

Factores de Virulencia en Cepas de *Aeromonas* spp.

Virulence Factors of *Aeromonas* spp

Rincón V. Gresleida¹; Fuenmayor B. Alisbeth¹; Castellano G. Maribel²; Barrios U. Rosana³; Colina Ch. María³; Nuñez F. Génesis³.

¹Bacteriología Clínica. Escuela de Bioanálisis. Universidad del Zulia-Venezuela. ²Bacteriología.

³Licenciadas en Bioanálisis General. Escuela de Bioanálisis. Universidad del Zulia-Venezuela.

Autor de correspondencia: Gresleida Rincón.

E-mail: gresle61@hotmail.com

Resumen

Algunas especies de *Aeromonas* han emergido como patógenos importantes, asociadas al desarrollo de infecciones gastrointestinales y extraintestinales. El objetivo de este estudio fue evaluar el potencial de virulencia de cepas de *Aeromonas* procedentes de vegetales. Se analizó los factores de virulencia: DNAsa, lecitinasa, caseinasa, gelatinasa, β -hemolisinas y hemaglutininas, en 59 cepas de *A. hydrophila* y 61 de *A. caviae*, aisladas de cilantro, perejil y lechuga, comercializados en Maracaibo. Los resultados fueron analizados mediante el estadístico χ^2 . Los factores de virulencia estudiados fueron expresados por más del 80% de las cepas. Cuatro de los 6 factores fueron expresados en mayor proporción por las cepas de *A. hydrophila*, aunque la diferencia entre las especies sólo resultó significativa para la expresión de caseinasa (94,9% vs 72,1% $p < 0,05$). Todas las cepas exhibieron actividad de DNAsa. La expresión de lecitinasa resultó ligeramente superior en las cepas de *A. caviae* ($p > 0,05$). Se evidenció una diferencia significativa en el número de factores de virulencia expresado por las dos especies, siendo mayor para *A. hydrophila* ($p < 0,05$). La expresión de un número elevado de factores de virulencia por las cepas de *Aeromonas* analizadas, permite atribuirles un potencial de patogenicidad similar al descrito en las cepas procedentes de infecciones humanas.

Palabras clave: *Aeromonas* spp, factores de virulencia, patogenicidad, vegetales tipo hoja, gastroenteritis

Abstract

Some species of *Aeromonas* have emerged as important pathogens associated with the development of gastrointestinal and extra-intestinal infections. The objective of this study was to evaluate the potential virulence of *Aeromonas* strains from vegetables. Virulence factors were analyzed: DNase, lecitinasa, caseinase, gelatinase, hemolysines and hemagglutinies, in 59 strains of *A. hydrophila* and 61 of *A. caviae*, isolated from coriander, parsley and lettuce obtained in establishments in Maracaibo city. The results were analyzed through statistics χ^2 . The virulence factors studied were expressed for more of the 80% of the strains. Four of the 6 factors were expressed in greater proportion in *Aeromonas hydrophila* strains, although the difference between the species only significant in for caseinase expression (94.9% vs 72.1%, $p < 0.05$). All strains exhibited DNase activity. The lecitinasa expression result slightly higher in *A. caviae* strains ($p > 0.05$). A significant difference was evident in the number of virulence factors expressed by the two species, being higher for *A. hydrophila* ($p < 0.05$). The expression of a large number of virulence factors the analyzed *Aeromonas* strains, allow to attribute a potential of pathogenicity to the strain of human infections.

Keywords: *Aeromonas* spp, virulence factors, pathogenicity, vegetables, gastroenteritis.

Introducción

El género *Aeromonas* está conformado por bacilos Gram-negativos, fermentadores rápidos de la glucosa, oxidasa-positivos y anaerobios facultativos, que habitan en ecosistemas acuáticos naturales (lagos, ríos, aguas subterráneas y ambientes marinos con bajas concentraciones de sodio) o en aguas acumuladas artificialmente (represas, plantas de tratamiento, sistemas de distribución y otras)(1). También pueden encontrarse en el suelo, en los sedimentos y en algunos alimentos, incluyendo carne, pescado, vegetales y leche cruda (2).

