

## Determinación de factores de virulencia en cepas de *Aeromonas* spp., aisladas a partir de pescado

### Determination of virulence factors in strains of *Aeromonas* spp., isolated from fish

William Suárez Q,<sup>1\*</sup> M.Sc, Fanny Herrera A,<sup>1</sup> Ph.D.

<sup>1</sup>Universidad de Pamplona. Departamento de Microbiología, Facultad de Ciencias Básicas. Grupo de Investigación en Microbiología y Biotecnología (GIMBIO). Ciudad Universitaria. Pamplona, Norte De Santander. Colombia. \*Correspondencia: aquifex3@hotmail.com

Recibido: Mayo de 2010; Aceptado: Junio de 2011.

#### RESUMEN

**Objetivo.** Investigar la incidencia de cinco marcadores fenotípicos de virulencia en cepas de *Aeromonas* aisladas a partir de muestras de pescado expendido en Pamplona, Colombia. **Materiales y métodos.** Se utilizaron 47 cepas identificadas previamente. Se evaluaron: actividad hemolítica en agar sangre, suplementado con 5% de eritrocitos de cordero y agar sangre suplementado con 5% eritrocitos de sangre humana; actividad proteolítica en agar Mueller-Hinton suplementado al 10% (p/v) con leche descremada, actividad lipolítica en agar tributirina; actividad desoxirribonucleasas en agar DNAsa. **Resultados.** Se encontró que las cepas de *A. hydrophila*, *A. veronii* GH 8, *A. jandaei*, *A. veronii* GH 10 y *A. eucrenophila*, demostraron capacidad hemolítica, proteolítica, lipolítica y nucleasa. Todas las cepas de *A. popoffii* fueron  $\beta$ -hemolíticas en agar sangre humana, proteolíticas y con actividad DNAsa. Las cepas de *A. caviae*, coincidieron en ser hemolíticas y lipolíticas, mientras que la cepa de *A. schubertii*, manifestó la presencia de actividad hemolítica y DNAsa. **Conclusiones.** La frecuencia de los factores de virulencia en las cepas estudiadas fue: el 87% demostraron producción de nucleasas; el 83% fueron  $\beta$ -hemolíticas sobre eritrocitos humanos; el 68% expresaron producción de lipasas, el 63% fueron proteolíticas y el 53% resultaron ser hemolíticas sobre eritrocitos de cordero, indicando estos datos el posible potencial patógeno de las cepas. Estos resultados mostraron que el pescado comercializado en Pamplona, puede ser una fuente importante de especies de *Aeromonas* que expresan factores asociados a la virulencia para el hombre.

**Palabras clave:** *Aeromonas*, desoxirribonucleasa, hemólisis, lipasa, pescado, virulencia (Fuente: CAB, DeCS).

## ABSTRACT

**Objective.** The aim of this study was to determine the incidence of five phenotypic virulence markers in isolated strains of *Aeromonas* in fish being sold in Pamplona, Colombia. **Materials and methods.** A total of 47 strains previously identified were used. Haemolytic activity on blood agar, supplemented with 5% sheep erythrocytes, and blood agar supplemented with 5% human erythrocytes; proteolytic activity in Mueller-Hinton agar supplemented with 10% (w/v) skim milk; lipolytic activity on tributyrin agar and deoxyribonuclease (DNase) activity on DNase agar plates were evaluated. **Results.** Strains of *A. hydrophila*, *A. veronii* GH 8, *A. jandaei*, *A. veronii* GH 10 and *A. eucrenophila* demonstrated haemolytic, proteolytic, lipolytic and nuclease capacities. All *A. popoffii* strains were  $\beta$ -haemolytic, proteolytic and with DNase activity on human blood agar. Strains of *A. caviae*, also were haemolytic and lipolytic, whereas the strain of *A. schubertii* presented haemolytic and DNase activity. **Conclusions.** The frequency of the virulence factors in the studied strains was: 87% of the isolates presented nuclease production, 83% were  $\beta$ -hemolytic on human erythrocytes, 68% presented lipase production, 63% were proteolytic, and 53% were found to be haemolytic on sheep erythrocytes, these data indicate the possible pathogenic potential of the strains. These results also suggest that the fish sold in Pamplona, could be an important source of *Aeromonas* species expressing factors associated with virulence in humans.

