilina, cefalexina, cefoxitina, eritromicina y furazolidona (Chaudhury *et al.*, 1996), y un plásmido con resistencia a cloranfenicol, tetraciclina y estreptomomicina (Kul'ba *et al.*, 1997).

Ho *et al.* (1992) han observado, por otra parte, la presencia de un gen , *fxp*, que codifica para una fimbria flexible de una cepa de *A. hydrophila* y que se encuentra presente en un plásmido, siendo esta la primera información que se tiene sobre la presencia de un gen que codifique para un factor de virulencia presente en un plásmido de este género. Asimismo Noonan & Trust (1995) sugieren que los plásmidos de alto peso molecular presentes en cepas de *A. salmonicida* podrían ser importantes factores de virulencia ya que las cepas que poseen plásmidos delecionados presentan una notable reducción de su capacidad patógena.

1.4.3.2. Fenómeno suicida

Cuando algunas aeromonadaceas mesófilas (*A. hydrophila*, *A. caviae* y *A. sobria*) se siembran en medios que contienen un 0.5% de glucosa sufren una inhibición del crecimiento que se ha dado en llamar fenómeno suicida. Esta inhibición es concomitante con una acumulación de ácido acético y otros ácidos grasos de cadena corta como resultado de la supresión del ciclo de los ácidos tricarbónicos lo cual reduce el pH del medio, desencadenándose la muerte celular al cabo de 24 horas (Namdari & Bottone, 1988).

Las aeromonadaceas que presentan este fenómeno parecen estar mejor adaptadas, que los biotipos no suicidas, a medios anaeróbicos de crecimiento en ambientes con pocos nutrientes. Se cree, por lo tanto, que este fenómeno constituiría una adaptación ecológica en la que estas bacterias privarían a las demás bacterias con las que compiten de la utilización de la glucosa y otros azúcares mediante su conversión en acetato (Namdari & Cabelli, 1989). Se ha visto que el fenómeno suicida puede prevenirse a través de la estimulación del metabolismo bacteriano mediante repetidos pases por caldo de cultivo (Guimaraes *et al.*, 1996), y se ha empleado, junto con otras pruebas bioquímicas, como herramienta para la identificación de fenoespecies de aeromonadaceas mesófilas (Namdari & Bottone, 1989; Piersimoni *et al.*, 1990).

2. OBJETIVOS

Durante muchos años, la taxonomía de *Aeromonas* spp. ha sido objeto de una gran controversia, y no se arrojó luz sobre la diferenciación de estos microorganismos hasta que varios investigadores encuadraron a las distintas especies de este género en 14 grupos de hibridación de DNA. Por este motivo, el desarrollo y puesta a punto de técnicas que permitan una identificación fiable en el laboratorio de *Aeromonas* spp. podría ser de gran importancia dado que la caracterización fenotípica de este microorganismo ha resultado, hasta ahora, insuficiente.

Al mismo tiempo, el estudio de los mecanismos de patogenicidad y el diseño de nuevas estrategias para la detección rápida de *Aeromonas*, supondría un avance considerable. Nos permitiría subsanar, por una parte, las deficiencias sanitarias en las explotaciones piscícolas y , por otra, incluir en centros sanitarios nuevas técnicas de diagnóstico rápido para la detección de estos microorganismos en muestras procedentes del hombre, animales, así como del ambiente, incidiendo directamente en la medicina preventiva, de vital importancia para el mantenimiento de una población sana.

Los objetivos concretos de este trabajo son los siguientes:

1.- Identificación del género *Aeromonas* mediante amplificación de genes específicos y de genes que forman parte de rutas metabólicas universales utilizando la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

2.- Caracterización de productos extracelulares de *A. hydrophila* y estudio de su efecto en la virulencia.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1. MATERIAL BIOLÓGICO

3.1.1. Microorganismos

3.1.1.1 Cepas de *Aeromonas*

Las cepas ambientales de *Aeromonas* utilizadas a lo largo de este estudio (Tabla III) fueron aisladas y caracterizadas en nuestro laboratorio a partir de muestras de agua procedente de diversos ríos de León. Tres de las cepas de *A. hydrophila* (67-P-24, 1.54 y AG2) se aislaron directamente a partir de trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*) (Santos *et al.*, 1988; Hernanz Moral *et al.*, 1998).

Las cepas procedentes de aislamientos humanos fueron proporcionadas por el Hospital Princesa Sofía de León, mientras que las cepas de referencia fueron obtenidas a partir de la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT). Las células fueron incubadas a 28°C salvo las cepas de *A. salmonicida* las cuales fueron incubadas a 22°C.

Tabla III. Cepas usadas a lo largo del estudio

Cepa	Origen
<i>Vibrio fluvialis</i>	Este trabajo
<i>Streptococcus pyogenes</i>	CECT 190
<i>Serratia marcescens</i>	CECT 159
<i>Pseudomonas putida</i>	CECT 324
<i>E. coli</i> C600-1	Nagahare <i>et al.</i> (1977)
<i>E. coli</i> AB2829	Pittard & Wallace (1996)
<i>E. coli</i> S17-1	Simon <i>et al.</i> (1983)
<i>A. hydrophila</i>	CECT 839 (ATCC 7966)
<i>A. hydrophila</i>	CECT 398 (NCIB 9233)
<i>A. hydrophila</i>	CECT 4223 (ATCC 14486)
<i>A. eichrenophila</i>	CECT 4224 (ATCC 23309)
<i>A. jandaei</i>	CECT 4228 (ATCC 49568)
<i>A. salmonicida</i> subsp. <i>achromogenes</i>	CECT 895 (ATCC 33659)
<i>A. salmonicida</i> subsp. <i>salmonicida</i>	CECT 894 (ATCC 33658)
<i>A. salmonicida</i> subsp. <i>masoucida</i>	CECT 896 (ATCC 27013)
<i>A. sobria</i>	CECT 837 (NCIB 12065)
<i>A. trota</i>	CECT 4255 (ATCC 49657)
<i>A. enteropelogenes</i>	CECT 4487 (ATCC 49803)
<i>A. schubertii</i>	CECT 4241 (ATCC 43700)
<i>A. ichthiosmia</i>	CECT 4486 (ATCC 49904)
<i>A. media</i>	CECT 4232 (ATCC 33907)
<i>A. allosaccharophila</i>	CECT 4199
<i>A. caviae</i>	CECT 838 (ATCC 15468)
<i>A. hydrophila</i> D6	Este trabajo
<i>A. hydrophila</i> D9	"
<i>A. hydrophila</i> D11	"
<i>A. hydrophila</i> D13	Rivero <i>et al.</i> (1990)
<i>A. hydrophila</i> A7	Este trabajo
<i>A. hydrophila</i> F9	"
<i>A. hydrophila</i> S04/1	"
<i>A. hydrophila</i> 67-P-24	Santos <i>et al.</i> (1988)

Tabla III. (Continuación).

Cepa	Origen
<i>A. hydrophila</i> AG2	Hernanz Moral <i>et al.</i> (1998)
<i>A. hydrophila</i> B01.3	Este trabajo
<i>A. hydrophila</i> B01.6	"
<i>A. hydrophila</i> B01.9	"
<i>A. hydrophila</i> B01.27	"
<i>A. hydrophila</i> B01.28	"
<i>A. hydrophila</i> 1.54	Santos <i>et al.</i> (1988)
<i>A. hydrophila</i> S02/2	Rivero <i>et al.</i> (1990)
<i>A. caviae</i> B01.5	Este trabajo
<i>A. caviae</i> B01.31	"
<i>A. caviae</i> B01.32	"
<i>A. caviae</i> D5	"
<i>A. caviae</i> D8	"
<i>A. caviae</i> D10	"
<i>A. caviae</i> B01.10	"
<i>A. caviae</i> B01.11	"
<i>A. caviae</i> B01.23	"
<i>A. caviae</i> B02.8	"
<i>A. caviae</i> H01	"
<i>A. caviae</i> H02	"
<i>A. caviae</i> H03	"
<i>A. sobria</i> HS1	"
<i>A. sobria</i> HS2	"
<i>A. sobria</i> B01.1	"
<i>A. hydrophila</i> H1	"
<i>A. hydrophila</i> H2	"
<i>A. hydrophila</i> H3	Anguita <i>et al.</i> (1993)

3.1.1.2. Cepas de *E. coli*

La cepa *E. coli* C600-1 fue utilizada en los experimentos de clonación y subclonación, mientras que la cepa *E. coli* S17-1 se utilizó para la transferencia de plásmidos a *Aeromonas* por conjugación, gracias a la presencia en su cromosoma de los genes necesarios para la movilización de estos vectores (Simon *et al.*, 1983). *E. coli* AB2829 es un derivado de *E. coli* K-12 con una mutación en el gen *aroA*, y se usó para el manejo de este gen. Todas estas cepas se sembraron para su crecimiento en medio LB y se incubaron a 37°C.

3.1.1.3. Otras cepas

También se utilizaron, como controles negativos en los experimentos de PCR, otras cepas como: *Pseudomonas putida*, *Vibrio fluvialis*, *Serratia marcescens* y *Streptococcus pyogenes* (Tabla III).

3.1.2. Plásmidos

Los plásmidos utilizados para la realización del trabajo se encuentran reflejados en la Tabla IV.

pUC18 se utilizó para los experimentos de clonación, subclonación y secuenciación. Contiene un gen de resistencia a ampicilina así como el promotor y el gen de la β -galactosidasa.

pJRD215 se empleó para la transferencia de genes a *Aeromonas* por conjugación. Es un derivado del plásmido RSK1010 de amplio rango de hospedador y posee la característica de ser movilizado a otras cepas que actuarían como receptoras. Contiene un gen de resistencia a kanamicina. Para su movilización necesita la participación de un

plásmido “helper” que se encuentra integrado en el cromosoma de la cepa de *E. coli* S17-1 usada en los procesos de conjugación.

pSUP202 se utilizó para la sustitución de los genes nativos por los genes mutados en las cepas de *Aeromonas*. Este vector se comporta como un plásmido suicida cuando se transfiere a *Aeromonas*, lo que quiere decir que no se puede replicar si no se integra en su cromosoma. Posee 3 genes de resistencia a antibióticos: ampicilina, cloranfenicol y tetraciclina.

pSUP202-1 procede del plásmido pSUP202 en el que se ha eliminado la resistencia a ampicilina mediante la digestión del plásmido con la enzima PstI, que interrumpe la citada resistencia, relleno de los extremos con el fragmento klenow de la DNA polimerasa I y ligación de los extremos romos resultantes.

pULMJ8 se utilizó para obtener la resistencia a kanamicina (que a su vez procede del transposón Tn5) empleada para el marcaje de los mutantes usados en el reemplazamiento alélico.

pLA2 contiene el gen *lip* de *A. hydrophila* y se utilizó para la obtención de la sonda empleada en el experimento de hibridación con los DNAs amplificados durante el primer proceso de PCR (Figura 2).

pARO39 contiene el gen *aroA* de *A. hydrophila* y se empleó para la obtención de la sonda utilizada en el experimento de hibridación con los DNAs amplificados durante el segundo proceso de PCR (Figura 2).

Tabla IV. Plásmidos utilizados en este trabajo.

Plásmido	Origen
pUC18	Yanish-Perron <i>et al.</i> (1985)
pJRD215	Davison <i>et al.</i> (1987)
pULMJ8	Fernández-González <i>et al.</i> (1994)
pSUP202	Simon <i>et al.</i> (1983)
pLA2	Anguita <i>et al.</i> (1993)
pARO39	Hernanz Moral <i>et al.</i> (1998)
pAHPA	Este trabajo (Figura 12)
pJRDAHPA	"
pKAHPA	"
pSKAHPA	"
pAHE5	Este trabajo (Figura 19)
pAHE6	"
pAHE7	"
pAHE8	"
pSUP202-1	"

3.2. ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN

Para las infecciones experimentales realizadas con truchas se usaron ejemplares de trucha arco iris de 8 a 10 meses de edad, con 12 cm de longitud media y 19 g de peso, procedentes de la piscifactoría “Las Zayas” situada en Velilla de la Valduerna.

Los conejos, blancos de la raza “New Zealand”, fueron utilizados para la obtención de anticuerpos frente a las proteasas. Estos animales se mantuvieron y alimentaron en el Animalario de la Universidad de León.

3.3. MEDIOS DE CULTIVO Y REACTIVOS

3.3.1. Medios de cultivo

- *Medio LB*. Medio empleado de forma rutinaria tanto en el crecimiento como en el mantenimiento de las distintas especies de bacterias empleadas en este trabajo (Tabla V).

Tabla V. Medio LB.

<i>Composición (pH 7)</i>
NaCl 10 g
Extracto de levadura 5 g
Caseína tripsinizada 10 g
Agar 2% (medio sólido)
H ₂ O hasta 1 litro

- *Medio TSA*. Medio empleado en el crecimiento y mantenimiento de las especies de bacterias empleadas en este trabajo (Biolife S.R.L., Milano, Italia).

- *Medio agar-sangre*. Medio empleado para la observación de la capacidad hemolítica de las bacterias. Se preparó añadiendo al medio TSA un 5% de sangre de oveja desfibrinada.

- *Medio LB con leche descremada*. Medio utilizado para la observación de la capacidad proteolítica de las bacterias sobre las proteínas de la leche. Se preparó añadiendo al medio LB un 2% de leche descremada.

- *Medio SOC* (Tabla VI). Medio empleado en la transformación mediante electroporación.

Tabla VI. Medio SOC.

<i>Composición</i>
Extracto de levadura 0,5%
Caseína tripsinizada 0,5%
NaCl 10 mM
KCl 2,5 mM
MgCl ₂ 10 mM
MgSO ₄ 10 mM
Glucosa 20 mM

- *Medio con almidón y DNA* (Biolife S.R.L., Milano, Italia). Medio selectivo empleado para la identificación de *Aeromonas* spp.

- *Medio con triptosa y azul de bromotimol* (Biolife S.R.L., Milano, Italia). Medio selectivo empleado para la identificación de *Aeromonas* spp.

- *Medio LB con tributirina*. Medio empleado para la observación de la capacidad lipolítica de las bacterias. Se preparó añadiendo al medio LB un 0,5% de tributirina.

- *Solución salina*. Se utilizó para realizar diluciones tanto de las bacterias como del DNA utilizado en los experimentos de PCR. También se empleó para diluir los cultivos bacterianos utilizados en las inoculaciones realizadas en truchas y las muestras de agua de río. Se preparó con NaCl en agua destilada al 0,85 %.

Todos los medios de cultivo empleados a lo largo del trabajo fueron preparados en campana de flujo laminar siendo sometidos a un proceso de esterilización en autoclave con anterioridad a su utilización. Aquellas soluciones sensibles a la esterilización por calor fueron filtradas antes de ser utilizadas.

3.3.2. Materias base

- Extracto de levadura, caseína tripsinizada, leche descremada, agar técnico, hidrolizado de soja con agar (Biolife S.R.L., Milano, Italia).

- Tributirina (Fluka Chemie AG, GmbH & Co., KG).

3.3.3. Reactivos

- Tween 20, 8-hidroxiquinoleína, Rojo Ponceau S (Fluka Chemie AG, GmbH & Co., KG).

- Ácido acético, etanol absoluto, metanol, cloroformo, formamida, isopropanol, sulfato amónico, cloruro sódico, tritón X-100, gelatina, 2-mercaptoetanol, agua oxigenada, glicina, ácido bórico, fenol, glicerol, soluciones tampón (pH 4, 7 y 9), sacarosa, sulfato de magnesio heptahidratado, albúmina de suero bovino (fracción V), cloruro de calcio dihidratado, cloruro de magnesio hexahidratado, hidróxido sódico (NaOH), cloruro de litio, ácido maleico, citrato trisódico bihidratado (Merck Farma y Química, S.A., Barcelona, España).

- Sephacryl S-200, Sephadex A25, PD-10, endonucleasas de restricción (Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden).

- Ácido etilenglicol-bis-(β -aminoetileter)-N-N-N',N'-tetraacético (EGTA), ácido etilen diamino tetraacético (EDTA), 2-amino-2-(hidroximetil)-1,3-propanodiol (Tris), sodio

dodecilsulfato (SDS), cloranfenicol, lisozima, ligasa del fago T4, RNasa A, endonucleasas de restricción, pUC18 *Bam*HI defosforilado, kanamicina, tetraciclina, cefalotina, ditioneitol (DTT), agente bloqueante, X-gal, fosfatasa alcalina, fragmento klenow de la DNA polimerasa I, agarosa, desoxinucleósidos trifosfato (dNTPs), ampicilina, fenilmetilsulfonil fluoruro (PMSF), L-1-cloro-3-(4-tosilamido)-7-amino-2-heptanona hidrocloreto (TCLK), isopropil- β -D-galactopiranosido (IPTG) (Roche Diagnostics GmbH, Ottweiler, Germany).

- Polietilenglicol (PGE), ácido 3-(N-morfolino)-propanosulfónico (MOPS), ficoll 400, azocaseína, azul de Coomassie, cloruro potásico, aceite mineral, elastina, bromuro de etidio, N-lauril sarcosinato sódico, MS-222, elastina-rojo congo, 4-cloro-1-naftol, inhibidor de tripsina de soja, inhibidor de tripsina de lima (Sigma Chemical Company, St. Louis, MO, USA).

- Anti-inmunoglobulinas de conejo conjugadas con peroxidasa, acrilamida, N, N, N', N'-tetrametildiamina (TEMED), N', N'-metilen bisacrilamida, persulfato amónico (Bio-Rad Laboratories, Richmond, CA, USA).

- Ácido tricloroacético, acetona, oxalato amónico, alcohol iso-amílico, dimetil sulfóxido (DMSO), azul de bromofenol, cristal violeta, fucsina, lugol (Panreac Química, S.A., Barcelona, España).

- Ácido acético, ácido nítrico, ácido clorhídrico, ácido sulfúrico, D-glucosa (Farmitalia Carlo Erba, S.R.L., Milano, Italia).

El resto de reactivos empleados tenían calidad analítica. El agua usada tanto en la elaboración de los medios de cultivo como en la preparación de las soluciones utilizadas a lo largo del trabajo era de calidad milli Q (doblemente destilada y desionizada). La sangre empleada para la preparación de medios suplementados como el agar-sangre se obtuvo a partir de ovejas de la Facultad de Veterinaria, extraída mediante tubos de vacío para extracción de sangre (Venoject®, Terumo Corp., Leuven, Belgium).

3.4. CULTIVO DE LOS MICROORGANISMOS

3.4.1. Aislamiento de *Aeromonas* a partir de muestras de agua

Las muestras de agua, procedentes de ríos de la provincia de León, fueron recogidas en botellas estériles y se transportaron conservadas en hielo hasta su posterior procesamiento en el laboratorio.

Una vez en el laboratorio, las muestras fueron diluidas convenientemente en solución salina estéril y sembradas en cantidades de 0,1 ml en placas preparadas con los medios selectivos para aeromonadaceas mencionados con anterioridad (medio con almidón y DNA y medio con triptosa y azul de bromotimol). Las placas se incubaron a una temperatura de 28°C.

Aquellas colonias sospechosas de ser *Aeromonas* fueron identificadas mediante los sistemas comerciales “API”®: 20 NE y 20E (BioMérieux SA, Marcy l’Etoile, France) siguiendo las recomendaciones del fabricante. También se emplearon las pruebas bioquímicas recomendadas por Joseph y Carnahan (1994). En todo caso se realizó una tinción de Gram para la observación microscópica de las bacterias.

3.4.2. Mantenimiento de los microorganismos

El mantenimiento de las distintas cepas usadas a lo largo del trabajo se realizó mediante resiembras periódicas cada 20-30 días, realizadas en medio LB, a partir de las placas originales, las cuales se almacenaron selladas y bajo refrigeración. En el caso de cepas que contuviesen un plásmido, la siembra se realizaba en placas de LB suplementadas con el antibiótico adecuado. La ampicilina se empleó a una concentración de 100 µg/ml, la tetraciclina a 15 µg/ml, la kanamicina a 50 µg/ml y el cloranfenicol a 30 µg/ml.

Para la conservación a largo plazo de los microorganismos, estos fueron sembrados en medio líquido con los correspondientes antibióticos. Tras un periodo de incubación de 16 horas se preparó la mezcla: cultivo, glicerol y medio fresco (5:2:3) que fue almacenada a -80°C .

3.5. MANIPULACIÓN DEL DNA

3.5.1. Obtención y purificación de DNA de alto peso molecular

Se utilizó el método de Prierer *et al.* (1984) con algunas modificaciones. El microorganismo correspondiente se inoculó en 100 ml de medio líquido (LB o TSA) durante toda la noche, precipitándose a continuación las células mediante la centrifugación de las mismas a 3.000 rpm durante 10 minutos a temperatura ambiente.

El precipitado de células se resuspendió en 10 ml de tampón TGE (Tabla VII). Se añadió a continuación a la suspensión bacteriana unos copos de lisozima hasta alcanzar una concentración de 50 $\mu\text{g/ml}$. Se agitó suavemente y se incubó durante 30 minutos a 37°C . A continuación se añadió 1 ml de SDS 10% y se agitó de nuevo suavemente incubándose esta vez durante 15 minutos a temperatura ambiente. Se añadió después proteinasa K hasta alcanzar una concentración de 0,15 mg/ml y se incubó durante 60 minutos a 37°C . Se añadió por último NaCl hasta una concentración final de sal de 0,1 M y se procedió a limpiar el DNA mediante una extracción fenol/cloroformo.

Tabla VII. Tampones usados en la obtención de DNA.

<i>TE (pH 8)</i>	<i>TGE (pH 8)</i>
Tris-HCl 10 mM	Tris-HCl 25 mM
EDTA 1mM	EDTA 10 mM
	Glucosa 50 mM

El DNA se precipitó, tras la extracción, con 2,5 volúmenes de etanol frío y se lavó con etanol al 70%, tras lo cual se recogió con una varilla de vidrio. Por último se dejó secar al aire y se resuspendió en agua destilada estéril o en tampón TE (Tabla VII).

3.5.2. Obtención y purificación de plásmidos

Se utilizó el protocolo comercial “Wizard miniprep”® (Promega Corporation, Madison, USA) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. En este método se usa una resina de sílica con una alta afinidad por el DNA plasmídico, obteniéndose unas eficiencias de 1-10 µg de plásmido por 1-3 ml de cultivo.

3.5.3. Procesamiento de muestras de DNA

3.5.3.1. Extracción fenol/cloroformo

Este método se usa para la eliminación de restos de proteínas y otras impurezas presentes en las muestras de DNA (Maniatis *et al.*, 1989).

En primer lugar se procedió a ajustar la concentración de sal de la muestra hasta 0,1 M con NaCl. Posteriormente se añadió un volumen, equivalente al de la muestra, de fenol preparado neutralizando varias veces el fenol puro con Tris-HCl 0,1 M (pH 8) hasta alcanzar un pH de 7,6. Se agitó suavemente la mezcla durante 1 minuto a temperatura ambiente y se centrifugó a continuación a 11.000 rpm durante 3 minutos recogiendo la fase acuosa que queda en la parte superior. Esta misma operación se realizó 2 veces con fenol, otras 2 con una mezcla de fenol:cloroformo:isoamilalcohol (25:24:1) y una vez más con cloroformo:isoamilalcohol (24:1). Después de esta última extracción se precipitó la fase acuosa con 2,5 volúmenes, equivalentes al de la muestra, de etanol frío durante al menos 30 minutos a -20°C. A continuación se centrifugó la muestra a 11.000 rpm durante

15 minutos y se secó a totalidad para resuspender el DNA finalmente en agua destilada estéril o en tampón TE (Tabla VII).

3.5.3.2. Digestión con endonucleasas de restricción

Las endonucleasas de restricción son enzimas que identifican y cortan el DNA bicatenario en sitios concretos al reconocer secuencias específicas de una longitud de 4 a 6 pares de bases. Estas enzimas se emplearon para la obtención de los fragmentos de DNA utilizados en los experimentos de ligación y subclonación. Al mismo tiempo, y en función de los sitios de corte presentes en los genes estudiados, sirvieron para la elaboración de los mapas de restricción. Para la preparación de reacciones de digestión con endonucleasas de restricción se siguieron las instrucciones de los fabricantes (Roche Diagnostics GmbH, Ottweiler, Germany; Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden) añadiéndose de 1 a 5 unidades (U) de enzima/ μ g de DNA.

Cuando se realizó una digestión con dos endonucleasas que empleaban distintas soluciones tampón, se intercaló entre ambas digestiones una extracción del DNA mediante fenol/cloroformo y posterior precipitación con etanol. En el caso de digestiones parciales del DNA, se utilizaron tiempos de incubación muy cortos, al cabo de los cuales se inactivó la actividad mediante calentamiento.

3.5.3.3. Defosforilación del DNA

Se utilizó la actividad enzimática fosfatasa alcalina procedente de intestino de ternera para la eliminación, mediante hidrólisis, de los extremos 5'-fosfato de las cadenas de DNA. Este procedimiento se empleó para evitar que las cadenas de DNA lineal de los vectores, usadas en reacciones de ligación, se circularizasen sobre si mismas en lugar de unirse con el DNA diana, cuyos extremos 5'-fosfato se mantuvieron intactos.

Para su realización se siguieron las instrucciones del fabricante (Roche Diagnostics GmbH, Ottweiler, Germany) con ligeras modificaciones. Se emplearon dos incubaciones consecutivas de 30 minutos a 37 y 50°C con 5 U de enzima, parándose después la reacción con EGTA (que actúa quelando cationes necesarios para la actuación de la enzima). El DNA se extrajo posteriormente con fenol/cloroformo y se precipitó con etanol.

3.5.3.4. Ligación del DNA

Para este procedimiento se utilizó la ligasa del fago T4 que cataliza la formación del enlace fosfodiéster, usando ATP como cofactor, entre el extremo 5'-fosfato y el 3'-hidroxilo de una misma molécula de DNA de doble cadena, o bien de moléculas distintas. Se siguieron las instrucciones del fabricante (Roche Diagnostics GmbH, Ottweiler, Germany) usándose 1 U de enzima por reacción. Este procedimiento se utilizó para la obtención de todas las construcciones genéticas empleadas a lo largo del trabajo.

3.5.3.5. Obtención de extremos romos

Para este procedimiento se empleó el fragmento Klenow de la DNA polimerasa I que conserva la actividad polimerasa en la dirección 5'→3' y la actividad exonucleasa en la dirección 3'→5'. Estas actividades le permiten la formación de extremos romos en las cadenas de DNA protuberantes en 5' al introducir nucleótidos en el extremo 3'-hidroxilo en unos casos, y eliminar nucleótidos de los extremos 5'-fosfato en otros. Para la realización de este protocolo se siguieron las instrucciones del fabricante (Roche Diagnostics GmbH, Ottweiler, Germany) con ligeras modificaciones.

El DNA utilizado se obtuvo a partir de una extracción fenol/cloroformo o de otro protocolo de limpieza. Junto con la enzima (2 U) y el tampón, se añadieron DTT 1mM y dNTPs 0,05 mM. La reacción se incubó a 37°C durante 30 minutos tras lo cual se inactivó

la enzima sometiéndola a 65°C durante 10 minutos. El DNA se extrajo posteriormente con fenol/cloroformo.

3.5.4. Electroforesis en geles de agarosa

Mediante este procedimiento se separaron, identificaron, cuantificaron y purificaron los distintos fragmentos de DNA utilizados a lo largo de todo el trabajo. Se emplearon fuentes de alimentación (Bio-Rad Laboratories, Richmond, CA, USA) y cubetas de electroforesis (Renner GmbH, Dannstadt, Germany) de diferente potencia y capacidad respectivamente en función de las condiciones del ensayo a realizar.

Se utilizaron geles de agarosa con bromuro de etidio (0,5 µg/ml) preparados en tampón TBE (Tabla VIII). Los porcentajes de agarosa utilizados variaron desde el 0,8 al 3%, y se emplearon voltajes comprendidos entre 0,5 y 5 V/cm. Las muestras incluían un 10% de tampón de carga (Tabla VIII) necesario para la visualización de la carrera así como para conferir al DNA la densidad necesaria que le permitiese entrar en los pocillos del gel.

Tabla VIII. Tampones usados en la electroforesis.

<i>TBE (pH 8,3)</i>	<i>Tampón de carga</i>
Tris HCl 0,9 M	Tris HCl 10 mM
Ácido bórico 0,9 M	Azul de bromofenol 0,024%
EDTA 20 mM	EDTA 1 mM
	Sacarosa 35%

Como marcadores de peso molecular se emplearon, en función del tamaño de las muestras, los siguientes patrones comerciales: escalera de 100 pb (Roche Diagnostics GmbH, Ottweiler, Germany), fago λ (Roche Diagnostics GmbH, Ottweiler, Germany) cortado con la endonucleasa de restricción *HindIII* y el fago φX173 cortado con *HaeIII*

(Promega Corporation, Madison, USA). Los tamaños, en pares de bases, de las bandas de cada marcador están especificados en la Tabla IX.

Tabla IX. Marcadores de peso molecular para DNA (los tamaños se expresan en pb).

<i>λ Hind III</i>	<i>Escalera de 100 pb</i>	<i>φX174 HaeIII</i>
23.130	2.642	1.353
9.416	1.500	1.078
6.557	1.400	872
4.361	1.300	603
2.322	...	310
2.027	1.000	281/271
564	...	234
	500	194
	...	118
	100	72

3.5.5. Extracción de DNA a partir de geles de agarosa

Se utilizó el protocolo comercial “GeneClean II”® estandarizado y proporcionado por la casa Bio 101 (Bio 101 Inc., La Jolla, California, USA) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Este método contiene una matriz de sílica que une DNA específicamente, recuperándose aproximadamente un 80% de la muestra cargada en el gel. También se utilizó este procedimiento, en algún caso, como sustituto de la extracción de DNA por fenol/cloroformo.

3.5.6. Construcción de una genoteca de *A. hydrophila* AG2

El DNA de alto peso molecular se digirió parcialmente con *Sau3A*, endonucleasa de restricción que reconoce y corta una secuencia de 4 nucleótidos que se encuentra

ampliamente repetida a lo largo del genoma. Los fragmentos del DNA de tamaños comprendidos entre 4 y 10 Kpb, obtenidos tras el corte, se extrajeron de un gel de agarosa y se ligaron con el plásmido pUC18 digerido con *Bam*HI y defosforilado (Roche Diagnostics GmbH, Ottweiler, Germany). La ligación se transformó por electroporación (electrotransformación) en *E. coli* C600-1, y las colonias resultantes de la transformación se recogieron en medio LB y se congelaron a -80°C hasta su posterior utilización.

3.5.7. Secuenciación del DNA

Para la obtención de algunas de las muestras utilizadas para secuenciar se empleó el sistema “Erase-a-Base”[®] (Promega Corporation, Madison, USA) siguiéndose las instrucciones del fabricante. Mediante este método se pueden obtener sucesivos subclones con deleciones unidireccionales progresivas del correspondiente inserto de DNA. El protocolo que se sigue está basado en el descrito por Henikoff (1984) y aprovecha la actividad exonucleasa III para digerir un extremo romo o 5'-protuberante del DNA dejando intacto el extremo 3'-protuberante. Así, al ir tomando muestras de la reacción cada cierto tiempo, se van obteniendo fragmentos de DNA de tamaños progresivamente más cortos con lo que se obtienen numerosos subclones cuyas secuencias se pueden solapar.

Para la secuenciación del DNA se utilizó el sistema de secuenciación “fmol”[®] de Promega (Promega Corporation, Madison, USA), el cual requiere *Taq* DNA polimerasa modificada la cual optimiza el proceso de amplificación con DNA de doble cadena. Esta enzima termoestable, que procede de *Termus aquaticus*, se usó para replicar el DNA a 70°C en un termociclador (Omn-E Thermal Cycler, Hybaid Limited, Middlesex, U.K.) donde se llevó a cabo el proceso.

Los oligonucleótidos utilizados como cebadores, que figuran en la Tabla X, estaban marcados con fluoresceína en su extremo 5' y fueron sintetizados por Pharmacia (Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden). Se utilizó en todos los casos, como plásmido

portador del fragmento de DNA a secuenciar, el pUC18, para el cual estaban diseñados estos oligonucleótidos.

Tabla X. Oligonucleótidos y condiciones empleados en la secuenciación.

	<i>Primer reverso (5'→3')</i>	<i>Primer directo (5'→3')</i>
	caggaaacagctatgac	cgccagggttttcccagtcacgac
Anillamiento	30'' a 42°C	30'' a 70°C
Extensión	1' a 70 °C	30'' a 70°C

La secuenciación se realizó siguiendo las instrucciones del fabricante (Promega Corporation, Madison, USA) y con las condiciones que se especifican en la Tabla X. Se usaron 100 ng de DNA molde, 1,5 pmol de oligonucleótido marcado y 5 U de enzima por reacción. Las reacciones así preparadas fueron analizadas en un secuenciador ALF DNA Sequencer (Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden).

Las construcciones empleadas en los experimentos de secuenciación se consiguieron mediante subclonación a partir de los clones originales. Una vez obtenidas las secuencias, estas se analizaron mediante el programa informático **PCGENE** (Intelligenetics Inc., Mountain View, CA, USA), que también se utilizó para la deducción de la secuencia de aminoácidos correspondiente a cada gen.

3.5.8. “Southern Blot” e hibridación del DNA

La transferencia del DNA a membranas de nylon se realizó según el método descrito por Southern (1975) con algunas modificaciones, y la hibridación se llevó a cabo mediante el uso de un protocolo suministrado por Boehringer (Roche Diagnostics GmbH, Ottweiler, Germany) y basado en la detección de los fragmentos de DNA, que presentan homologías con la sonda utilizada, mediante reacciones inmunoenzimáticas con producción de color.

Para la transferencia, los DNAs objeto de estudio se sometieron a digestión con endonucleasas de restricción y se separaron acto seguido mediante electroforesis en un gel de agarosa. A continuación se realizó una lisis parcial o depurinización sumergiendo el gel de agarosa en una solución que contenía HCl 0,25 N para facilitar la transferencia y se preparó el montaje de transferencia o “sandwich”. Para la transferencia se utilizó NaOH 50 mM como tampón, papel Whatmann 3MM como material absorbente y membranas de nylon cargadas positivamente (Roche Diagnostics GmbH, Ottweiler, Germany) como superficie de transferencia.

Posteriormente se lavó la membrana con tampón SSC (Tabla XI) para eliminar los posibles restos de agarosa y se procedió a secar y fijar el DNA a la membrana mediante su calentamiento a 120° C durante 30 minutos

Por otra parte se marcó la fracción del DNA utilizada como sonda mediante la síntesis nucleotídica realizada por el fragmento klenow de la DNA polimerasa, que utiliza dNTPs y combinaciones al azar de hexanucleótidos que actúan como cebadores de la enzima. El marcaje se incorpora en forma de dUTP marcado con digoxigenina (DIG).

La membrana se puso a prehibridar a 42° C durante al menos 1 hora con la solución de hibridación (Tabla XI) para equilibrar, y al mismo tiempo bloquear, los posibles lugares inespecíficos de unión. A continuación se introdujo la membrana en un tubo de hibridación con la solución de hibridación definitiva, en la que se había incluido la sonda previamente marcada y desnaturalizada, y se mantuvo a 42°C durante al menos 6 horas.

Por último se procedió a la detección, mediante un inmunoensayo enzimático, de la reacción coloreada que se produjo en aquellos sitios en los que había una unión de la sonda marcada con DIG al DNA diana. Para ello se usaron anticuerpos anti-DIG conjugados con una actividad enzimática (fosfatasa alcalina) que actuó sobre los substratos

(5-bromo-4-cloro-3-indolil fosfato y cloruro de tetrazolio 4-nitroazul) añadidos en el último paso del proceso el cual se realizó en oscuridad.

Tabla XI. Soluciones usadas en la hibridación.

SSC	Solución de hibridación (50 ml)
NaCl 0,15 M	Formamida 50% (v/v)
Citrato 3Na 15 mM	SSC 5%
	SDS 0,02%
	dH ₂ O
	N-lauril sarcosinato sódico 0,1 % (w/v)
	Agente bloqueante 2% (w/v)

Como sondas en los experimentos de hibridación se emplearon fragmentos de DNA obtenidos a partir de los plásmidos pLA2 (Anguita *et al.*, 1993) y pARO39 (Hernanz Moral *et al.*, 1998) cuyos mapas se pueden ver en la Figura 2.

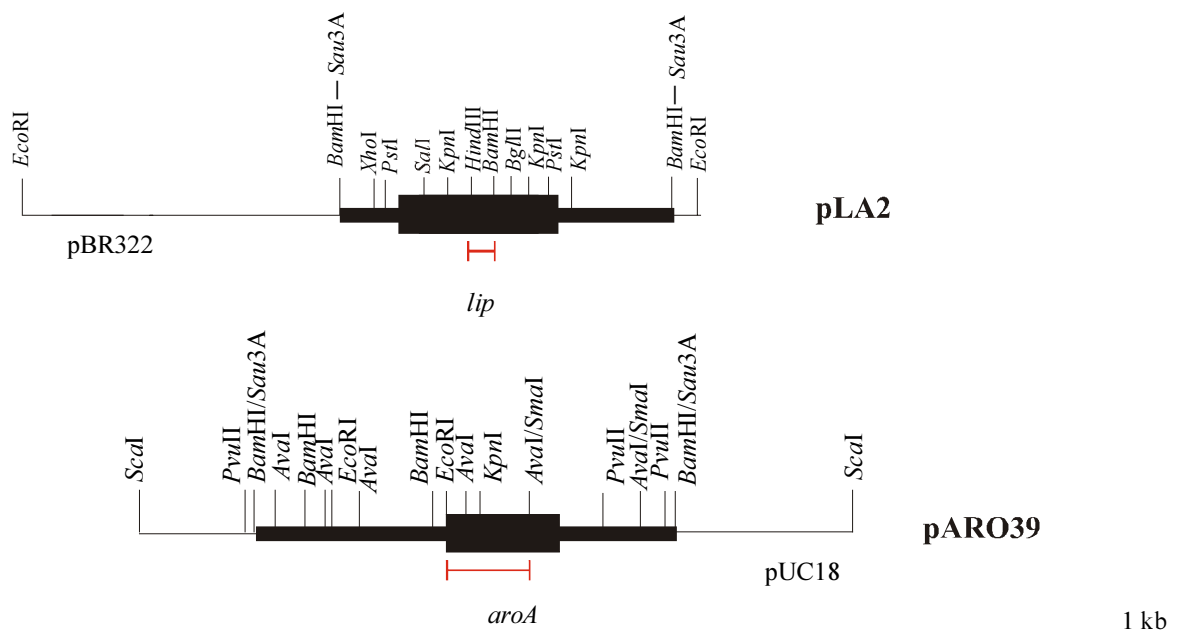



Figura 2. Mapas de restricción de los plásmidos utilizados en los experimentos de hibridación. Las sondas aparecen señaladas con , el vector se muestra con trazo fino, el inserto con trazo intermedio y el gen con trazo grueso.

3.5.9. Amplificación de DNA por PCR

Los experimentos de PCR se realizaron en un termociclador (Omn-E, Hybaid Limited Thermal Cycler, Middlesex, U.K.) y se emplearon oligonucleótidos sintetizados por dos fabricantes distintos (British Bio-Technological Products, Avingdon, England; Boehringer Ingelheim; Life Technologies Ltd, Paisley, U.K.).

Las muestras analizadas en los experimentos de amplificación fueron tanto cultivos bacterianos como ácidos nucleicos extraídos de las bacterias. Las bacterias se suspendieron en solución salina antes de ser lisadas hirviéndolas en un baño de agua durante 10 minutos, siendo posteriormente centrifugadas para la eliminación de restos celulares y la obtención del DNA presente en el sobrenadante.