Durante las últimas dos o tres décadas estos microorganismos han ido emergiendo como patógenos importantes para el humano (3), asociados al desarrollo de una variedad de infecciones tanto intestinales como extraintestinales (4). Actualmente el género incluye alrededor de 30 especies y 12 subespecies, algunas de las cuales han sido catalogadas por la Organización Mundial de la Salud como microorganismos de riesgo II (2).

El rol etiológico de *Aeromonas* en infecciones extraintestinales, especialmente a nivel de piel y tejidos blandos, es indiscutible. Por otra parte, su papel enteropatógeno ha sido ampliamente debatido, a pesar de que

en estos microorganismos se ha descrito una variedad de factores de virulencia, los cuales podrían participar en la patogénesis tanto de las infecciones sistémicas como de las infecciones intestinales que se le atribuyen. Entre tales factores se encuentran enzimas extracelulares (DNasa, gelatinasa, proteasas, hemolisinas), además de citotoxinas, enterotoxinas, hemagglutininas y otros, que le confieren al microorganismo el potencial para invadir, adherirse y lesionar los tejidos del hospedador (5,6).

Durante las últimas décadas se han venido presentado cada vez mayores evidencias en favor de la participación de algunas especies de *Aeromonas* como verdaderos agentes etiológicos de gastroenteritis (7,8), con una mayor importancia para los niños, los adultos mayores de 60 años y los viajeros (1). Pese a ello, los reportes referentes a la prevalencia de estos microorganismos en pacientes con diarrea aguda son escasos. Probablemente, esto se deba a que aún no se ha generalizado la implementación de una metodología dirigida a su investigación, así como la de otros bacilos oxidasa positiva, en los cultivos rutinarios de materia fecal (2).

Algunos estudios que documentan la importancia de *Aeromonas* como patógeno

intestinal demuestran que, en algunas regiones, la frecuencia de estos microorganismos puede ser similar, o inclusive superior, a la de los enteropatógenos convencionales como *Salmonella* y *Shigella* (9). En los Estados Unidos, las *Aeromonas* dan cuenta de aproximadamente el 13% de los casos de gastroenteritis (10). En Nigeria, constituyen los enteropatógenos más frecuentemente aislados durante las épocas de lluvia (9). En la India, se reporta el aislamiento de *Aeromonas* en un porcentaje importante de los pacientes hospitalizados con diarrea aguda (1). En Cuba, estos microorganismos ocupan el cuarto lugar entre los enteropatógenos bacterianos más frecuentes (2).

En Venezuela, específicamente en el Estado Zulia, una región con fuerte influencia lacustre, las especies de *Aeromonas* han sido reportadas con una frecuencia elevada en individuos con diarrea, ocupando el primer o segundo lugar entre los patógenos entéricos bacterianos más prevalentes, tanto en niños como en adultos (11,12). Resultados similares se derivan también de un estudio poblacional realizado en indígenas Añu de la Laguna de Sinamaica (13). *Aeromonas caviae* y *A. hydrophila* reiteradamente han quedado registradas como las especies más frecuentes en las muestras fecales analizadas en la región (11-13), en concordancia con diversos estudios que le atribuyen a esas especies, así como *A. veronii* biovar *sobria*, un verdadero potencial enteropatógeno (2,14-18).

Como se mencionó anteriormente, se ha documentado la presencia de miembros del género *Aeromonas* en una variedad de alimentos frescos, entre los que se incluyen vegetales como espárragos, brotes de soja y alfalfa, brócoli, repollo, coliflor, lechuga, cilantro, perejil, zanahorias, espinacas, tomates y pepino, entre otros (19,20). Un estudio realizado en la ciudad de Maracaibo (estado Zulia), posicionó a las *Aeromonas*, y especialmente a las especies *A. caviae* y *A. hydrophila*, como los enteropatógenos más frecuentemente aislados a partir de vegetales tipo hoja como cilantro, lechuga y perejil (21). Adicionalmente, en los vegetales tipo hoja contenidos en comidas rápidas expandidas al oriente del país, también se ha registrado una elevada frecuencia de aislamiento de

estos microorganismos, especialmente de las especies *A. schubertii* y *A. caviae* (22).