**Key words:** *Aeromonas*, desoxirribonucleases, fish, hemolysis, lipases, virulence (Sources: CAD, DeCS).

## INTRODUCCIÓN

El género *Aeromonas* está formado por bacilos Gram-negativos, oxidasa-positivos y anaerobios facultativos. Algunas especies han sido relacionadas como agentes de infecciones gastrointestinales y de infecciones extraintestinales. El género *Aeromonas* en la actualidad incluye 30 especies y 12 subespecies, con la inclusión de *A. tecta* (1). *A. hydrophila*, *A. veronii* biovar *sobria*, *A. caviae*, *Aeromonas jandaei*, *A. schubertii* y *A. trota* son las especies frecuentemente aisladas de muestras clínicas (2). En Colombia, por sus condiciones culturales y socioeconómicas, las enfermedades gastrointestinales son un gran problema de salud pública (3).

Los estudios epidemiológicos relacionados con la función etiológica de *Aeromonas* spp., en episodios de diarrea son limitados, ya que pocos laboratorios de microbiología emplean técnicas y métodos específicos para su aislamiento e identificación (4); los procesos entéricos afectan a todos los grupos de edad, sin embargo la población infantil es la más afectada (5,6). La presencia de factores de virulencia en *Aeromonas* spp. es un hecho reconocido. Sin embargo, la patogénesis de las infecciones causadas por *Aeromonas* spp. se desconoce. Los factores de virulencia descritos en *Aeromonas* spp. incluyen tanto componentes estructurales como flagelos, pilis, cápsula, capa S, LPS y proteínas de la membrana externa y productos extracelulares como hemolisinas (7), enterotoxinas citotóxicas y citotónicas (8) proteasas, lipasas, desoxirribonucleasas y sideróforos (4,9,10).

El objetivo del presente estudio fue determinar la presencia de marcadores fenotípicos de virulencia en cepas de *Aeromonas* aisladas a partir de muestras de pescado comercializado en la ciudad de Pamplona, Colombia.

## MATERIALES Y MÉTODOS.

**Cepas.** En un estudio realizado previamente, se analizaron muestras de pescado comercializado en Pamplona (Colombia), con el fin de determinar la presencia de *Aeromonas*, logrando aislar un total de 47 cepas. La adscripción a especie de estas cepas se realizó por métodos bioquímicos tradicionales (11). La tabla 1 indica las especies aisladas.

Las cepas se conservaron congeladas en glicerol,

**Tabla 1.** Especies de *Aeromonas* aisladas en muestras de pescado

Especie	Número de cepas <sup>1</sup>
<i>A. hydrophila</i>	14
<i>A. veronii</i> GH 8	9
<i>A. jandaei</i>	8
<i>A. veronii</i> GH 10	8
<i>A. popoffii</i>	3
<i>A. eucrenophila</i>	2
<i>A. caviae/A. media</i>	2
<i>A. schubertii</i>	1
<b>TOTAL</b>	<b>47</b>

<sup>1</sup>Cantidad de cepas aisladas de cada especie.

de donde se tomaron 20 µL y se inocularon en Agar Base Rojo de Fenol incubando a 30°C durante 18 horas, para confirmar la pureza del cultivo. Después las colonias fueron sembradas en Agar Nutritivo (AN), y se evaluaron las siguientes actividades:

**Actividad hemolítica.** Se empleó el agar sangre suplementado con 5% eritrocitos de cordero y agar sangre suplementado con 5% eritrocitos de sangre humana. Para esto, a partir de cada una de las cepas cultivadas en el medio AN, se tomó una asada de cultivo y se sembró en spot en la superficie de cada uno de los dos tipos de medios de cultivo, incubando a 30°C durante 24 h. La presencia de zonas claras alrededor de las colonias indicó la actividad β-hemolítica.

**Actividad proteolítica.** Se evaluó la actividad caseinolítica de las cepas de la siguiente manera. Las colonias cultivadas en el medio AN se inocularon en spot sobre la superficie de placas de petri conteniendo agar Mueller-Hinton suplementado al 10% (p/v) con leche descremada, y se incubaron a 30°C durante 24 h. La presencia de una zona transparente alrededor de las colonias indicó la actividad proteolítica.