La mezcla de reacción consistió, por regla general, en: 5 μ l de muestra conteniendo DNA, 1,25 U de *Taq* DNA polimerasa, 5 μ l de tampón de PCR (Tris-HCl 100 mM, MgCl₂ 20 mM, KCl 500 mM [ph 8,3]), 1 μ M de cada oligonucleótido, 0,4 mM de los desoxinucleósidos trifosfato y agua doblemente destilada hasta alcanzar un volumen final de 50 μ l. Para prevenir la evaporación se añadieron 50 μ l de aceite mineral a cada una de las mezclas de reacción. Los oligonucleótidos empleados en cada uno de los experimentos de amplificación se eligieron mediante el programa informático **PCGENE**.

Para la determinación de la sensibilidad de la PCR se realizaron diluciones seriadas de los cultivos (de 10⁶ hasta 0 bacterias). De cada dilución hervida se tomaron 100 μ l y se centrifugaron (12.000 rpm durante 15 minutos) para eliminar los residuos celulares, usándose 5 μ l del sobrenadante para la amplificación sin ningún otro procesamiento. Las células viables presentes en cada dilución se contaron como CFU (unidades formadoras de colonia) mediante la siembra de las muestras por triplicado en placas de medio LB y recuento de las colonias después de 24 horas de incubación a 28°C.

Cuando se usaron ácidos nucleicos, la sensibilidad de la PCR se determinó mediante la amplificación de 5 µl procedentes de sucesivas diluciones seriadas (desde 1 ng hasta 0,1 pg).

3.5.9.1. Amplificación del gen *lip*

Para la amplificación se utilizaron 2 oligonucleótidos (Tabla XII) diseñados sobre la secuencia del gen *lip* (Anguita *et al.*, 1993). Este gen consta de 2055 pb y los oligonucleótidos se encuentran situados entre los nucleótidos 443-466 (BB9301) y 1182-1203 (BB9302) de su secuencia (Figura 3).

Tabla XII. Oligonucleótidos empleados en la amplificación del gen *lip*.

<i>BB9301</i> (5'→3')	<i>BB9302</i> (5'→3')
AACCTGGTTCCGCTCAAGCCGTTG	TTGCTCGCCTCGGCCAGCAGCT

Las condiciones del experimento de PCR, tras una desnaturalización previa de 2 minutos a 94°C, fueron: desnaturalización del DNA a 92°C durante 1 minuto, anillamiento de los oligonucleótidos a 62°C durante 1 minuto y extensión del DNA a 72°C durante 1,5 minutos. Estas condiciones se repitieron a lo largo de 40 ciclos, y después del último se realizó una extensión final de 5 minutos a 72°C para terminar las reacciones.

ACTTCCTCTCCTCACCGGCGACCGCAGGTTCTGGAGCAAGGCCAAGACCCAGTCCTGGC 1047
 T S S P H R R P Q V P G A R P R P S P G 349

ACGGTGCCATCCAGCCTGTACGCCATCGCCAATGCGCTGAAGGCGTGACACGAAGTGAT 1107
 T V P S Q P V R H R Q C A E G V T R S D 369

CGCCGGGCTGGTGGGGCGGGCGTGGATCCGGCCCTGCTGGCGACGCTGATTGCCGATCC 1167
 R R A G G G R G S G P A G D A D C R S 389

BB9302

GACCCGCCAGAGCGAGCTGCTGGCCGAGGCGAGCAAAGCTGATTGGGGTGACGCTCACCTC 1227
 D P P E R A A G R G E Q A D W G D A H L 409

CGGCGCAAGCCGCTGGACGCCGAGCAGAACATTGGTCGCTTCAACCCGCTGCCGATGCT 1287
 R R Q A A G R R A E H W S L Q P A A D A 429

GGAAGAGGTGCAATCCGTGCCGATGCGTGTCTTCGCCAAGGATGCCCTCAACACCATCAC 1347
 G R G A I R A D A C L R Q G C P Q H H H 449

GGATGTCATCATCTATCAGCACGGCGTGACCTCGGTCAAAGAGAACGCCTACGGCCTGGC 1407
 G C H H L S A R R D L G Q R E R L R P G 469

GCTGGCCAGATCTAGAGGATCTATGCCGGCATGCAGGCGGGCAAGAAGGTGGCGCTGGT 1467
 A G P D L E D L C R H A G G Q E G G A G 489

GGTGATCGATCATCCGCTGCACGGCGAGCGTGGCTTCGCTGAGTGGCAGCATGGATACG 1527
 G D R S S A A R R A W L R L S G S M D T 509

GTGACCACCTCCGACAACCCGACACCGTACCTGAATCTGAGCTACCTGACAGTGGCGCGG 1587
 V T T S D N P T P y L N L S y L T V A R 529

GACAACCTGAAACAGAGCGTCGCGATCTGCTGGGCCTGCGTCTGGCGGTTGGCCTGGCCA 1647
 D N L K Q S V A I C W A C V W R L A W P 549

ACGCCAAGGGCCATCGGGACGGCCGCGAGCCTCAAGGTGCACTTCCTGGGTCACTCGCTG 1707
 T P R A I G T A G S L K V H F L G H S L 569

GGTGCATCTCGGGTACCAACTTGCTGCGGTGCGCAACCAGACCATAGGCAACGCGCAAGC 1767
 G A S R V P T C C G R Q P D H R Q R A S 589

GGATGCCCTGTTCAAGTTCGATACCGGTGGCCTGGCCATGCCGGTTCGCATAGCGCCGCT 1827
 G C P V Q V R y R W P G H A G S H S A A 609

GCTGCTGAACCTCGCGACTTCGGCCCGACCATCAAGATGGGCGTGCTGACCAGCGGCAGT 1887
 A A E L A D F G P T I K M G V L T S G S 629

GCCGAGCTGAAGCCGGCTTCACCGCCTATGCTCCCAACTGCACAGACGGCGGTGCCTAC 1947
 A E L K A G F T A y A P N C T D G G A y 649

CTGCTTCGTCAACGAGTTCCTGCCGAGCCTGGACGCGGCCACTCAGCGACCGCAGCCACA 2007
 L L R Q R V P A E P G R G H S A T A A T 669

CGCTGCAGAGTACAGCTTTGCGGCCAGTCGGTGTGGATTGCGCTGACCCGATCAACCT 2067
 R C R V Q L C G P V G A G F G -684

Figura 3. (Continuación).

3.5.9.2. Amplificación del gen *aroA*

Para el proceso de amplificación se utilizaron los oligonucleótidos que aparecen en la Tabla XIII diseñados sobre la secuencia del gen *aroA* de *A. salmonicida* (base de datos del GenBank, L05002) y que corresponden a las posiciones 12-35 (PF1) y 1226-1250 (PR1) de su secuencia (Figura 4).

Tabla XIII. Oligonucleótidos empleados en la amplificación.

<i>PF1 (5'→3')</i>	<i>PR1 (5'→3')</i>
TTTGGAACCCATTTCTCGTGTGGC	TCGAAGTAGTCCGGAAGGTCTTGG

Después de 2 minutos de desnaturalización del DNA a 94 °C se llevaron a cabo 40 ciclos bajo las siguientes condiciones: desnaturalización del DNA a 92°C durante 1 minuto, anillamiento de los oligonucleótidos a 50°C durante 1 minuto y extensión del DNA a 72 °C durante 1 minuto. Después del ciclo final se realizó una extensión a 72 °C durante 10 minutos.

3.5.9.3. Amplificación del gen *ahpA*

El gen *ahpA* codifica para una serinproteasa termolábil de *A. hydrophila* AG2. En este caso se emplearon los oligonucleótidos AHPAF1 (11-33) y AHPAR1 (1771-1796) diseñados sobre la secuencia del gen *ahpA* (Figura 17) de *A. hydrophila* AG2 (Tabla XIV).

Tabla XIV . Oligonucleótidos empleados en la amplificación del gen *ahpA*.

<i>AHPAF1 (5'→3')</i>	<i>AHPAR1 (5'→3')</i>
CATCGTTGGCGTTGGCAATCTCG	AGGGTACTGCGGGTGTGGTTCTGCG


```

+1
PF1
AATTCGTTGCGTTTGGAAACCCATTTCTCGTGTGGCCGGTGAGGTCAATCTGCCCGGCTCC 60
N S L R L E P I S R V A G E V N L P G S 20

AAGAGCGTATCCAATCGGGCTTTGTTGCTGGCGGCCCTTGCCCGTGGCACCACCGGCTG 120
K S V S N R A L L L A A L A R G T T R L 40

ACCAATCTGCTCGACAGCGATGATATTCGTATATGCTGGCGGCGCTGACCCAGCTCGGG 180
T N L L D S D D I R H M L A A L T Q L G 60

GTCAAGTACAAGCTTTCGCCGACAAGACAGAGTGACAGTGACAGGTCTGGGTGCGCAGC 240
V K Y K L S A D K T E C T V H G L G R S 80

TTTGCGGTATCGGCACCGGTCAACCTGTTCTCGGCAATGCCGGTACTGCCATGCGTCT 300
F A V S A P V N L F L G N A G T A M R P 100

CTGTGTGCGGCCCTGTGTCTGGGATCCGGTGAATACATGCTGGGCGGTGAACCCAGGATG 360
L C A A L C L G S G E Y M L G G E P R M 120

GAAGAGCGTCCCATCGGCCATCTGGTGGATTGCCTTGCGTTGAAGGGCGCCCATATCCAG 420
E E R P I G H L V D C L A L K G A H I Q 140

TACCTGAAAAAAGATGGCTACCCGCCGCTGGTGGTGGATGCCAAGGTCTCTGGGGCGGT 480
Y L K K D G Y P P L V V D A K G L W G G 160

GACGTACACGTCGATGGGTCCGTCTCCAGCCAGTTCCTGACGGCGTTTTTGGATGGCGGG 540
D V H V D G S V S S Q F L T A F L M A A 180

CCAGCCATGGCGCGGTGATACCCCGTATCCACATCAAGGGTGAGCTGGTCTCCAAGCCC 600
P A M A P V I P R I H I K G E L V S K P 200

TACATCGACATCACGTTGCACATCATGAACAGTTCGGGTGTGTCATCGAGCAGACAAC 660
Y I D I T L H I M N S S G V V I E H D N 220

TACAAGCTGTTTCTACATCAAGGGCAACCAGAGCATTGTCAGCCCGGGTGACTTCCTGGTG 720
Y K L F Y I K G N Q S I V S P G D F L V 240

GAAGGGGACGCCTCCAGCGTCTTACTTCTCGCGGCAGGTGCCATCAAGGGCAAGGTG 780
E G D A S S A S Y F L A A G A I K G K V 260

CGGGTGACCGGCATCGGCAAGCACAGTATTGGCGATATCCACTTCGCGGACGTGTGGAG 840
R V T G I G K H S I G D I H F A D V L E 280

AGGATGGGCGCCCGCATCACCTGGGGTGACGACTTCATCGAGGCAGAGCAAGGCCGCTG 900
R M G A R I T W G D D F I E A E Q G P L 300

CACGGCGTGCACATGGACATGAACCATATTCGGATGTCGGCCATGACCATAGCGGTCAG 960
H G V D M D M N H I P D V G H D H S G Q 320

TCGCACTGTTTCCGAGGGTCCACCTCATTGCAACATCTACAACCTGGCGGTGAGAGAC 1020
S H C L P R V P P H S Q H L Q L A V R D 340

GATCGCTGCACGCCATGCACGCATGGCCACCGACGTGCGCAAGCTGGTGTGAGTGAAGAG 1080
D R C T P C T H G H R R A Q A G V S E E 360

GGCAGGACCTTCATTACCCGTGACGCCGCCAGCTCAAGCAGCCGAGATCGACAC 1140
G T T F I T R D A A D P A Q A R R D R H 380

CTACAACGATCACGCATCGCCATGTGCTTCTCGTGGTGGCGCTGTCGATATCGCCGTC 1200
L Q R S R I A M C F S L V A L S D I A V 400

PR1
ACCATCAATGATCCGGTGTGACTTCCAAGACCTTCCCGGACTACTTCGATAAATTGGCC 1260
T I N D P G C T S K T F P D Y F D K L A 420

AGCGTCAGCCAGGCCGTTTGAACCTGTCCGGCGCTTGGTGCGGG 1304
S V S Q A V -426

```

Figura 4. Secuencia de nucleótidos del gen *aroA* de *A. salmonicida* y secuencia de aminoácidos deducida de la proteína codificada (AroA). Los oligonucleótidos empleados en la PCR se muestran coloreados.

El DNA se desnaturalizó después de someterlo a 94 °C durante 2 minutos, tras lo cual se llevaron a cabo 40 ciclos bajo las siguientes condiciones: desnaturalización del DNA a 92°C durante 1 minuto, anillamiento de los oligonucleótidos a 65°C durante 1 minuto y extensión del DNA a 72 °C durante 2,5 minutos. Después del ciclo final se realizó una extensión a 72 °C durante 10 minutos.

3.5.9.4. Amplificación del gen *ahpB*

El gen *ahpB* codifica para una Zinc-metaloproteasa termoestable con actividad elastasa de *A. hydrophila* AG2. La amplificación del gen *ahpB* se llevó a cabo mediante la utilización de los oligonucleótidos AHPBF1 (571-592) y AHPBR1 (1338-1357) especificados en la Tabla XV y obtenidos a partir de su secuencia (Figura 24).

Tabla XV. Oligonucleótidos empleados en la amplificación del gen *ahpB*.

<i>AHPBF1</i> (5'→3')	<i>AHPBR1</i> (5'→3')
GGCAACGTCAAGACTGGCAAGT	AGCCGCAGGCTCCCTGATCG

Tras la desnaturalización del DNA a 94 °C durante 2 minutos se llevaron a cabo 40 ciclos bajo las siguientes condiciones: desnaturalización del DNA a 92°C durante 1 minuto, anillamiento de los oligonucleótidos a 45°C durante 1 minuto y extensión del DNA a 72 °C durante 3 minutos. Después del ciclo final se realizó una extensión de 10 minutos a 72 °C.

3.5.10. Análisis de los RFLPs

Con el objeto de emplear los productos de la amplificación del gen *aroA*, obtenidos para todas las especies de *Aeromonas* probadas, para un estudio taxonómico más pormenorizado, se realizó un análisis basado en el polimorfismo del tamaño de los fragmentos de restricción (RFLP). Para ello, se llevó a cabo una digestión total de dichos

productos con la endonucleasa de restricción *Hae*II, que reconoce una secuencia de 6 nucleótidos ampliamente representada en el DNA objeto de estudio: 5'-A/G GCGC T/C-3'.

El análisis de los patrones de restricción generados, y la representación gráfica de la relación (distancia/similitud) existente entre los mismos, se realizó mediante el programa **LANE MANAGER** (T.D.I., S.A., Madrid, España). Este programa emplea un dendograma, basado en los estudios de taxonomía numérica realizados por Sneath y Sokal (1973), en el que el eje horizontal representa la distancia media entre pares de muestras expresada en términos de proporción.

3.5.11. Transformación de *E. coli*

La introducción del DNA en el interior de *E. coli* se realizó por 2 métodos distintos: transformación por choque térmico (Hanahan, 1983) y electroporación o electrotransformación (Dower *et al.*, 1988). En ambos casos fue necesaria la preparación de células competentes, es decir, células susceptibles de introducir DNA en su interior durante el curso de la transformación.

3.5.11.1. Choque térmico

Para la obtención de células competentes para transformar por choque térmico se empleó una solución de calcio como tampón (Tabla XVI). La cepa de *E. coli* usada para este fin se sembró en medio LB líquido (40 ml) y se incubó hasta alcanzar la fase logarítmica de crecimiento (DO₆₀₀ de 0,5-0,7). Después de incubar el cultivo durante 10 minutos en hielo, se lavaron las células varias veces con el tampón de calcio mediante centrifugaciones a 4.000 rpm y 4°C, resuspendiéndose finalmente en un volumen de 4 ml que fue repartido en alícuotas de 200 µl cada una.

Tabla XVI. Solución de calcio.

<i>Composición (pH 8)</i>
Tris HCl 10 mM
CaCl ₂ 50 mM

Una vez obtenidas las células competentes se añadió el plásmido, en un volumen no superior a 20 μ l, sobre una de las alícuotas. Se incubó la mezcla células/plásmido en hielo durante 30 minutos, tras lo cual se sometió a un choque térmico mediante inmersión en un baño a 42°C durante 2 minutos. Inmediatamente después se pasó de nuevo a hielo durante 5 minutos al cabo de los cuales se le añadieron 0,8 ml de medio LB líquido y se incubó durante 1 hora a 37°C. Por último se sembró en placas de medio LB suplementadas con el antibiótico adecuado.

3.5.11.2. Electrotransformación

Mediante este método se obtienen, con algunos plásmidos, eficiencias de transformación del orden de 10^9 - 10^{10} transformantes/ μ g de DNA. Para la preparación de células competentes se partió de 200 ml de cultivo, incubado hasta alcanzar la fase logarítmica de crecimiento, el cual se sometió a sucesivos lavados con glicerol al 10%. Las células se centrifugaron a 6.000 rpm y se resuspendieron finalmente en un volumen de 400 μ l ($1-3 \times 10^{10}$ células/ml) que se repartió en alícuotas de 40 μ l.

La transformación se llevó a cabo con un aparato Pulse Controller® (Bio-Rad Laboratories, Richmond, CA, USA) siguiendo las instrucciones del fabricante. Se utilizaron cubetas de 0,1 cm con las siguientes condiciones por pulso: 25 μ F, 200 Ω y 1,8 kV. Las células competentes, el DNA y la cubeta se mantuvieron en hielo hasta su uso. Se transformaron volúmenes de 40 μ l de células con 1-2 μ l de DNA. Tras el paso de la corriente a través de la cubeta se añadió 1 ml de medio de cultivo SOC (Tabla VI) y se

incubó la muestra a 37°C durante 1 hora. Al cabo de ese tiempo se sembró el producto de la transformación en placas de LB suplementadas con el antibiótico adecuado.

3.5.12. Conjugación de *Aeromonas*

La transferencia de DNA por conjugación se realizó siguiendo la técnica empleada por Simon *et al.* (1983) con algunas modificaciones. Se usaron dos plásmidos, el pJRD215 y el pSUP202-1, para estos experimentos introduciéndose previamente en la cepa donadora *E. coli* S17-1. Tanto la cepa donadora como la receptora fueron sembradas en medio LB líquido suplementado con los correspondientes antibióticos. En el caso de la cepa receptora de *Aeromonas* se empleó ampicilina como antibiótico, aprovechando la resistencia natural de las cepas utilizadas en este trabajo.

Al cabo de 16 horas de incubación se realizó una mezcla de ambos cultivos, cepa receptora:cepa donadora (4:1), que fue lavada con medio líquido fresco. La mezcla fue depositada, a continuación, sobre un trozo de papel de filtro de 0,45 µm de diámetro de poro (Millipore Corporation, Bedford, MA, USA) que se incubó durante 7 horas a 28°C sobre una placa de medio LB como soporte. Al cabo de ese tiempo, se resuspendieron las bacterias en 3 ml de medio LB líquido y, tras hacer las diluciones correspondientes, se sembró sobre placas suplementadas con los antibióticos adecuados. En el caso del pJRD215 el antibiótico usado fue la kanamicina, mientras que para el pSUP202-1 se usaron cloranfenicol o tetraciclina.

3.6. MANIPULACIÓN DE LAS PROTEÍNAS

3.6.1. Precipitación de proteínas con ácido tricloroacético (TCA)

Para la preparación de las muestras utilizadas en las electroforesis e inmunoensayos se usó el método empleado por Kessler *et al.* (1998) con algunas modificaciones. Se utilizó este método tanto para la precipitación de las proteínas presentes

en el interior de las bacterias como para las que se encontraban en los sobrenadantes de los cultivos. Para separar las células de los sobrenadantes se centrifugaron los cultivos bacterianos a 12.000 rpm durante 5-10 minutos. Se separó el sobrenadante obtenido en el paso anterior y se recentrifugó durante otros 5 minutos para eliminar por completo las bacterias del caldo. A continuación se procedió a filtrar los sobrenadantes mediante filtros estériles de 0,2 μm de diámetro de poro (Millipore Corporation, Bedford, MA, USA). Una vez obtenidos los caldos libres de células, se añadió 1 ml de TCA al 10% por cada ml de muestra y, tras mezclar bien, se procedió a guardar las muestras a 4°C hasta su posterior procesamiento. Las bacterias se resuspendieron en 1 ml de TCA al 10% y se almacenaron también a 4°C.

Para la obtención de las proteínas precipitadas se procedió a centrifugar las muestras a 12.000 rpm a 4°C durante 15 minutos, tras lo cual se realizaron sucesivos lavados (hasta 5 en total) con acetona, centrifugando después de cada lavado a 12.000 rpm a 4°C durante 15 minutos. Tras el último lavado se resuspendieron las muestras en 15 μl de agua destilada a los que se añadió el mismo volumen de la solución de carga indicada para las electroforesis en geles de acrilamida.

3.6.2. Electroforesis en geles de acrilamida (SDS-PAGE)

Para la separación de las proteínas presentes tanto en sobrenadantes de cultivo como en extractos celulares se realizaron electroforesis en geles de acrilamida. Este procedimiento se llevó a cabo según el método descrito por Laemmli (1970) que consiste en una electroforesis desnaturizante en presencia de SDS utilizándose para ello un sistema Miniprotein II (Bio-Rad Laboratories, Richmond, CA, USA). Se emplearon dos soluciones de acrilamida distintas: **A**, 29,2 g de acrilamida y 0,8 g de bisacrilamida en 100 ml de agua destilada; **E**, 10 g de acrilamida y 0,5 de bisacrilamida en 100 ml de agua destilada. Ambas soluciones se filtraron convenientemente y se mantuvieron en oscuridad a una temperatura de 4°C.

Se usaron también dos soluciones tampón: **B**, Tris-HCl 3M (pH 8,8); **F**, Tris-HCl 0,5 M (pH 6,8). Por último, se emplearon dos sustancias para desencadenar la polimerización de los geles: **C**, persulfato amónico al 20%; **D**, TEMED (N, N, N',N',tetrametiletilendiamina).

Los geles separador y concentrador, que constituyen cada gel de acrilamida, se prepararon mediante la mezcla de los productos anteriormente citados en las cantidades indicadas en la Tabla XVII, las cuales corresponden a la preparación de 2 geles.

Una vez preparada la mezcla indicada en la Tabla XVII para el gel separador, se depositó esta entre los cristales de la unidad de electroforesis hasta alcanzar la altura adecuada y se añadió butanol saturado con agua para conseguir un frente completamente lineal. Después de permitir la polimerización completa del gel durante 30-45 minutos, se lavó para eliminar el butanol y se secó con papel poroso. A continuación se depositó el gel concentrador sobre el separador colocando, entre los cristales, los peines de teflón con el fin de obtener los pocillos necesarios para la carga de las muestras. Este segundo gel se dejó polimerizar durante 45-60 minutos.

Tabla XVII . Composición de los geles de acrilamida (cantidades necesarias para 2 geles).

	<i>Gel separador (10%)</i>	<i>Gel concentrador (3%)</i>
<i>A</i>	3,85 ml	—
<i>B</i>	1,46 ml	—
<i>C</i>	58,5 μ l	25 μ l
<i>D</i>	3,75 μ l	5 μ l
<i>E</i>	—	1,25 ml
<i>F</i>	—	1 ml
<i>H₂O</i>	6,2 ml	1,854 ml
<i>SDS 10%</i>	117 μ l	41,5 μ l

Las muestras a analizar se mezclaron en proporción 1:1 con el tampón de carga el cual contenía: 93,75 μ l de solución F, 250 μ l de SDS 10%, 50 μ l de β -mercaptoetanol, 10 μ l de azul de bromofenol al 0,2% (indicador de la distancia recorrida por el frente) y 96,25 μ l de agua saturada con sacarosa. Se hirvió esta mezcla durante 5 minutos y se cargó en el gel. Junto con las muestras se utilizaron marcadores preteñidos (Tabla XVIII) de pesos moleculares conocidos (Bio-Rad Laboratories, Richmond, CA, USA).

El gel, ya polimerizado, se dispuso en la cubeta de electroforesis sumergido en una solución tampón que contenía: 15 g de Tris base, 72 g de glicina y 5 g de SDS en un litro de agua destilada (pH 8,8). Se estableció una diferencia de potencial de 200V entre los electrodos y se dejó salir del gel, en todo caso, el azul de bromofenol antes de detener la carrera.

Tabla XVIII. Marcador de peso molecular para proteínas.

<i>Marcador</i>	<i>PM (kDa)</i>
Fosforilasa b	106
Albúmina sérica	81
Ovoalbúmina	47,5
Anhidrasa carbónica	35,3
Inhibidor de tripsina	28,2
Lisozima	20,8

Una vez finalizada la carrera, los geles que no fueron utilizados para transferencias a papel se tiñeron con una solución de metanol:ácido acético:agua (40:10:50), con 0,1% de azul de Coomassie como colorante, durante 30 minutos a temperatura ambiente tras lo cual se destiñeron con la misma solución sin el colorante.

3.6.3. Electro-transferencia de proteínas (“Western blot”)

Después de separar las proteínas objeto de estudio mediante SDS-PAGE se procedió a la transferencia a través del sistema de transferencia semiseca Trans-blot SD (Bio-Rad Laboratories, Richmond, CA, USA) y siguiendo el método descrito por Towbin *et al.* (1979) con algunas modificaciones.

Cuando se realizó la transferencia de las proteínas para luego llevar a cabo una reacción inmunológica se usaron membranas de nitrocelulosa (Hybond-C pure, Amersham Life Science Ltd, Buckinghamshire, England), mientras que cuando la transferencia tenía como fin la secuenciación de la proteína se utilizó el sistema “Inmobilon-P” (Millipore Corporation, Bedford, MA, USA) consistente en membranas de di-fluoruro de polivinilideno (PVDF) sobre las que se adsorben las proteínas mediante interacciones hidrofóbicas entre la membrana y los aminoácidos de la proteína ensayada.

Para esta transferencia se pusieron a equilibrar en primer lugar el gel, la membrana de nitrocelulosa y los papeles absorbentes Whatman 3MM (Afora S.A., Barcelona, España) en el tampón de transferencia (Tabla XIX) durante 15-30 minutos. Las membranas de PVDF se incubaron previamente en metanol, debido a su hidrofobicidad inherente, antes de equilibrarse en la solución de transferencia.

Tabla XIX. Tampón de transferencia.

<i>Composición</i>
Tris HCl 25 mM
Glicina 129 mM
Metanol 20%

A continuación se preparó el “sandwich” de transferencia en el Trans-blot SD, colocándose por este orden: 2 papeles absorbentes, la membrana, el gel y otros 2 papeles

absorbentes. Se secó completamente la superficie de la placa, eliminándose todas las burbujas existentes entre las capas, y se sometió a un voltaje constante de 15 V (5,5 mA/cm²). Al cabo de 1 hora se reveló la presencia de proteínas mediante tinción con colorante rojo Ponceau S (Fluka Chemie AG, GmbH & Co., Germany).

3.6.4. Inmunoensayo

Con el fin de detectar la presencia de las proteínas objeto de estudio en las membranas de nitrocelulosa, estas se sometieron a un inmunoensayo. Para la realización de este ensayo, se siguió el protocolo proporcionado por Bio-Rad (Bio-Rad Laboratories, Richmond, CA, USA). La composición de las soluciones empleadas se especifica en la Tabla XX.

La membrana de nitrocelulosa en la que se encuentran retenidas las proteínas tras la electro-transferencia se introdujo en solución de bloqueo durante 30 minutos para impedir la unión inespecífica de los anticuerpos con otras superficies, ya que la gelatina bloquea estos sitios. A continuación se lavó la membrana durante 10 minutos con la solución TTBS, tras lo cual se añadió el primer anticuerpo convenientemente diluido en el Tampón Ac incubándose durante 2 horas. En el caso de los anticuerpos obtenidos a partir de la proteasa AhpA se utilizó una dilución 1:200, mientras que en el caso de los anticuerpos obtenidos frente a la elastasa AhpB, se empleó una dilución 1:300. La membrana se lavó después con TTBS durante 5 minutos por 2 veces y se incubó con el anticuerpo anticonejo (anti-inmunoglobulina de conejo conjugada con peroxidasa), diluido 1:3.000 en el Tampón Ac, durante 2 horas mas.

Se lavó a continuación la membrana 2 veces con TTBS y 1 con TBS y se procedió a revelar la reacción incubando la membrana durante 30 minutos en la solución de revelado la cual contiene los substratos sobre los que actúa la peroxidasa (H₂O₂ y 4-cloro-1-naftol). Tras visualizar la reacción, esta se detuvo mediante la inmersión de la membrana durante

10 minutos en agua destilada, guardándose posteriormente en oscuridad para evitar su deterioro.

Tabla XX. Soluciones usadas durante el inmunoensayo.

<i>TBS (pH 7.5)</i>	<i>TTBS</i>	<i>Solución de Bloqueo</i>	<i>Tampón Ac</i>	<i>Solución de revelado</i>
Tris 20 mM	TBS	TBS	TTBS	TBS 82,95%
NaCl 0,5 M	Tween 20 0,05%	Gelatina 3%	Gelatina 1%	Metanol 17%
				H ₂ O ₂ 0,05%
				4-Cl-1-Naftol 2,7 mM

3.6.5. Identificación del extremo N-terminal de las proteínas

Las muestras de proteína una vez purificadas fueron enviadas al Centro de Investigaciones Biológicas (Madrid, España), retenidas en membranas de PVDF, para su posterior secuenciación. Se utilizó un secuenciador de fase líquido-gas (Applied Biosystems 470A) con 40 ciclos de secuenciación y β -lactoglobulina como patrón.

3.6.6. Obtención de anticuerpos

Para la obtención de suero hiperinmune frente a la proteasas AhpA y AhpB, se usaron conejos blancos de pesos comprendidos entre 1,5 y 2 Kg siguiendo el protocolo descrito por Rodríguez-Aparicio *et al.* (1993). Se utilizó un conejo como control del experimento que fue inyectado en las mismas condiciones que los demás pero incluyendo agua en lugar de enzima en el inóculo.

La primera inyección contenía 130 μ g de proteasa purificada a homogeneidad y desnaturalizada según el procedimiento descrito por Rodríguez-Aparicio *et al.* (1992). Una

vez disuelta la enzima en 1,5 ml de agua destilada estéril, se emulsionó con 2,5 volúmenes de adyuvante completo de Freund (Sigma Chemical Company, St. Louis, MO, USA). La muestra, así preparada, se inyectó en 2 dosis intramusculares de 1 ml y 4 dosis subcutáneas de 0,5 ml. La dosis siguiente se administró al cabo de 1 mes empleando las mismas condiciones que para la primera pero usando adyuvante incompleto de Freund.

Durante los 3 meses que duró el protocolo se hicieron extracciones de sangre mensuales, a partir de la vena marginal de la oreja de los conejos, con el fin de detectar la presencia de anticuerpos frente a la enzima en el suero. El suero definitivo se obtuvo 15 días después de la tercera inyección. Para la obtención del suero se extrajo la sangre del conejo y se incubó durante 2 horas a temperatura ambiente durante las cuales se produjo la coagulación. Después se incubó la muestra a 4°C para que se produjera la compresión del coágulo y se pudiera separar el suero.

La titulación de los anticuerpos se realizó mediante un inmunoensayo y posteriormente fueron guardados en alicuotas de 50 µl cada una a -80°C.

3.6.7. FPLC y columnas cromatográficas

Las muestras proteicas usadas en los experimentos de purificación procedían de sobrenadantes de *Aeromonas* obtenidos mediante centrifugación de los cultivos celulares. Estos caldos se filtraron a través de membranas de 0,45 µm de tamaño de poro (Millipore Corporation, Bedford, MA, USA) y a continuación se precipitó su contenido proteico con distintos porcentajes de sulfato amónico dependiendo de la proteína objeto de estudio. Tras la precipitación, las muestras fueron desaladas mediante el uso de columnas PD-10 diseñadas a tal efecto siguiendo las instrucciones del fabricante (Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden).

Para la purificación de las proteínas se ensayaron varias columnas de afinidad con distintos adsorbentes enumerados en la Tabla XXI (Sigma Chemical Company, St. Louis,

MO, USA) así como: una columna de intercambio aniónico DEAE 8HR con 10 x 100 mm de diámetro interno (Waters) incluida en un sistema de FPLC (Advanced Protein Purification System, Waters Millipore), una columna de intercambio iónico DEAE-Sephadex A25 (2 x 20 cm) y una columna de tamizado molecular Sephacryl S-200 (2,2 x 100 cm). Durante el proceso de purificación las muestras se mantuvieron en todo momento a una temperatura de 4°C para evitar la desnaturalización y la pérdida de actividad.

El protocolo utilizado para la cromatografía de afinidad se ajustó a las instrucciones del fabricante, usando como tampón de carga y lavado Tris-HCl 25 mM (pH 8) al que se añadió KCl a distintas concentraciones para la elución de las fracciones retenidas. Posteriormente se juntaron y concentraron las fracciones con actividad en una membrana PM-10 (Amicon Corp., Lexington, MA, USA) y tras desalar de nuevo se inyectó en el sistema de FPLC.

Tabla XXI. Adsorbentes ensayados en las cromatografías de afinidad.

<i>Columnas de afinidad (0,5x6 cm)</i>
Cibacron Blue 3GA Agarose
Reactive Blue 4 Agarose
Reactive Blue 72 Agarose
Reactive Brown 10 Agarose
Reactive Green 5 Agarose
Reactive Green 19 Agarose
Reactive Red 120 Agarose
Reactive Yellow 3 Agarose
Reactive Yellow 86 Agarose

Para la columna de intercambio aniónico DEAE 8HR se usaron como tampones: **A**, Tris-HCl 25 mM (pH 8) y **B**, Tris-HCl 50 mM (pH 8)+ KCl 0,2 M. Se utilizó un flujo de 1 ml/min pasando desde un régimen isocrático para el primer tampón hasta isocrático para

el segundo mediante un gradiente lineal (Tabla XXII). La elución final se realizó con C, Tris-HCl 50 mM + KCl 1M, probándose a continuación la actividad de las muestras recogidas mediante un ensayo de actividad proteolítica con azocaseína como sustrato. Las muestras que demostraron una mayor actividad se analizaron en geles de acrilamida tras lo cual se guardaron a -20°C las que contenían la proteína purificada.

Tabla XXII. Gradiente cromatográfico.

Tiempo (min)	Flujo (ml/min)	A	B	C
0	1	100	0	0
15	1	100	0	0
55	1	0	100	0
65	1	0	100	0
70	1	0	0	100

En el caso de las columnas DEAE-Sephadex y Sephacryl S-200 se empleó el mismo protocolo que Rivero *et al.* (1990).

Para la determinación de la concentración de proteínas en todos los extractos enzimáticos se utilizó el método Bradford (Bradford 1976) empleándose albúmina sérica bovina (fracción V) como patrón.

3.6.8. Actividades enzimáticas

3.6.8.1. Caseinasa

La actividad caseinasa de los sobrenadantes de *Aeromonas* fue ensayada mediante la utilización del sustrato azocaseína. La azocaseína está compuesta por caseína marcada con un grupo azo- que absorbe luz de longitud de onda de 450 nm. Estos grupos azo- se encuentran unidos a diferentes puntos de la molécula de caseína, de forma que a medida que se va degradando la proteína en pequeños péptidos estos llevan consigo varios de estos grupos. Al emplear ácido tricloroacético (TCA) se consigue precipitar las proteínas de alto

peso molecular pero no los péptidos pequeños producto de la actividad proteolítica que quedan en solución. Mediante centrifugación se pueden separar ambas fracciones y al medir la absorbancia del sobrenadante donde se encuentran esos péptidos se tendrá una medida de la actividad proteolítica al ser esta proporcional.

Para esta valoración se usó el método de Leung & Stevenson (1988b) con algunas modificaciones (Tabla XXIII), definiéndose la actividad enzimática como la cantidad de enzima capaz de producir un aumento de la absorbancia a 450 nm de 1 en 1 hora. La mezcla de azocaseína, tampón y enzima (sobrenadante) se incubó durante 1 hora a 37°C tras lo cual se paró la reacción con TCA. Después de dejar durante 30 minutos a temperatura ambiente se centrifugó a 12.000 rpm durante 5 minutos para precipitar los péptidos. A continuación se mezclaron volúmenes iguales de la reacción y de NaOH y se calculó la absorbancia a 450 nm.

La actividad caseinasa en medio sólido se observó mediante la siembra de los microorganismos en placas de LB suplementadas con leche descremada en un 2% apreciándose de este modo la actividad proteolítica en forma de halo de lisis alrededor de cada colonia.

3.6.8.2. *Elastasa*

Como en el caso anterior se aprovecha la unión del substrato (elastina) a un grupo (rojo congo) que absorbe la luz a una determinada longitud de onda (495 nm), con lo que los péptidos originados por la actividad enzimática se podrán cuantificar en función de su absorbancia, siendo esta proporcional a la actividad.

Para esta valoración se utilizó una modificación (Tabla XXIII) de los métodos descritos por Shotton (1970) y Bjorn *et al.* (1979) definiéndose la actividad enzimática como la cantidad de enzima capaz de producir un aumento de la absorbancia a 495 nm de 1 en 1 hora. La mezcla de elastina-rojo congo, tampón y enzima se incubó durante 8 horas en

agitación a 37°C, tras lo cual se centrifugó durante 5 minutos y se midió la absorbancia a 450 nm.

Para la observación de esta actividad en medio sólido se usaron placas de LB suplementadas con elastina insoluble en un 1%, apreciándose la actividad enzimática en forma de halos de lisis alrededor de las colonias. El tiempo de incubación necesario para la identificación de la actividad elastolítica fue de al menos 36 horas para las cepas de *A. hydrophila* y de no menos de 48 horas para las cepas de *A. salmonicida* subsp *salmonicida* usadas a lo largo de este trabajo.

Tabla XXIII. Ensayos proteolíticos.

	<i>Azocaseína</i>	<i>Elastina-rojo congo</i>
<i>Enzima</i>	5 µl	100 µl
<i>Elastina-rojo congo 2,5%</i>	—	1 mg
<i>Azocaseína 5%</i>	25 µl	—
<i>Tris-HCl 10 mM (pH8)</i>	10,5 µl	—
<i>Tris-HCl 100 mM (pH8)</i>	—	1 ml
<i>TCA 10%</i>	312,5 µl	—
<i>NaOH 1N</i>	1 vol.	—
<i>H₂O</i>	hasta 312,5 µl	—

3.7. INFECCIONES EXPERIMENTALES Y CÁLCULO DE LA DOSIS LETAL 50 (LD₅₀) DE LAS CEPAS UTILIZADAS

Para las infecciones se utilizaron acuarios de vidrio de 30X60X33 cm con 27 litros de agua y un difusor de cerámica de 15 cm (Renacer, Rena) conectado a un aireador Rena 301® (Rena). Estos acuarios fueron introducidos en bañeras de fibra de vidrio de

60X100X40 cm en las que se mantuvo un flujo constante de agua para evitar las oscilaciones térmicas ambientales. La renovación del agua se realizó cada 2 días y se mantuvo la temperatura entre 14 y 16°C mediante un flujo constante de agua en los contenedores de fibra.

Las cepas de *Aeromonas* usadas para las infecciones fueron sembradas en medio LB suplementado con los antibióticos adecuados y se incubaron durante 16 horas en agitación a 28°C. Se usaron lotes de 10 truchas por acuario y se inocularon intraperitonealmente volúmenes de cultivo de 100 µl/trucha, convenientemente diluido con solución salina estéril, utilizando para ello jeringuillas de insulina con agujas estériles 30G (Línea Médica, Gijón, España). Para la inoculación se anestesió a las truchas mediante inmersión en una solución de 50 ppm de MS-222 (metil sulfonato de tricaina, Sigma Chemical Co., St. Louis, MI, USA).