**Actividad lipolítica.** La actividad lipasa se determinó tomando una asada a partir del cultivo de las cepas en el medio AN, sembrando en spot en la superficie de placas de petri conteniendo agar Tributirina, e incubando a 30°C durante 24 h, la presencia de un halo opaco alrededor de las colonias, indicó la actividad de la lipasa.

**Actividad Desoxirribonucleasa.** A partir de colonias de las cepas cultivadas en el medio AN, se transfirió una asada sobre el agar DNasa, realizando siembra en spot y se incubó a 30°C durante 24 h. Posteriormente, se reveló inundando la caja con HCl 1 M, evaluando como

positivo las que presentaron un halo alrededor de las colonias.

## RESULTADOS

En la tabla 2, se relaciona la distribución de los factores de virulencia en las diferentes especies de *Aeromonas* analizadas.

Como puede observarse, la gran mayoría de las cepas de *A. hydrophila*, *A. veronii* GH 8, *A. jandaei*, *A. veronii* GH 10, *A. eucrenophila* y *A. popoffii*, expresaron todos los factores de virulencia analizados, indicando esto, el posible potencial patógeno de las cepas. Con relación a la frecuencia de los factores de virulencia en las cepas analizadas, los resultados más altos se presentaron para producción de nucleasas (87%), para actividad hemolítica en eritrocitos humanos (83%), siendo menor la producción de lipasas (68%), la producción de proteasas (63%) y la actividad hemolítica en eritrocitos de cordero (53%). Las cepas de *A. caviae* no expresaron actividad caseinolítica y aquellas identificadas como *A. schubertii* no presentaron β-hemólisis en eritrocitos de cordero y fueron negativas para la actividad proteasa, proteolítica y lipolítica.

## DISCUSIÓN

Aunque se han realizado numerosos estudios para esclarecer los mecanismos de patogenicidad en las infecciones causadas por *Aeromonas* spp., aún no se han dilucidado completamente (1,4). Sin embargo, se han identificado varios factores de virulencia entre los que se incluyen un gran número de enzimas extracelulares que parecen jugar un papel importante en la patogenicidad de estas bacterias (12,13); La producción de enzimas extracelulares es muy variable dentro de las especies de *Aeromonas*,

**Tabla 2.** Incidencia de cinco factores de virulencia en especies de *Aeromonas*.

CEPA	N° de cepas	Número de cepas (%)				
		β-hemólisis		Proteólisis	Lipólisis	DNAsas
		Sangre de cordero	Sangre humana			
<i>A. hydrophila</i>	14	8 (57)	10 (71)	7 (50)	10 (71)	11 (79)
<i>A. veronii</i> GH 8	9	5 (56)	7 (78)	7 (78)	6 (67)	8 (89)
<i>A. jandaei</i>	8	4 (50)	8 (100)	6 (75)	7 (88)	7 (88)
<i>A. veronii</i> GH 10	8	4 (50)	6 (75)	5 (63)	3 (38)	8 (100)
<i>A. popoffii</i>	3	2 (67)	3 (100)	3 (100)	2 (67)	3 (100)
<i>A. eucrenophila</i>	2	1 (50)	2 (100)	2 (100)	2 (100)	2 (100)
<i>A. caviae</i>	2	1 (50)	2 (100)	0 (0)	2 (100)	1 (50)
<i>A. schubertii</i>	1	0 (0)	1 (100)	0 (0)	0 (0)	1 (100)
<b>Total</b>	<b>47</b>	<b>25(53)</b>	<b>39(83)</b>	<b>30 (63)</b>	<b>32 (68)</b>	<b>41 (87)</b>