Para el aislamiento de las bacterias utilizadas en la infección se procedió a sembrar directamente a partir del músculo, riñón e hígado de las truchas muertas o moribundas en placas de LB suplementadas con el correspondiente antibiótico. Para la identificación de las bacterias aisladas se llevaron a cabo experimentos de amplificación por PCR. Las truchas que 10 días después de la infección no habían muerto fueron sacrificadas mediante inmersión en una solución de 100 ppm de MS-222.

El cálculo de la LD₅₀ se hizo de acuerdo con la aproximación estadística descrita por Reed & Muench (1938), mediante la realización de 4 experimentos llevados a cabo por duplicado.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. PROCESO DE IDENTIFICACIÓN DE *Aeromonas* MEDIANTE LA AMPLIFICACIÓN DE GENES ESPECÍFICOS.

4.1.1. Amplificación del gen *lip* mediante PCR

El hecho de que las lipasas permanezcan activas en solventes orgánicos y su alta estabilidad frente a la temperatura hacen que estas enzimas tengan un enorme potencial en lo que a usos industriales se refiere. Por esta razón, las lipasas microbianas han recibido una creciente atención durante los últimos años, además de por sus potenciales aplicaciones en la biotecnología como catalizadores estereo-específicos, enzimas modificadoras del aroma o aditivos en los detergentes (Harwood, 1989), pero el papel que juegan en el metabolismo bacteriano sigue estando, aún hoy, en entredicho.

Se sabe que las lipasas son enzimas extracelulares importantes para la nutrición bacteriana, y que pueden constituir también factores de virulencia que afecten a algunas funciones del sistema inmune a través de los ácidos grasos libres generados por su actividad lipolítica.

Por otra parte, desde que *A. hydrophila* fue reconocida por primera vez como un significativo patógeno oportunista en seres humanos, se han dedicado muchos esfuerzos a encontrar métodos para la correcta identificación y clasificación de las especies pertenecientes a este género. Cada vez es más frecuente el aislamiento de cepas de *A. hydrophila* en distintas muestras (agua, especímenes fecales y clínicos, comida), por lo que se hace imprescindible el desarrollo de métodos sensibles y específicos para su rápida detección. En este sentido, la amplificación de genes específicos mediante PCR proporciona una herramienta altamente sensible para la detección de microorganismos procedentes de diferentes orígenes.

4.1.1.1. Desarrollo del ensayo y especificidad del mismo

Sobre esta base se planificaron los experimentos de amplificación, usándose para ello los oligonucleótidos (Tabla XII) diseñados sobre la secuencia del gen *lip* (Anguita *et al.*, 1993), el cual codifica para una lipasa extracelular termoestable purificada a partir de *Aeromonas hydrophila* H3 (Figura 3). El fragmento de DNA esperado como producto de la amplificación, mediante el uso de estos oligonucleótidos, tiene un tamaño de 760 pb.

Para la amplificación se utilizaron secuencias diana del DNA genómico de 50 cepas de *Aeromonas* (Tabla XXIV), empleándose como control negativo tanto DNA como células de *E. coli*. Las muestras analizadas fueron tanto los ácidos nucleicos extraídos de las bacterias (DNA de alto peso molecular) como los propios cultivos bacterianos procesados como se explica en Materiales y métodos.

Aunque el procedimiento de amplificación mediante PCR se realizó de acuerdo con las sugerencias del fabricante se introdujeron algunas modificaciones. Se realizó un estudio con el objeto de determinar la concentración óptima de $MgCl_2$ que debía estar presente en la reacción. De esta manera, se realizó una amplificación a partir de DNA de *A. hydrophila* H3 en la cual se iba aumentando gradualmente la concentración de $MgCl_2$ en

0,5 mM. La concentración óptima de $MgCl_2$ fue de 2 mM en la mezcla de reacción, no obteniéndose ningún producto de amplificación cuando la concentración fue de 1,5 mM. Se obtuvieron, por otra parte, amplificaciones inespecíficas cuando la concentración fue superior a 2 mM (Figura 5).

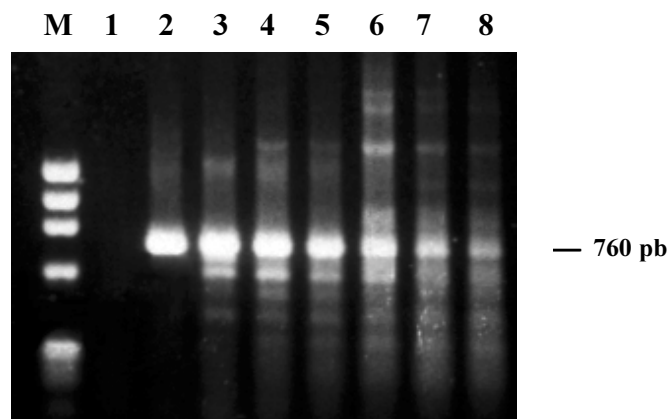


Figura 5. Amplificación, mediante PCR, a partir de DNA de *A. hydrophila* H3 utilizando una concentración creciente de $MgCl_2$: 1-8, 1,5 mM hasta 5 mM con un aumento gradual de 0,5mM; M, ϕ X174 *Hae*III.

Cuando se utilizaron células de *A. hydrophila* H3, el origen del gen *lip*, como fuente de DNA diana se amplificó un producto esperado de 760 pb de tamaño. Al emplearse las pruebas bioquímicas recomendadas por Joseph y Carnahan (1994) para la identificación de genotipos del género *Aeromonas*, se encuadró a *A. hydrophila* H3 dentro del HG 1. Del mismo modo, todas las cepas de *A. hydrophila* ambientales aisladas en nuestro laboratorio y aquellas aisladas de seres humanos se identificaron como pertenecientes al HG 1 obteniéndose un producto de PCR de 760 pb de tamaño tal y como se esperaba (Figura 6). *A. hydrophila* ATCC 7966, la cepa tipo del HG 1, resultó también positiva en el ensayo de amplificación mediante PCR (Tabla XXIV).

Otras dos cepas de referencia de *A. hydrophila* (CECT 398 y CECT 4223), empleadas en el experimento, dieron negativo en el ensayo de PCR. Estas dos cepas están,

sin embargo, incluidas dentro del HG 2. No se obtuvieron productos de amplificación cuando se utilizaron células o ácidos nucleicos aislados de las cepas de referencia representantes de la mayoría de los HGs, excluyendo el HG 1, así como cuando se utilizó como blanco DNA procedente de células de *A. caviae* y *A. sobria* aisladas en nuestro laboratorio.

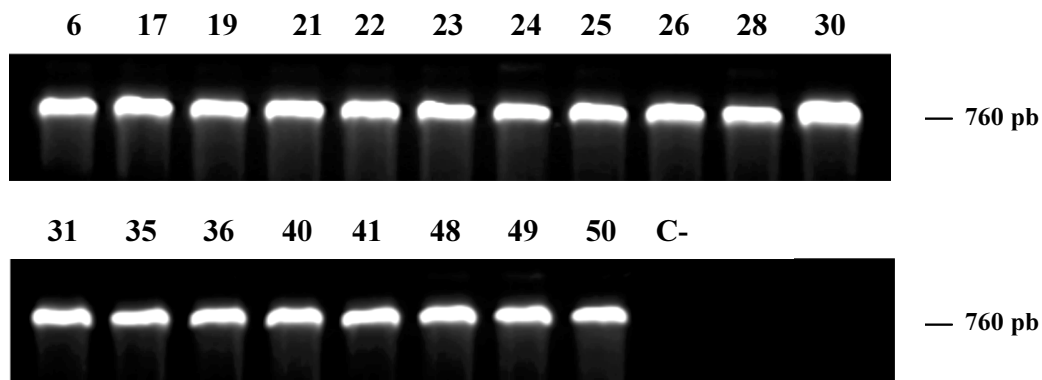


Figura 6. Productos de PCR de las cepas pertenecientes al HG 1 realizada a partir de las cepas de este grupo presentes en la Tabla XXIV. C-: control negativo.

Existe un protocolo para la detección del gen de la aerolisina en ácidos nucleicos extraídos a partir de *A. hydrophila* (Pollard *et al.*, 1990) pero, por este método, cepas de *Streptococcus pyogenes* que producen toxina eritrogénica y estreptolisina O dan falsos positivos. Este resultado, que podría inducir a error, se solventa mediante la amplificación de un fragmento de 200 pb, que puede diferenciarse del producto de la amplificación del gen *aer* de 209 pb, a través de una electroforesis en un gel de agarosa al 4% o mediante la digestión con la endonucleasa de restricción *NciI*. Para comprobar si nuestra pareja de oligonucleótidos podía amplificar el DNA procedente de *S. pyogenes*, utilizamos la cepa CECT 190 de este microorganismo así como otros productores de lipasas como *Serratia marcescens* CECT 159 y *Pseudomonas putida* CECT 324 como blancos de amplificación por PCR. No se obtuvieron productos de amplificación en ninguno de los casos.

Tabla XXIV. Actividades lipolíticas y presencia del gen *lip* en las cepas de *Aeromonas*

CEPAS	HG	Actividad lipolítica ^a	Amplificación (760 pb)
Cepas de referencia			
1. <i>A. hydrophila</i> CECT 398 (NCIB 9233)	2	+	-
2. <i>A. hydrophila</i> CECT 4223 (ATCC 14486)	2	+	-
3. <i>A. eichrenophila</i> CECT 4224 (ATCC 23309)	6	+	-
4. <i>A. jandaei</i> CECT 4228 (ATCC 49568)	9	+	-
5. <i>A. salmonicida</i> CECT 895 (ATCC 33659)	3	+	-
6. <i>A. hydrophila</i> CECT 839 (ATCC 7966)	1	+	+
7. <i>A. salmonicida</i> CECT 894 (ATCC 33658)	3	+	-
8. <i>A. salmonicida</i> CECT 896 (ATCC 27013)	3	+	-
9. <i>A. sobria</i> CECT 837 (NCIB 12065)	7	+	-
10. <i>A. trota</i> CECT 4255 (ATCC 49657)	14	+	-
11. <i>A. enteropelogenes</i> CECT 4487 (ATCC 49803)	ND ^b	+	-
12. <i>A. schubertii</i> CECT 4241 (ATCC 43700)	12	+	-
13. <i>A. ichthiosmia</i> CECT 4486 (ATCC 49904)	ND	+	-
14. <i>A. media</i> CECT 4232 (ATCC 33907)	5b	+	-
15. <i>A. allosaccharophila</i> CECT 4199	ND	+	-
16. <i>A. caviae</i> CECT 838 (ATCC 15468)	4	+	-
Cepas ambientales ^c			
17. <i>A. hydrophila</i> D6	1	+	+
18. <i>A. caviae</i> D5	4	+	-
19. <i>A. hydrophila</i> D9	1	+	+
20. <i>A. caviae</i> B01.5	4	+	-
21. <i>A. hydrophila</i> D11	1	+	+
22. <i>A. hydrophila</i> D13	1	+	+
23. <i>A. hydrophila</i> A7	1	+	+
24. <i>A. hydrophila</i> F9	1	+	+
25. <i>A. hydrophila</i> S04/1	1	+	+
26. <i>A. hydrophila</i> 67-P-24	1	+	+
27. <i>A. caviae</i> B01.31	4	+	-
28. <i>A. hydrophila</i> B01.3	1	+	+
29. <i>A. caviae</i> B01.32	4	+	-
30. <i>A. hydrophila</i> B01.6	1	+	+
31. <i>A. hydrophila</i> B01.9	1	+	+
32. <i>A. caviae</i> D8	4	+	-
33. <i>A. caviae</i> D10	4	+	-
34. <i>A. caviae</i> B01.10	4	+	-
35. <i>A. hydrophila</i> B01.27	1	+	+
36. <i>A. hydrophila</i> B01.28	1	+	+
37. <i>A. caviae</i> B01.11	4	+	-
38. <i>A. caviae</i> B01.23	4	+	-
39. <i>A. caviae</i> B02.8	4	+	-
40. <i>A. hydrophila</i> 1.54	1	+	+
41. <i>A. hydrophila</i> S02/2	1	+	+
42. <i>A. caviae</i> H01	4	+	-
43. <i>A. caviae</i> H02	4	+	-
44. <i>A. caviae</i> H03	4	+	-
45. <i>A. sobria</i> HS1	7	+	-
46. <i>A. sobria</i> HS2	7	+	-
47. <i>A. sobria</i> B01.1	7	+	-
Cepas aisladas de humanos ^d			
48. <i>A. hydrophila</i> H1	1	+	+
49. <i>A. hydrophila</i> H2	1	+	+
50. <i>A. hydrophila</i> H3	1	+	+

^aLa actividad lipolítica se determinó en placa^bND, no determinado^cCepas aisladas de agua de río^dCepas aisladas en placas con sangre de pacientes hospitalizados

4.1.1.2. Origen del fragmento amplificado

Para determinar si los fragmentos obtenidos en el proceso de amplificación pertenecían efectivamente a la amplificación del gen *lip*, se llevó a cabo un experimento de hibridación mediante la transferencia de estos productos de PCR a una membrana de nylon y la posterior identificación de los mismos mediante una sonda de DNA convenientemente marcada. Todos los productos de PCR se analizaron mediante electroforesis en geles de agarosa al 1,2%. El DNA presente en los geles se transfirió a una membrana de nylon y fue hibridado con la sonda marcada con DIG-dUTP. Los híbridos (Figura 7) se detectaron por un inmunoensayo enzimático usándose condiciones muy astringentes (50% de formamida y una temperatura de 42°C).

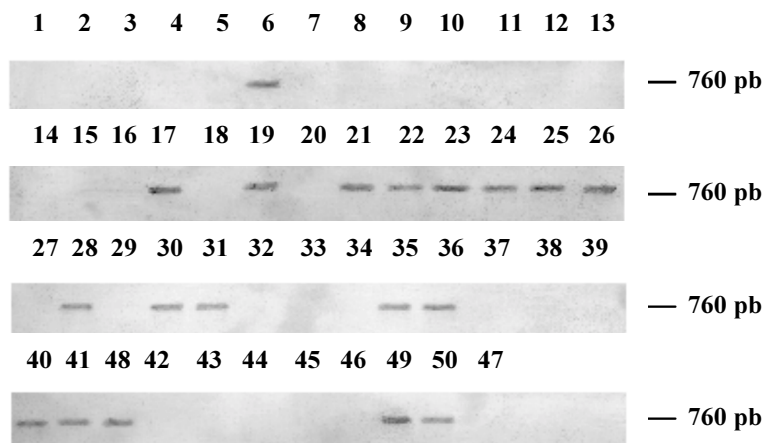


Figura 7. Hibridación realizada a partir de las muestras procedentes de la amplificación por PCR de las cepas de la Tabla XXIV de acuerdo con la numeración.

Como sonda para la hibridación se utilizó un fragmento del gen *lip* obtenido al cortar el plásmido pLA2 (Anguita *et al.*, 1993) con las endonucleasas de restricción *HindIII*-*BamHI*. Como resultado de la digestión con estas endonucleasas se originó un fragmento de 356 pb que contenía parte de la secuencia de la lipasa (Figura 2). Todos los productos procedentes de la amplificación hibridaron con la sonda demostrando que fueron efectivamente originados a partir de la amplificación del gen *lip*.

4.1.1.3. Actividad lipolítica de las *Aeromonas spp.* ensayadas

Se sabe que las aeromonadaceas expresan muchas actividades enzimáticas extracelulares. Todas las cepas de *Aeromonas*, probadas en los experimentos de amplificación por PCR del gen *lip*, secretaban alguna actividad lipolítica al medio de cultivo. Esta actividad se comprobó en placas de LB suplementadas con tributirina en un 0,5% (Tabla XXIV). Dado que tan sólo las cepas pertenecientes al HG 1 resultaron positivas en el experimento de PCR, amplificando el gen *lip*, se deduce que la actividad lipolítica identificada no es la única presente en los sobrenadantes de los cultivos analizados.

La presencia de más de una actividad lipolítica es, por lo tanto, la razón por la que todas las cepas de *Aeromonas* mostraron esta actividad y sólo los productores de lipasa H3 resultaron positivos en el ensayo de PCR. Las cepas de *Aeromonas* que resultaron negativas en el ensayo de amplificación y positivas para la actividad lipolítica carecen de la lipasa H3 y este hecho podría verse enmascarado por otras actividades lipolíticas. Por este motivo el aislamiento y caracterización de genes específicos para las distintas especies, como el gen *lip*, debería de constituir una herramienta muy útil para la identificación de todas las genoespecies de *Aeromonas*.

4.1.1.4. Sensibilidad del ensayo de amplificación por PCR del gen *lip*

Una de las grandes ventajas para la detección de microorganismos, y en su caso identificación de los mismos, por PCR, es precisamente la alta sensibilidad de esta técnica. Con objeto de determinar el límite de detección del ensayo, se emplearon tanto células como DNA extraído de *A. hydrophila* H3 (Figura 8A).

Cuando se emplearon células para este procedimiento, se diluyó una suspensión bacteriana y se procesó tal y como se detalla en Materiales y métodos. La amplificación que

dio como resultado unos niveles detectables de producto de PCR se alcanzó cuando se lisaron un mínimo de 8 CFU (unidades formadoras de colonia) de *A. hydrophila* H3, en base a un promedio de 5 pruebas realizadas con células viables. Cuando se utilizaron muestras con más de 10^6 CFU por ensayo, la amplificación se mostró incierta, probablemente porque la acumulación de productos celulares solubles inhibe la PCR.

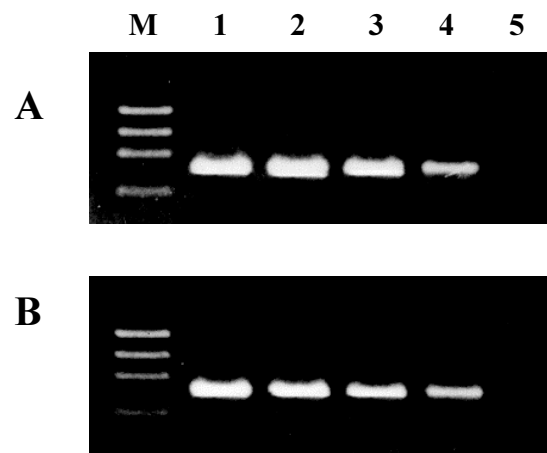


Figura 8. A: Análisis en gel de agarosa de los productos de PCR obtenidos por amplificación de diluciones seriadas de *A. hydrophila* H3 en LB; 1-5, 10^4 a 1 CFU respectivamente. B: Análisis en gel de agarosa de los productos de PCR obtenidos por amplificación de diluciones seriadas de DNA extraído a partir de *A. hydrophila* H3; 1-5, 1 ng a 0,1 pg respectivamente. M, marcador ϕ X174.

Para el cálculo del límite de detección, cuando se utilizaba DNA como molde (Figura 8B), se emplearon diluciones seriadas del DNA de *A. hydrophila* H3 en solución salina. La mínima cantidad de DNA necesaria para obtener un producto detectable de PCR fue de 0,89 pg. Este ensayo de PCR también detectó *A. hydrophila* en muestras naturales, como agua de río, sin cultivos ulteriores. El límite de detección observado estaba relacionado con la temperatura ambiental, estación del año y grado de contaminación del agua.

4.1.1.5. Discusión

En los últimos años son muchos los investigadores que han utilizado diferentes genes como secuencias diana para la identificación de microorganismos, y en este sentido, la valía del método depende sobre todo de la especificidad del gen escogido. En 1997, Khan y Cerniglia lograron detectar dos especies, *A. caviae* y *A. trota*, como las únicas capaces de amplificar con los oligonucleótidos AER1 y AER2 un fragmento de 316 pb correspondiente a parte de la secuencia del rDNA 16S. Khan *et al.* (1999) lograron identificar más específicamente cepas del HG 14, al que pertenece *A. trota*, mediante la amplificación por PCR de un fragmento de 622 pb correspondiente al gen de la aerolisina (*aerA*), consiguiendo un resultado negativo para el resto de HGs.

Los resultados obtenidos demuestran que el par de oligonucleótidos utilizados en este estudio son específicos para la amplificación por PCR de un fragmento de 760 pb del gen *lip* de *A. hydrophila* H3, el cual es específico para las cepas de *A. hydrophila* incluidas dentro del HG 1. No se obtuvieron productos inespecíficos a lo largo de este experimento cuando se emplearon como fuente del DNA especies de *Aeromonas* identificadas como pertenecientes a otros grupos de hibridación. Tampoco hubo amplificaciones cuando se utilizaron como control negativo rutinario células o ácidos nucleicos aislados a partir de *E. coli*, *P. putida*, *S. marcescens* y *S. pyogenes*.

Por lo tanto, se puede considerar este procedimiento como un excelente método para la identificación de las cepas del género *Aeromonas* pertenecientes a este grupo de hibridación.

4.1.2. RFLP-PCR del gen *aroA*

El gen *aroA*, que codifica para la enzima 5-enolpiruvilsikimato 3-fosfato sintasa, está involucrado en una ruta biosintética universal, para la síntesis de ácido fólico y aminoácidos aromáticos, la cual es funcional en todas las bacterias. La secuencia de

nucleótidos del gen *aroA* está muy conservada dentro del grupo de las bacterias Gram-negativas, por lo que se consideró como una herramienta apropiada para su utilización en la identificación de *Aeromonas* hasta el nivel de género mediante PCR.

Hoy en día, y por la utilización de sistemas comerciales no demasiado discriminatorios, se siguen identificando cepas del género *Aeromonas* como pertenecientes al género *Vibrio* (Abbott *et al.*, 1998). Por esta razón, la identificación de estos microorganismos al nivel de género se hace muy necesaria, ya que los errores a la hora de situar a las aeromonadaceas dentro del taxón adecuado siguen constituyendo un grave problema para la salud pública.

4.1.2.1. Amplificación del gen *aroA*

El tamaño del fragmento que se esperaba amplificar mediante la utilización de los oligonucleótidos PF1 y PR1 (Tabla XIII), diseñados sobre la secuencia del gen *aroA* (Figura 4), era de 1238 pb. Para el experimento de PCR se utilizaron como secuencias diana los DNAs genómicos de 26 cepas de *Aeromonas* (Tabla XXV), empleándose a modo de control negativo células de *E. coli*, *V. fluvialis* y *P. putida* (Tabla III).

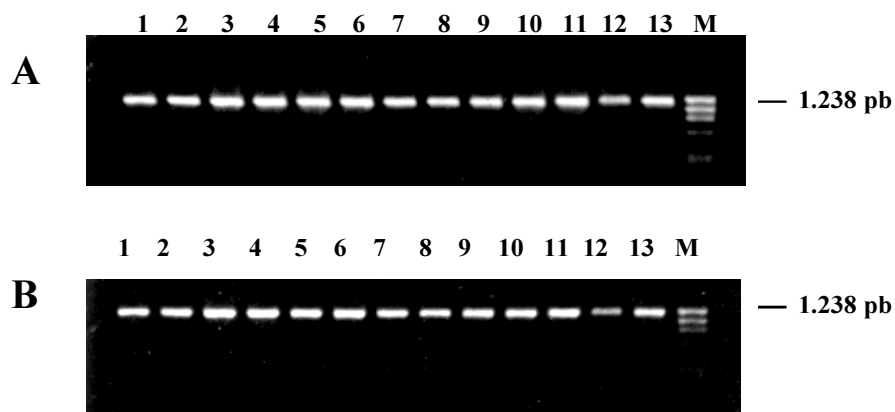


Figura 9. Electroforesis en gel de agarosa de los productos de PCR amplificados con PF1 y PR1 a partir de las cepas incluidas en la Tabla XXV siguiendo el mismo orden. **A:** 1-13, cepas de referencia. **B:** 1, *A. veronii* ATCC 35624; 2-13, cepas ambientales con el mismo orden de la tabla XXV. M, marcador ϕ X174 *Hae*III.

Con las condiciones de PCR, descritas en Materiales y métodos, se logró amplificar el fragmento de DNA esperado de 1238 pb (Figura 9), el cual representaba la mayor parte de la secuencia del gen *aroA*, en todas las *Aeromonas* probadas, no obteniéndose ningún producto de amplificación por PCR cuando se utilizaron células de *E. coli*, *V. fluvialis* y *P. putida* como controles negativos. Las amplificaciones se realizaron tanto a partir de células como de ácidos nucleicos extraídos, sin embargo, para prevenir las contaminaciones y evitar una excesiva manipulación del DNA, todos los datos del presente estudio fueron obtenidos a partir de las propias células, lo cual simplificó el procedimiento.

Tabla XXV. Cepas de *Aeromonas* utilizadas para la amplificación del gen *aroA*.

CEPAS	HG
Cepas de referencia	
1. <i>A. eichrenophila</i> CECT 4224 (ATCC 23309)	6
2. <i>A. jandaei</i> CECT 4228 (ATCC 49568)	9
3. <i>A. salmonicida</i> CECT 894 (ATCC 33658)	3
4. <i>A. hydrophila</i> CECT 839 (ATCC 7966)	1
5. <i>A. sobria</i> CECT 837 (NCIB 12065)	7
6. <i>A. enteropelogenes</i> CECT 4487 (ATCC 49803)	ND*
7. <i>A. schubertii</i> CECT 4241 (ATCC 43700)	12
8. <i>A. ichthiosmia</i> CECT 4486 (ATCC 49904)	ND
9. <i>A. media</i> CECT 4232 (ATCC 33907)	5b
10. <i>A. allosaccharophila</i> CECT 4199	ND
11. <i>A. caviae</i> CECT 838 (ATCC 15468)	4
12. <i>A. encheleia</i> CECT 4341 (S176)	ND
13. <i>A. trota</i> CECT 4255 (ATCC 49657)	14
14. <i>A. veronii</i> ATCC 35624 (A901)	8
Cepas ambientales	
1. <i>A. hydrophila</i> D6	1
2. <i>A. hydrophila</i> D9	1
3. <i>A. hydrophila</i> D11	1
4. <i>A. hydrophila</i> D13	1
5. <i>A. hydrophila</i> A7	1
6. <i>A. hydrophila</i> 67-P-24	1
7. <i>A. hydrophila</i> B01.3	1
8. <i>A. hydrophila</i> B01.6	1
9. <i>A. hydrophila</i> B01.9	1
10. <i>A. hydrophila</i> B01.27	1
11. <i>A. hydrophila</i> B01.28	1
12. <i>A. hydrophila</i> S02/2	1
13. <i>A. sobria</i> B01.1	7
14. <i>A. salmonicida</i> MA.1	3
15. <i>A. salmonicida</i> MA.5	3
16. <i>A. salmonicida</i> MA.2	3
17. <i>A. caviae</i> B01.23	4
18. <i>A. caviae</i> B01.5	4
19. <i>A. caviae</i> B01.11	4
20. <i>A. caviae</i> B01.10	4

*ND, no determinado

Dentro de las cepas de referencia utilizadas para la PCR, se encontraban representantes de la mayor parte de HGs reconocidos para el género *Aeromonas*. Por otra parte, todas las cepas de origen ambiental utilizadas en este trabajo, e identificadas como pertenecientes al HG 1, rindieron el producto de amplificación correspondiente a la secuencia del gen *aroA* con los oligonucleótidos utilizados. Los productos de la PCR se mantuvieron a 4°C hasta su posterior procesamiento por RFLP.

4.1.2.2. Origen del fragmento amplificado

Del mismo modo que en el experimento realizado con el gen *lip*, se comprobó mediante una hibridación que los productos obtenidos tras la PCR eran efectivamente el resultado de la amplificación del gen *aroA*. Para ello se diseñó una sonda a partir del plásmido pARO39 (Hernanz Moral *et al.*, 1998), que contiene el gen *aroA* de *A. hydrophila* clonado en pUC18 (Figura 2). Más concretamente se usó el fragmento de 740 pb procedente de la digestión del plásmido pARO39 con *EcoRI-SmaI*. Mediante este procedimiento se consiguió una única banda de hibridación de 1238 pb en todos y cada uno de los productos de PCR obtenidos en este experimento.

4.1.2.3. Sensibilidad del ensayo de amplificación por PCR del gen *aroA*

Con objeto de probar la sensibilidad del ensayo, realizamos un experimento similar al utilizado para determinar el límite de detección de la amplificación del gen *lip*. La sensibilidad calculada mediante este procedimiento fue muy alta, obteniéndose amplificaciones con niveles detectables del producto de la PCR para un mínimo de 8 CFU en todas las *Aeromonas* lisadas.

4.1.2.4. Análisis mediante PCR-RFLP

El fragmento amplificado del gen *aroA* mediante PCR, que se obtuvo para todas las especies y cepas de *Aeromonas* utilizadas en este estudio, fue empleado para un ensayo

posterior con endonucleasas de restricción con el fin de determinar si se podía obtener un patrón de restricción que sirviera de base para la discriminación entre los distintos HGs. Asimismo, se quería averiguar si existían diferencias ostensibles dentro de los distintos genotipos, para lo cual se empleó el HG 1. Para la reacción enzimática se utilizó la endonucleasa de restricción *HaeII* y 5 µl del producto de amplificación, por PCR, del gen *aroA*. Una vez terminada la reacción se procedió a separar los fragmentos resultantes mediante una electroforesis en un gel de agarosa al 3% (Figuras 10, 11 y 12).

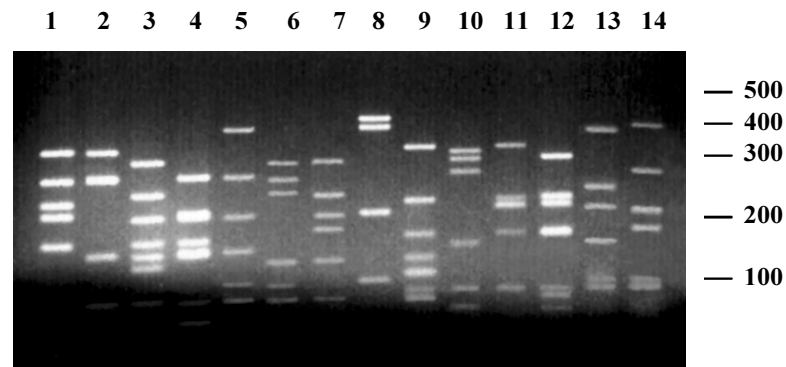


Figura 10. Electroforesis en gel de agarosa de los fragmentos producidos mediante la digestión con *HaeII* de los genes amplificados por PCR de las cepas de referencia 1-14 incluidas en la Tabla XXV.

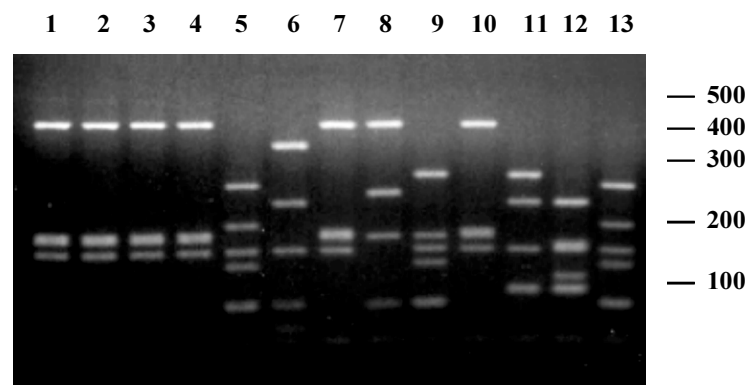


Figura 11. Electroforesis en gel de agarosa de los fragmentos producidos mediante la digestión con *HaeII* de los genes amplificados por PCR de las cepas ambientales de 1-12 incluidas en la Tabla XXV junto con la cepa control *A. hydrophila* CECT 839 (13).

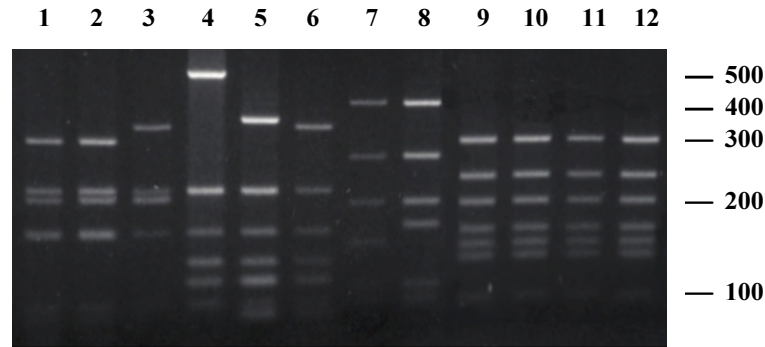


Figura 12. Electroforesis en gel de agarosa de los fragmentos producidos mediante la digestión con *Hae*II de los genes amplificados por PCR de las cepas ambientales 13-20 incluidas en la Tabla XXV comparadas con cepas de referencia: 3, *A. caviae* CECT 838; 6, *A. media* CECT 4232; 7, *A. sobria* CECT 837; 9, *A. salmonicida* CECT 894.

Como se puede apreciar en la Figura 10, cada HG tenía su propio patrón RFLP, aunque se podrían agrupar en base a RFLPs similares (Figura 13). Para ello se elaboró el

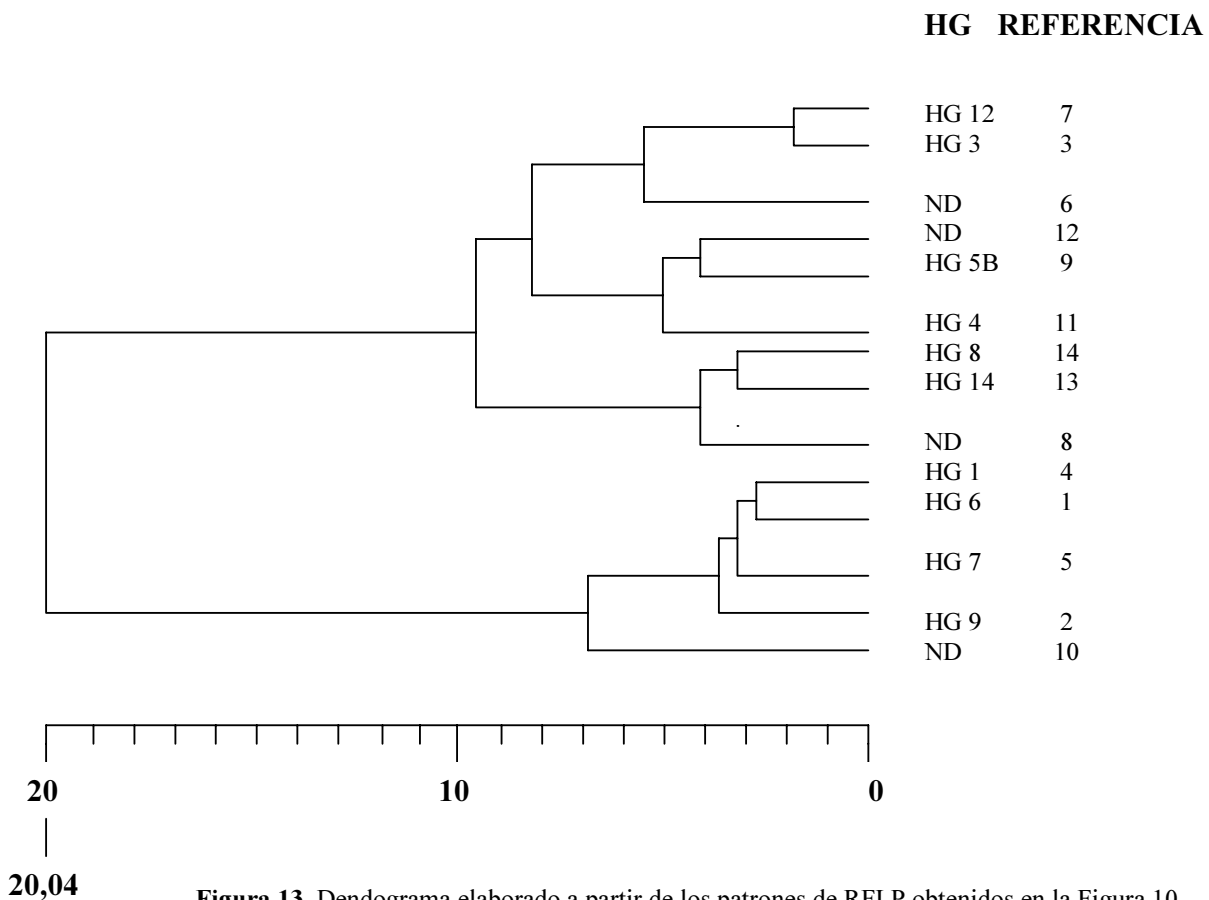


Figura 13. Dendrograma elaborado a partir de los patrones de RFLP obtenidos en la Figura 10. La escala representa la divergencia entre las especies expresada en términos de porcentaje.

dendograma correspondiente a partir del programa **LANE MANAGER**, tal y como se describe en Materiales y métodos. Esto fue lo que ocurrió también cuando el género *Aeromonas* fue analizado mediante AFLP (Huys *et al.*, 1996), donde cada cepa, a menos que fueran idénticas, presentaba un RFLP particular.

Cuando se estudiaron los RFLPs originados dentro de algunos de los HG (Figura 12), se pudo ver que aunque en algunos casos, como ocurrió con el HG 3, se originaba siempre el mismo patrón de restricción, en otros grupos como el HG 4 y HG 7 se podían apreciar claras diferencias entre los patrones. Incluso algunas cepas identificadas por métodos bioquímicos como pertenecientes al HG 4, parecían estar más cerca del HG 5b como se puede ver en el dendograma (Figura 14).

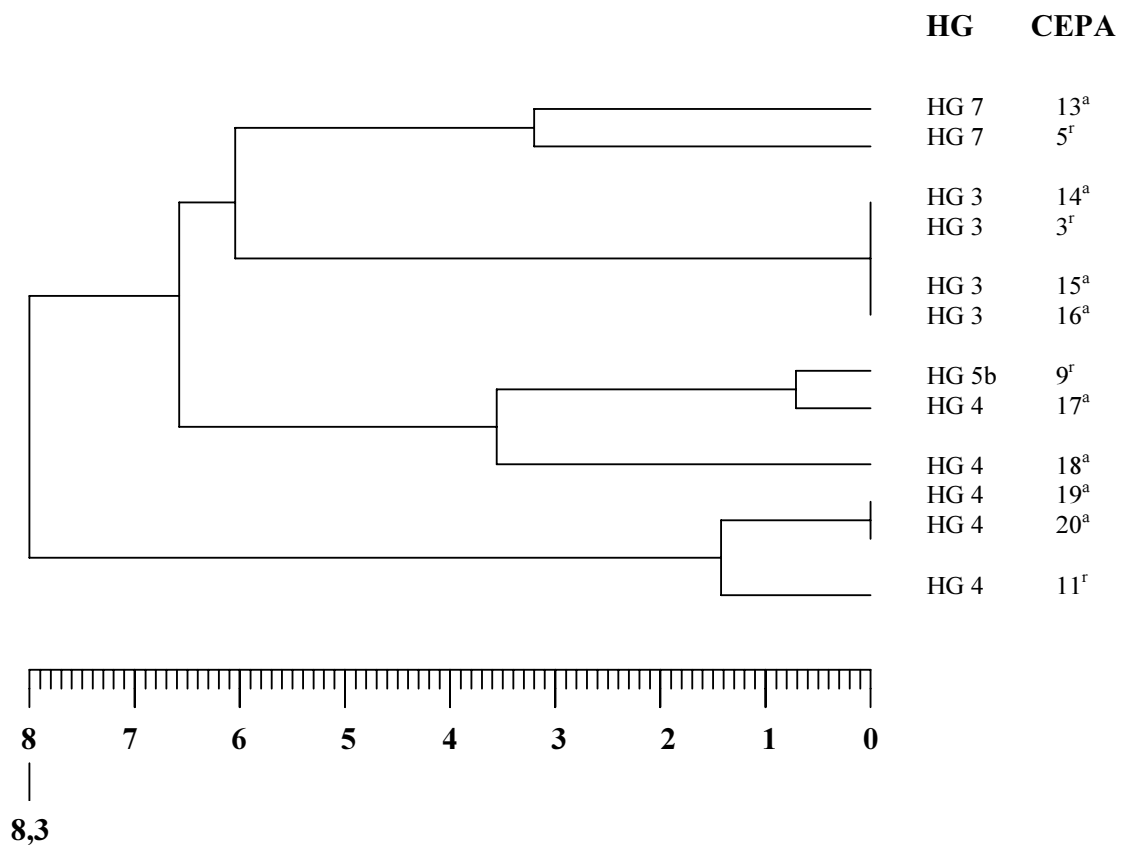


Figura 14. Dendograma elaborado a partir de los patrones de RFLP obtenidos en la Figura 11. La escala representa la divergencia entre las especies expresada en términos de porcentaje.

En nuestra investigación, una de las especies mejor estudiada dentro de este género, *A. hydrophila*, mostró un alto grado de diversidad genotípica entre las cepas aisladas del medio ambiente (Figura 11). En este caso, el dendograma (Figura 15) reveló diferencias más acusadas entre los RFLPs de algunas cepas de *A. hydrophila*, que las existentes entre especies encuadradas en HGs diferentes.

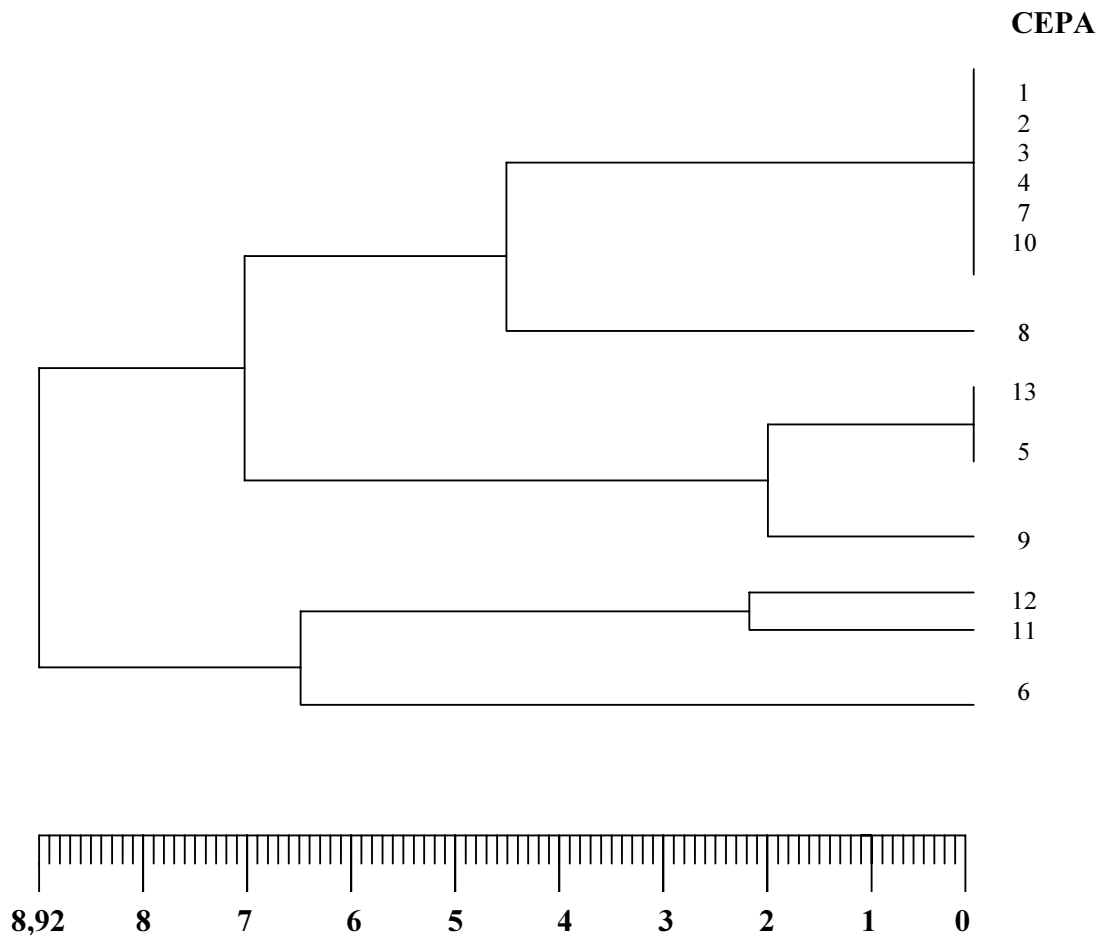


Figura 15. Dendograma elaborado a partir de los patrones de RFLP obtenidos en la Figura 12. La escala representa la divergencia entre las cepas expresada en términos de porcentaje.

4.1.2.5. Discusión

Como ya se ha comentado, han sido muchos los métodos que se han empleado para solucionar los problemas que se presentan a la hora de identificar y clasificar las especies de *Aeromonas*. En este sentido, se han obtenido buenos resultados mediante la utilización de métodos como la electroforesis en geles de SDS-PAGE de proteínas celulares (Mulla & Millership, 1993), la serotipificación (Havelaar *et al.*, 1992) y la espectrometría de masas (Magee *et al.*, 1993). De todas formas, los datos obtenidos a partir de estos procedimientos no parecían ser consecuentes con los datos taxonómicos que se desprenden de la biotipificación clásica o de los estudios de homología DNA-DNA, aunque podían utilizarse para la discriminación de *Aeromonas* en estudios epidemiológicos.

Otros métodos, como la comparación de las movilidades electroforéticas de algunas isoenzimas y el análisis de la composición de los ácidos grasos mediante cromatografía gas-líquido, resultaron mas útiles para la identificación y clasificación de aeromonadaceas desconocidas, aunque estos procedimientos no estén siempre en perfecto acuerdo con los datos generados por la hibridación DNA-DNA (Altwegg *et al.*, 1991; Huys *et al.*, 1994).

Otra técnica, como es la ribotipificación, dio como resultado una separación insuficiente de las especies relacionadas ya que existían demasiadas semejanzas entre las secuencias de rRNA 16S (Lucchini & Altwegg, 1992; Martínez-Murcia *et al.*, 1992a). Por otra parte, el género *Aeromonas* ha sido analizado genotípicamente mediante AFLP, procedimiento que, a través de métodos muy laboriosos, puede considerarse como una alternativa a los procedimientos convencionales de identificación y clasificación (Huys *et al.*, 1996; Kühn *et al.*, 1997a y 1997b). Esta técnica consiste en la amplificación selectiva de fragmentos de restricción mediante la digestión del DNA total de una bacteria con varias endonucleasas. A continuación se ligan los fragmentos obtenidos con unos adaptadores genéticos. Estos adaptadores presentan secuencias complementarias a las de los

oligonucleótidos empleados para una posterior amplificación por PCR. Por último se separan los fragmentos amplificados mediante una electroforesis en un gel de agarosa. Este procedimiento constituye una técnica de identificación bastante eficiente, sin embargo requiere una metodología muy laboriosa.

Todos estos estudios no hacen sino corroborar las dificultades que los investigadores han encontrado durante los últimos 20 años para situar cada cepa aislada dentro del taxón correcto, así como la razón por la cual las especies móviles de *Aeromonas* (*A. hydrophila*, *A. caviae* y *A. sobria*) descritas por Popoff (1984) han sido consideradas como complejos durante los últimos 20 años. También resulta muy difícil la reconciliación del genotipo con el fenotipo dentro del género *Aeromonas*.

Los datos obtenidos en este trabajo permiten la identificación inequívoca de las aeromonadaceas hasta el nivel de género, sin que existieran amplificaciones inespecíficas en las especies emparentadas utilizadas como control. Asimismo, el posterior análisis por RFLP-PCR, nos mostró la posibilidad de alcanzar un nivel de identificación superior. Las diferencias, claramente detectables, apreciadas entre los patrones de restricción de los distintos HGs pueden servir de base a la hora de clasificar a las especies de este género de tan compleja taxonomía. Sin embargo, dada la variabilidad genética de estos microorganismos, este método resulta tan sólo orientativo a nivel de especie, aunque definitivo a nivel de género.

Una de las limitaciones de este tipo de análisis es la aparición de patrones electroforéticos distintos para las cepas englobadas dentro de una misma especie. En el análisis realizado con *A. hydrophila*, se encontraron diferencias significativas entre las cepas empleadas en lo que al patrón de restricción se refiere. De hecho, estas diferencias intraespecíficas nos inducen a pensar que dentro de esta especie se incluyen microorganismos tan distintos genéticamente que podrían constituir un grupo taxonómico diferente.

Un resultado similar se obtuvo al analizar los patrones de restricción obtenidos a partir de varias cepas identificadas como *A. caviae* mediante métodos bioquímicos. Los diferentes patrones obtenidos sugerían la posibilidad de que alguna de las cepas identificadas en nuestro laboratorio y englobadas en el HG 4, pertenecieran en realidad al HG 5b representado por la fenoespecie *A. media*. Al mismo tiempo este estudio corroboraba la relación existente entre *A. ichthiosmia* y el HG 8, tal y como sugieren varios autores (Collins *et al.*, 1993; Huys *et al.*, 1996), aunque no ocurría lo mismo con *A. enteropelogenes* y el HG 14. Aunque la agrupación en “clusters” llevada a cabo por Huys *et al.* (1996) constituye una guía clara y precisa para la identificación y clasificación de las cepas desconocidas de *Aeromonas*, hay que tener en cuenta que el método taxonómico empleado (AFLP) resulta, como hemos comentado, una técnica demasiado compleja.

La estrategia derivada del uso de RFLP-PCR con genes de rutas universales como el gen *aroA*, el cual se halla presente en todas las bacterias, puede ser una alternativa a los métodos bioquímicos de identificación, cuya puesta a punto es en muchos casos difícil y tediosa. Frente a los procedimientos bioquímicos, el análisis llevado a cabo mediante RFLP-PCR ofrece una serie de ventajas como son la rapidez, especificidad y facilidad de su realización, así como la posibilidad de no tener que manipular excesivamente el DNA.

4.2. CLONACIÓN DE PROTEASAS EXTRACELULARES

Como se ha señalado anteriormente, la virulencia de *Aeromonas hydrophila* puede involucrar a varias enzimas extracelulares entre las que se incluyen proteasas, hemolisinas, enterotoxinas y acetilcolinesterasa. Algunas de las toxinas han sido caracterizadas bioquímicamente pero su papel en la patogenicidad de *A. hydrophila* aún no se ha determinado con detalle (Chakraborty *et al.*, 1987; Leung & Stevenson, 1988b; Rivero *et al.*, 1990; Nieto *et al.*, 1991; Rivero *et al.*, 1991).

Muchas cepas de *A. hydrophila* secretan al medio de cultivo una actividad elastolítica que se pone de manifiesto por su crecimiento en medio sólido suplementado con

elastina insoluble. Sin embargo, todavía no se ha caracterizado ninguna proteasa liberada por *Aeromonas* con actividad elastolítica, aun cuando se la ha relacionado frecuentemente con la patogenicidad de las aeromonadaceas (Santos *et al.*, 1988; Hasan *et al.*, 1992). Se sabe además que esta actividad se encuentra muy implicada en la virulencia de otras bacterias como es el caso de *P. aeruginosa*.

Se han utilizado varias estrategias a la hora de examinar el papel que desempeñan algunas de las proteasas de *Aeromonas hydrophila* en la virulencia. Leung & Stevenson (1988a) obtuvieron mutantes deficitarios en la capacidad proteolítica mediante el uso de transposones, mientras que Rodríguez *et al.* (1992) llevaron a cabo una inoculación directa de la serinproteasa de 22 kDa en trucha arco iris. Los resultados obtenidos ponen de manifiesto una LD₅₀ muy baja para estos productos extracelulares. Sin embargo, no se sabe si la cantidad inoculada es producida por el microorganismo *in vivo*.

Por otra parte, durante mucho tiempo se ha considerado a la serinproteasa extracelular de *A. salmonicida* (AspA) y a la glicerofosfolípido: colesterol aciltransferasa como responsables de la forunculosis producida en salmones, al ser productos extracelulares mayoritarios en los cultivos de esta bacteria (Coleman & Whitby, 1993; Ellis, 1997). Sin embargo, se ha demostrado recientemente, mediante mutantes con deleciones isogénicas de sus genes, *aspA* y *sata*, que estos no tienen ningún efecto en la virulencia de *A. salmonicida* (Vipond *et al.*, 1998).

Se hacen necesarios, por lo tanto, nuevos estudios que arrojen luz sobre la implicación en la patogenicidad de los productos secretados por *Aeromonas* spp. al medio extracelular. Al mismo tiempo, la caracterización de alguna proteína con actividad elastolítica secretada por *Aeromonas* spp. despejaría las dudas sobre su participación en la patogenicidad de estas bacterias.

4.2.1. Proteasa AhpA

Dos genes involucrados en la producción de proteasas de *A. hydrophila* han sido clonados y expresados en nuestro laboratorio con anterioridad a este trabajo. Uno de ellos, fue clonado a partir de *A. hydrophila* SO2/2, y codifica una serinproteasa termolábil de 68 kDa (Rivero *et al.*, 1991), el cual es muy similar a la serinproteasa AspA producida por *A. salmonicida*. El otro se clonó de la misma bacteria y codifica para una metaloproteasa termoestable de 38 kDa (Rivero *et al.*, 1990). Ambas proteasas presentaron actividad caseinolítica cuando se usó azocaseína como sustrato, pero no se detectó ninguna actividad elastolítica cuando se utilizó elastina-rojo congo como sustrato en las condiciones del ensayo.

4.2.1.1. Clonación y secuenciación del gen *ahpA* de *A. hydrophila* AG2

El gen *ahpA* fue clonado a partir de la cepa patógena *A. hydrophila* AG2, microorganismo aislado directamente de trucha arco iris (Hernanz Moral *et al.*, 1998). Para la clonación de este gen, se partió de una genoteca, construida en *E. coli* C600-1 y con pUC18 como plásmido de clonación, en la cual se seleccionaron aproximadamente 3.000 transformantes resistentes a ampicilina en placas de LB suplementadas con el correspondiente antibiótico y con leche descremada. Al cabo de 48 horas de incubación a 37°C aparecieron sendos halos de lisis, que indicaban la degradación de las proteínas propias de la leche, rodeando a dos de las colonias de esta genoteca.

El DNA plasmídico obtenido a partir de uno de los transformantes, guardándose debidamente el otro para ulteriores análisis, se denominó pAHPA (Figura 16) y fue utilizado para transformar *E. coli* C600-1 de nuevo. Cuando se incubaron las células procedentes de esta segunda transformación en placas con ampicilina y leche descremada, el 100% de las colonias obtenidas tenía un fenotipo ampicilina-resistente y proteasa positivo. Como control negativo, se transformó *E. coli* C600-1 con el plásmido pUC18 obteniéndose bacterias ampicilina-resistentes pero proteasa negativas.

El análisis de la secuencia de nucleótidos del inserto de 2,5 kpb demostró la presencia de un marco de lectura abierto de 1.875 pb con capacidad para codificar un polipéptido de 625 aminoácidos con un peso molecular de 67.567 (Figura 17) con una secuencia señal de 24 aminoácidos. La secuencia de aminoácidos predecible para AhpA mostró un alto grado de homología (88%) a la de la proteína AspA (Figura 18), una serinproteasa de *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida* (Whitby *et al.*, 1992). Además, el tamaño calculado para la proteína una vez eliminada la secuencia señal coincidía con el calculado por Rivero *et al.* (1991) para la serinproteasa de *A. hydrophila* SO2/2. No se encontró ninguna otra homología significativa con secuencia alguna al comparar la proteína con las presentes en varias bases de datos.

La secuencia de aminoácidos de *A. hydrophila* AhpA fue analizada mediante el programa **PROSITE** (Swiss Institute of Bioinformatics) encontrándose de este modo 3 sitios activos típicos de las serinproteasas (Figura 17): en la posición 98-VAVVDDGMAIAH-109, un sitio activo de ácido aspártico; en la posición 139-HGTSVSGIIAA-149, un sitio activo de histidina; y en la posición 358-GTSSATPNTTG-368, un sitio activo de serina. Al compararse estos datos con los que se desprenden del análisis de la secuencia de aminoácidos de la serinproteasa AspA de *A. salmonicida*, se encontraron secuencias consenso similares a las de la serina y la del aspártico, aunque la secuencia consenso para el sitio activo de la histidina no se encontró en AspA.

Los resultados de este análisis, junto con la conducta de la proteasa frente a distintos inhibidores, nos permitieron deducir que la proteína AhpA de *A. hydrophila* era una serinproteasa de la superfamilia de las subtilasas.

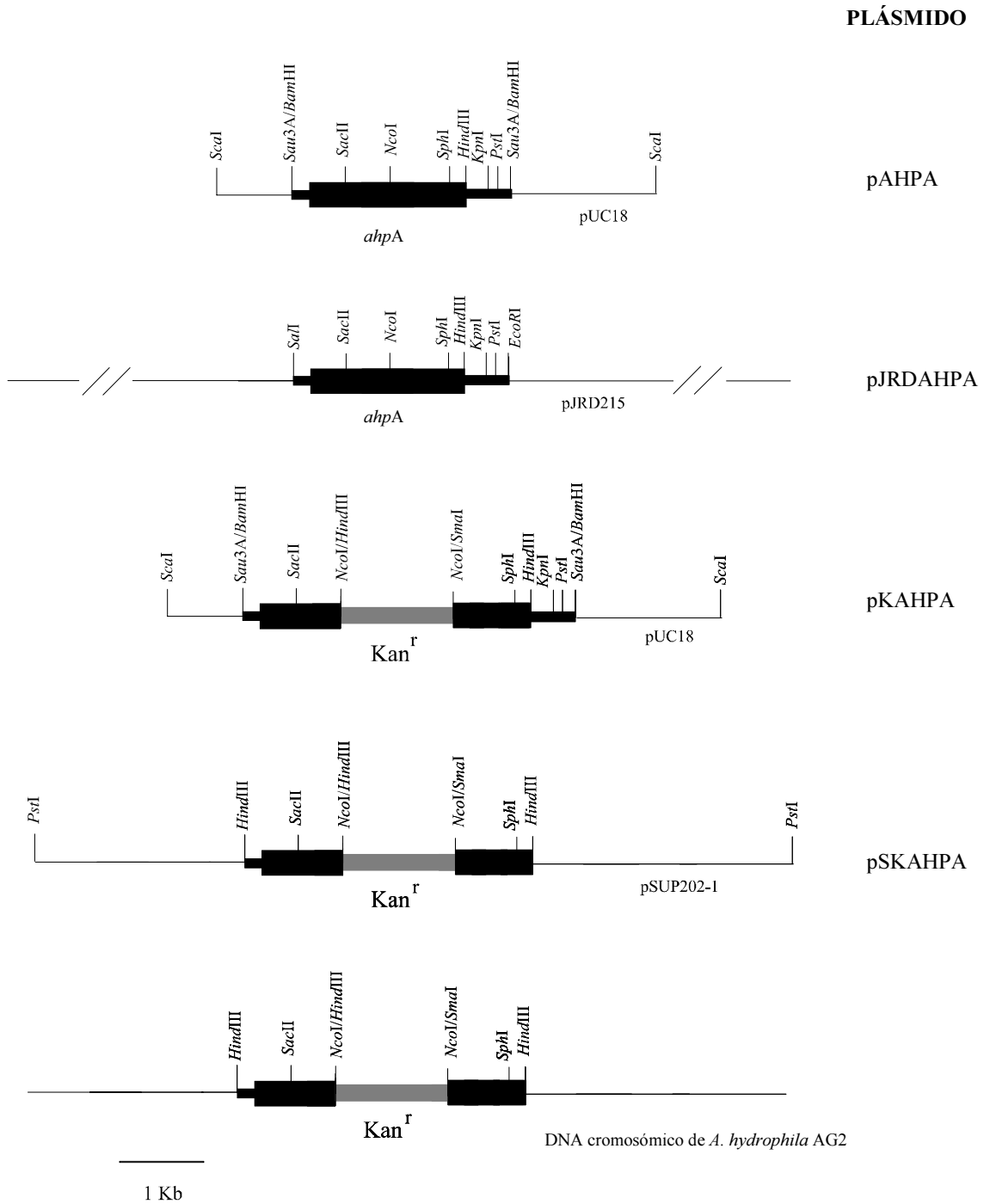


Figura 16. Mapas de los plásmidos de clonación y subclonación del gen *ahpA*. El vector se muestra con trazo fino, el inserto con trazo intermedio y el gen con trazo grueso. En gris aparece la resistencia a kanamicina.

		+1	AHPAF1	
TGCGATATAAGATGGAGTTTATAAA		ATGAGAAAA	CATCGTTGGCGTTGGCAATCTCG	48
	SD	M R K T S L A L A I S A L L S A		16
CTGCCTATCGCTTCAGTTCAGGCTAATGAGAGTTGCACCCCACTCACCGGCAAAGAGGCCGGACTCGATAACC				120
L P I A S V Q A N E S C T P L T G K E A G L D T				40
		→		
		N-terminal de AhpA		
GGCCGACGAGCAGCGCAGTCCGCTGTCTGCCCGGCATCAATCCCCTACAGGACCAGCAGTGGCACCTGCTCAAC				192
G R S S A V R C L P G I N P L Q D Q Q W H L L N				64
AGCGGCCAGAATGCCTTCAGCACGCGCGGGCGTGGCGGGCAATGACCTCAACCTCTGGTGGGCACACCCGC				264
S G Q N A F S T R G G V A G N D L N L W W A H R				88
ACCGACGTATTGGGTTCAGGGCATCAATGTGGCCGTGGTGGACGATGGCATGGCCATAGCGCACCCGGATCTG				336
T D V L G Q G I N V A V V D D G M A I A H P D L				112
GCCGACAATGTGCGCCCCGGCTCCAAAAACGTGGTGACCGCGGCAGTGATCCTACCCCGACCGATCCGGAC				408
A D N V R P G S K N V V T G G S D P T P T D P D				136
AGTGCCACGGCACTTCGGTATCCGGCATCATAGCCGCGGTGGACAACAGCATAGGCACCCTGTGGGTAGCT				480
S A H G T S V S G I I A A V D N S I G T L W V A				160
CCCCGCGCCAGTTGCAAGGCTTCAACCTGCTCGATGACAACAGCCAGCAGTTGCAAAAAGATTGGCTCTAC				552
P R A Q L Q G F N L L D D N S Q Q L Q K D W L Y				184
GCCCTTGTGCGGCAACGCCGTACCAGCAGACAACCGGTCTTCAACCAGAGTTACGCATGAGCCTGGTCGAT				624
A L V R Q R R H R R Q P G L Q P E L R M S L V D				208
CCTGAAGGGCCAACGGGCTGGATCAGGTACAGCTCGATCGCCTGTTTGAACAGCGGACCCAGCAGGCGCAG				696
P E G A N G L D Q V Q L D R L F E Q R T Q Q A Q				232
GGGCGGCCCTATATCAAGCGCGGGCAACGGCTTCAACCGGATGCCTCCGGCAACTATGTGCTCAACCGC				768
G A A Y I K A A G N G F N R I A S G N Y V L N R				256
ACCGGCAACCTGCCAAGCTGCCGTTTGAGAACAGCAATATAGATCCCCTCCAACAGCAACTTCTGGAACCTG				840
T G N L P K L P F E N S N I D P S N S N F W N L				280
GTGGTGAGCGCCATCAACGCGGACGGGTGCGTTCTTCTACTCCAGCGTCGGCAGCAACGTCTTCCTGAGC				912
V V S A I N A D G V R S S Y S S V G S N V F L S				304
GCCCCGCGGGGAATACGGCACGGATGCGCCCGCATGGTGACCACGGATCTGCCCGGCTGCGACATGGGT				984
A P G G E Y G T D A P A M V T T D L P G C D M G				328

Figura 17. Secuencia de nucleótidos de *ahpA* y secuencia de aminoácidos deducida de la proteína codificada (AhpA). SD: secuencia Shine Dalgarno; la flecha muestra el extremo N-terminal de la proteína; en verde aparecen los sitios activos; en amarillo los oligonucleótidos utilizados en la PCR.

TACAACCGGGTGGACGATCCCAGCACCAACCGGCTGCACAACAACCCGCAACTGGATGCCAGCTGCGACTAT 1056
 Y N R V D D P S T N R L H N N P Q L D A S C D Y 352

AACGGCGTGATGAACGGCACCTCCTCGGCAACCCGAACACCACAGGCGTCATGGCGCTGCTGATGTCCGCC 1128
 N G V M N **G T S S A T P N T T G** V M A L L M S A 376

TATCCGGACTTGTTCGGTGCGGGATCTGCGCGACCTGCTGGCCCGCAACGCCACCCGGCTCGACGCCAATCAG 1200
 Y P D L S V R D L R D L L A R N A T R L D A N Q 400

GTGCCCGTACAGATAAGCTACACGGCCGCCAACGGCCAGCGCCGCCAGGTGACGGGTCTGGAGGGGTGGGAG 1272
 V P V Q I S Y T A A N G Q R R Q V T G L E G W E 424

CGCAACGCGGCTGGCCTCTGGTACAGCCCGACCTATGGTTTCGGCCTGGTGGATGTGAACAAGACCCTGGCC 1344
 R N A A G L W Y S P T Y G F G L V D V N K T L A 448

CGCGCCGCCAGCCACGAACCGCTGCCGCCACTGGTACAGTTGCCCTGGCAGAAGGTGACGGTCCGGGATCGC 1416
 R A A S H E P L P P L V Q L P W Q K V T V R D R 472

GCCGTCGGTGCCATCCCGGATGTGGGCAGCAGCCGACCCGCTCCAGCACGCAGGTTCGATCAGCCATTGACG 1488
 A V G A I P D V G S S P T R S S T Q V D Q P L T 496

GTCGAGGCCGTGCAGGTGATGGTGAGCCTGGATCACCAGCGGCTGCCCGACCTGCTGATCGAGCTGGTCTCG 1560
 V E A V Q V M V S L D H Q R L P D L L I E L V S 520

CCATCCGGCACCCGCAGCGTGTCTCAACCCCAACAACAGCCTGGTGGGACAATCCCTCGACCCGGCAGCAG 1632
 P S G T R S V L L N P N N S L V G Q S L D R Q Q 544

CTGGGCTATGTGCGCACCAAGGGGCTACGTGACATGCGCATGCTCTCCACAAGTTCTACGGCGAACC GGCT 1704
 L G Y V R T K G L R D M R M L S H K F Y G E P A 568

CAGGGCGAGTGGCGCCTGGAGGTGACCGACGTGGCCAATGGCAGCCGCCAGGTCTCGCTGCTCGAT**CGCAGA** 1776
 Q G E W R L E V T D V A N G S R Q V S L L D R R 592

AHPAR1
ACCAACCCCGCAGTACCCTGACCGAGCGCAACAACAACCAGCCGGGTCAACTGCTCGACTGGTCCCTGCGG 1848
 T N T R S T L T E R N N N Q P G Q L L D W S L R 616

G T A C T C G G T C A C G A C G C A G C C C G T T C C T G A T C A C A G A G 1886
 V L G H D A A R S - 625

Figura 17. (Continuación).

4.2.1.2. Actividad proteolítica y elastolítica de *AhpA*

Para demostrar la actividad proteolítica del producto del gen *ahpA* (*AhpA*), se subclonó el fragmento de 2,5 kpb *SalI-EcoRI* del plásmido pAHPA (Figura 16) que contenía la totalidad del gen. Aprovechando ambos sitios de corte, presentes en el vector de clonación, se empleó este fragmento para ligarlo con el vector pJRD215, plásmido de amplio rango de hospedador, previamente digerido con las endonucleasas *SalI* y *EcoRI*. De esta forma se obtuvo el plásmido pJRDAHPA (Figura 16), el cual se usó para la transformación de *E. coli* S17-1, cepa con capacidad para movilizar plásmidos empleada en los experimentos de conjugación.

El plásmido pJRDAHPA fue transferido de la cepa *E. coli* S17-1, donadora, a la cepa receptora, una especie no proteolítica de *A. salmonicida* (*A. salmonicida* subsp. *masoucida* CECT 896), mediante conjugación. Los transconjugantes se seleccionaron en placas de LB suplementadas con ampicilina y kanamicina.

Las colonias que presentaban el fenotipo de resistencia a kanamicina y ampicilina se transfirieron a placas de LB con kanamicina y suplementadas con leche descremada o bien con elastina insoluble (Figura 19). Como control se empleó el plásmido pJRD215 para la conjugación de *A. salmonicida* subsp. *masoucida* comprobándose a continuación si los transconjugantes obtenidos poseían alguna actividad proteolítica en placas con leche descremada o elastina insoluble.

Se pudo apreciar una zona clara de lisis alrededor de los depósitos bacterianos de *A. salmonicida* subsp. *masoucida* que contenían el pJRDAHPA, demostrándose de este modo la secreción tanto de caseinasa como de elastasa. La cepa conjugada con pJRD215 no mostró por el contrario ninguna actividad en placa.

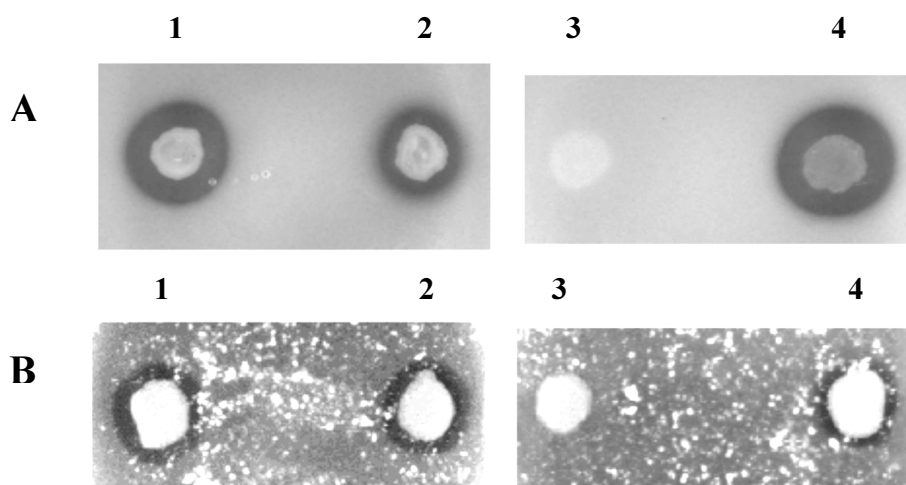


Figura 19. Actividad proteolítica detectada en medio sólido. **A:** placas de LB con leche descremada; 1, AG2 salvaje; 2, *A. hydrophila* *ahpA::Kan^r*; 3, *A. salmonicida* subsp. *masoucida* conteniendo el plásmido pJRD215; 4, *A. salmonicida* subsp. *masoucida* conteniendo el plásmido pJRDAHPA. **B:** placas de LB con elastina insoluble; 1, AG2 salvaje; 2, *A. hydrophila* *ahpA::Kan^r*; 3, *A. salmonicida* subsp. *masoucida* conteniendo el plásmido pJRD215; 4, *A. salmonicida* subsp. *masoucida* conteniendo el plásmido pJRDAHPA.

Por otra parte, se determinaron ambas actividades en sobrenadantes de cultivos de *A. hydrophila* AG2, *A. salmonicida* subsp. *masoucida* y *A. salmonicida* subsp. *masoucida* conteniendo el plásmido pJRDAHPA (Figura 16) e incubados durante 48 horas.

Estos resultados sugerían que la serinproteasa AhpA clonada, secuenciada y purificada de la cepa *A. hydrophila* AG2 contribuía, al menos parcialmente, a la actividad elastolítica de esta cepa. Esta primera caracterización de una proteasa con actividad elastolítica en *A. hydrophila* constituye una primicia, ya que hasta la fecha no existen datos sobre la clonación de genes que codifiquen para elastasa alguna en esta especie.

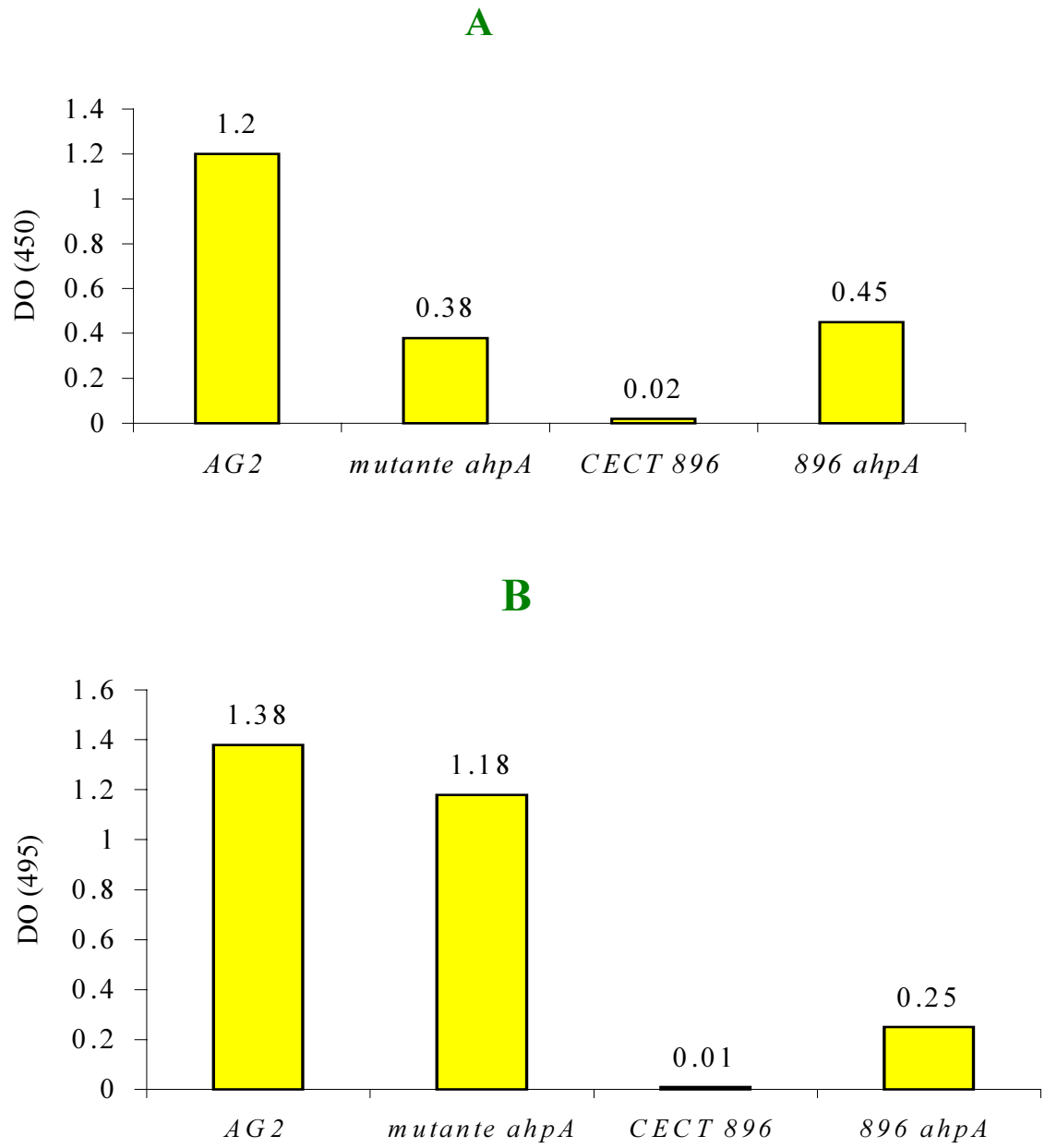


Figura 20. Actividad proteolítica detectada en el sobrenadante de las cepas de *Aeromonas* utilizadas. **A:** actividad caseinolítica. **B:** actividad elastolítica.

4.2.1.3. Purificación y caracterización de la proteasa AhpA

La proteasa AhpA se purificó, como una única banda con un peso molecular aproximado de 64.000 Da, cuando se analizó mediante SDS-PAGE (Figura 21). Para la purificación de la proteasa (Tabla XXVI) se probaron varias columnas de intercambio aniónico así como DEAE-FPLC, definiéndose la unidad (U) de actividad enzimática como la cantidad de enzima que genera un incremento de 1 en la DO a 450 nm al cabo de 1 hora en las condiciones del ensayo (Materiales y métodos).

Tabla XXVI. Purificación de AhpA.

Tratamiento	Volumen (ml)	Factor de recuperación (%)	Actividad específica (U/mg)	Cantidad de proteína (mg)	Factor de purificación (n°)
Extracto crudo	1.000	82	365	100	1
Sulfato amónico 40-60%	3	6,5	954	21	3
Reactive Green 19	12	1,5	2.440	12	7
DEAE-FPLC	8	0,3	7.330	7	20

La precipitación con sulfato amónico se realizó de forma fraccionada, llevándose a cabo una primera precipitación al 40% y 0°C, tras la cual se descarta el depósito, precipitándose a continuación el caldo hasta alcanzar un 60% de sal. La proteína se purificó tanto de sobrenadantes procedentes de cultivos de *A. hydrophila* AG2 como de *A. salmonicida* subsp. *masoucida* cuando *ahpA* se expresó eficientemente en esta cepa no proteolítica. Cada paso, llevado a cabo en la purificación de AhpA, fue seguido de ensayos de actividad enzimática utilizando azocaseína como sustrato.

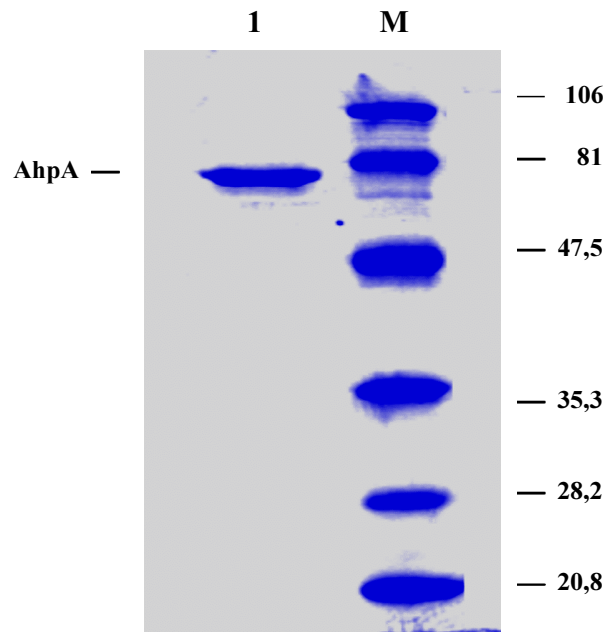


Figura 21. Proteasa AhpA purificada y cargada en un gel de acrilamida. **1**, proteasa AhpA; **M**, marcador

La proteasa AhpA una vez purificada se usó para la determinación de la secuencia de aminoácidos de su extremo N-terminal tal y como se describe en Materiales y métodos, obteniéndose por este método la secuencia de 14 residuos aminoacídicos que presentaban una coincidencia perfecta con la secuencia de aminoácidos deducida a partir del gen *ahpA* (Figura 17): **NESCTPLTGKEAGL**. El peso molecular de la proteasa estudiada, 64.000 Da de acuerdo con los cálculos hechos en SDS-PAGE, estaba razonablemente de acuerdo con el obtenido por análisis de la secuencia de aminoácidos (65.045 Da) una vez excluidos los 24 aminoácidos de la secuencia señal.