se considera que *A. hydrophila* y *A. sobria* los tienen con mayor frecuencia y *A. caviae* con menor frecuencia (7). Entre estos factores, la actividad hemolítica es la más relacionada con la enterotoxigenicidad de las cepas, siendo la aerolisina la hemolisina mejor estudiada (1). Las cepas de *A. hydrophila* aisladas en este estudio, demostraron una alta capacidad hemolítica, resultados que concuerdan con los hallados por otros autores (11,12); las cepas de *A. caviae* fueron hemolíticas en agar sangre humana y de cordero. Un estudio diferente reveló que el 52% de las cepas de *A. caviae* eran  $\beta$ -hemolíticas en agar sangre de cordero (11). El 50% de las cepas de *A. jandaei* aisladas aquí fueron hemolíticas en sangre de cordero. Resultados de otro ensayo demostraron que el 100% de las cepas de *A. caviae* y *A. jandaei* aisladas de pacientes con bacteriemia eran hemolíticas (12). De igual forma, se ha determinado que el 56.25% de cepas de *A. hydrophila*, el 26.05% de las cepas de *A. caviae* y el 100% de cepas *A. veronii* biovar *sobria* aisladas de niños menores de cinco años con enfermedad diarreica aguda, eran  $\beta$ -hemolíticas (14). Otra publicación reveló que el 100% de las cepas *A. hydrophila* y *A. caviae*, de origen ambiental y clínico expresaron esta actividad (15).

En cuanto a las cepas de *A. popoffii*, un alto porcentaje de ellas demostró actividad  $\beta$ -hemolítica (Tabla 2), coincidiendo con los resultados encontrados por otros autores (16).

Respecto a los sustratos empleados, el 83% de las especies de *Aeromonas* expresaron actividad hemolítica sobre eritrocitos humanos, mientras que el 53% lo hicieron sobre eritrocitos de cordero, aspecto que fue analizado previamente, indicando que los eritrocitos de cordero son menos sensibles que los eritrocitos de otros mamíferos (10).

El 87% de las especies estudiadas demostraron actividad nucleasa (DNasa) y, aunque no se conoce con precisión su posible función en la patogenia de *Aeromonas*, se sabe que son importantes para la nutrición bacteriana (16); estas enzimas son importantes para el establecimiento (invasión de las células huéspedes), desarrollo de la infección y, en otras bacterias como *Streptococcus*, se ha demostrado que las DNAsas están involucradas en infecciones bacterianas en humanos (17). Adicionalmente, se ha señalado que cepas de *Aeromonas* DNAsas positivas están relacionadas con septicemia en humanos (12,17); se considera a *A. hydrophila* como la principal especie productora de nucleasas aspecto que, si se tienen en cuenta el número de cepas aisladas

pertenecientes a esta especie, fue ratificado con los resultados de este estudio. El 50% de las cepas de *A. caviae* aisladas demostraron actividad DNasa (Tabla 2); Otros autores (13), detectaron actividad DNasa en el 66% de cepas de *A. caviae* aisladas de muestras fecales de niños con diarrea aguda.

Con relación a la producción de lipasas, el 68% de las cepas de *Aeromonas* evaluadas expresaron esta actividad; se cree que estas enzimas pueden alterar la membrana plasmática del huésped (16). Igualmente, se sabe que las lipasas interactúan con los leucocitos humanos y que la delección en los genes que las codifican reducen los efectos letales de las cepas en ratones y peces (18,19); se reconoce a *A. hydrophila* como una importante productora de lipasas, lo que fue corroborado por los resultados del estudio en cuestión. Se ha reportado, además, que por lo menos el 91% de las cepas de *A. hydrophila*, *A. caviae* y *A. veronii* biovar *sobria* aisladas de pacientes con diarrea en Brasil demostraron actividad lipolítica (18).

En conjunto, en el 63% de las especies se detectaron proteasas. Se considera que el papel principal de las proteasas es establecer y mantener la infección. Éstas son capaces de degradar diferentes compuestos como albúmina, fibrina, gelatina y elastina (20) y pueden estar involucradas en el mantenimiento de infecciones en heridas de humanos (20, 21). Resultados de otro estudio han indicado que el 100% de cepas de *A. hydrophila*, *A. caviae* y *A. veronii* biovar *sobria* aisladas de pacientes con diarrea demostraron actividad proteolítica (18). En el presente estudio, 50% de las cepas de *A. hydrophila* fueron proteolíticas (Tabla 2); Se ha reportado que el 90% de las cepas de *A. hydrophila* de origen clínico evidenciaron actividad proteolítica (22). En cuanto a las cepas de *A. caviae*, ninguna de ellas mostró actividad proteasa, resultado que no se relaciona con los hallazgos de otro ensayo, en el que se comprobó actividad proteasa en por lo menos el 58% de las cepas de *A. caviae* aisladas de infección intestinal en humanos (13).