El pH óptimo para la actividad enzimática fue de 7,5 cuando se utilizaron azocaseína o elastina-rojo congo como substratos, y la proteasa no conservó su estabilidad cuando se incubó a 56°C durante 30 minutos. Los estudios de inhibición fueron realizados

mediante preincubación de la enzima con una concentración apropiada de inhibidor. La actividad de la enzima era fuertemente inhibida por PMSF, un inhibidor de serinproteasas, no obstante no se inhibió con otros inhibidores de serinproteasas como TCLK, inhibidor de tripsina de soja o inhibidor de tripsina de lima. Los agentes bloqueantes de tiol tampoco tenían efectos en esta actividad. Estos resultados coincidían con los obtenidos para la serinproteasa P2 la cual fue parcialmente purificada a partir de *A. hydrophila* SO2/2 (Rivero *et al.*, 1991).

4.2.1.4. Obtención de anticuerpos frente a AhpA

La proteína una vez purificada se empleó para la obtención de anticuerpos mediante la inmunización de conejos. Estos anticuerpos se utilizaron mas tarde para la identificación de AhpA tanto en los sobrenadantes como en las células de las cepas de *Aeromonas* utilizadas en este experimento, mediante la transferencia de las proteínas a membranas de nitrocelulosa y la posterior inmunolocalización de las mismas.

4.2.1.5. Reemplazamiento genético de *ahpA*

Como hemos señalado anteriormente, una forma de dilucidar si un determinado gen participa o no en la virulencia de un microorganismo, consiste en sustituir el gen salvaje por un alelo mutado y probar la virulencia de la cepa mutante. El gen *ahpA* salvaje fue reemplazado en el cromosoma de la cepa *A. hydrophila* AG2 por un alelo que contenía un marcador de resistencia a kanamicina. El reemplazamiento se llevó a cabo mediante el uso de un vector movilizable y suicida denominado pSUP202-1, el cual es un derivado del pSUP202 en el que se procedió a eliminar la resistencia a ampicilina.

Para obtener la construcción empleada en este experimento, se partió del plásmido pAHPA (Figura 16) el cual se digirió con la endonucleasa de restricción *NcoI* que presenta un solo sitio de corte sobre su secuencia. A continuación se ligó este plásmido con un fragmento de DNA que contenía la resistencia a kanamicina obtenida a partir del plásmido

pULMJ8 (Fernández-González *et al.*, 1994) digerido con las endonucleasas *Hind*III y *Sma*I. Previamente se hicieron romos los extremos del DNA a ligar.

El plásmido resultante, pKAHPA (Figura 16), se digirió a su vez con *Hind*III con el fin de obtener el fragmento de 3,4 kpb que contiene el gen mutado. Este fragmento se clonó a continuación en el plásmido pSUP202-1, previamente digerido con la misma endonucleasa, seleccionando tras la posterior transformación aquellas colonias resistentes a cloranfenicol y kanamicina. Este último plásmido, pSKAHPA (Figura 16), transformado en *E. coli* S17-1, se usó para la conjugación con la cepa salvaje de *A. hydrophila*.

De este modo se obtuvieron 110 colonias resistentes a kanamicina (marcador) y a ampicilina (resistencia natural de *A. hydrophila* AG2). Estos transconjugantes se transfirieron a placas con kanamicina y ampicilina, haciéndose al mismo tiempo una réplica de las colonias en placas con kanamicina y cloranfenicol. Sólo las colonias sensibles al cloranfenicol eliminaron el vector suicida y llevaron a cabo la doble recombinación necesaria para el reemplazamiento.

Aquellos transconjugantes que siendo resistentes a kanamicina, no lo eran a cloranfenicol (alrededor de un 60%), se analizaron como posibles mutantes. Para la determinación del reemplazamiento se realizó un experimento de amplificación por PCR con los oligonucleótidos AHPAF1 (11-33) y AHPAR1 (1771-1796) del gen *ahpA* tanto de la cepa salvaje *A. hydrophila* AG2 como de los posibles mutantes *A. hydrophila ahpA::kan^r*.

Como se puede ver en la Figura 22, el producto de la amplificación mediante PCR del mutante presentaba un tamaño de 3,1 kpb que correspondían a la amplificación del gen *ahpA* (1,8 kpb) mas el marcador de resistencia a kanamicina (1,3 kpb).

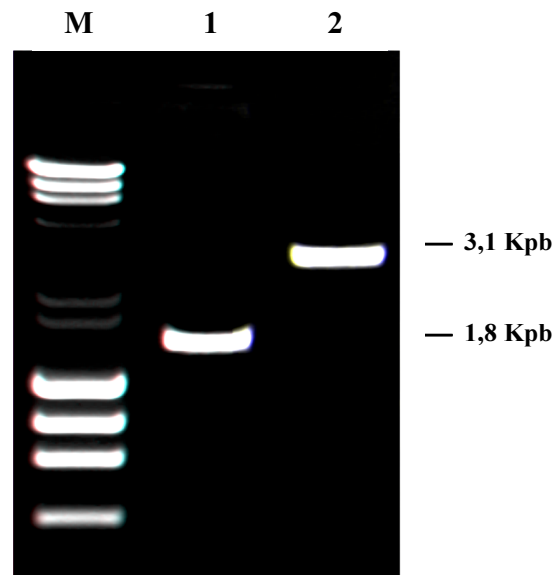


Figura 22. Electroforesis en gel de agarosa al 2% de los productos de la amplificación del gen *ahpA*. 1: cepa salvaje de *A. hydrophila* AG2. 2: cepa mutada *A. hydrophila ahpA::kan^r*. M, marcadores λ *Hind*III y ϕ X174 *Hae*III.

El mutante *A. hydrophila ahpA* mostró, al sembrarlo en placas de LB suplementadas con leche descremada, una notable reducción en el halo de proteólisis alrededor de las colonias respecto al que presentó la cepa salvaje, aunque se observó por otra parte, una pequeña diferencia cuando ambas cepas fueron sembradas en placas de medio LB suplementadas con elastina insoluble (Figura 19).

A partir de sobrenadantes de medios de cultivo de ambas cepas, la salvaje y la mutada en el gen *ahpA*, se determinaron las actividades caseinolítica y elastolítica (Figura 20). De nuevo, la actividad caseinolítica de la cepa mutante fue inferior hasta en un 70% con respecto a la observada para la cepa salvaje, y la actividad elastolítica fue menor en un 15%. Estos resultados sugieren que la actividad caseinolítica es debida principalmente a la serinproteasa AhpA, y que la actividad elastolítica podría ser debida principalmente a otras actividades proteolíticas presentes en los sobrenadantes de los cultivos bacterianos.

4.2.1.6. Inoculación en trucha arco iris

Para conocer el papel que desempeña AhpA en la patogénesis de *A. hydrophila* AG2, se determinó la LD₅₀ en trucha arco iris tanto para la cepa salvaje como para la cepa mutante *A. hydrophila ahpA::kan^r* (Tabla XXVII). La LD₅₀ de la cepa salvaje resultó ser bastante similar a la de la cepa mutada (7×10^5 y 10^6 respectivamente). Por lo tanto, aunque existía un ligero aumento de la LD₅₀ de los mutantes *ahpA::kan^r*, este era marginal, no pudiéndose considerar a esta actividad proteolítica como un factor de virulencia a tener en cuenta en esta especie.

Tabla XXVII. Experimentos de inoculación en trucha y cálculo de la LD₅₀.

<i>Bacterias/0,1 ml</i>	<i>A. hydrophila</i> AG2		<i>A. hydrophila ahpA::kan^r</i>	
	Expt 1	Expt 2	Expt 1	Expt 2
10^9	10*	10	10	9
10^8	10	9	9	9
10^7	7	8	8	8
10^6	6	6	5	6
10^5	3	3	3	3
10^4	0	0	0	0
10^3	0	0	0	0
LD₅₀	7×10^5	6×10^5	10^6	7×10^5

* Número de truchas muertas

Básicamente, estos resultados están de acuerdo con aquellos obtenidos en cepas de *A. salmonicida* (Vipond *et al.*, 1998). Estos autores han visto que el gen *aspA* codifica para una serinproteasa, muy similar a la que codifica el gen *ahpA* de *A. hydrophila* AG2 caracterizado a lo largo de este trabajo, que tiene un efecto marginal en la virulencia de *A. salmonicida* en salmón Atlántico (*Salmo salar* L.).

4.2.1.7. Discusión

En este estudio se ha clonado y secuenciado el gen *ahpA* procedente de la cepa patógena *A. hydrophila* AG2, el cual codifica para la actividad proteolítica AhpA. Basándonos en la secuencia de aminoácidos, así como en la conducta exhibida frente a distintos inhibidores, podemos concluir que la proteína purificada es una serinproteasa de la familia de las subtilasas. Además, se encontró un 88% de homología cuando se analizó la secuencia de aminoácidos, al compararla con varias bases de datos de proteínas, con la de la serinproteasa AspA procedente de una *A. salmonicida* patógena (Vipond *et al.*, 1998). La secuencia de nucleótidos del gen *ahpA* no presentó homología con ninguna otra secuencia conocida.

La serinproteasa AhpA se expresó eficientemente, cuando se clonó en pJRD215, en la cepa de *A. salmonicida* utilizada en este estudio, la cual no es proteolítica, excretándose al sobrenadante del medio de cultivo. Esto nos permitió determinar la actividad proteolítica, a lo largo de todo el tiempo de incubación, sobre dos substratos diferentes, azocaseína y elastina-rojo congo, sin interferencias debidas a la presencia de otras actividades proteásicas presentes en los sobrenadantes del medio de cultivo.

Los resultados obtenidos nos indican que la principal actividad proteolítica de la proteína AhpA se manifiesta sobre la caseína, aunque también se pudo observar cierta actividad elastolítica. Se obtuvieron resultados similares cuando se ensayó la actividad proteolítica en placas de LB suplementadas con caseína o elastina insoluble. Se sabe que la serinproteasa AspA desempeña un papel importante en la activación de la glicerofosfolípido:colesterol aciltransferasa (GCAT) de *A. salmonicida* (Eggset *et al.*, 1994) y probablemente en otros procesamientos proteicos, por lo que podemos asumir también estas funciones para la proteasa AhpA.

El mutante obtenido por intercambio alélico para la cepa AG2 presentaba una capacidad caseinolítica bastante reducida y casi la misma actividad elastolítica tanto en

sobrenadantes de cultivos como en placas de LB suplementadas con caseína y elastina respectivamente.

La inoculación intraperitoneal del mutante isogénico *A. hydrophila ahpA::kan^r* en trucha no tenía efectos en la virulencia de *A. hydrophila* AG2, aunque se obtuvo un incremento marginal en la LD₅₀. Una situación similar se encontró al estudiar el papel que desempeña, en la virulencia de *A. salmonicida*, la proteína AspA. Los mutantes para el gen *aspA* obtenidos mediante mutagénesis química o por intercambio alélico presentaron LD₅₀ prácticamente idénticas a las que se encontraron para la cepa salvaje (Drinan & Smith, 1985; Vipond *et al.*, 1998). La mutagénesis por intercambio alélico realizada sobre el gen *ahpA* no viene sino a confirmar estos resultados.

4.2.2. Proteasa AhpB

Como ya se ha apuntado, uno de los factores considerados dentro de las posibles causas de la patogenicidad de *Aeromonas* es la producción y liberación al medio de cultivo de proteasas capaces de degradar la elastina presente en la matriz extracelular de tejidos como la piel, los vasos sanguíneos y los pulmones.

Aunque ya se ha hablado de una cierta actividad elastolítica presente en la proteasa AhpA, esta no justifica en modo alguno la envergadura de la actividad determinada por diferentes ensayos para las distintas cepas de *Aeromonas*.

4.2.2.1. Clonación molecular y secuenciación del gen *ahpB*

El gen *ahpB* se clonó a partir de la cepa patógena *A. hydrophila* AG2. Para ello se utilizó la genoteca construida en *E. coli* C600-1 para la clonación del gen *ahpA*, en la que se obtuvieron aproximadamente 3.000 transformantes seleccionados por su resistencia a ampicilina en placas de LB suplementadas con este antibiótico y leche descremada. Como plásmido para la clonación se utilizó el pUC18, y al cabo de 48 horas se pudo ver un halo de proteólisis rodeando a dos de las colonias (la primera fue analizada en el punto 4.2.1.1.). Una vez extraído el DNA plasmídico de esta segunda colonia, que se denominó pAHE5 (Figura 23), se usó para transformar de nuevo *E. coli* C600-1 obteniéndose en esta segunda transformación un 100% de colonias, resistentes a ampicilina, que degradaban las proteínas presentes en la leche. Como control negativo se transformó la misma cepa con pUC18 no viéndose en este caso degradación alguna.

El inserto de DNA (Figura 23) clonado resultó ser de 2,7 kpb y mediante el análisis de su secuencia (Figura 24) se obtuvo un marco de lectura abierto de 1.764 pb con capacidad para codificar un polipéptido de 588 aminoácidos con un peso molecular de 62.728.

PLASMIDO

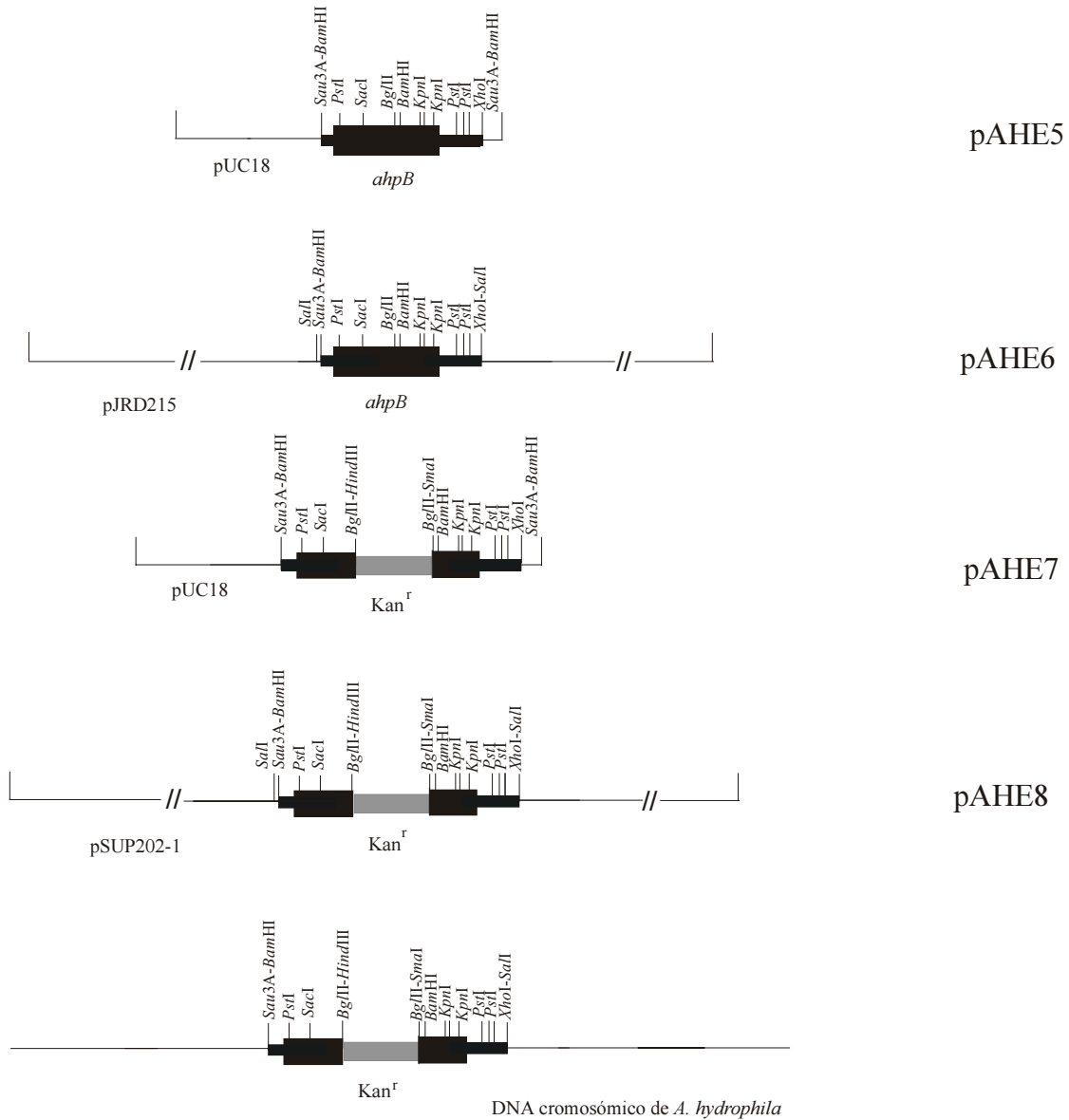


Figura 23. Mapas de los plásmidos de clonación y subclonación del gen *ahpB*. El vector se muestra con trazo fino, el inserto con trazo intermedio y el gen con trazo grueso. En gris aparece la resistencia a kanamicina.

TGTAGGAACGCCGGGCAACGGACCCGGCGTGCAATCTTCATCGACTTA**AGGA**AAGACGAG
 +1 SD
ATGAACAAAGTCTATTTGGCCGTGGTATTGGCCTGCTGGGGAAGCGCAGCCTTGGCTGCA 60
 M N K V Y L A V V L A C W G S A A L A A 20
 PreproAhpB ProAhpB
 GAACAGGTTGACGTACATCAGGTGGCGGGCATTTCAGGGGGCACCGAGCGGCGCCGGGGT 120
 E Q V D V H Q V A G I Q G A P S G A A G 40
 GTTAGCGCGCTGGCCGGGATGGCGAGTTTCGTCAGGTGCGGGCGGTCAAGCTGCCCAAT 180
 V S A L A G D G E F R Q V R A V K L P N 60
 GGCCAGCAGCGGGTTCGCTATGAGCAGACCTGGCACGGCATCCCGGTCTGGGGCCAGGTG 240
 G Q Q R V R Y E Q T W H G I P V W G Q V 80
 CTGGTGGCCGAACAGTCCCTCGGTGGTCAGATAAGCCAGGTCCTCCGGCCAGATCCTGCGC 300
 L V A E Q S L G G Q I S Q V S G Q I L R 100
 CAGATCGATGCCGACGTGGCCAGCCCCGACAGCCGCCCTGTACCAGCCGATGCCGCTGGC 360
 Q I D A D V A S P T A A L S P A D A A G 120
 AAGGCCCGTGCCTGGGGCCAGGGCAGCAACGAGCGGGTCAAGCTGTTTCGTGATGCAGGAT 420
 K A R A G A K G S N E R V K L F V M Q D 140
 GAGGCCGGTCAAGCCGTCCTGGTCTATCTGGTCTCCTGGCTGGGCCGCAAGCGAGCAGCCG 480
 E A G Q P V W S I W S P G W A A S E Q P 160
 AGCCGTCCCTTTGTTGTGATCGATGCCAGAGCGGGGCCGAGCTCAAGCGCTGGGAGGGG 540
 S R P F V V I D A Q S G A E L K R W E G 180
AHPBF1
 ATCAACCACAAGGACGCCACAGGCCCGGGTGGCAACGTCAAGACTGGCAAGTACTTCTAT 600
 I N H **K D A T G P G G N V K T** G K Y F Y 200
 N-terminal de AhpB
 GGCTCCGACTTTGGCCCCCTGCTGGTGGACGACAGCTGCCGCATGACCAGCCCGAACGTG 660
 G S D F G P L L V D D S C R M T S P N V 220
 GACACGGTCAACATGAATCAGCCACCACGGGTGTGCCGTGCACCAGTTCACCTGCCCG 720
 D T V N M N H A T T G C A V H Q F T C P 240
 GAGAACACGGTCAAGGAGATCAACGGTGCCTACTCGCCGCTCAACGATGCCCACTACTTC 780
 E N T V K E I N G A Y S P L N D A H Y F 260
 GGCAACGTGGTGTTCGACATGTACCGCAACTGGTACAACACGGCGCCGCTCAGCTTCAAG 840
 G N V V F D M Y R N W Y N T A P L S F K 280
 CTGAAGATGCGGGTACACTACAGCCGCAACTACGAGAATGCCTTCTGGGACGGCAGCCAG 900
 L K M R V H Y S R N Y E N A F W D G S Q 300
 ATTGACTTCGGTGATGGTGCCACCACCTTCTACCCGCTGGTGAGTCTGGATGTGGCCGCC 960
 I D F G D G A T T F Y P L V S L D **V A A** 320
 CACGAGGTGAGCCACGGCTTACCCGAGCAAACCTCTGGGCTGGTCTACTCGGGTCAATCG 1020
H E V S H G F T E Q N S G L V Y S G Q S 340

Figura 24. Secuencia de nucleótidos del gen *ahpB* y secuencia de aminoácidos deducida de la proteína codificada (AhpB). SD: secuencia Shine Dalgarno; doblemente subrayado se encuentra una región de unión a Zinc; las flechas indican los lugares en los que se produce el procesamiento; los oligonucleótidos empleados en la PCR aparecen coloreados.

GGCGGCATCAACGAGGCCTTCTCCGACATGGCGGGGAAGCAGCCGAGAACTACATGAAG 1080
G G I N E A F S D M A G E A A E N Y M K 360
GGCAGCAACGACTGGCTGGTCGGGGCCAGATCTTCAAGGGCAACGAGCCCTGCGCTAC 1140
G S N D W L V G A Q I F K G N E P L R Y 380
TTCGAGGATCCGACCCGTGATGGCAGCTCCATCGGTTCATGCCAGCGATTACTACGATGGC 1200
F E D P T R D G S S I G H A S D Y Y D G 400
ATCGACGTGCACCACAGTTCGGGCGTCTACAACCGTGCTTTCTACCTGCTGGCCAACACC 1260
I D V H H S S G V Y N R A F Y L L A N T 420
AGCGGCTGGAATACCCGCAAGGCCTTTGAAGTGTTCGTGCTGGCCAACCGCCTCTACTGG 1320
S G W N T R K A F E V F V L A N R L Y W 440
AHPBR1
GGCGCCAACACCACCTA**CGATCAGGGAGCCTGCGGCT**GGACCAAGGCGGCCACCGATCTG 1380
G A N T T Y D Q G A C G W T K A A T D L 460
GGCTACAGCCTGACTGACGTGGCAGCAGCCTTTACCACTGTCGGGGTCAACGCCTCCTGC 1440
G Y S L T D V A A A F T T V G V N A S C 480
GGTACCACGCCGCCCGGAGCGAGGGGCTTGCAAAACGGGGTACCGTGACCGGGCTCTCC 1500
G T T P P P S E G L A K R G T V T G L S 500
GCCGCCAAGGGTGGCAAGGTGAACTTCACTATCGACGTGCCGGCCGGCAAGAGCAAGCTG 1560
A A K G G K V N F T I D V P A G K S K L 520
GTGGTTGCCAGCAGTGGCGGCACAGGTGATGCGGATCTCTACGTGAAGTTCGGGGCACTG 1620
V V A S S G G T G D A D L Y V K F G A L 540
CCGACCAGCACCAGTTATGACTGCCGTCTTACAAGGGGGGAATGCAGAGACCTGTACC 1680
P T S T S Y D C R P Y K G G N A E T C T 560
CTGAACCTCCCCAAGGCGGGTACCTGGTATGTACAGCTGAGTGGTTTCAGTGCCTTCTCC 1740
L N L P K A G T W Y V Q L S G F S A F S 580
GGGGTGACCCTCAAGGCGACCTACTGATCCCGGGTTGATGTGATTTAGCCTGTGCGCCG 1800
G V T L K A T Y - 588
GACTTGTCCGGTATTTTTTATGCGGATTTGCCTGACCAGCGCCGGGCAAGGGCTCTGGCT 1860
GCCTCCAAC 1869

Figura 24. (Continuación).

AHPB	MNKV-----YLAVVLACWGSAAALAAEQVDVHQVAG-IQGAPSGAAGVSAL	44
HAPT	MKMIQRPLNWLVLAGAATGFPLYAAQMVTTDDASM-VEQALA-QQYYSMM	48
LASB	MKKV-STLDLFLVAIMGVSPAFAADLIDVSKLPSKAAQGAPGPVTLQAA	49
AHPB	AGDGE---FRQVRAVKLPNGQQRVRYEQTWHGIPVWGOVLVAEQSLGGQI	91
HAPT	PAASG---FKAVNTVQLPNGKVKVRYQOMYNGVPVYGTVVVATESKGI	94
LASB	VGAGGADELKAIRSTTLPNGKQVTRYEQFHNGVRRVVGAEITEVKGP GKSV	99
AHPB	S-QVSGQILRQIDADVASPTAALSPADAA-----GKARAGAK--GSNE	131
HAPT	S-QVYQMAQQLPADLPTVTPDIESQQAIALAVSHFGEQHAGESLPVNE	143
LASB	AAQRSGHFVANIAADLPGSTTAAVSAEQV-LAQA---KSLKAQGRKTEND	145
AHPB	RVKLFVMQDEAGQPVWSIWSPGWAASEQPSRFVVIDAQSGAELKRWEGL	181
HAPT	SVQLMVRLLDDNQQLVYLVDFFVASETPSRPFYFISAETGEVLDDQWDGI	193
LASB	KVELVIRLGENNIAQLVYNVSYLIPGEGLSRPHFVIDAKTGEVLDDQWEGCL	195
AHPB	NHKDATG--PGGNVKTGKYFYGSD----FGPLLVDSDCRMTSPNVDIVNM	225
HAPT	NHAQATGTGPGGNKTKRYEYGSNGLPGFTIDKTGTTCTMNSAVKTVNL	243
LASB	AHAEAGC--PGGNKTKKYTYGSD----YGPLIVNDRCEMDDGNVITVDM	239
AHPB	NHATTGC--AVHQFTCPENT---VKEINGAYSPLNDAHVFQNVVFDMYR	269
HAPT	NGGTSGS--TAFSYACNNSTNYSNVKTVNGAYSPLNDAHFFCKVVFDMYQ	291
LASB	NSSITDSDKTTTFRFACPTNT-Y---KQVNGAYSPLNDAHFFGGVVFKLYR	285
AHPB	NWYNTAPLSFKLKM RVHYSRNYENAFWDGSDIFGDGATTFYPLVSLDVA	319
HAPT	QWLNTSPLTFQLIMRVHYGNNYENAFWDGRAMTFGDGYTRFYPLVDINVS	341
LASB	DWFGTSPLTHKLYMKVHYGRSVENAYWDGTAMLFGDGATTFYPLVSLDVA	335
AHPB	AHEVSHGFTEQNSGLVYSGQSGGINEAFSDMAGEAAENYMKGSNDWLVGA	369
HAPT	AHEVSHGFTEQNSGLVYRDMSSGGINEAFSDIAGEAAEYFMRGNVDWI VGA	391
LASB	AHEVSHGFTEQNSGLVYRQSGGMEAFSDMAGEAAEFYMRGKNDFLTY	385
HAP	-----NSGLVYRDMSSGGINEAFSDIAGEAAEYFMRGNVDWI VGA	39
AHPB	QIFKGNELRYFEDPTRDGSSTICHASDYDGDIVHSSSGVMNRAFYLLAN	419
HAPT	DIFKSSGGLRYFDQPSRDGRSIDHASQYYSGIDVHSSSGVMNRAFYLLAN	441
LASB	DIKKGSGALRYMDQPSRDGRSIDNASQYYNGIDVHSSSGVMNRAFYLLAN	435
HAP	DIFKSSGGLRYFDQPSRDGRSIDHASQYYSGIDVH--SSGVMNRAFYLLAN	88
AHPB	TSGWNTRKAFEVFLANRLYWGANTTYDQACCGWTKAATDLGYSLTDVVA	469
HAPT	KSGWNVRKGFVFAVANQLYWTPNSTFDQGGCGVVKAAQDLNLYNTADVVA	491
LASB	SPGWDTRKAFEVFDANRYWTATSNYNSGACGVIRSAQNRNYSAADVTR	485
HAP	KSGWNVRKGFVFAVANQLYWTPNSTFDQGGCGVVKAAQDLNLYNTADVVA	138
AHPB	AFTTVGVNASCGTTPPP-SEGLAKRGTVTGLSAAKGGKVNFTIDVPAGKS	518
HAPT	AFNTVGVNASCGTTPPPVGKVLBKPKPIITGLSGSRGGEDFYTFV-TNSG	540
LASB	AFSTVGV-----	492
HAP	AFNTVGVNASCGTTPPPVGKVLBKPKPIITGLSGSRGGEDFYTFV-TNSG	187
AHPB	KLIVASSGGTGDADLYVKFGALPTSTSYDSRPYKKGNAETCTLNLPKAGT	568
HAPT	SVVVISGGTGDADLYVKAGSKPTTSSWDCRPYRSGNAEQCSISAVVGTI	590
LASB	-----TCPSAL-----	498
HAP	SVVVISGGTGDADLYVKAGSKPTTSSWDCRPYRSGNAEQCSISAVVGTI	237
AHPB	WYVQLSGFSAFSGVTLKATY	588
HAPT	YHVMRLRGYSNYSVTLRLD-	609
HAP	YHVMRLRGYSNYSVTLRLD-	256

Figura 25. Alineamiento de la secuencia de aminoácidos de AhpB con otras secuencias: HAPT, precursor hemoglutinin/proteasa de *V. cholerae*; LASB, precursor de la elastasa de *Pseudomonas aeruginosa*; HAP, hemoglutinin/proteasa de *Helicobacter pilori*. En negro se muestra la homología entre 3 o mas secuencias; en gris se muestra cuando la homología es sólo entre dos de las secuencias.

La secuencia de aminoácidos de la proteasa AhpB mostró, al compararse con secuencias proteicas de varias bases de datos, una gran homología (Figura 25) con: varias metaloproteasas de *Vibrio* spp. (David, 1992; Milton *et al.*, 1992; Cheng *et al.*, 1996), el fragmento hemoglutinin/proteasa de *Helicobacter pylori* (Smith *et al.*, 1994), el precursor hemoglutinin/proteasa de *V. cholerae* (Häse & Finkelstein, 1991), el precursor (LasB) de la elastasa de *P. aeruginosa* (Fukushima *et al.*, 1989) así como con otras proteasas bacterianas (Tabla XXVIII).

Tabla XXVIII . Porcentaje de homología de AhpB con varias proteasas bacterianas.

BACTERIA	DEFINICIÓN DE LA PROTEASA	NÚMERO DE ACCESO	HOMOLOGÍA (%)	ZONA DE HOMOLOGÍA
<i>Vibrio cholerae</i>	HAP (Vibriolisina)	122223	53.74	Proteína madura
<i>Vibrio proteolyticus</i>	Precursor de proteasa neutral	266650	52.72	„
<i>Vibrio anguillarum</i>	Precursor de metaloproteasa virulenta	1169522	53.23	„
<i>Vibrio vulnificus</i>	Zinc metaloproteasa	1794194	53.06	„
<i>Helicobacter pylori</i>	Zinc metaloproteasa	2499906	61.72	„
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Precursor de elastasa (LasB)	151212	52.21	„
<i>Legionella longbeachae</i>	Precursor de Zinc metaloproteasa	1709781	35.73	„
<i>Legionella pneumophila</i>	Precursor de Zinc metaloproteasa	130961	27.55	„
<i>Shewanella sp. Ac10</i>	Serinproteasa alcalina extracelular	2921857	25.85	Extremo C-terminal
<i>Alteromonas sp.</i>	Serinproteasa alcalina	2120571	23.64	„
<i>Bacillus stearothermophilus</i>	Termolisina	482454	23.64	„
<i>Xanthomonas campestris</i>	Precursor de proteasa extracelular	130965	23.45	„
<i>Xanthomonas sp.</i>	Xanthomonapepsina	2145514	27.55	„

Asimismo se analizó la secuencia de aminoácidos de esta proteasa, al igual que en el caso de la proteasa AhpA, mediante el programa **PROSITE** encontrándose por este método una región de unión a Zinc (Figura 24) en la posición 318-VAAHEVSHGF-327 la

cual es característica de las Zinc metaloproteasas, por lo que se la podría englobar dentro de esta familia.

Al analizar la secuencia nucleotídica del gen *ahpB*, se pudo ver que estaba compuesto por un dominio estructural de preproenzima, con una secuencia señal típica compuesta por 19 aminoácidos (1.903 Da). Entre las posiciones 17 y 19 (Figura 24) de la secuencia aminoacídica se encontró una secuencia potencial de reconocimiento de una peptidasa (17-A-X-A-19) que rompería la proteína por detrás de la segunda alanina (Pugsley, 1993).

La región situada a continuación de la secuencia señal, estaría constituida por un propéptido típico de 164 aminoácidos y 17.342 Da. En este punto se encuentra el extremo N-terminal de la hemoglutinin/proteasa madura de *V. cholerae* (Häse & Finkelstein, 1991). Esto nos dejaba 405 aminoácidos para la proteína madura que, por lo tanto, tendría un tamaño de 43.473 Da. El cálculo de estos tamaños se realizó siempre según la secuencia aminoacídica deducida para la secuencia de nucleótidos.

4.2.2.2. Purificación y caracterización de la proteasa AhpB

Para la purificación de la proteasa AhpB (Figura 26) se utilizó el método descrito por Rivero *et al.* (1990) para la purificación de una metaloproteasa en *A. hydrophila* SO2/2, usándose para ello tanto los sobrenadantes obtenidos a partir de la cepa silvestre *A. hydrophila* AG2 como los obtenidos de la cepa de *A. salmonicida* subsp. *masoucida* a la cual se transfirió el gen por conjugación. La precipitación de la proteína con sulfato amónico se realizó de forma fraccionada, llevándose a cabo una precipitación al 35% en primera instancia y precipitándose a continuación el caldo obtenido en el primer paso hasta alcanzar un 65% de sal. Tras cada paso de purificación se realizó una valoración con azocaseína como substrato lo cual constituyó una guía con la que monitorizar el proceso en todo momento.

El tamaño de la proteína madura purificada, que por secuencia se había calculado en torno a los 43 kDa, fue de 38 kDa en ambos casos, lo cual sugería un posible procesamiento C-terminal. Este tamaño coincidía con el calculado por Rivero *et al.* (1990) para la metaloproteasa termoestable de *A. hydrophila* SO2/2. Una vez pura, la proteína se transfirió a una membrana de PVDF y se secuenció el extremo amino, resultando: **KDATGPGGNVKTG** (Figura 24). El extremo N-terminal coincidía perfectamente con la secuencia de aminoácidos deducida de la secuencia de nucleótidos del gen *ahpB* para esa región, y además se encontraba situado en la misma posición que el extremo N-terminal de la hemoglutinin/proteasa de *V. cholerae* (Häse & Finkelstein, 1991).

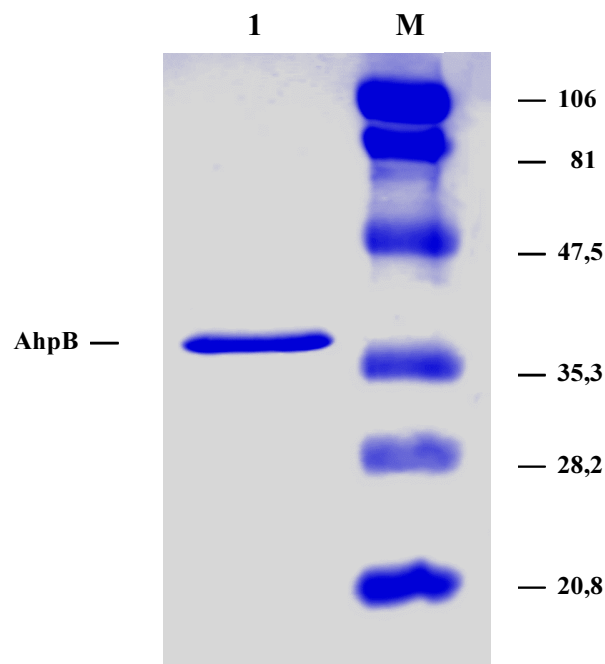


Figura 26. Proteasa AhpB purificada y cargada en un gel de acrilamida. **1**, proteasa AhpA; **M**, marcador.

4.2.2.3. Actividad proteolítica y elastolítica de *AhpB*

Para demostrar tanto la actividad proteolítica como elastolítica del producto del gen *ahpB* (*AhpB*) se diseñó un experimento mediante el cual se lograra expresar dicho gen en una cepa no proteolítica de *Aeromonas*. Para ello se subclonó el fragmento *SaII-XhoI* de 2,5 kpb del plásmido pAHE5 (Figura 23), el cual contiene el gen *ahpB*, en pJRD215 digerido con *SaII* y defosforilado para evitar las posibles religaciones del vector. El plásmido resultante, pAHE6 (Figura 23), se transfirió a *E. coli* S17-1 por transformación. Esta cepa, a su vez, se utilizó para transferir por conjugación el plásmido pAHE6 a *A. salmonicida* subsp. *masoucida* que, como ya hemos dicho, no tiene actividad proteolítica apreciable.

Los transconjugantes que crecieron en las placas de LB con ampicilina y kanamicina se sembraron a continuación sobre otras que además poseían leche descremada o elastina insoluble (Figura 27). Como control del experimento se empleó el plásmido pJRD215 tal cual para conjugar *A. salmonicida* subsp. *masoucida*, sembrándose también los transconjugantes en placas con leche descremada por un lado y con elastina insoluble por otro (Figura 27).

Al cabo de 24 horas las colonias sembradas sobre placas con leche descremada presentaban halos de lisis que demostraban la secreción de caseinasa (Figura 27B-2). La degradación de la elastina se producía al cabo de 48 horas pero esta era mucho mayor que la que se veía con la proteasa *AhpA* (Figura 27A-2). En el caso de *A. salmonicida* subsp. *masoucida* conjugada con pJRD215 como control, no se apreció degradación alguna (Figura 27A-1 y 23B-1).

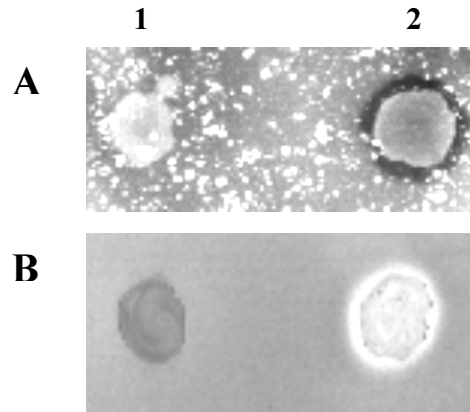


Figura 27. Actividad proteolítica detectada en medio sólido. **A:** placa de LB suplementada con elastina; 1, *A. salmonicida* subsp. *masoucida* conteniendo el plásmido pJRD215; 2, *A. salmonicida* subsp. *masoucida* conteniendo el plásmido pAHE6 ; **B:** placa de LB suplementada con caseína; 1, *A. salmonicida* subsp. *masoucida* conteniendo el plásmido pJRD215; 2, *A. salmonicida* subsp. *masoucida* conteniendo el plásmido pAHE6.

Por otra parte, se determinaron ambas actividades, caseinolítica y elastolítica, en sobrenadantes de cultivos, incubados durante 48 horas, de *A. hydrophila* AG2, *A. salmonicida* subsp. *masoucida* y *A. salmonicida* subsp. *masoucida* conteniendo el plásmido pAHE6.

Los resultados obtenidos (Tabla XXIX), en los cuales los sobrenadantes de *A. salmonicida* subsp. *masoucida* con el plásmido AHE6 poseían una actividad elastolítica muy similar a la observada en *A. hydrophila* AG2, demuestran que esta proteasa contribuye de forma fundamental a la actividad elastolítica de esta cepa.

4.2.2.4. Obtención de anticuerpos

La proteína una vez purificada se empleó para la obtención de anticuerpos mediante la inmunización de conejos. Estos anticuerpos se utilizaron mas tarde para la identificación de la proteína AhpB, en sobrenadantes y células de las cepas de *Aeromonas*,

mediante la transferencia de las proteínas a membranas de nitrocelulosa y la posterior inmunolocalización de las mismas

4.2.2.5. Reemplazamiento genético de *ahpB*

El gen *ahpB* se reemplazó, en el cromosoma de *A. hydrophila* AG2, por un alelo que contenía un marcador de resistencia a kanamicina, obteniéndose de este modo un mutante isogénico empleado en posteriores experimentos.

Para este experimento, se partió del plásmido pAHE5 (Figura 23). Este plásmido se digirió con la endonucleasa *Bgl*III, que presenta un único sitio de corte, y se ligó a continuación con la resistencia a kanamicina procedente del plásmido pULMJ8 cortado con *Hind*III y *Sma*I. Los extremos a ligar se hicieron romos con el fragmento klenow de la DNA polimerasa I. El plásmido resultante de tal experimento, pAHE7 (Figura 23), se digirió con las endonucleasas *Sal*I y *Xho*I obteniéndose un fragmento de 3,8 Kpb, conteniendo el gen mutado. Este fragmento se ligó a continuación con el plásmido pSUP 202-1 abierto con la endonucleasa *Sal*I, obteniéndose de esta forma el plásmido pAHE8. Este último plásmido se transformó en *E. coli* S17-1, y los transformantes se emplearon para conjugar con la cepa salvaje *A. hydrophila* AG2, sembrando el producto de la conjugación en placas suplementadas con ampicilina y kanamicina.

De este modo se obtuvieron 190 colonias resistentes a kanamicina (marcador) y a ampicilina (resistencia natural de *A. hydrophila* AG2). Estos transconjugantes se transfirieron a placas con kanamicina y ampicilina, haciéndose al mismo tiempo una réplica de las colonias en placas con kanamicina y cloranfenicol. Sólo se analizaron las colonias sensibles al cloranfenicol como posibles mutantes por inactivación insercional.

Los transconjugantes resistentes a kanamicina y sensibles a cloranfenicol (un 50% de las 190 colonias obtenidas) se emplearon a continuación para comprobar el reemplazamiento, para lo cual se procedió a la amplificación del gen *ahpB* salvaje así como

del gen mutado utilizándose los oligonucleótidos AHPBF1 (571-592) y AHPBR1 (1338-1357). El producto de la amplificación (Figura 28) resultó ser, en la cepa salvaje, un fragmento de DNA de 786 pb tal y como se esperaba, mientras que en las cepas mutadas aparecía un fragmento de 2,1 kpb producto de la suma del fragmento de la cepa salvaje mas la resistencia a kanamicina (1,3 kpb).

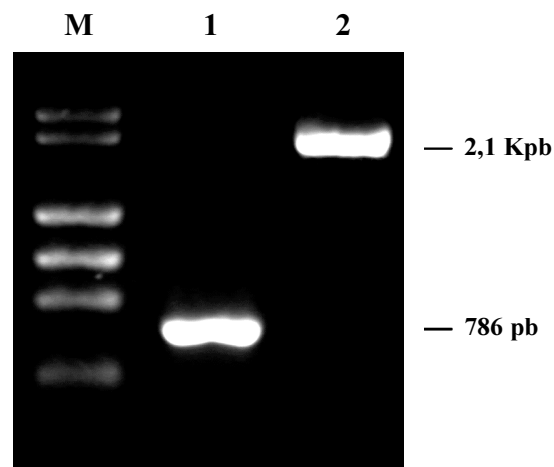


Figura 28. Electroforesis en gel de agarosa al 2% de los productos de la amplificación del gen *ahpB*. 1: en la cepa salvaje *A. hydrophila* AG2. 2: en el mutante *A. hydrophila ahpB::kan^r*. M, marcadores λ *Hind*III y ϕ X174 *Hae*III.

El mutante *A. hydrophila ahpB::kan^r* se sembró a continuación en placas de LB con leche descremada por una parte y elastina insoluble por otra. El halo de proteolisis aparecido en las placas que contenían leche descremada era ligeramente inferior al que mostraba la cepa salvaje (Figura 29A), siendo la reducción con respecto a la cepa salvaje en el halo de lisis que aparecía en las placas con elastina lo mas llamativo del experimento (Figura 29B). Se sembró *A. hydrophila ahpA::kan^r* en las mismas placas (Figura 29A y 25B), con el objeto de comparar la actividad de la proteasa AhpB con la de la proteasa AhpA, tanto con elastina como con caseína como sustrato.

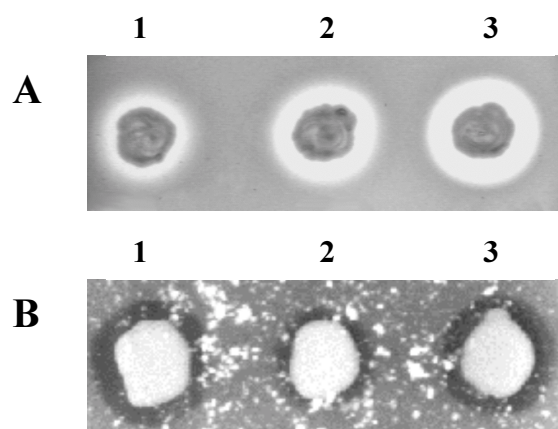


Figura 29. Actividad proteolítica detectada en medio sólido. **A:** placa de LB suplementada con caseína; 1, *A. hydrophila ahpA::kan^r*; 2, *A. hydrophila ahpB::kan^r*; 3, *A. hydrophila* AG2. **B:** placa de LB suplementada con elastina; 1, *A. hydrophila ahpA::kan^r*; 2, *A. hydrophila ahpB::kan^r*; 3, *A. hydrophila* AG2.

Se determinaron asimismo las actividades caseinolítica y elastolítica presentes en los sobrenadantes de cultivos de la cepa salvaje y de la cepa mutada (Tabla XXIX). La actividad caseinolítica del mutante con respecto a la cepa salvaje sufría una reducción de un 20%, mientras que la reducción de la actividad elastolítica era de hasta un 90%. Se realizó al mismo tiempo un experimento de complementación mediante la conjugación del plásmido pAHE6 (Figura 23) en *A. hydrophila ahpB::kan^r* obteniéndose unos niveles de actividad proteolítica idénticos a los de la cepa salvaje.

Tabla XXIX. Actividad proteolítica detectada en sobrenadantes de *Aeromonas*.

Cepas	% Actividad caseinolítica	% Actividad elastolítica
<i>A. hydrophila</i> AG2	100	100
<i>A. hydrophila ahpA::kan^r</i>	30	85
<i>A. hydrophila ahpB::kan^r</i>	80	10
<i>A. salmonicida subsp. salmonicida</i>	0	0
<i>A. salmonicida subsp. salmonicida ahpA</i>	40	18
<i>A. salmonicida subsp. salmonicida ahpB</i>	16	90

Los resultados obtenidos venían a confirmar lo que ya se había visto al expresar la proteasa en *A. salmonicida* subsp *masoucida*, es decir, la importancia de esta enzima como responsable de la actividad elastolítica manifestada por *A. hydrophila* AG2. La actividad caseinolítica sin embargo se debe atribuir mayoritariamente a otra proteasa que muy bien podría ser la serinproteasa AhpA.

Con el fin de comprobar la presencia de AhpB en el sobrenadante de los cultivos del mutante, se incubó esta cepa en medio LB a lo largo de 72 horas. Mediante el uso de los anticuerpos obtenidos frente a AhpB se comprobó que los mutantes, *A. hydrophila* *ahpB::kan^r*, no excretaban esta proteína al medio de cultivo.

4.2.2.6. Secreción y procesamiento de AhpB

Para entender los mecanismos que intervienen en el procesamiento y secreción de esta proteína, intentamos diseñar, en principio, experimentos que nos permitieran la identificación de especies proteicas secretadas por la bacteria durante tiempos cortos de incubación. Se procedió en primer lugar a la suspensión en medio de cultivo LB fresco de las células de *A. hydrophila* AG2 crecidas a 30°C hasta la fase logarítmica tardía de su crecimiento. El cultivo así obtenido se incubó de nuevo a 30°C y se tomaron muestras tanto del caldo como de las células cada 10 o 20 minutos hasta las dos horas de incubación. Estas muestras se procesaron inmediatamente mediante la adición de TCA al 10% para prevenir la proteólisis y para precipitar las proteínas.

Mediante un inmunoensayo, realizado con anticuerpos obtenidos frente a AhpB, a partir de las muestras procedentes de las células (Figura 30A) se vio que estas poseían únicamente una especie proteica de 62 kDa (proAhpB), mientras que las muestras del caldo presentaban dos especies proteicas: una proteína de 62 kDa que se encontraba en cantidad prácticamente constante a lo largo del tiempo de incubación y que correspondía a proAhpB; y otra proteína de 43,4 kDa correspondiente a un intermediario, que iba incrementando a medida que transcurría el tiempo (Figura 30B).

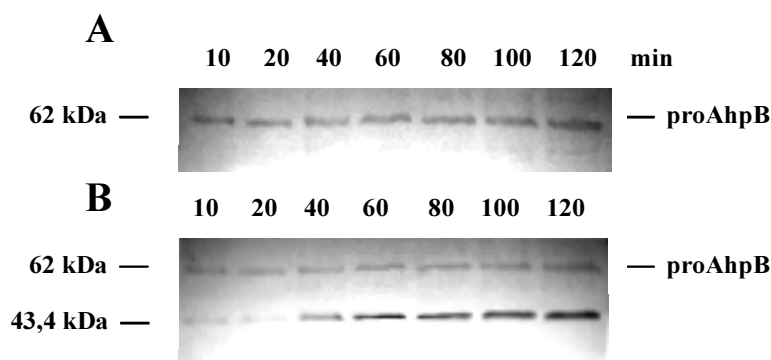


Figura 30. Inmunoensayo realizado con muestras de *A. hydrophila* AG2 obtenidas durante tiempos cortos de incubación. **A:** células. **B:** sobrenadantes.

La proteína madura no aparecía en ninguno de los dos casos por lo que se deduce que se requiere una incubación mas prolongada para que se produzca el procesamiento de las especies proteicas observadas.

Con el objeto de conocer el procesamiento de la elastasa AhpB, realizamos el análisis de los sobrenadantes de cultivos recogidos a lo largo de 86 horas. Para ello se procedió a inocular medio de cultivo fresco con un cultivo de *A. hydrophila* AG2 crecido durante toda la noche, y se recogieron muestras desde las tres horas de incubación hasta las 86 siendo procesadas como en el experimento anterior (Figura 31).

Mediante los inmunoensayos realizados con anticuerpos obtenidos frente a AhpB se pudo observar que, al igual que en el caso anterior, las células poseían proAhpB como única especie proteica, con lo que podemos suponer que no existe ningún procesamiento de proAhpB en el interior de las mismas. En los sobrenadantes analizados (Figura 31A), se pudieron identificar, sin embargo, hasta tres especies proteicas distintas: una proteína de 62 kDa (proAhpB) que aparecía en cantidad aparentemente constante hasta las 12 horas de incubación, momento a partir del cual desaparecía; un intermediario de 43,4 kDa cuya cantidad incrementa hasta las 24 horas de incubación, y a partir de ahí disminuye

gradualmente; una proteína madura de 38 kDa que aparecía a partir de las 18 horas de incubación y que iba incrementando paulatinamente a partir de ese tiempo.

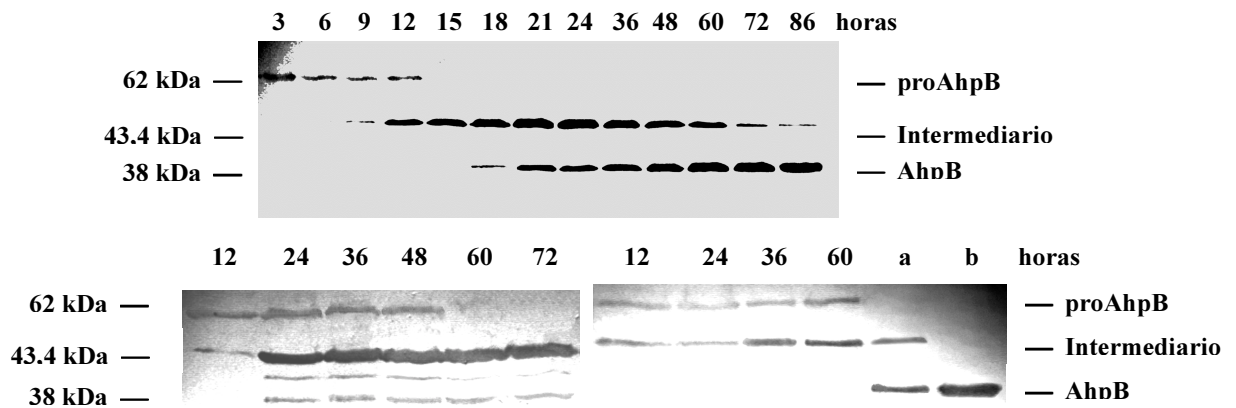


Figura 31. Inmunoensayo realizado con sobrenadantes recogidos después de incubaciones a largo tiempo. **A:** *A. hydrophila* AG2. **B:** *A. hydrophila* *ahpA::kan^r*. **C:** *A. salmonicida* subsp. *salmonicida* con el plásmido pAHE6; a: sobrenadante incubado durante 48 horas, b: sobrenadante incubado 72 horas.

Con objeto de conocer la naturaleza del intermediario detectado, las proteínas, separadas mediante SDS-PAGE, se transfirieron a una membrana de PVDF, determinándose de este modo la secuencia del extremo N-terminal de esta especie proteica de 43,4 kDa. La secuencia obtenida era idéntica a la que se había identificado en la proteína de 38 kDa. Este resultado sugiere que el intermediario sufre un procesamiento en el extremo C-terminal el cual elimina un péptido, de aproximadamente 6 kDa, originando de este modo una proteína madura de 38 kDa. Este mismo procesamiento en el extremo C-terminal se daba en la hemaglutinina/proteasa de *V. cholerae* (Häse & Finkelstein, 1991). Ambos procesamientos, N-terminal y C-terminal, tienen lugar extracelularmente como se desprende del hecho de no encontrarse ni el intermediario ni la proteína madura en el interior de las células.

Para saber si la serinproteasa AhpA podía jugar algún papel en el procesamiento de proAhpB, se tomaron muestras cada 12 horas de un cultivo de *A. hydrophila ahpA::kan^r* y se procesaron de igual manera que en casos anteriores (Figura 31B). El inmunoensayo correspondiente reveló que el intermediario de 43,4 kDa sufría una acumulación en los sobrenadantes de estos mutantes. Del mismo modo, se observa una transformación menor de este intermediario en la proteína madura. Asimismo, la proteína proAhpB se mantenía en el sobrenadante durante un periodo de tiempo superior (hasta 48 horas) que en el caso de la cepa salvaje, apreciándose por otra parte un segundo intermediario, producto probablemente de la pérdida de la proteasa AhpA en el mutante. Todo esto sugiere la participación en cierta medida de la proteasa AhpA en el procesamiento del intermediario de 43,4 kDa, y que, aunque no es necesaria para el procesamiento del propéptido, sí acelera la transición de este hacia el intermediario.

Por otra parte, dado que aparece una pequeña cantidad de proteína AhpB madura en estos sobrenadantes de *A. hydrophila ahpA::kan^r*, parte del procesamiento de proAhpB tendría lugar por la acción de otras proteasas o bien por un auto-procesamiento de la propia proteína. Un paso más en este sentido se dio al incubar, en medio LB, *A. salmonicida* subsp. *masoucida* conteniendo el plásmido pAHE6 (Figura 23), el cual incluye el gen *ahpB*. Se recogieron muestras del cultivo cada 12 horas y se procesaron como las anteriores. El inmunoensayo correspondiente reveló un procesamiento de proAhpB hasta el intermediario de 43,4 kDa (Figura 31C), aunque después de 60 horas de incubación no se apreció cantidad alguna de proteína madura en las muestras.

Sin embargo, cuando se incubó a 37°C una muestra del sobrenadante libre de células obtenido a las 48 horas, todo el intermediario de 43,4 kDa pasó a la especie proteica madura de 38 kDa después de 72 horas de incubación (Figura 31C-a y 27C-b). Estos resultados sugieren, por tanto, que el procesamiento completo de proAhpB es un mecanismo lento llevado a cabo, al menos, por la propia actividad proteica descrita, así como por la serinproteasa AhpA.

4.2.2.7. Inoculación en trucha arco iris

Con el fin de estudiar el papel de AhpB en la patogenicidad de esta bacteria, y al igual que en el caso de la AhpA, se determinó la LD₅₀ tanto para la cepa salvaje como para la mutante *A. hydrophila ahpB::kan^r* (Tabla XXX). La LD₅₀ de estos mutantes (3×10^7 UFC) sufría un incremento apreciable con respecto a la de la cepa salvaje (6×10^5 UFC), sugiriendo, por lo tanto, estos resultados que el producto del gen *ahpB* podría constituir un importante factor de virulencia para esta cepa.

Además de este incremento del orden de 2 unidades logarítmicas en la LD₅₀, la mortalidad de las truchas inoculadas con la cepa salvaje se produjo siempre dentro de los 3 primeros días post-inoculación, mientras que en el caso de las truchas inoculadas con el mutante se produjeron muertes hasta 6 días después de la infección.

Tabla XXX. Experimentos de inoculación en trucha y cálculo de la LD₅₀.

<i>Bacterias/0,1 ml</i>	<i>A. hydrophila</i> AG2		<i>A. hydrophila ahpB::kan^r</i>	
	Expt 1	Expt 2	Expt 1	Expt 2
10^9	10*	10	9	10
10^8	9	10	6	5
10^7	8	8	3	3
10^6	6	6	2	2
10^5	3	3	1	1
10^4	0	0	0	0
10^3	0	0	0	0
LD₅₀	7×10^5	6×10^5	$2,9 \times 10^7$	$3,3 \times 10^7$

* Numero de truchas muertas

Las truchas inoculadas presentaban los signos típicos de una septicemia hemorrágica con lesiones externas (distensión abdominal y ulceración de la piel) y hemorragias internas (Hernanz Moral *et al.*, 1998), sin apreciarse diferencias en cuanto a la

patología de la enfermedad entre la cepa salvaje y la mutada. Ambos tipos de microorganismos fueron recuperados de las lesiones.

4.2.2.8. Discusión

En este estudio se ha clonado y secuenciado el gen *ahpB*, procedente de la cepa patógena *A. hydrophila* AG2, que codifica para la actividad elastolítica AhpB. Basándonos en el análisis de la secuencia de aminoácidos de AhpB por comparación con otras proteínas semejantes y en los resultados obtenidos por Rivero *et al.* (1990), se deduce que esta proteína es una Zinc metaloproteasa. Además, se encontró un 52,21% de homología cuando se comparó su secuencia con la del precursor de la elastasa de *P. aeruginosa* (LasB), sugiriéndonos este resultado la posibilidad de que esta actividad proteolítica fuese también una elastasa. El porcentaje de homología con otras proteasas del género *Vibrio*, íntimamente relacionado con *Aeromonas*, también fue alto.

La proteasa AhpB se expresó eficientemente en la cepa no proteolítica *A. salmonicida* subsp. *masoucida* utilizada en este estudio cuando se clonó en el vector movilizable pJRD215, excretándose al sobrenadante del medio de cultivo. Esto nos permitió, al igual que en el caso de AhpA, determinar la actividad proteolítica sobre dos substratos diferentes, azocaseína y elastina-rojo congo, sin interferencias debidas a la presencia de otras actividades proteolíticas en los sobrenadantes del medio de cultivo a lo largo de todo el tiempo de incubación.

Los resultados obtenidos indicaban que la principal actividad proteolítica de la proteína AhpB se manifiesta sobre elastina, aunque también se puede apreciar una mínima actividad caseinolítica. Se obtuvieron resultados similares cuando se ensayó la actividad proteolítica en placas de LB suplementadas con caseína o elastina insoluble.

El mutante obtenido por intercambio alélico para la cepa AG2 presentaba una capacidad elastolítica reducida en un 90%, mientras que la actividad caseinolítica se

reducía tan solo en un 20%. La inoculación intraperitoneal realizada con el mutante isogénico *A. hydrophila ahpB::kan^r* en trucha tenía efectos claros en la virulencia de *A. hydrophila* AG2, produciéndose un incremento del orden de dos unidades logarítmicas en la LD₅₀. Estos resultados confirman que la actividad elastolítica de *A. hydrophila* AG2 constituye un factor de virulencia en este microorganismo, al igual que ocurre con la elastasa de otras especies como *P. aeruginosa* (Homma *et al.*, 1975). Por otra parte, Chakraborty *et al.* (1987), realizaron un estudio similar para el gen de la aerolisina (*aer*), encontrando que los mutantes isogénicos, obtenidos mediante inactivación por inserción, presentaban un incremento de la LD₅₀, con respecto a la cepa salvaje, de 7×10^7 a 8×10^8 . Estos autores sugieren que la aerolisina desempeña, por lo tanto, un importante papel en la virulencia de *A. hydrophila*, requiriéndose para la iniciación del daño tisular y la septicemia subsiguiente.

El procesamiento de AhpB se lleva a cabo mediante la eliminación de una secuencia señal en el interior de las células cuando la preproAhpB pasa del citoplasma al espacio periplásmico de la bacteria. Posteriormente, y ya en el exterior de las células, se produce la eliminación del propéptido para dar lugar a una proteína intermediaria con actividad elastolítica. Este intermediario sufre finalmente un procesamiento en su extremo C-terminal, debido parcialmente a la actividad de la serinproteasa AhpA y probablemente mediante un autoprocesamiento lento, dando lugar a la proteína madura.

5. CONCLUSIONES

PRIMERA.- La amplificación del gen *lip* mediante PCR constituye un método rápido, específico y económico para la identificación de *Aeromonas hydrophila* perteneciente al HG 1, ya que únicamente se obtiene un resultado positivo para esta prueba en los aislados pertenecientes a este grupo.

SEGUNDA.- Mediante la amplificación del gen *aroA*, que forma parte de una ruta metabólica universal, se han podido identificar todas las especies del género *Aeromonas*, evitando de esta manera una identificación errónea y la confusión con géneros que, como *Vibrio*, se encuentran profundamente relacionados con las aeromonadaceas. El posterior análisis por RFLP de los fragmentos amplificados proporciona una herramienta orientativa para la identificación al nivel de especie de los microorganismos ensayados.

TERCERA.- Se ha clonado, secuenciado e inactivado por inserción el gen *ahpA* de *A. hydrophila* AG2 que codifica para la proteasa AhpA, la cual se excreta al medio de cultivo tras la eliminación del péptido señal. Esta proteasa mostró una gran homología con la proteasa AspA de *A. salmonicida* y, como ella, no tiene efecto en la virulencia de esta

cepa, aunque interviene, en cierta medida, en el procesamiento de otros productos extracelulares.

CUARTA.- Se ha clonado, secuenciado e inactivado por inserción el gen *ahpB* de *A. hydrophila* AG2 que codifica para la proteasa AhpB. Esta proteasa posee la práctica totalidad de la actividad elastolítica de *A. hydrophila* AG2, y constituye un factor de virulencia de esta cepa a tener en cuenta, ya que la mutación isogénica del gen *ahpB*, que codifica para este producto extracelular, trajo consigo un aumento de la LD₅₀ del orden de dos unidades logarítmicas.

QUINTA.- El gen *ahpB* se expresa como una preproenzima que se procesa, extracelularmente, de la siguiente forma: 1, pérdida del extremo amino (19 aminoácidos) durante su transporte al espacio periplásmico; 2, autoprosesamiento del propéptido a un intermediario de 43,4 kDa; 3, procesamiento de este intermediario a la proteína madura. En este último paso interviene la serinproteasa AhpA y, de forma muy lenta, el intermediario también se autoprosesa.

7. BIBLIOGRAFÍA

- A**BBOT, S.L., SELI, L.S., CATINO, M., HARTLEY, M.A. & JANDA, J.M. (1998). Misidentification of unusual *Aeromonas* species as members of the genus *Vibrio*: a continuing problem. *J. Clin. Microbiol.*, **36**: 1103-1104.
- ABRUTYN, E. (1988). Hospital-associated infection from leeches. *Ann. Intern. Med.*, **109**:356-358.
- ACRES, S.D., ISAACSON, L.A., BABIUK, L.A. & KAPITANY, R.A. (1979). Immunization of calves against enterotoxigenic colibacillosis by vaccinating dams with purified K99 antigen and whole cell bacterins. *Infect. Immun.*, **25**: 121-126.
- AGUILAR, A., MERINO, S., RUBIRES, X. & TOMÁS, J.M. (1997). Influence of osmolarity on lipopolysaccharides and virulence of *Aeromonas hydrophila* serotype O:34 strains grown at 37 degrees C. *Infect. Immun.*, **65**: 1245-1250.
- AHMED, A., HAFIZ, S., ZAFAR, A., SHAMSI, T., RIZVI, J. & SYED, S. (1997). Isolation and identification of *Aeromonas* species from human stools. *J. Pak. Med. Assoc.*, **47**: 305-308.
- AKAN, M., EYIGOR, A. & DIKER, K.S. (1998). Motile aeromonads in the feces and carcasses of broiler chickens in Turkey. *J. Food Prot.*, **61**: 113-115.
- ALI, A., CARNAHAN, M., ALTWEGG, J., LÜTHY-HOTTENSTEIN & JOSEPH, S.W. (1996). *Aeromonas bestiarum* sp. nov. (formerly genomospecies DNA group 2 *A. hydrophila*), a new species isolated from non-human sources. *Med. Microbiol. Lett.*, **5**: 156-165.

- ALLAN, B.J. & STEVENSON, R.M. (1981). Extracellular virulence factors of *Aeromonas hydrophila* in fish infections. *Can. J. Microbiol.*, **27**: 1114-1122.
- ALLEN, D.A., AUSTIN, B. & COLWELL, R.R. (1983). *Aeromonas media*, a new species isolated from river water. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, **33**: 599-604.
- AL-MASHAT, R.R. & TAYLOR, D.J. (1983). Bacteria in enteric lesions of cattle. *Vet. Rec.*, **112**: 5-10.
- AL-MASHAT, R.R. & TAYLOR, D.J. (1986). Bacteria in enteric lesions of horses. *Vet. Rec.*, **118**: 453-458.
- ALTWEGG, M., ALTWEGG-BISSIG, A., DEMARTA, R., PEDUZZI, M. REEVES, W. & SWAMINATHAN, B. (1988). Comparison of four typing methods for *Aeromonas* species. *J. Diarrhoeal Dis. Res.*, **6**: 88-94.
- ALTWEGG, M., REEVES, M.W., ALTWEGG-BISSING, R. & BRENNER, D.J. (1991). Multilocus enzyme analysis of the genus *Aeromonas* and its use for species identification. *Zentralbl. Bakteriol.*, **275**: 28-45.
- ANANTHAN, S. & ALAVANDI, S.V. (1999). Biochemical characteristics and secretory activity of *Aeromonas* species isolated from children with gastroenteritis in Chennai. *Indian J. Med. Res.*, **109**: 136-140.
- ANDRE-FONTAINE, G., MONFORT, P., BUGGIN-DAUBIE, M., FILLONEAU, C. & GANIERE, J.P. (1995). Fatal disease mimicking leptosperosis in a dog, caused by *Aeromonas hydrophila*. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.*, **18**: 69-72.
- ANDRUS, C. & PAYNE, S.M. (1982). *Abstr. Annu. Meet. Am. Soc. Microbiol., CCI, II* **11**, p. 89.
- ANGUITA, J., RODRÍGUEZ APARICIO, L.B. & NAHARRO, G. (1993). Purification, gene cloning, amino acid sequence analysis, and expression of an extracellular lipase from an *Aeromonas hydrophila* human isolate. *Appl. Environ. Microbiol.*, **59**: 2411-2417.
- AOKI, T. & 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.
- AOKI, T., MITOMA, Y. & CROSA, J.H. (1986). The characterization of a conjugative R-plasmid isolated from *Aeromonas salmonicida*. *Plasmid*, **16**: 213-218.

- ASAO, T., KINOSHITA, S., KOZAKI, T., UEMURA, T. & SAKAGUCHI, G. (1984). Purification and some properties of *Aeromonas hydrophila* hemolysin. *Infect. Immun.*, **46**: 122-127.
- ASAO, T., KOZAKI, T., KATO, K., KINOSHITA, S., OTSU, K., UEMURA, T. & SAKAGUCHI, G. (1986). Purification and Characterization of an *Aeromonas hydrophila* hemolysin. *J. Clin. Microbiol.*, **24**: 228-232.
- ATKINSON, H.M. & TRUST, T.J. (1980). Hemagglutination properties and adherence ability of *Aeromonas hydrophila*. *Infect. Immun.*, **27**: 938-946.
- AUSTIN, B., AUSTIN, D.A., DALSGAARD, I., GUDMUNSDOTTIR, B.K., HOIE, S., THORNTON, J.M., LARSEN, J.L., O'HICI, B. & POWELL, R. (1998). Characterization of atypical *Aeromonas salmonicida* by different methods. *Syst. Appl. Microbiol.*, **21**: 50-64.
- B**ARGHOUTH, S., YOUNG, R. OLSON, M.O.J., ARCENEUX, J.E.L., CLEM, L.W. & BYERS, B.R. (1989). Amonabactin, a novel tryptophan- or phenylalanine-containing phenolate siderophore in *Aeromonas hydrophila*. *J. Bacteriol.*, **171**: 1811-1816.
- BARGHOUTH, S., PAYNE, S.M., ARCENEUX, J.E.L. & BYERS, B.R. (1991). Cloning, mutagenesis, and nucleotide sequence of a siderophore biosynthetic gene (*amoA*) from *Aeromonas hydrophila*. *J. Bacteriol.*, **173**: 5121-5128.
- BAYER, A.S., COULTER, S.N., STOVER, C.K. & SCHWAN, W.R. (1999). Impact of the high-affinity proline permease gene (*putP*) on the virulence of *Staphylococcus aureus* in experimental endocarditis. *Infect. Immun.*, **67**: 740-744.
- BEIJERINCK, M.W. (1900). Schwefelwasser Stoffbildung in den Stadtgraben und Aufstellung der Gattung *Aerobacter*. *Zbl. Bakteriol.*, II. Abt., **7**: 193-206.
- BELLAND, R.J. & 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. & TRUST, T.J. (1987). Cloning of the gene for the surface protein array of *Aeromonas salmonicida* and evidence linking loss of expression with genetic deletion. *J. Bacteriol.*, **169**: 4086-4091.

- BELLAND, R.J. & 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.
- BERGEY, D.H., HARRISON, F.C., BREED, R.S., HAMMER, B.W. & HUNTOON, F.M.** (eds.) (1923) Bergey's manual of determinative bacteriology. Williams & Wilkins Co., Baltimore, MD, 442 pp.
- BERGEY, D.H., HARRISON, F.C., BREED, R.S., HAMMER, B.W. & HUNTOON, F.M.** (eds.) (1934) Bergey's manual of determinative bacteriology. (fourth edition) Williams & Wilkins Co., Baltimore, MD, 462 pp.
- BERNHEIMER, A.W. & AVIGAD, L.S.** (1974). Partial characterization of aerolysin, a lytic exotoxin from *Aeromonas hydrophila*. *Infect. Immun.*, **9**: 1016-1021.
- BERRY, A.M. & PATON, J.C.** (2000). Additive attenuation of virulence of *Streptococcus pneumoniae* by mutation of the genes encoding pneumolysin and other putative pneumococcal virulence proteins. *Infect. Immun.*, **68**: 133-140.
- BEVER, R.A. & IGLEWSKI, B.H.** (1988). Molecular characterization and nucleotide sequence of the *Pseudomonas aeruginosa* elastase structural gene. *J. Bacteriol.*, **170**: 4309-4314.
- BHAKDI, S. & TRANUM-JENSEN, J.** (1988). Damage to cell membranes by pore-forming bacterial cytolytins. *Prog. Allergy*, **40**: 1-43.
- BHAKHOO, M. & HERBERT, R.A.** (1979). The effects of temperature on the fatty acid and phospholipid composition of four obligated psychrophilic *Vibrio* spp. *Arch. Microbiol.*, **121**: 121-127.
- BJORN, M.J., SOKOL, P.A. & IGLEWSKY, B.H.** (1979). Influence of iron on yields of extracellular products in *Pseudomonas aeruginosa* cultures. *J. Bacteriol.*, **138**: 193-200.
- BLAIR, J.E., WOO-MING, M.A. & McGUIRE, P.K.** (1999). *Aeromonas hydrophila* bacteremia acquired from an infected swimming pool. *Clin. Infect. Dis.*, **28**: 1336-1337.
- BOLIVAR, F., RODRÍGUEZ, R., GREENE, P.J., BETLACK, M.C., HEYNECKER, H., BOYER, W., CRORA, J.H. & FALKOW, S.** (1977). Construction of new cloning vehicles. II. A multiple cloning system. *Gene*, **2**: 95-113.
- BORRELL, N., ACINAS, S.G., FIGUERAS, M.J. & MARTÍNEZ-MURCIA, A.J.** (1997). Identification of *Aeromonas* clinical isolates by restriction fragment length polymorphism of PCR-amplified 16S rRNA genes. *J. Clin. Microbiol.*, **35**: 1671-1674.

- BRADFORD, M.N.** (1976). A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye-binding. *Anal. Biochem.*, **72**: 248-254.
- BRADLEY, D.E.** (1989). Conjugation system of IncC plasmid RA1, and the interaction of RA1 pili with specific RNA phage C-1. *Res. Microbiol. (Netherlands)*, **140**: 439-446.
- BRICKNELL, I.R., BOWDEN, T.J., LOMAX, J. & ELLIS, E.** (1997). Antibody response and protection of Atlantic salmon (*Salmo salar*) immunised with an extracellular polysaccharide of *Aeromonas salmonicida*. *Fish Shellfish Immunol.*, **7**: 1-16.
- BRUMLIK, M.J., Van der GOOT, F.G., WONG, K.R. & BUCKLEY, J.T.** (1997). The disulfide bond in the *Aeromonas hydrophila* lipase/acyltransferase stabilizes the structure but is not required for secretion or activity. *J. Bacteriol.*, **179**: 3116-3121.
- BUCKLEY, J.T., HALASA, L.N., LUND, K.D. & MacINTYRE, S.** (1981). Purification and some properties of the hemolytic toxin aerolysin. *Can. J. Biochem.*, **59**: 430-435.
- BUCKLEY, J.T. & HOWARD, S.P.** (1999). The cytotoxic enterotoxin of *Aeromonas hydrophila* is aerolysin. *Infect. Immun.*, **67** (letter to the editor): 466-467.
- BUNCIC, S. & PANIN, J.** (1994). Presence of *Aeromonas hydrophila* in slaughtered animals. *Int. J. Food Microbiol.*, **23**: 221-225.
- BURKE, V., COOPER, M., ROBINSON, J., GRACEY, M., LESMANA, M., ECHEVARRIA, P. & JANDA, J.M.** (1984). Hemagglutination patterns of *Aeromonas* spp. in relation to biotype and source. *J. Clin. Microbiol.*, **19**: 39-43.
- BUTTKE, T.M. & CUCHENS, M.A.** (1984). Inhibition of lymphocyte proliferation by free fatty acids. II. Toxicity of stearic acid towards phytohaemagglutinin-activated T cells. *Immun.*, **53**: 507-517.
- C**ARNAHAN, A.M., MARI, M.A., FANNING, G.R., PASS, M.A. & JOSEPH, S.W. (1989). Characterization of *Aeromonas schubertii* strains recently isolated from traumatic wound infections. *J. Clin. Microbiol.*, **27**: 1826-1830.
- CARNAHAN, A.M., BEHRAM, S. & JOSEPH, S.W.** (1991a). Aerokey II: a flexible key for identifying clinical *Aeromonas* species. *J. Clin. Microbiol.*, **29**: 2843-2849.

- CARNAHAN, A.M., CHKRABORTY, T., FANNING, G.R., VERMA, D., ALI, A., JANDA, J.M. & 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. & JOSEPH, S.W. (1991c). *Aeromonas jandaei* (formerly genospecies DNA group 9 *A. sobria*), a new sucrose-negative species isolated from clinical specimens. *J. Clin. Microbiol.*, **29**: 560-564.
- CARNAHAN, A.M. & ALTWEGG, M. (1996). Taxonomy, p. 1-38. In B. Austin, M. Altwegg, P.J. Gosling, and S. Joseph (ed.), *The genus Aeromonas*. John Wiley & Sons, Chichester, United Kingdom.
- CARRELO, A., SILBURN, K.A., BUDDEN, J.R. & CHANG, B.J. (1988). Adhesion of clinical and environmental isolates to HEp-2 cells. *J. Med. Microbiol.*, **26**: 19-27.
- CASELITZ, F. H., HOFFMAN, A. & MARTINEZ-SILVA, R. (1957). Unbeschreibener Keim der Familie *Pseudomonadaceae* als Infektionserreger. *Zbl. Bakteriol. Abt. I. Orig.*, **170**: 564-570.
- CASELITZ, F.H. & GÜNTER, R. (1960). Häemolysin studien mit *Aeromonas* stämmen. *Zentralbl. Bakteriol. Parasitenkd. Infektionskr. Hyg. Abt. 1 Orig.*, **180**: 30-38.
- CHAKRABORTY, T., MONTENEGRO, M.A., SANYAL, S.C., HELMUTH, R., BULLING, E. & TIMMIS, K.N. (1984). Cloning of enterotoxin gene from *Aeromonas hydrophila* provides conclusive evidence of production of a cytotoxic enterotoxin. *Infect. Immun.*, **46**: 435-441.
- CHAKRABORTY, T., HUHLE, B., BERGBAUER, H. & GOEBEL, W. (1986). Cloning, expression, and mapping of the *Aeromonas hydrophila* aerolysin gene determinant in *Escherichia coli* K-12. *J. Bacteriol.*, **167**: 368-374.
- CHAKRABORTY, T., HUHLE, B., HOF, H., BERGBAUER, H. & GOEBEL, W. (1987). Marker exchange mutagenesis of the aerolysin determinant in *Aeromonas hydrophila* demonstrates the role of aerolysin in *A. hydrophila*-associated systemic infections. *Infect. Immun.*, **55**: 2274-2280.
- CHAKRABORTY, T., SCHMID, A., NOTERMANS, S. & BENZ, R. (1990). Aerolysin of *Aeromonas sobria*: Evidence for formation of ion-permeable channels and comparison with alpha-toxin of *Staphylococcus aureus*. *Infect. Immun.*, **58**: 2127-2132.
- CHANG, B.J. & BOLTON, S.M. (1987). Plasmids and resistance to antimicrobial agents in *Aeromonas sobria* and *Aeromonas hydrophila* clinical isolates. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **31**: 1281-1282.