Es importante destacar, que un alto porcentaje de las cepas identificadas como *A. veronii* biovar *sobria* o *A. veronii* GH 8 (anteriormente, *A. sobria*), presentaron actividad hemolítica, proteolítica, lipasa y DNasa, coincidiendo con los resultados obtenidos en diferentes estudios (18,23); Otros autores, encontraron que el 100% de *A. veronii* biovar *sobria* aisladas de pacientes con septicemia eran hemolíticas (12). Adicionalmente, se reportó que el 50% de aislamientos provenientes de procesos

diarreicos en humanos correspondientes a *A.veronii* biovar *sobria*, arrojaron resultados positivos para actividad hemolítica (24).

En total, el 83% de las cepas ensayadas fueron  $\beta$ -hemolíticas sobre eritrocitos humanos, 63% fueron proteolíticas, 68% expresaron producción de lipasas y el 87% demostraron producción de DNAsa, resultados que concuerdan con los hallados en un estudio realizado previamente, en el que se demostró actividad hemolítica, proteolítica, lipasa y DNAsa en el 60.5, 69.5, 73.6 y 68.6% respectivamente, de cepas de *Aeromonas* aisladas a partir de alimentos, señalando que estas cepas pueden representar un riesgo potencial para la salud del hombre (25).

En conclusión, en este estudio se logró determinar que un elevado porcentaje de cepas de *Aeromonas*, aisladas a partir de pescado consumido en la Ciudad de Pamplona (Colombia), demostraron marcadores fenotípicos de virulencia relacionados con la patogenicidad de las mismas en el ser humano. En todo caso, es importante investigar la presencia de genes que codifican factores de virulencia en las cepas estudiadas, como son *hlyA*, *aerA*, *act*, *alt* y *ast*, y así confirmar el rol de las cepas como vehículos de enfermedad en el hombre.

## REFERENCIAS

1. Janda JM, Abbott SL. The genus *Aeromonas*: Taxonomy, pathogenicity, and infection. Clin Microbiol Rev 2010; 23:35-73.
2. Martin-Carnahan A. Joseph SW. Aeromonadaceae. En: Brenner DJ, Krieg NR, Staley JT, Garrity GM. Eds. The Proteobacteria, Part B, Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. 2nd Ed. New York, NY: Springer-Verlag; 2005.
3. INVIMA. Ministerio de la Protección social. Informe de la vigilancia de las enfermedades transmitidas por alimentos. [en línea]. 2008. [Consultado Mayo 16 de 2011] URL Disponible En: [http://web.invima.gov.co/portal/documents/portal/documents/root/INFORMEETA\\_%20IITRIMESTRE%20200801.pdf](http://web.invima.gov.co/portal/documents/portal/documents/root/INFORMEETA_%20IITRIMESTRE%20200801.pdf).
4. Von Graevenitz A. The role of *Aeromonas* in diarrhea: a review. Infection 2007; 35(2):59-64.
5. Vila J, Ruiz J, Gallardo F, Vargas M, Soler L, Figueras MJ, Gascón J. *Aeromonas* spp. and traveler's diarrhea: Clinical Features and Antimicrobial Resistance. Emerg Infect Dis 2003; 9(5):552-555.
6. Krzymińska S, Mokracka J, Laganowska M, Włodarczyk K, Guszczńska E, Liszkowska J, Popkowska E, Lima I, Lemańska I, Wendt M. Enhancement of the virulence of *Aeromonas caviae* diarrhoeal strains by serial passages in mice. J Med Microbiol 2001; 50:303-312.
7. Farmer JJ, Arduino MJ, Hickman-Brenner FW. The genera *Aeromonas* and *Plesiomonas*. Prokaryotes 2006; 6:564-596.
8. Balaji V, Jesudason V, Sridharan G. Cytotoxin testing of environmental *Aeromonas* spp. In Vero cell culture. Indian J Med Res 2004; 119:186-189.
9. González-Serrano CJ, Santos JA, García-López ML y Otero A. Virulence markers in *Aeromonas hydrophila* and *Aeromonas veronii* biovar *sobria* isolates from freshwater fish and from a diarrhoea case. J Appl Microbiol 2002; 93:414-419.
10. Santos A, González J, Otero A, García-López ML. Hemolytic activity and siderophore production in different *Aeromonas* species isolated from fish. Appl Environ Microbiol 1999; 65(12):5612-5614.
11. Abbott SL, Cheung KW, Janda M. The genus *Aeromonas*: Biochemical characteristics, atypical reactions, and phenotypic identification schemes. J Clin Microbiol 2003; 37(11):2348-2357.
12. Cabrera LE, Bravo L, Ramírez MM, Llop A, Fernández A, Morier L, Borrego G. Factores de virulencia en cepas de *Aeromonas* spp. aisladas de pacientes con bacteriemia. Rev Panam Infectol 2007; 9(4):19-23.