- CHART, H. & TRUST, T.J.** (1983). Acquisition of iron by *Aeromonas salmonicida*. *J. Bacteriol.*, **156**: 758-764.
- CHAUDHURY, A., NATH, G., SHUKLA, B.N. & SANYAL, S.C.** (1996). Biochemical characterization, enteropathogenicity and antimicrobial resistance plasmids of clinical and environmental *Aeromonas* isolates. *J. Med. Microbiol.*, **44**: 434-437.
- CHENG, J.C. SHAO, C.P. & HOR, L.I.** (1996). Cloning and nucleotide sequencing of the protease gene of *Vibrio vulnificus*. *Gene*, **183**: 255-257.
- CHESTER, F.C.** (1901). Manual of determinative bacteriology. The MacMillan Co., NY.
- CHOPRA, A.K., HOUSTON, C.W., GENAUX, C.T., DIXON, J.D. & KUROSKY, A.** (1986). Evidence for production of an enterotoxin and cholera toxin cross-reactive factor by *Aeromonas hydrophila*. *J. Bacteriol.*, **24**: 661-664.
- CHOPRA, A.K., HOUSTON, C.W., PETERSON, J.W. & 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. & HOUSTON, C.W.** (1999). The cytotoxic enterotoxin of *Aeromonas hydrophila* is aerolysin. *Infect. Immun.*, **67** (author reply's to a letter to the editor): 466-467.
- CHU, S., CAVAGNAC, S., FEUTRIER, J., PHIPPS, B.M., KOSTRZYNSKA, M., KAY, W.W. & TRUST, T.J.** (1991). Structure of the tetragonal surface virulence array protein and gene of *Aeromonas salmonicida*. *J. Biol. Chem.*, **266**: 15258-15265.
- CICMANEC, J.F. & HOLDER, I.A.** (1979). Growth of *Pseudomonas aeruginosa* in normal and burned skin extract role of extracellular proteases. *Infect. Immun.*, **25**: 477-483.
- CIUFECU, C., NACESCU, N., ISRAIL, A. & CEDRU, C.** (1990). Isolation of motile aeromonads from foods of animal origin. *Arch. Roum. Pathol. Exp. Microbiol.*, **49**: 119-129.
- CLAYTON, C., KLEANTHOS, K. & TABAQCHALI, S.** (1991). Detection and identification of *Helicobacter pylori* by the polymerase chain reaction. *J. Clin. Pathol.*, **44**: 515-516.
- COLEMAN, G. & WHITBY, P.W.** (1993). A comparison of the amino acid sequence of the serine protease of the fish pathogen *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida* with those of subtilisin-type enzymes relative to their substrate-binding sites. *J. Gen. Microbiol.*, **139**: 245-249.

- COLLINS, M.D., MARTÍNEZ-MURCIA, A.J. & 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. Syst. Bacteriol.*, **43**: 855-856.
- COLWELL, R.R., MacDONELL, M.T. & De LEY, J.** (1986). Proposal to recognize the family *Aeromonadaceae* fam.nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, **36**: 473-477.
- COTTER, P.D., EMERSON, N., GAHAN, C.G. & HILL, C.** (1999). Identification and disruption of *lisRK*, a genetic locus encoding a two-component signal transduction system involved in stress tolerance and virulence in *Listeria monocytogenes*. *J. Bacteriol.*, **181**: 6840-6843.
- CROSA, J.H.** (1980). A plasmid associated with virulence in the marine fish pathogen *Vibrio anguillarum* specifies an iron-sequestering system. *Nature*, **284**: 566-568.
- CROSA, J.** (1989). Genetics and molecular biology of siderophore-mediated iron transport in bacteria. *Microbiol. Rev.*, **53**: 517-530.
- CUNNINGHAM, A.A., LANGTON, T.E., BENNETT, P.M., LEWIN, J.F., DRURY, S.E., GOUGH, R.E. MacGREGOR, S.K.** (1996). Pathological and microbiological findings from incidents of unusual mortality of the common frog (*Rana temporaria*). *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.*, **351**: 1539-1557.
- D****AHLE, H.K.** (1971). The purification and some properties of two *Aeromonas* proteinases. *Acta pathologica microbiologica Scandinava Section B*, **79**: 726-738.
- DALSGAARD, I., GUDMUNSDOTTIR, B.K., HELGASON, S., HOIE, S., THORESEN, O.F., WICHARDT, U.P. & WIKLUND, T.** (1998). Identification of atypical *Aeromonas salmonicida*: inter-laboratory evaluation and harmonization of methods. *J. Appl. Microbiol.*, **84**: 999-1006.
- DAVID, V.A., DEUTCH, A.H., SLOMA, A., PAWLYK, D., ALLY, A. & DURHAM, D.R.** (1992). Cloning, sequencing and expression of the gene encoding the extracellular neutral protease, vibriolysin, of *Vibrio proteolyticus*. *Gene*, **112**: 107-112.
- DAVIDSON, J.M.** (1987). Connective Tissue Disease: Molecular Pathology of the Extracellular Matrix, p. 423. In J. Uitto and A.J. Perejda (ed.), Dekker, New York.
- DAVIN-REGLI, A., BOLLET, C., CHAMOREY, E., COLONNA D'ISTRIA, V. & CREMIEUX, A.** (1998). A cluster of cases of infections due to *Aeromonas*

- hydrophila* revealed by combined RAPD and ERIC-PCR. *J. Med. Microbiol.*, **47**: 499-504.
- DAVISON, J., HEUSTERPREUTE, M., CHEVALIER, N., HA-THI, V. & BRUNEL, F.** (1987). Vectors with restriction site banks. V. pJRD215, a wide host range cosmid vector with multiple cloning sites. *Gene*, **51**: 275-280.
- DENIS, F. & VEILLET-PONCET, L.** (1984). Demonstration of a proteolytic activity on intracellular origin in *Aeromonas hydrophila* LP 50. *Can. J. Microbiol.*, **30**: 1190-1192.
- DIENER, M., EGLEME, C. & RUMMEL, W.** (1991). Phospholipase C-induced secretion and its interaction with carbachol in the rat colonic mucosa. *Eur. J. Pharmacol.*, **299**: 267-276.
- DOIG, P., EMÖDY, L. & TRUST, T.J.** (1992). Binding of laminin and fibronectin by the major trypsin-resistant structural domain of the crystalline virulence surface array protein of *Aeromonas salmonicida*. *J. Biol. Chem.*, **267**: 43-49.
- DOOLEY, J.S.G., LALLIER, R. & 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. & TRUST, T.J.** (1988). Isolation and biochemical characterization of the S-layer protein from pathogenic *Aeromonas hydrophila* strain. *J. Bacteriol.*, **170**: 2631-2638.
- DOOLEY, J.S.G. & 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.
- DOOLEY, J.S.G., ENGELHARDT, H., BAUMEISTER, W., KAY, W.W. & TRUST, T.J.** (1989). Three-dimensional structure of the surface layer from the fish pathogen *Aeromonas salmonicida*. *J. Bacteriol.*, **171**: 190-197.
- DOWER, W.J., MILLER, J.F. & RAGSDALE, C.W.** (1988). High efficiency transformation of *E. coli* by high voltage electroporation. *Nucleic Acids Res.*, **16**: 6127-6145.
- DRINAN, E.M. & SMITH, P.R.** (1985). Histopathology of a mutant *Aeromonas salmonicida* infection in Atlantic salmon (*Salmo salar*), p. 79-83. In A.E. Ellis (ed.), Fish and shellfish pathology. Academic Press Ltd., London, United Kingdom.

- E**GGSET, G., BJORNSDOTTIR, R., LEIFSON, R.M., ARNESEN, J.A., COUCHERON, D.H. & JORGENSEN, T.O. (1994). Extracellular glycerophospholipid: cholesterol acyltransferase from *Aeromonas salmonicida*: activation by serine protease. *J. Fish Dis.*, **17**: 17-29.
- ELLIS, A.E. (1997). The extracellular toxins of *Aeromonas salmonicida* ssp. *salmonicida*, p. 248-268. In E.-M. Bernoth, A.E. Ellis, P.J. Midtlyng, G. Olivier, and P. Smith (ed.), *Furunculosis. Multidisciplinary fish disease research*. Academic Press Ltd., London, United Kingdom.
- EMÖDY, L., HEESEMANN, J., WOLF-WATZ, H., SKURNIK, M., KAPPERUD, G., O'TOOLE, P. & WADSTRÖM, T. (1989). Binding of collagen by *Yersinia enterocolitica* and *Yersinia pseudotuberculosis*: evidence for *yopA*-mediated and chromosomally encoded mechanisms. *J. Bacteriol.*, **171**: 6674-6679.
- ENCINAS, J.P., GONZÁLEZ, C.J., GARCÍA-LÓPEZ, M.L. & OTERO, A. (1999). Numbers and species of motile aeromonads during the manufacture of naturally contaminated Spanish fermented sausages (longaniza and chorizo). *J. Food Prot.*, **62**: 1045-1049.
- ERNST, P. (1890). Die Frühjahrsseuche der Frösche und ihre Abhängigkeit von Temperatur-inflüsse. *Beitr. Pathol. Anat.* **8**: 203-220.
- ESTEREBADI, A.H., ENTESSAR, F. & KHAN, M.A. (1973). Isolation and identification of *Aeromonas hydrophila* from an outbreak of haemorrhagic septicemia in snakes. *Can. J. Comp. Med. Vet. Sci.*, **37**: 418-420.
- ESTEVE, C., GUTIERREZ, M.C. & VENTOSA, A. (1995). *Aeromonas encheleia* sp. nov., isolated from European eels. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, **45**: 462-466.
- F**ANNING, G.R., HICKMAN-BRENNER, F.W., FARMER III, J.J. & BRENNER, D.J. (1985). DNA relatedness and phenotypic analysis of the genus *Aeromonas*, *Abstr. 85th Annu. Meet. Am. Soc. Microbiol.*, abstr. C-116, p. 319.
- FERGUSON, M.R., XU, X.-J., HOUSTON, C.W., PETERSON, J.W., COPPENHAVER, D.H., POPOV, V.L. & CHOPRA, A.K. (1997). Hyperproduction, purification, and mechanism of action of the cytotoxic enterotoxin produced by *Aeromonas hydrophila*. *Infect. Immun.*, **65**: 4299-4308.

- FERNÁNDEZ, A.I., FERNÁNDEZ, A.F., PÉREZ, M.J., NIETO, T.P. & ELLIS, A.E. (1998). Siderophore production by *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida*. Lack of strain specificity. *Dis. Aquat. Organ.*, **33**: 87-92.
- FERNÁNDEZ-GONZÁLEZ, C., CADENAS, R.F., NOIROT-GROS, M.F., MARTÍN, J.F. & GIL, J.A. (1994). Characterization of a region of plasmid pBL1 of *Brevibacterium lactofermentum* involved in replication via the rolling circle model. *J. Bacteriol.*, **176**: 3154-3161.
- FIGURA, N. & GUGLIELMETTI, P. (1987). Differentiation of motile and mesophilic *Aeromonas* strains into species by testing for a CAMP-like factor. *J. Clin. Microbiol.*, **25**: 1341-1342.
- FIorentini, C., Barbieri, E., Falzano, L., Matarrese, P., Baffone, W., Pianetti, A., Katouli, M., Kuhn, I., Mollby, R., Bruscolini, F., Casiere, A. & Donelli, G. (1998). Occurrence, diversity and pathogenicity of mesophilic *Aeromonas* in estuarine waters of the Italian coast of the Adriatic Sea. *J. Appl. Microbiol.*, **85**: 501-511.
- Freter, R. (1978). Association of enterotoxigenic bacteria with the mucosa of the small intestine: mechanisms and pathogenic implications, p. 155-170. In O. Ochterlony, J. Holmgren, J. Craig, and D. Barua (ed.), *Cholera and related diarrhoeas*. S. Karger, Basel.
- Fukushima, J., Yamamoto, S., Morihara, K., Atsumi, Y., Takeuchi, H., Kawamoto, S. & Okuda, K. (1989). Structural gene and complete amino acid sequence of *Pseudomonas aeruginosa* IFO 3455 elastase. *J. Bacteriol.*, **171**: 1698-1704.
- Funada, H. & Matsuda, T. (1997). *Aeromonas* bacteremia in patients with hematologic diseases. *Intern. Med.*, **36**: 171-174.
- Fyfe, L., Finley, A., Coleman, G. & Munro, A.L.S. (1986). A study of the pathological effect of isolated *Aeromonas salmonicida* extracellular protease on Atlantic salmon, *Salmo salar* L. *J. Fish Dis.*, **9**: 403-409.
- Fyfe, L., Coleman, G. & Munro, A.L.S. (1987). Identification of major common extracellular proteins secreted by *Aeromonas salmonicida* strains isolated from diseased fish. *Appl. Environ. Microbiol.*, **53**: 722-726.
- G**AMBELLO, M.J. & IGLEWSKI, B.H. (1991). Cloning and characterization of the *Pseudomonas aeruginosa lasR* gene, a transcriptional activator of elastase expression.

- J. Bacteriol.*, **173**: 3000-3009.
- GARCÍA-LÓPEZ, M.L., OTERO, A., GARCÍA-FERNÁNDEZ, M.C. Y SANTOS, J.A.** (1993). Incidencia, conducta y control de *Aeromonas hydrophila* en carne y productos de uso diario. *Microbiología*, **9 Spec. No.:** 49-56.
- GAYDOS, C.A., QUINN, T.C. & EIDEN, J.J.** (1992). Identification of *Chlamydia pneumoniae* by DNA amplification of the 16S rRNA gene. *J. Clin. Microbiol.*, **30**: 796-800.
- GARDUÑO, R.A., PHIPPS, B.M. & KAY, W.W.** (1994). Physiological consequences of the S-layer of *Aeromonas salmonicida* in relation to growth, temperature, and outer membrane permeation. *Can. J. Microbiol.*, **40**: 622-629.
- GARDUÑO, R.A., PHIPPS, B.M. & KAY, W.W.** (1995). Physical and functional S-layer reconstitution in *Aeromonas salmonicida*. *J. Bacteriol.*, **177**: 2684-2694.
- GARLAND, W.J. & BUCKLEY, J.Y.** (1988). The cytolytic toxin aerolysin must aggregate to disrupt erythrocytes, and aggregation is stimulated by human glycophorin. *Infect. Immun.*, **56**: 1249-1253.
- GAVRIEL, A.A., LANDRE, J.P. & LAMB, A.J.** (1998). Incidence of mesophilic *Aeromonas* within a public drinking water supply in north-east Scotland. *J. Appl. Microbiol.*, **84**: 383-392.
- GHENGHESH, K.S., ABEID, S.S., JABER, M.M. & BEN-TAHER, S.A.** (1999). Isolation and haemolytic activity of *Aeromonas* species from domestic dogs and cats. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.*, **22**: 175-179.
- GOLDBERG, J.B. & OHMAN, D.E.** (1987). Cloning and transcriptional regulation of the elastase *lasA* gene in mucoid and nonmucoid *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.*, **169**: 1349-1351.
- GORDEN, R.W., HAZEN, T.C., ESCH, G.W. & FLIERSMANS, C.B.** (1979). Isolation of *Aeromonas hydrophila* from the American alligator, *Alligator mississippiensis*. *J. Wildl. Dis.*, **15**: 239-243.
- GRAY, L. & KREGER, A.** (1979). Microscopic characterization of rabbit lung damage produced by *Pseudomonas aeruginosa* proteases. *Infect. Immun.*, **23**: 150-159.
- GRAY, S.J., STICKLER, D.J. & BRYANT, T.N.** (1990). The incidence of virulence factors in mesophilic *Aeromonas* species isolated from farm animals and their environment. *Epidemiol. Infect.*, **105**: 277-284.

- GRIFFITHS, S. & LYNCH, W.H.** (1990). Characterization of *Aeromonas salmonicida* variants with altered cell surfaces and their use in studying surface protein assembly. *Arch. Microbiol.*, **154**: 308-312.
- GUIMARAES, M.S., NEVES, M.S. & NUNES, M.P.** (1996). Prevention of suicide phenomenon in aeromonads. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.*, **15**: 420-422.
- H****AMMER, B.** (1917). Fishiness in evaporated milk. *Res. Bull. Iowa Agricult. Exper. Sta.*, **38**: 233-246.
- HANDFIELD, M., SIMARD, P., COUILLARD, M. & LETARTE, R.** (1996). *Aeromonas hydrophila* isolated from food and drinking water: hemagglutination, hemolysis, and cytotoxicity for a human intestinal cell line (HT- 29). *Appl. Environ. Microbiol.*, **62**: 3459-3461.
- HANAHAH, D.** (1983). Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.*, **166**: 557-580.
- HÄNNINEN, M.L.** (1993). Occurrence of *Aeromonas* spp. in samples of ground meat and chicken. *Int. J. Food Microbiol.*, **18**: 339-342.
- HÄNNINEN, M.L., SALMI, S., MATTILA, L., TAIPALINEN, R. & SIITONEN, A.** (1995). Association of *Aeromonas* spp. with travellers' diarrhoea in Finland. *J. Med. Microbiol.*, **42**: 26-31.
- HÄNNINEN, M.L. & SIITONEN, A.** (1995). Distribution of *Aeromonas* phenospecies and genospecies among strains isolated from water, foods or from human clinical samples. *Epidemiol. Infect.*, **115**: 39-50.
- HÄNNINEN, M.L. & HIRVELA-KOSKI, V.** (1997). Molecular and phenotypic methods for the characterization of atypical *Aeromonas salmonicida*. *Vet. Microbiol.*, **56**: 147-158.
- HÄNNINEN, M.L., OIVANEN, P. & HIRVELA-KOSKI, V.** (1997). *Aeromonas* species in fish, fish-eggs, shrimp and freshwater. *Int. J. Food microbiol.*, **34**: 17-26.
- HARWOOD, J.** (1989). The versatility of lipases for industrial uses. *Trends Biochem. Sci.*, **14**: 125-126.
- HASAN J.A., MACALUSO P., CARNAHAN A.M. & JOSEPH S.W.** (1992). Elastolytic activity among *Aeromonas* spp. using a modified bilayer plate assay. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.*, **15**: 201-206.

- HÄSE, C.C. & FINKELSTEIN, R.A. (1991). Cloning and nucleotide sequence of the *Vibrio cholerae* hemagglutinin/protease (HA/protease) gene and construction of an HA/protease-negative strain. *J. Bacteriol.*, **173**: 3311-3317.
- HATHCOCK, T.L., SCHUMACHER, J., WRIGHT, J.C. & STRINGFELLOW, J. (1999). The prevalence of *Aeromonas* species in feces of horses with diarrhea. *J. Vet. Intern. Med.*, **13**: 357-360.
- HAVELAAR, A.H., SCHETS, F.M., Van SILFHOUT, A., JANSEN, W.H., WIETEN, G. & Van der KOOIJ, D. (1992). Typing of *Aeromonas* strains from patients with diarrhoea and from drinking water. *J. Appl. Bacteriol.*, **72**: 435-444.
- HAZEN, T.C., FLIERMANS, C.B., HIRSCH, R.P. & ESCH, G.W. (1978). Prevalence and distribution of *Aeromonas hydrophila* in the United States. *Appl. Environ. Microbiol.*, **36**: 731-738.
- HAZEN, T.C. & FLIERMANS, C.B. (1979). Distribution of *Aeromonas hydrophila* in natural and man-made thermal effluents. *Appl. Environ. Microbiol.*, **38**: 166-168.
- HENIKOFF, S. (1984). Unidirectional digestion with exonuclease III creates targeted breakpoints for DNA sequencing. *Gene*, **28**: 351-359.
- HERNANZ MORAL, C., FLAÑO DEL CASTILLO, E., LÓPEZ FIERRO, P., VILLENA CORTÉS, A., ANGUITA CASTILLO, J., CASCÓN SORIANO, A., SÁNCHEZ SALAZAR, M., RAZQUÍN PERALTA, B. & NAHARRO CARRASCO, G. (1998). Molecular characterization of the *Aeromonas hydrophila aroA* gene and potential use of an auxotrophic *aroA* mutant as a live attenuated vaccine. *Infect. Immun.*, **66**: 1813-1821.
- HERNANZ MORAL, C., CASCON SORIANO, A., SANCHEZ SALAZAR, M., YUGUEROS MARCOS, J., SUAREZ RAMOS, S. & NAHARRO CARRASCO, G. (1999). Molecular cloning and sequencing of the *aroA* gene from *Actinobacillus pleuropneumoniae* and its use in a PCR assay for rapid identification. *J. Clin. Microbiol.*, **37**: 1575-1578.
- HICKMAN-BRENNER, F.W., MacDONALD, K.L., STEIGERWALT, A.G., FANNING, G.R., BRENNER, D.J. & FARMER III, J.J. (1987). *Aeromonas veronii*, a new ornithine decarboxylase-positive species that may cause diarrhea. *J. Clin. Microbiol.*, **25**: 900-906.
- HICKMAN-BRENNER, F.W., FANNING, G.R., ARDUINO, M.J., BRENNER, D.J. & FARMER III, J.J. (1988). *Aeromonas schubertii*, a new mannitol-negative species found in human clinical specimens. *J. Clin. Microbiol.*, **26**: 1561-1564.

- HILL, K.R., CASELITZ, F.H. & MOODY, L.M.** (1954). A case of acute metastatic myositis caused by a new organism of the family *Pseudomonadaceae*: a preliminary report. *W. Ind. Med. J.*, **3**: 9-11.
- HIRONO, I. & AOKI, T.** (1991). Nucleotide sequence and expression of an extracellular haemolysin gene of *Aeromonas hydrophila*. *Microb. Pathogen.*, **11**: 189-197.
- HIRONO, I., AOKI, T., ASAO, T. & KOZAKI, S.** (1992). Nucleotide sequences and characterization of haemolysin genes from *Aeromonas hydrophila* and *Aeromonas sobria*. *Microb. Pathogen.*, **13**: 433-446.
- HIRONO, I. & AOKI, T.** (1993). Cloning and characterization of three hemolysin genes from *Aeromonas salmonicida*. *Microb. Pathog.*, **11**: 189-197.
- HO, A.S.Y., MIETZNER, T.A., SMITH, A.J. & SCHOOLNIK, G.K.** (1990). The pili of *Aeromonas hydrophila*: identification of an environmental regulated "mini pilin". *J. Exp. Med.*, **172**: 795-806.
- HO, A.S.Y., SOHEL, I. & SCHOOLNIK, G.K.** (1992). Cloning and characterization of *fxp*, the flexible pilin gene of *Aeromonas hydrophila*. *Mol. Microbiol.*, **6**: 2725-2732.
- HOIE, S., DALSGAARD, I., AASE, I.L., HEUM, M., THORNTON, J.M. & POWELL, R.** (1999). Polymerase chain reaction (PCR)-based typing analysis of atypical isolates of the fish pathogen *Aeromonas salmonicida*. *Syst. Appl. Microbiol.*, **22**: 403-411.
- HOKAMA, A. & IWANAGA, M.** (1991). Purification and characterization of *Aeromonas sobria* pili, a possible colonization factor. *Infect. Immun.*, **59**: 3478-3483.
- HOKAMA, A. & IWANAGA, M.** (1992). Purification and characterization of *Aeromonas sobria* Ae24 pili: a possible new colonization factor. *Microb. Pathog.*, **13**: 325-334.
- HOLT, J.G., KRIEG, N.R., SNEATH, P.H.A., STALEY, J.T. & WILLIAMS, S.T.** (1994). *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology* (ninth edition). The Williams & Wilkins Co., Baltimore, Md.
- HONDA, T., SATO, M., NISHIMURA, T., HIGASHITSUTSUMI, M., FUKAI, K. & MIWATANI, T.** (1985). Demonstration of cholera toxin-related factor in cultures of *Aeromonas* species by enzyme-linked immunosorbent assay. *Infect. Immun.*, **50**: 322-323.
- HOMMA, J.Y., TOMIYAMA, T., SANO, H., HIRAS, Y. & SAKWI, K.** (1975). Passive hemagglutination reaction test using formalinized sheep erythrocytes treated with

- tannic acid and coated with protease or elastase from *Pseudomonas aeruginosa*. *Jpn. J. Exp. Med.*, **45**: 361-365.
- HONMA, Y. & NAKASONE, N.** (1990). Pili of *Aeromonas hydrophila*: purification, characterization, and biological role. *Microbiol. Immunol.*, **34**: 83-98.
- HOWARD, S.P. & BUCKLEY, J.T.** (1982). Membrane glycoprotein receptor and hole-forming properties of a cytolytic protein toxin. *Biochemistry*, **21**: 1662-1667.
- HOWARD, S.P. & BUCKLEY, J.T.** (1985). Activation of the hole-forming toxin aerolysin and extracellular processing. *J. Bacteriol.*, **163**: 336-340.
- HOWARD, S.P. & 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.
- HOWARD, S.P., GARLAND, W.J., GREENE, M.J. & BUCKLEY, J.T.** (1987). Nucleotide sequence of the gene for the hole-forming toxin aerolysin of *Aeromonas hydrophila*. *J. Bacteriol.*, **169**: 2869-2871.
- HUSSLEIN, V., HUHLE, T., JARCHAU, R.K., GOEBEL, W. & CHAKRABORTY, T.** (1988). Nucleotide sequence and transcriptional analysis of the *aerAerC* region of *Aeromonas sobria* encoding aerolysin and its regulatory region. *Mol. Microbiol.*, **2**: 507-517.
- HUYS, G., VANCANNEYT, M., COOPMAN, R., JANSSEN, P., FALSEN, E., ALTWEGG, M. & 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., COOPMAN, R., JANSSEN, P. & KERSTERS, K.** (1996). High-resolution phenotypic analysis of the genus *Aeromonas* by AFLP fingerprinting. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, **46**: 572-580.
- HUYS, G., KAMPFER, P., ALTWEGG, M., KERSTERS, I., LAMB, A., COOPMAN, R., LUTHY-HOTTENSTEIN, J., VANCANNEYT, M., JANSSEN, P. & KERSTERS, K.** (1997). *Aeromonas popoffi* sp. nov., a mesophilic bacterium isolated from drinking water production plants and reservoirs. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, **47**: 1165-1171.

I**BRAHIM, A. & MacRAE, I.C.** (1991). Incidence of *Aeromonas* and *Listeria* spp. in

red meat and milk samples in Brisbane, Australia. *Int. J. Food Microbiol.*, **12**: 263-269.

INGHAM, A.B. & PEMBERTON, J.M. (1995). A lipase of *Aeromonas hydrophila* showing nonhemolytic phospholipase C. *Curr. Microbiol.*, **31**: 28-33.

ISHIGURO, E.E., KAY, W.W., AINSWORTH, T., CHAMBERLAIN, J.B., AUSTEN, R.A., BUCKLEY, J.T. & TRUST, T.J. (1981). Loss of virulence during culture of *Aeromonas salmonicida* at high temperature. *J. Bacteriol.*, **148**: 333-340.

IWANAGA, M. & HOKAMA, A. (1992). Characterization of *Aeromonas sobria* TAP13 pili: a possible new colonization factor. *J. Gen. Microbiol.*, **138**: 1913-1919.

JANDA, J.M., OSHIRO, L.S., ABBOTT, S.L. & 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. (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., ABBOTT, S.L. & CARNAHAN, A.M. (1995). *Aeromonas* and *Plesiomonas*, p. 477-482. In Murray, P.R. et al. (ed.), *Manual of Clinical Microbiology*. Sixth edition. ASM Press, Washington, D.C.

JANDA, J.M. & ABBOTT, S.L. (1998). Evolving concepts regarding the genus *Aeromonas*: an expanding panorama of species, disease presentations, and unanswered questions. *Clin. Infect. Dis.*, **27**: 332-344.

JANSSEN, P., COOPMAN, R., HUYS, G., SWINGS, J., BLEEKER, M., VOS, P., ZABEAU, M. & KERSTERS, K. (1996). Evaluation of the DNA fingerprinting method AFLP as a new tool in bacterial taxonomy. *Microbiology*, **142**: 1881-1893.

JENSEN, S.E., FECYCZ, I.T., STEMKE, G.W. & CAMPBELL, J.N. (1980). Demonstration of a cell-associated, inactive precursor of an exocellular protease produced by *Pseudomonas aeruginosa*. *Can. J. Microbiol.*, **26**: 87-93.

JIANG, B. & HOWARD, S.P. (1991). Muthagenesis and isolation of *Aeromonas hydrophila* genes which are required for extracellular secretion. *J. Bacteriol.*, **173**: 1241-1249.

JIANG, B. & HOWARD, S.P. (1992). The *Aeromonas hydrophila* *exeE* gene, required both for protein secretion and normal outer membrane biogenesis, is a member of a general secretion pathway. *Mol. Microbiol.*, **6**: 1351-1361.

JOSEPH, S.W. & CARNAHAN, A. (1994). The isolation, identification, and systematics of the motile *Aeromonas* species. *Annu. Rev. Fish Dis.*, **4**: 315-343.

KAPER, J.B., LOCKMAN, H. & COLWELL, R.R. (1981). *Aeromonas hydrophila*: Ecology and toxigenicity of isolates from a estuary. *J. Appl. Bacteriol.*, **50**: 359-377.

KARUNAKARAN, T. & DEVI, B.G. (1994). Characterization of haemolytic activity from *Aeromonas caviae*. *Epidemiol. Infect.*, **112**: 291-298.

KAWAHARAJO, K. & HOMMA, J.Y. (1977). Effects of elastase, protease and common antigen (OEP) from *Pseudomonas aeruginosa* on protection against burns in mice. *Jpn. J. Exp. Med.*, **47**: 495-500.

KAY, W.W., BUCKLEY, J.T., ISHIGURO, E.E., PHIPPS, B.M., MONETTE, J.P.L. & TRUST, T.J. (1981). Purification and disposition 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. & TRUST, T.J. (1984). Surface layer virulence A-proteins from *Aeromonas salmonicida* strains. *Can. J. Biochem. Cell. Biol.*, **62**: 1064-1071.

KAY, W.W., PHIPPS, B.M., ISHIGURO, E.E. & TRUST, T.J. (1985). Porphyrin binding by the surface array virulence protein of *Aeromonas salmonicida*. *J. Bacteriol.*, **164**: 1332-1336.

KAZNOWSKI, A. (1998). Identification of *Aeromonas* strains of different origin to the genomic species level. *J. Appl. Microbiol.*, **85**: 501-511.

KESSLER, E. & SAFRIN, M. (1988). Partial purification and characterization of an inactive precursor of *Pseudomonas aeruginosa* elastase. *J. Bacteriol.*, **170**: 1215-1219.

KESSLER, E., SAFRIN, M., GUSTIN, J.K. & OHMAN, D.E. (1998). Elastase and the LasA protease of *Pseudomonas aeruginosa* are secreted with their propeptides. *J. Biol. Chem.*, **273**: 30225-30231.

- KHAN, A.A. & CERNIGLIA, C.E.** (1997). Rapid and sensitive method for the detection of *Aeromonas caviae* and *Aeromonas trota* by polymerase chain reaction. *Lett. Appl. microbiol.*, **24**: 233-239.
- KHAN, A.A., KIM, E. & CERNIGLIA, C.E.** (1998). Molecular cloning, nucleotide sequence, and expression in *Escherichia coli* of a hemolytic toxin (aerolysin) gene from *Aeromonas trota*. *Appl. Environ. Microbiol.*, **64**: 2473-2478.
- KHAN, A.A., NAWAZ, M.S., KHAN, S.A. & CERNIGLIA, C.E.** (1999). Identification of *Aeromonas trota* (hybridization group 13) by amplification of the aerolysin gene using polymerase chain reaction. *Mol. Cell. Probes*, **13**: 93-98.
- KINGOMBE, C.I., HUYS, G., TONOLLA, M., ALBERT, M.J., SWINGS, J., PEDUZZI, R. & JEMMI, T.** (1999). PCR detection, characterization and distribution of virulence genes in *Aeromonas* spp.. *Appl. Environ. Microbiol.*, **65**: 5293-5302.
- KIROV, S.M., ANDERSON, M.J. & McMEEKIN, T.A.** (1990). A note on *Aeromonas* spp. from chickens as possible food-borne pathogens. *J. Appl. Bacteriol.*, **68**: 327-334.
- KIROV, S.M.** (1993). The public health significance of *Aeromonas* spp. in foods. *Int. J. Food Microbiol.*, **20**: 179-198.
- KIRSCHNER, P., SPRINGER, B., VOGEL, U., MEIER, A., WREDE, A., KIEKENBECK, M., BANGE, F.C. & BOTTGER, E.C.** (1993). Genotypic identification of mycobacteria by nucleic acid sequence determination: report of a 2-year experience in a clinical laboratory. *J. Clin. Microbiol.*, **31**: 2882-2889.
- KITA-TSUKAMOTO, K., OYAIZU, H., NANBA, K. & SIMIDU, U.** (1993). Phylogenetic relationships of marine bacteria, mainly members of the family *Vibrionaceae*, determined on the basis of 16 rRNA sequences. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, **43**: 8-19.
- KLINGER, J.D., STRAUS, D.C. HILTON, C.B. & BASS, J.A.** (1978). Antibodies to proteases and exotoxin A of *Pseudomonas aeruginosa* in patients with cystic fibrosis: Demonstration by radioimmunoassay. *J. Infect. Dis.*, **138**: 49-58.
- KLUYVER, A.J. & Van NIEL, C.B.** (1936). Prospects for a natural system of classification of bacteria. *Zentralbl. Bakteriol. Parasitenkd. Infektionskr. Hyg. Abt. II orig.*, **94**: 369-403.
- KO, W.C. & CHUANG, Y.C.** (1995). *Aeromonas* bacteremia: review of 59 episodes. *Clin. Infect. Dis.*, **20**: 1298-1304.

- KODJO, A., HAOND, F. & RICHARD, Y.** (1997). Molecular and phenotypic features of aeromonads isolated from snails (*Helix aspersa*) affected with a new summer disease. *Zentralbl. Veterinarmed.*, **44**: 245-252.
- KOKKA, R.P., JANDA, J.M., OSHIRO, L.S., ALTWEGG, T., SHIMADA, R., SAKAZAKI, R. & BRENNER, D.J.** (1991). Biochemical and genetic characterization of auto agglutinating phenotypes of *Aeromonas* associated with invasive and noninvasive disease. *J. Infect. Dis.*, **161**: 890-894.
- KOMATHI, A.G., ANANTHAN. S. & ALAVANDI, S.V.** (1998). Incidence & enteropathogenicity of *Aeromonas* spp. in children suffering from acute diarrhoea in Chennai. *Indian J. Med. Res.*, **107**: 252-256.
- KROVACEK, K., PASQUALE, V., BALODA, S.B., SOPRANO, V., CONTE, M. & DUMONTET, S.** (1994). Comparison of putative virulence factors in *Aeromonas hydrophila* strains isolated from marine environment and human diarrheal cases in southern Italy. *Appl. Environ. Microbiol.*, **60**: 1379-1382.
- KROVACEK, K., DUMONTET, S., ERIKSSON., E. & BALODA, S.B.** (1995). Isolation, and virulence profiles, of *Aeromonas hydrophila* implicated in an outbreak of food poisoning in Sweden. *Microbiol. Immunol.*, **39**: 655-661.
- KROVACEK, K., HUANG, K., STERNBERG, S. & SVENSON, S.B.** (1998). *Aeromonas hydrophila* septicaemia in a grey seal (*Halichoerus grypus*) from the Baltic Sea: a case study. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.*, **21**: 43-49.
- KUEHR, C.A.H. & von WOLZOGEN** (1932). Über eine Gaerungsmikrobe in Fäekallien und Mückenlarven. *Zbl. Bakteriol. Abt. II.*, **85**:223-250.
- KÜHN, I., ALBERT, M.J., ANSARUZZAMAN, M., BHUIYAN, N.A., ALABI, S.A., ISLAM, M.S., NEOGI, P.K., HUYS, G., JANSSEN, P., KERSTERS, K. & MOLLBY, R.** (1997a). Characterization of *Aeromonas* spp. isolated from humans with diarrhoea, from healthy controls, and from surface water in Bangladesh. *J. Clin. Microbiol.*, **35**: 369-373.
- KÜHN, I., HUYS, G., COOPMAN, R., KERSTERS, K. & JANSSEN, P.** (1997b). A 4-year study of the diversity and persistence of coliforms and *Aeromonas* in the water of a Swedish drinking water well. *Can. J. Microbiol.*, **43**: 9-16.
- KUIJPER, E.J., BOL, P., PEETERS, M.F., STEIGERWALT, A.G., ZANEN, H.C. & BRENNER, J.G.** (1989). Phenotyping characterization and DNA relatedness in human fecal isolates of *Aeromonas* spp. *J. Clin. Microbiol.*, **27**: 132-138.

KUL'BA, A.M., EL'GAMMUDI, A. & FOMICHEV, I.K. (1997). Isolation and characteristics of plasmids from *Aeromonas*. *Mol. Gen. Mikrobiol. Virusol.*, **1**: 22-25.

L**AEEMMLI, U.K.** (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**: 680-685.

LEBLANC, D., MITTAL, K.R., OLIVIER, G. & LALLIER, R. (1981). Serogrouping of motile *Aeromonas* species isolated from healthy and moribund fish. *Appl. Environ. Microbiol.*, **42**: 56-60.

LEE, K.K. & ELLIS, A.E. (1990). Glycerophospholipid:cholesterol acyltransferase complexed with lipopolysaccharide (LPS) is a mayor lethal exotoxin and cytolysin of *Aeromonas salmonicida*: LPS stabilizes and enhances toxicity of the enzyme. *J. Bacteriol.*, **172**: 5382-5393.

LEHMANN, K.B. & NEUMANN, R. (1896). Familie II. Bacteriacea. Stäbchenbakterien. *In: Atlas und Grundriss der Bakteriologie und Lehrbuch der speziellen bakteriologischen Diagnostik. Teil II.* J.F. Lehmann München, pp. 181-315.

LEUNG, K.Y. & STEVENSON, R.M.W. (1988a). Tn5-induced protease deficient strains of *Aeromonas hydrophila* with reduced virulence for fish. *Infect. Immun.*, **56**: 2639-2644.

LEUNG, K.Y. & STEVENSON, R.M.W. (1988b). Characteristics and distribution of extracellular proteases from *Aeromonas hydrophila*. *J. Gen. Microbiol.*, **134**: 151-160.

LIEBLING, M.R., ARKFELD, D.G., MICHELINI, G.A., NISHIO, M.J., ENG, B.J., JIN, T. & LOUIE, J.S. (1994). Identification of *Neisseria gonorrhoeae* in synovial fluid using the polymerase chain reaction. *Arthritis Rheum.*, **37**: 702-709.

LIN, S.H., SHIEH, S.D., LIN, Y.F., De BRAUWER, E., VAQN LANDUYT, H.W., GORDTS, B. & BOELAERT, J.R. (1996). Fatal *Aeromonas hydrophila* bacteremia in a hemodialysis patient treated with deferoxamine. *Am. J. Kidney Dis.*, **27**: 733-735.

LIN, C.S. & CHENG, S.H. (1998). *Aeromonas hydrophila* sepsis presenting as meningitis and necrotizing fasciitis in a man with alcoholic liver cirrhosis. *J. Formos. Med. Assoc.*, **97**: 498-502.

- LIVESLEY, M.A., SMITH, S.N., ARMSTRONG, R. & BARKER, G.A. (1999). Characterization of *Aeromonas* strains and species by pulsed field electrophoresis and principal components analysis. *J. Fish Dis.*, **22**: 369-377.
- LJUNGH, A., POPOFF, M., & WADSTROM, T. (1977). *Aeromonas hydrophila* in acute diarrheal disease: detection of enterotoxin and biotyping of strains. *J. Clin. Microbiol.*, **6**: 96-100.
- LJUNGH, A., ENEROTH, P. & WADSTRÖM, T. (1982). Cytotoxic enterotoxin from *Aeromonas hydrophila*. *Toxicon*, **20**: 787-794.
- LJUNGH, A. & WADSTRÖM, T. (1983). Toxins of *Vibrio parahaemolyticus* and *Aeromonas hydrophila*. *J. Toxicol. Toxin. Rev.*, **1**: 257-307.
- LOEWY, A.G., SANTER, U.V., WIECZOREK, M., BLODGETT, J.K., JONES, W. & CHERONIS, J.C. (1993). Purification and characterization of a novel zinc-proteinase of *Aeromonas hydrophila*. *J. Biol. Chem.*, **268**: 9071-9078.
- LONGA, A., VIZCAYA, L., NIEVES, B., BRAVO, L. & BRAVO, J.R. (1997). Comparative study of 4 methods for identifying species of the genus *Aeromonas*. *Rev. Cubana Med. Trop.*, **49**: 84-85.
- LUCCHINI, G.M. & ALTWEEG, M. (1992). rRNA gene restriction patterns as taxonomic tools for the genus *Aeromonas*. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, **42**: 384-389.
- M**AGEE, J.T., RANDLE, E.A., GRAY, S.J. & JACKSON, S.K. (1993). Pyrolysis mass spectrometry characterization and numerical taxonomy of *Aeromonas* spp. *Antonie van Leeuwenhoek*, **64**:315-323.
- MACKAY, D.R., MANDERS, E.K., SAGGERS, G.C., BANDUCCI, D.R., PRINSLOO, J. & KLUGMAN, K. (1999). *Aeromonas* species isolated from medicinal leeches. *Ann. Plast. Surg.*, **42**: 275-279.
- MANIATIS, T., FRITSCH, E.F. & SAMBROOK, J. (1989). Molecular cloning: a laboratory manual (2nd ed.). Cold Spring Harbor Laboratory. New York.
- MARCOS, J.Y., SORIANO, A.C., SALAZAR, M.S., MORAL, C.H., RAMOS, S.S., SMELTZER, M.S. & CARRASCO, G.N. (1999). Rapid identification and typing of *Staphylococcus aureus* by PCR-restriction fragment length polymorphism analysis of the *aroA* gene. *J. Clin. Microbiol.*, **37**: 570-574.

- MARR, A.G. & INGRAHAM, J.L. (1962). Effect of the temperature on the composition of fatty acids in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.*, **84**: 1260-1267.
- MARTINETTI LUCCHINI, G. & ALTWEGG, M. (1992). rRNA gene restriction patterns as taxonomic tools for the genus *Aeromonas*. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, **42**: 384-389.
- MARTÍNEZ-MURCIA, A.J., ESTEVE, C., GARAY, E. & COLLINS, M.D. (1992a). Phylogenetic interrelationships of members of the genera *Aeromonas* and *Plesiomonas* as determined by 16S ribosomal DNA sequencing: lack of congruence with results of DNA-DNA hybridization. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, **42**: 412-421.
- MARTÍNEZ-MURCIA, A.J., ESTEVE, C., GARAY, E. & COLLINS, M.D. (1992b). *Aeromonas allosaccharophila* sp nov., a new mesophilic member of the genus *Aeromonas*. *FEMS Microbiol. Lett.*, **91**: 199-206.
- MARTINO, R., SANTAMARÍA, A., PERICAS, R., SUREDA, A. & BRUNET, S. (1997). Acute rhabdomyolysis and mionecrosis complicating *Aeromonas* bacteremia in neutropenic patients with hematologic malignancies: report of two cases. *Haematologica*, **82**: 692-694.
- MASCHER, F., REINTHALER, F.F., STUNZNER, D. & LAMBERGER, B. (1988). *Aeromonas* species in a municipal water supply of a central European city: biotyping of strains and detection of toxins. *Zentralbl. Bakteriol. Mikrobiol. Hyg.*, **186**: 333-337.
- MASSAD, G., ARCENEUX, J.E. & BYERS, B.R. (1994). Diversity of siderophore genes encoding biosynthesis of 2,3-dihydroxybenzoic acid in *Aeromonas* spp. *Biometals*, **7**: 227-236.
- MELLERGAARD, S. (1983). Purification and characterization of a new proteolytic enzyme produced by *Aeromonas salmonicida*. *J. Appl. Bacteriol.*, **54**: 289-294.
- MERINO, S., CAMPRUBÍ, S. & TOMÁS, J.M. (1991). The role of lipopolysaccharide in complement killing of *Aeromonas hydrophila* strains of serotype O:34. *J. Gen. Microbiol.*, **137**: 1583-1590.
- MERINO, S., CAMPRUBÍ, S. & TOMÁS, J.M. (1992). Effect of growth temperature on outer membrane components and virulence of *Aeromonas hydrophila* strains of serotype O:34. *Infect. Immun.*, **60**: 4343-4349.
- MERINO, S., RUBIRES, X., KNOCHEL, S. & TOMAS, J.M. (1995). Emerging pathogens: *Aeromonas* spp. *Int. J. Food Microbiol.*, **28**: 157-168.

- MERINO, S., RUBIRES, X., AGUILAR, A., GUILLOT, J.F. & TOMÁS, J.M. (1996). The role of the O-antigen lipopolysaccharide on the colonization in vivo of the germfree chicken gut by *Aeromonas hydrophila* serogroup O:34. *Microb. Pathog.*, **20**: 325-333.
- MERINO, S., NOGUERAS, M.M., AGUILAR, A., RUBIRES, X., ALBERTÍ, S., BENEDÍ, V.J. & TOMÁS, J.M. (1998). Activation of the complement classical pathway (C1q binding) by mesophilic *Aeromonas hydrophila* outer membrane protein. *Infect. Immun.*, **66**: 3825-3831.
- MERINO, S., AGUILAR, A., NOGUERAS, M.M., REGUE, M., SWIFT, S. & TOMÁS, J.M. (1999). Cloning, sequencing, and role in virulence of two phospholipases (A1 and C) from mesophilic *Aeromonas* sp. serogroup O:34. *Infect. Immun.*, **67**: 4008-4013.
- MILES, A., & HALNAN, E.T. (1937). A new species of microorganism (*Proteus melanovogenes*) causing black rot in eggs. *J. Hyg. Camb.*, **37**: 79-97.
- MILES, E.M. & MILES, A.A. (1951). The identity of *Proteus hidrophilus* Bergey *et al.* and *Proteus melanovogenes* Miles and Halvan, and their relation to the genus *Aeromonas* Kluyver and Van Niel. *J.Gen. Microbiol.*, **5**: 298-306.
- MILTON, D.L., NORQVIST, A. & WOLF-WATZ, H. (1992). Cloning of a metalloprotease gene involved in the virulence mechanism of *Vibrio anguillarum*. *J. Bacteriol.*, **174**: 7235-7244.
- MOISSENET, D., VALCIN, M., MARCHAND, V., GRIMPEL, E., BEGUE, P., GARBANG-CHENON, A. & VU-THIEN, H. (1996). Comparative DNA analysis of *Bordetella pertussis* clinical isolates by pulsed-field gel electrophoresis, randomly amplified polymorphism DNA, and ERIC polymerase chain reaction. *FEMS Microbiol. Lett.*, **143**: 127-132.
- MOLLET, C., DRANCOURT, M. & RAOULT, D. (1997). *rpoB* sequence analysis as a novel basis for bacterial identification. *Mol. Microbiol.*, **26**: 1005-1011.
- MORIHARA, K. & HOMMA, J.Y. (1985). *Pseudomonas* proteases, p. 41-79. In I.A. Holder (ed.), *Bacterial enzymes and virulence*. CRC Press, Inc., Boca Raton, Fla.
- MORRISON, K.E., LAKE, D., CROOK, J., CARLONE, G.M., ADES, E., FACKLAM, R. & SAMPSON, J.S. (2000). Confirmation of *psaA* in all 90 serotypes of *Streptococcus pneumoniae* by PCR and potential of this assay for identification and diagnosis. *J. Clin. Microbiol.*, **38**: 434-437.
- MOYER, C.D., SYKES, P.A. & RAYNER, J.M. (1977). *Aeromonas hydrophila* septicaemia producing ecthyma gangrenosum in a child with leukaemia. *Scand. J. Infect. Dis.*, **9**: 151-153.

- MOYER, N.P., LUCCINI, G.M., HOLCOMB, L.A., HALL, N.H. & ALTWEGG, M.** (1992). Application of ribotyping for differentiating aeromonads isolated from clinical and environmental sources. *Appl. Environ. Microbiol.*, **58**: 1960-1964.
- MULLA, R. & 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. & TRUST, T.J.** (1982). Role of surface components in serum resistance of virulent *Aeromonas salmonicida*. *Infect. Immuno.*, **36**: 1069-1075.
- MUÑOZ, P., FERNÁNDEZ-BACA, V., PELÁEZ, T., SÁNCHEZ, R., RODRÍGUEZ-CREIXEMS, M. & BOUZA, E.** (1994). *Aeromonas* peritonitis. *Clin. Infect. Dis.*, **18**: 32-37.
- MURPHY, O.M., GRAY, J. & PEDLER, S.J.** (1995). Non-enteric *Aeromonas* infections in hospitalized patients. *J. Hosp. Infect.*, **31**: 55-60.
- N**AGAHARE, K., KANAKA, T., HISHIMURA, F., KURODA, M. & SAKAGUCHI, K. (1977). Control of tryptophan synthetase amplified by varying the number of composite plasmids in *Escherichia coli* cells. *Gene*, **1**: 141-152.
- NAGY, B., MONN, H.W., ISAACSON, R.E., TO, C.C. & BRINTON, C.C.** (1978). Immunization of suckling pigs against enteric enterotoxigenic *Escherichia coli* infection by vaccinating dams with purified pili. *Infect. Immun.*, **21**: 269-274.
- NAIDU, A.J. & YADAV, M.** (1997). Influence of iron, growth temperature and plasmids on siderophore production in *Aeromonas hydrophila*. *J. Med. Microbiol.*, **46**: 833-838.
- NAMDARI, H. & BOTTONE, E.J.** (1988). Correlation of the suicide phenomenon in *Aeromonas* species with virulence and enteropathogenicity. *J. Clin. Microbiol.*, **26**: 2615-2619.
- NAMDARI, H. & BOTTONE, E.J.** (1989). Suicide phenomenon in mesophilic aeromonads as a basis for species identification. *J. Clin. Microbiol.*, **27**: 788-789.
- NAMDARI, H. & CABELLI, V.J.** (1989). The suicide phenomenon in motile aeromonads. *Appl. Environ. Microbiol.*, **55**: 543-547.

- NAMDARI, H. & BOTTONE, E.J.** (1990). Microbial and clinical evidence supporting the role of *Aeromonas caviae* as a pediatric enteric pathogen. *J. Clin. Microbiol.*, **28**: 837-840.
- NEILSON, A.H.** (1978). The occurrence of aeromonads in activated sludge: isolation of *Aeromonas sobria* and its possible confusion with *Escherichia coli*. *J. Appl. Bacteriol.*, **44**: 259-264.
- NIETO, T.P., CORCOBADO, M.J.R., TORANZO, A.E. & BARJA, J.L.** (1985). Relation of water temperature to infection of *Salmo gairdneri* with motile *Aeromonas*. *Fish Pathol.*, **20**: 99-105.
- NIETO, T.P. & ELLIS, A.E.** (1991). Heterogeneity of extracellular proteases produced by different isolates of *Aeromonas hydrophila* and *Aeromonas sobria* pathogenic for fish. *J. Fish Dis.*, **14**: 229-235.
- NIETO, T.P., SANTOS, Y., RODRÍGUEZ, L.A. & ELLIS, A.E.** (1991). An extracellular acetylcholinesterase produced by *Aeromonas hydrophila* is a major lethal toxin for fish. *Microb. Pathog.*, **11**: 101-110.
- NIRASAWA, S., NAKAJIMA, Y., ZHANG, Z.Z., YOSHIDA, M. & HAYASHI, K.** (1999a). Intramolecular chaperone and inhibitor activities of a propeptide from a bacterial zinc aminopeptidase. *Biochem. J.*, **341** (Pt 1): 25-31.
- NIRASAWA, S., NAKAJIMA, Y., ZHANG, Z.Z., YOSHIDA, M. & HAYASHI, K.** (1999b). Molecular cloning and expression in *Escherichia coli* of the extracellular endoprotease of *Aeromonas caviae* T-64, a pro-aminopeptidase processing enzyme (1). *Biochim. Biophys. Acta*, **1433** (1-2): 335-342.
- NOONAN, B. & TRUST, T.J.** (1995). The molecular biology of *Aeromonas salmonicida*. *Ann. Rev. Fish Dis.*, **5**: 95-111.
- O****AKEY, H.J., GIBSON, L.F. & GEORGE, A.M.** (1999). DNA probes specific for *Aeromonas hydrophila* (HG1). *J. Appl. Microbiol.*, **86**: 187-193.
- OBI, C.L., COKER, A.O., EPOKE, J. & NDIP, R.N.** (1997). Enteric bacterial pathogens in stools of residents of urban and rural regions in Nigeria: a comparison of patients with and without diarrhoea and controls without diarrhoea. *J. Diarrhoeal Dis. Res.*, **15**: 241-247.

- OLIVE, D.M.** (1989). Detection of enterotoxigenic *Escherichia coli* after polymerase chain reaction amplification with a thermostable DNA polymerase. *J. Clin. Microbiol.*, **27**: 261-265.
- OVERMAN, T.L. & JANDA, J.L.** (1999). Antimicrobial susceptibility patterns of *Aeromonas jandaei*, *A. schubertii*, *A. trota*, and *A. veronii* biotype *veronii*. *J. Clin. Microbiol.*, **37**: 706-708.
- P** **ANIAGUA, C., ARGUELLO-VILLARES, J.L., ARIAS, M.A. & HERREROS, M.** (1998). *Aeromonas hydrophila* associated with a severe outbreak of infection in farmed rabbits. *Zentralbl. Hyg. Umweltmed*, **201**: 423-430.
- PARVEEN, S., ISLAM, M.S. & HUQ, A.** (1995). Abundance of *Aeromonas* spp. in river and lake waters in and around Dhaka, Bangladesh. *J. Diarrhoeal Dis. Res.*, **13**: 183-186.
- PASSADOR, L., TUCKER, K.D., GUERTIN, K.R., JOURNET, M.P., KENDE, A.S. & IGLEWSKI, B.H.** (1996). Functional analysis of the *Pseudomonas aeruginosa* autoinducer PAI. *J. Bacteriol.*, **178**: 5995-6000.
- PAULA, S.J., DUFFEY, P.S., ABBOT, S.L., KOKKA, R.P., OSHIRO, L.S., JANDA, J.M., SHIMADA, T. & 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.
- PAYNE, S.M. & LAWLOR, K.M.** (1990). *The Bacteria*, vol. XI: Molecular Basis of Bacterial Pathogenesis, p. 225-248. In Iglewsky, B.H. & Clark, V.L. (ed), Academic press.
- PEMBERTON, J.M., KIDD, S.P. & SCHMIDT, R.** (1997). Secreted enzymes of *Aeromonas*. *FEMS Microbiol. Lett.*, **152**: 1-10.
- PETERS, G., FAISAL, M., LANG, T. & AHMED, I.** (1988). Stress caused by social interaction and its effect on susceptibility to *Aeromonas hydrophila* infection in rainbow trout *Salmo gairdneri*. *Dis. aquat. Org.*, **4**: 83-89.
- PETERS, J.E. & GALLOWAY, D.R.** (1990). Purification and characterization of an active fragment of the LasA protein from *Pseudomonas aeruginosa*: enhancement of elastase activity. *J. Bacteriol.*, **172**: 2236-2240.

- PHIPPS, B.M., TRUST, T.J., ISHIGURO, E.E. & KAY, W.W.** (1983). Purification and characterization of the cell surface virulence A-protein from *Aeromonas salmonicida*. *Biochemistry*, **22**: 2934-2939.
- PHIPPS, B.M. & KAY, W.W.** (1988). Immunoglobulin binding by the regular surface array *Aeromonas salmonicida*. *J. Biol. Chem.*, **263**: 9298-9303.
- PIERCE, R.L., DALEY C.A., GATES C.E. & WOHLGEMUTH K.** (1973). *Aeromonas hydrophila* septicemia in a dog. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, **162**: 469.
- PIERSIMONI, C., MORBIDUCCI, V., De SIO, G. & SCALISE, G.** (1990). Rapid presumptive phenospecies identification of mesophilic aeromonads by testing for suicidal activity. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.*, **9**: 608-610.
- PIN, C., MORALES, P., MARIN, M.L., SELGAS, M.D., GARCÍA, M.L. & CASAS, C.** (1997). Virulence factors-pathogenicity relationships for *Aeromonas* species from clinical and food isolates. *Folia. Microbiol. (Praha)*, **42**: 385-389.
- PITTARD, J. & WALLACE, B.J.** (1996). Distribution and function of genes concerned with aromatic biosynthesis in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.*, **91**: 1492-1508.
- POLLARD, D.R., JOHNSON, W.M., LIOR, H., TYLER, S.D. & ROZEE, K.R.** (1990). Detection of the aerolysin gene in *Aeromonas hydrophila* by the polymerase chain reaction. *J. Clin. Microbiol.*, **28**: 2477-2481.
- POPOFF, M. & VÉRON, M.** (1976). A taxonomic study of the *Aeromonas hydrophila*-*Aeromonas punctata* group. *J. Gen. Microbiol.*, **94**: 11-22.
- POPOFF, M. COYNAUET, C., KIREDJIAN, M. & LEMELIN, M.** (1981). Polynucleotide sequence relatedness among motile *Aeromonas* species. *Curr. Microbiol.*, **5**: 109-114.
- POPOFF, M.** (1984). Genus *Aeromonas* Kluver and Van Niel 1936, 398^{AL}, p. 545-548. In Krieg, N.R. & Holt, J.G. (ed.), *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, vol. 1. First edition. The Williams & Wilkins Co., Baltimore, Md.
- POTOMSKI, J., BURKE, V., WATSON, I. & GRACEY, M.** (1987). Purification of cytotoxic enterotoxin of *Aeromonas sobria* by use of monoclonal antibodies. *J. Med. Microbiol.*, **23**: 171-177.
- PRICE, N.C., STEVENS, L., DUNCAN, D. & SNODGRASS, M.** (1989). Proteases secreted by strains of *Aeromonas salmonicida*. *J. Fish Dis.*, **12**: 223-232.

- PRIEFER, U., SIMON, R. & PUHLER, A. (1984). Advanced molecular genetics: Cloning with cosmid, p. 190-201. In Puhler, A. & Timmis, K.N. (ed), Springer-Verlag KG, Berlin.
- PUGSLEY, A.P. (1993). The complete general secretory pathway in gram-negative bacteria. *Microbiol. Rev.*, **57**: 50-108.
- R**AUTELIN, H., HÄNNINEN, M.L., SIVONEN, A., TURUNEN, U. & VALTONEN, V. (1995a). Chronic diarrhea due to a single strain of *Aeromonas caviae*. *Eur. J. Clin. Microbiol Infect. Dis.*, **14**: 51-53.
- RAUTELIN, H., SIVONEN, A., KUIKKA, A., RENKONEN, O.V., VALTONEN, V. LEHTI, H., KAHANPAA, A. & KOSUNEN, T.U. (1995b). Role of *Aeromonas* isolated from feces of Finnish patients. *Scand. J. Infect. Dis.*, **27**: 207-210.
- REED, L.J. & MUENCH, H. (1938). A simple method of estimating fifty percent end points. *Am. J. Hyg.*, **27**: 493-497.
- RIVERO, O., ANGUITA, J., PANIAGUA, C. & NAHARRO, G. (1990). Molecular cloning and characterization of an extracellular protease gene from *Aeromonas hydrophila*. *J. Bacteriol.*, **172**: 3905-3908.
- RIVERO, O., ANGUITA, J., MATEOS, D., PANIAGUA, C. & NAHARRO, G. (1991). Cloning and characterization of an extracellular temperature-labile serine protease gene from *Aeromonas hydrophila*. *FEMS Microbiol. Lett.*, **81**: 1-8.
- RODRÍGUEZ, L.A., ELLIS, A.E. & NIETO, T.P. (1992). Purification and characterization of an extracellular metalloprotease, serine protease and haemolysin of *Aeromonas hydrophila* strain B32: all are lethal for fish. *Microb. Pathog.*, **13**: 17-24.
- RODRÍGUEZ, L.A., ELLIS, A.E. & NIETO, T.P. (1993). Effects of the acetylcholinesterase toxin of *Aeromonas hydrophila* on the central nervous system of fish. *Microb. Pathog.*, **14**: 411-415.
- RODRÍGUEZ-APARICIO, L.B., LUENGO, J.M. GONZÁLEZ-CLEMENTE, C. & REGLERO, A. (1992). Purification and characterization of the nuclear cytidine 5'-monophosphate N-acetylneuraminic acid synthetase from rat liver. *J. Biol. Chem.*, **267**: 9257-9263.

- RODRÍGUEZ-APARICIO, L.B., LUENGO, J.M., FERRERO, M.A. & REGLERO, A.** (1993). Comparative analysis of the antibodies against capsular polysaccharides of *Escherichia coli* K-92 and K-235: an immunochemical method for the identification of polysialic acids. *Int. J. Biochem.*, **25**: 427-432.
- ROLLOF, J., HEDSTROM, S.A. & NILSSON-EHLE, P.** (1988). Interference of *Staphylococcus aureus* lipase with human granulocyte function. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.*, **7**: 505-510.
- ROSE, J.M., HOUSTON, C.W., COPPENHAVER, D.H., DIXON, J.D. & KUROSKY, A.** (1989). 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.
- ROWE, B.** (1979). The role of *Escherichia coli* in gastroenteritis. *Clin. Gastroenterol.*, **8**: 625-644.
- RUST, L., MESSING, C.R. & IGLEWSKI, B.H.** (1994). Elastase assays. *Methods Enzymol.*, **235**: 554-562.
- S****AIKI, R.K., SCHARF, S., FALOONA, F., MULLIS, K.B., HORN, G.T., ERLICH, H.A. & ARNHEIM** (1985). Enzymatic amplification of β -globin genomic sequences and restriction site analysis for the diagnosis of sickle-cell anemia. *Science* **230**: 1350-1354.
- SAKAI, D.K.** (1977). Causative factors of *Aeromonas salmonicida* in salmonid furunculosis: extracellular protease. *Scientific Reports of the Hokkaido Fish Hatchery*, **32**: 61-89.
- SAKAI, D.K.** (1985). Loss of virulence in a protease-deficient mutant of *Aeromonas salmonicida*. *Infect. Immun.*, **48**: 146-152.
- SAKAZAKI, R. & SHIMADA, T.** (1984). O-serogrouping scheme for mesophilic *Aeromonas* strains. *Japan J. Med. Sci. Biol.*, **37**: 247-255.
- SAN JOAQUIN, V., ANDERSON, A. & PICKETT, D.** (1989). Plasmid, pili, and invasiveness of diarrheal isolates of *Aeromonas*. Abstract of ASM Annual Meeting. Washington D.C.: *American Society for Microbiology*, p. 73.
- SANARELLI, G.** (1891). Über einen neuen Mikroorganismus des Wassers welcher für Tiere mit veränderlicher und konstanter Temperatur pathogen ist. *Zbl. Bakteriol. Parasitenk.*, **9**: 222-228.

- SANTOS, Y., TORANZO, A.E., DOPAZO, C.P., NIETO, T.P. & BARJA, J.L. (1987). Relationships among virulence for fish enterotoxigenicity and phenotypic characteristics of motile *Aeromonas*. *Aquaculture*, **67**: 29-39.
- SANTOS, Y., TORANZO, A.E., BARJA, J.L., NIETO, T.P. & VILLA, T.G. (1988). Virulence properties and enterotoxin production of *Aeromonas* strains isolated from fish. *Infect. Immun.*, **56**: 3285-3293.
- SATO, M., ARITA, M., HONDA, T. & MIWATANI, T. (1989). Characterization of a pilus produced by *Aeromonas hydrophila*. *FEMS Microbiol. Lett.*, **50**: 325-329.
- SCHAD, P.A., BEVER, R.A., NICOS, T.I. LEDUC, F., HANNE, L.F. & IGLEWSKI, B.H. (1987). Cloning and characterization of elastase genes from *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.*, **169**: 2691-2696.
- SCHAD, P.A. & IGLEWSKI, B.H. (1988). Nucleotide sequence and expression in *Escherichia coli* of the *Pseudomonas aeruginosa lasA* gene, *J. Bacteriol.*, **170**: 2784-2789.
- SCHÄPERKLAUS, W. (1930). *Pseudomonas punctata* als Krankheitserreger bei Fischen. *Zbl. Bakteriol. 2. Abt.*, **28**: 289-370.
- SCHEFFER, J., KÖNIG, W., BRAUN, V. & GOEBEL, W. (1988). Comparison of four hemolysin-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.
- SCHERAGO, M. (1936). An epizootic septicaemia of young guinea pigs caused by *Pseudomonas caviae* n. sp. *J. Bacteriol.* **31**: 83.
- SCHUBERT, R.H.W. (1974). *Aeromonas*, p. 345-348. In Buchanan, R.E. & Gibbons, N.E (ed.), *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology* (eighth edition). The Williams & Wilkins Co., Baltimore, Md.
- SCHUBERT, R.H.W. & HEGAZI, M. (1988). *Aeromonas eucrenophila* species nova *Aeromonas caviae*, a later illegitimate synonym of *Aeromonas punctata*. *Zentralbl. Mikrobiol. Hyg. Sec. A*, **268**: 34-39.
- SCHUBERT, R.H.W., HEGAZI, M. & WAHLIG, W. (1990a). *Aeromonas enteropelogenes* species nova. *Hyg. Med.*, **15**: 471-472.
- SCHUBERT, R.H.W., HEGAZI, M. & WAHLIG, W. (1990b). *Aeromonas ichthiosmia* species nova. *Hyg. Medf.*, **15**: 477-479.
- SCHUBERT, R.H.W. (1998). Detection of psychotropic aeromonads in drinking water. *Zentralbl. Hyg. Umweltmed.*, **200**: 571-574.

- SHANE, S.M., HARRINGTON, K.S., MONTROSE, M.S. & ROEBUCK, R.G. (1984). The occurrence of *Aeromonas hydrophila* in avian diagnostic submissions. *Avian dis.*, **28**: 804-807.
- SHEERAN, B. & SMITH, P.R. (1981). A second extracellular proteolytic activity associated with the fish pathogen *Aeromonas salmonicida*. *FEMS Microbiol. Lett.*, **11**: 73-76.
- SHIEH, H.S. & MACLEAN, J.R. (1975). Purification and properties of an extracellular protease of *Aeromonas salmonicida*, the causative agent of furunculosis. *Int. J. Biochem.*, **6**: 653-656.
- SHIMADA, T., SAKAZAKI, R., HORIGOME, K., UESAKA, Y. & NIWANO, K. (1984). Production of cholera-like enterotoxin by *Aeromonas hydrophila*. *Jpn. J. Med. Sci. Biol.*, **37**: 141-144.
- SHOTTON, D.M. (1970). The serine proteases: elastase. *Methods Enzymol.*, **19**: 113-140.
- SHOTTS, E.B., GAINES, J.L., MARTIN, L. & PRIESTWOOD, A.K. (1972). *Aeromonas* induced deaths among fish and reptiles in an eutrophic island lake. *Am. Vet. Med. Assoc.*, **161**: 603-607.
- SIMON, R., PRIEFER, U. & PÜHLER, A. (1983). A broad host range mobilization system for in vivo genetic engineering: transposon mutagenesis in Gram-negative bacteria. *Biotech.*, **1**: 784-791.
- SINGH, D.V. & SANYAL, S.C. (1992). Production of haemolysis and its correlation with enterotoxicity in *Aeromonas* spp. *J. Med. Microbiol.*, **37**: 262-267.
- SMITH, J.A. (1980). *Aeromonas hydrophila*: analysis of 11 cases. *Can. Med. Assoc. J.*, **122**: 1270-1272.
- SMITH, A.W., CHAHAL, B. & FRENCH, G.L. (1994). The human gastric pathogen *Helicobacter pylori* has a gene encoding an enzyme first classified as a mucinase in *Vibrio cholerae*. *Mol. Microbiol.*, **13**: 153-160.
- SNEATH, P.H.A. & SOKAL, R.R. (1973). Numerical taxonomy. Freeman, San Francisco.
- SNIESZKO, S.F. (1957). *Aeromonas*, p. 189-193. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. (Breed, Murray & Smith ed.), seventh edition. The William & Wilkins Co., Baltimore, Md.
- SNIESZKO, S.F. (1974). History and present status of fish diseases. *J. Wildl. Dis.*, **11**: 446-459.

- SNOWER, D.P., RUEF, C., KURITZA, A.P. & EDBERG, S.C. (1989). *Aeromonas hydrophila* infection associated with the use of medicinal leeches. *J. Clin. Microbiol.*, **27**: 1421-1422.
- SOUTHERN, E. (1975). Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.*, **98**: 503-517.
- SOUTHERN, E. (1980). Gel electrophoresis of restriction fragments. *Methods Enzymol.*, **68**: 152-176.
- STANIER, R.Y. (1943). A note on the taxonomy of *Proteus hydrophilus*. *J. Bacteriol.*, **46**: 213-214.
- SWIFT, S., KARLYSHEV, A.V., FISH, L., DURANT, E.L., WINSON, M.K., CHHABRA, S.R., WILLIAMS, P., MACINTYRE, S. & STEWARD, G.A.A.B. (1997). Quorum sensing in *Aeromonas hydrophila* and *Aeromonas salmonicida*: identification of the LuxRI homologues AhyRI and AsaRI and their cognate *N*-acylhomoserine lactone signal molecules. *J. Bacteriol.*, **179**: 5271-5281.
- SWIFT, S., LYNCH, M.J., FISH, L., KIRKE, D.F., TOMAS, J.M., STEWART, G.S. & WILLIAMS, P. (1999). Quorum sensing-dependent regulation and blockade of exoprotease production in *Aeromonas hydrophila*. *Infect. Immun.*, **67**: 5192-5199.
- T**AJIMA, K., TAKAHASHI, T., EZURA, Y. & KIMURA, T. (1984). Enzymatic properties of the purified extracellular protease of *Aeromonas salmonicida*, Ar-4 (EFDL). *Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries*, **50**: 145-150.
- TAKAYAMA, K., QURESHI, N., RIBI, E. & CANTRELL, J.L. (1984). Influence of fine structure of lipid A to its *Limulus* amoebocyte lysate clotting and toxic activities. *Infect. Immun.*, **45**: 350-355.
- TALON, D., DUPONT, M.J., LESNE, J., THOUVEREZ, M. & MICHEL-BRIAND, Y. (1996). Pulsed-field gel electrophoresis as an epidemiological tool for clonal identification of *Aeromonas hydrophila*. *J. Appl. Bacteriol.*, **80**: 277-282.
- TALON, D., MULIN, B. & THOUVEREZ, M. (1998). Clonal identification of *Aeromonas hydrophila* strains using randomly amplified polymorphic DNA analysis. *Eur. J. Epidemiol.*, **14**: 305-310.
- TARKKANEN, A.M., ALLEN, B.L., WESTERLUND, B., HOLTHÖFER, H., KUUSELA, P., RISTELI, L., CLEGG, S. & KORHONEN, T.J. (1990). Type

- IV collagen as the target for type-3 fimbriae, enterobacterial adherence organelles. *Mol. Microbiol.*, **4**: 1351-1361.
- THOMAS, L.V., GROSS, R.J., CHEASTY, T. & ROWE, B.** (1990). Extended serogrouping scheme for motile, mesophilic *Aeromonas* species. *J. Clin. Microbiol.*, **28**: 980-984.
- THOMAS, S.R. & TRUST, T.J.** (1995). A specific PulD homolog is required for the secretion of paracrystalline surface array subunits in *Aeromonas hydrophila*. *J. Bacteriol.*, **177**: 3932-3939.
- THORNTON, J., HOWARD, S.P. & BUCKLEY, J.T.** (1988). Molecular cloning of a phospholipid-cholesterol acyltransferase from *Aeromonas hydrophila*. Sequence homologies with lecithin-cholesterol acyltransferase and other lipases. *Biochim. Biophys. Acta*, **959**: 153-159.
- TITBALL, R.W. & MUNN, C.B.** (1981). Evidence for two haemolytic activities from *Aeromonas salmonicida*. *FEMS Microbiol. Lett.*, **12**: 27-30.
- TITBALL, R.W. & MUNN, C.B.** (1983). Partial purification and properties of a haemolytic activity (T-lysin) from *Aeromonas salmonicida*. *FEMS Microbiol. Lett.*, **20**: 207-210.
- TITBALL, R.W. & MUNN, C.B.** (1985). The purification and some properties of H-lysin from *Aeromonas salmonicida*. *J. Gen. Microbiol.*, **131**: 1603-1609.
- TITBALL, R.W., BELL, A. & MUNN, C.B.** (1985). Role of caseinase from *Aeromonas salmonicida* in activation of hemolysin. *Infect. Immun.*, **49**: 756-759.
- TITBALL, R.W.** (1993). Bacterial phospholipases C. *Microbiol. Rev.*, **57**: 347-366.
- TODER, D.S., GAMBELLO, M.J. & IGLEWSKI, B.H.** (1991). *Pseudomonas aeruginosa* LasA: a second elastase under the transcriptional control of LasR. *Mol. Microbiol.*, **5**: 2003-2010.
- TORANZO, A.E., BARJA, J.L., COLWELL, R.R. & HETRICK, F.M.** (1983). Characterization of plasmids in bacterial fish pathogen. *Infect. Immun.*, **39**: 184-192.
- TORANZO, A.E., COMBARRO, P., CONDE, Y. & BARJA, J.L.** (1985). Bacteria isolated from rainbow trout reared in fresh-water in Galicia (N.W., Spain): taxonomic analysis and drug resistance patterns. *In Fish and shellfish pathology*. A.E. Ellis (ed.). **15**: 141-152. Academic Press, London.

- TOWBIN, H., STAEHELIN, T. & GORDON, J.** (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **76**: 4350-4354.
- TRUST, T.J., KAY, W.W. & ISHIGURO, E.E.** (1983). Cell surface hydrophobicity and macrophage association of *Aeromonas salmonicida*. *Curr. Microbiol.*, **9**: 315-318.
- TRUST, T.J., KOSTRZYNSKA, M., EMÖDY, L. & WADSTRÖM, T.** (1993). High-affinity binding of the basement membrane protein collagen type IV to the crystalline virulence surface protein array of *Aeromonas salmonicida*. *Mol. Microbiol.*, **7**: 593-600.
- TSAI, G.J., TSAI, F.C. & KONG, Z.L.** (1997). Effects of temperature, medium composition, pH, salt and dissolved oxygen on haemolysin and cytotoxin production by *Aeromonas hydrophila* isolated from oyster. *Int. J. Food Microbiol.* **38**: 111-116.
- TYLER, S.D., JOHNSON, W.M., HUANG, J.C., ASHTON, F.E., WANG, G., LOW, D.E. & ROZEE, K.R.** (1992). Streptococcal erythrogenic toxin genes: detection by polymerase chain reaction and association with disease in strains isolated in Canada from 1940 to 1991. *J. Clin. Microbiol.*, **30**: 3127-3131.

UMELO, E. & TRUST, T.J. (1998). Physical map of the chromosome of *Aeromonas salmonicida* and genomic comparisons between *Aeromonas* strains. *Microbiology*, **144**: 2141-2149.

UTSALO, S.J., EKO, F.O., ANTIA-OBONG, O.E. & NWAIGWE, C.U. (1995). Aeromonads in acute diarrhoea and asymptomatic infections in Nigerian children. *Eur. J. Epidemiol.*, **11**:171-175.

VAN LITH, L.A. & AARTS, H.J. (1994). Polymerase chain reaction identification of *Salmonella* serotypes. *Lett. Appl. Microbiol.*, **19**: 273-276.

VELÁZQUEZ, L.C., ESCUDERO, M.E., DIGENARO, M.S., DECORTINEZ, Y.M. & De GUZMAN, A.M. (1998). Survival of *Aeromonas hydrophila* in fresh tomatoes (*Lycopersicon esculentum* Mill) stored at different temperatures and treated with chlorine. *J. Food Prot.*, **61**: 414-418.

VIPOND, R., BRICKNELL, I.R., DURANT, E., BOWDEN, T.J. ELLIS, A.E. SMITH, M. & MacINTYRE, S. (1998). Defined deletion mutants demonstrate that the major secreted toxins are not essential for the virulence of *Aeromonas salmonicida*. *Infect. Immun.*, **66**: 1990-1998.

W

WAKABONGO, M., BORTEY, E., MEIER, F.A. & DALTON, H.P. (1992). Rapid identification of motile *Aeromonas*. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.*, **15**: 511-515.

WAKABONGO, M. (1995). Motile *Aeromonas* as agent of infections of the foot. *J. Am. Podiatr. Med. Assoc.*, **85**: 505-508.

WANDERSMAN, C. (1989). Secretion, processing and activation of bacterial extracellular proteases. *Mol. Microbiol.*, **3**: 1825-1831.

WELDIN, J.C. & LEVINE, M. (1923). An artificial key to the species and varieties of the colon-typhoid or intestinal group of bacilli. *Abstr. Bacteriol.*, **7**: 13-16.

WERTHEIMER, A.M., VERWEIJ, W., CHEN, Q., CROSA, L.M., NAGASAWA, M., TOLMASKY, M.E., ACTIS, L.A. & CROSA, J.H. (1999). Characterization of the *angR* gene of *Vibrio anguillarum*: essential role in virulence. *Infect. Immun.*, **67**: 6496-6509.

WHITBY, P.W., LANDON, M. & COLEMAN, G. (1992). The cloning and nucleotide sequence of the serine protease gene (*aspA*) of *Aeromonas salmonicida* ssp. *salmonicida*. *FEMS Microbiol. Lett.*, **99**: 65-72.

WILCOX, M.H., COOK, A.M., ELEY, A. & SPENCER, R.C. (1992). *Aeromonas* spp. as a potential cause of diarrhoea in children. *J. Clin. Pathol.*, **45**: 959-963.

WOHLGEMUTH, K., PIERCE, R.L. & KIRKBRIDE, C.A. (1972). Bovine abortion associated with *Aeromonas hydrophila*. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, **160**: 1001-1002.

WONG, K.R., McLEAN, D.M. & BUCKLEY, J.T. (1990). Cloned aerolysin of *Aeromonas hydrophila* is exported by a wild type marine *Vibrio* strain but remains periplasmic in pleiotropic export. *J. Bacteriol.*, **172**: 372-376.

WONG, C.Y., HEUZENROEDER, M.W. & FLOWER, R.L. (1998). Inactivation of two haemolytic toxin genes in *Aeromonas hydrophila* attenuates virulence in a suckling mouse model. *Microbiology*, **144**: 291-298.

WRETLIND, B. & PAVLOVSKIS, O.R. (1983). *Pseudomonas aeruginosa* elastase and its role in *Pseudomonas* infections. *Rev. Infect. Dis.*, **5**: 998-1004.

- Y**AMADA, S., MATSUSHITA, S., DEJSIRILERT, S. & KUDOH, Y. (1997). Incidence and clinical symptoms of *Aeromonas* associated. *Epidemiol. Infect.*, **119**: 121-126.
- YAMADA-OKABE, T., MIO, T., ONO, N., KASHIMA, Y., MATSUI, M., ARISAWA, M. & YAMADA-OKABE, H.** (1999). Roles of three histidine kinase genes in hyphal development and virulence of the pathogenic fungus *Candida albicans*. *J. Bacteriol.*, **181**: 7243-7247.
- YANISCH-PERRON, C., VIEIRA, J. & MESSING, J.** (1985). Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC18 vectors. *Gene*, **9**: 103-119.
- Z**IMMERMANN, O.E.R. (1890). Die bakterien unserer trink- und Nutzwässer, insbesondere des wassers der chemnitzer wasserleitung. *Elfter Bericht. Naturewiss. Gess. Chemnitz.*, 53-154.
- ZYWNO, S.R., ARCENEUX, J.E., ALTWEGG, M. & BYERS, B.R.** (1992). Siderophore production and DNA hybridization groups of *Aeromonas* spp. *J. Clin. Microbiol.*, **30**: 619-622.