13. Castro-Escarpulli G, Peña del Barrio D, Castañeda N, García A, Morier L, Aguilera-Arreola MG, Bravo L. Virulence factors of *A. caviae* strains isolated from acute diarrheic disease in Cuba. *Rev Latinoam Microbiol* 2002; 44(1):11-13.
14. Longa A, Vizcaya L, Nieves B, Bravo L, Morier L, Pérez-Schael I, Cabrera LE. Factores de virulencia asociados a la enteropatogenicidad en cepas de *Aeromonas* spp. aisladas de niños con diarrea en Mérida, Venezuela. *Rev Cubana Med Trop* 2005; 57(2):85-91
15. Castilho MC, Castro TL, Araújo VS, Trajano RS, Santos PA, Pimenta PM, et al. High frequency of hemolytic and cytotoxic activity in *Aeromonas* spp. isolated from clinical, food and environmental in Rio de Janeiro, Brazil. *Antonie Van Leeuwenhoek* 2009; 96:53-61.
16. Soler L, Figueras MJ, Chacón MR, Vila J, Marco F, Martínez-Murcia AJ, Guarro J. Potential virulence and antimicrobial susceptibility of *Aeromonas popoffii* recovered from freshwater and seawater. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2002; 32:243-247.
17. Chacón MR, Figueras MJ, Castro-Escarpulli G, Soler L, Guarro J. Distribution of virulence genes in clinical and environmental isolates of *Aeromonas* spp. *Antonie Van Leeuwenhoek* 2003; 84:269-278.
18. Guerra MF, Fadanelli R, Figueiró M, Schreiner F, Delamare AP, Wollheim C, Costa SP, Echeverrigaray S. *Aeromonas* associated diarrhoeal disease in south Brazil: prevalence, virulence factors and antimicrobial resistance. *Braz J Microbiol* 2007; 38(4):638-643.
19. Merino S, Aguilar A, Nogueras MM, Regue M, Swift S, Tomas JM. Cloning, sequencing, and role in virulence of two phospholipases (A1 and C) from mesophilic *Aeromonas* sp. serogroup O:34. *Infect Immun* 1999; 67(8):4008-4013.
20. Castro-Escarpulli G, Aguilera-Arreola M, Giono S, Hernández-Rodríguez C, Rodríguez M, Soler L, et al. El género *Aeromonas*. ¿Un patógeno importante en México? *Enf Infec Micro* 2002; 22(4):206-216.
21. Cascón A, Yugueros J, Temprano A, Sánchez M, Herranz C, Luengo JM. A major secreted elastase is essential for pathogenicity of *Aeromonas hydrophila*. *Infect Immun* 2000; 68:3233-3241.
22. Sechi LA, Deriu A, Falchi MP, Fadda G y Zanetti S. Distribution of virulence genes in *Aeromonas* spp. isolated from sardinian waters and from patients with diarrhea. *J App Microbiol* 2002; 92:221-227.
23. Ivanova EP, Zhukova NV, Gorshkova NM, Chaikina EL. Characterization of *Aeromonas* and *Vibrio* species isolated from a drinking water reservoir. *J Appl Microbiol* 2001; 90:919-927.
24. Rahman M, Colque-Navarro P, Kunh I, Huys G, Swings J, Möllby R. Identification and characterization of pathogenic *Aeromonas veronii* Biovar *sobria* associated with epizootic ulcerative syndrome in fish in Bangladesh. *Appl Environ Microbiol* 2002; 68(2):650-655.
25. Yucel N, Erdogan S. Virulence properties and characterization of aeromonads isolated from foods of animal origin and environmental sources. *J Food Prot* 2010; 73(5):855-60.