Debido a que los vegetales tipo hoja suelen consumirse crudos, en ensaladas y otras preparaciones, su contaminación por agentes bacterianos potencialmente patógenos puede representar para el consumidor un riesgo elevado de sufrir episodios gastrointestinales. Sin embargo, los estudios dirigidos a analizar el potencial enteropatógeno de las cepas de *Aeromonas* procedentes de fuentes ambientales son escasos. En el estado Zulia, donde estos microorganismos parecen representar un problema de salud importante, hasta ahora se desconoce si las cepas presentes en los alimentos expresan factores de virulencia similares a los descritos en las cepas intestinales. En consecuencia, no existen estimaciones de la magnitud del riesgo al que se encuentran expuestos los consumidores habituales de los alimentos susceptibles de estar contaminados por estos microorganismos.

Por lo anteriormente expuesto, el presente trabajo se realizó con el propósito de identificar la expresión fenotípica de algunos factores de virulencia, en cepas de *Aeromonas* spp. procedentes de vegetales tipo hoja, expendidos libremente en mercados populares y supermercados del municipio Maracaibo, Estado Zulia, y comparar la frecuencia de éstos en las especies *A. hydrophila* y *A. caviae*, como una contribución al discernimiento del papel enteropatógeno de estos microorganismos, así como del riesgo potencial al que se expone la población que adquiere y consume los vegetales expendidos en los mercados de la región.

MATERIALES Y METODOS

El tipo de investigación, corresponde al tipo descriptivo transversal, que es un estudio el cual está diseñado para medir la prevalencia de una exposición, en una población definida y en un tiempo específico.

Cepas bacterianas

Para el desarrollo de la investigación, se analizaron 120 cepas de *Aeromonas* spp. que

fueron aisladas e identificadas en un estudio previo, a partir de muestras de cilantro, perejil y lechuga, comercializados en diferentes mercados de la ciudad de Maracaibo, estado Zulia. (Tabla 1) Para el aislamiento de las cepas se emplearon los medios de DNAsa-Azul de Toluidina-Agar y Agar-Ampicilina-Almidón. Para la identificación hasta el nivel de especie

se siguió la metodología recomendada por Abbott y cols .basada en pruebas bioquímicas (23). Estos procedimientos se llevaron a cabo en el Laboratorio de Bacteriología de la Escuela de Bioanálisis de la Universidad del Zulia. Las cepas fueron conservadas a temperatura ambiente, en tubos con Agar Nutritivo sellados con parafina, para los estudios posteriores.

Tabla 1. Especies de *Aeromonas* estudiadas y vegetales de procedencia

Especies	Vegetales de procedencia		
	Nº de cepas (%)		
	Cilantro	Lechuga	Perejil
A. <i>hydrophila</i>	26 (44,1)	25 (42,4)	8 (13,6)
A. <i>caviae</i>	30 (49,2)	21 (34,4)	10 (16,4)

Detección fenotípica de factores de virulencia

Durante el periodo comprendido entre Octubre y Diciembre de 2015, se llevó a cabo el procesamiento de las cepas, para la investigación de algunos factores de virulencia. Para ello, se verificó su pureza y su viabilidad, mediante subcultivo a placas de Agar Mc Conkey incubadas por 24 horas, en aerobiosis, a 35°C. Las colonias, fermentadoras o no de la lactosa, fueron sembradas en agar nutritivo para verificar que presentaran una reacción positiva a la prueba de la oxidasa. A partir de las cepas consideradas aptas, se llevó a cabo la investigación fenotípica de los siguientes factores de virulencia: producción de las enzimas extracelulares DNAsa, caseinasa, gelatinasa, lecitinasa y β -hemolisinas, así como la presencia de hemaglutininas.

La actividad de nucleasa fue investigada siguiendo el procedimiento descrito por McFaddin (24), para evaluar la actividad proteolítica se investigó la presencia de las enzimas caseinasa y gelatinasa (2,25).La capacidad del microorganismo para hidrolizar lípidos fue evaluada a través de la actividad de lecitinasa aplicando el protocolo descrito por Boiko (26), la presencia de β -hemolisinas fue investigada según la metodología descrita por Robinson (27) y la detección de hemaglutininas se llevó a cabo por el método en microplaca (28).

Análisis Estadístico: Para el análisis estadístico de los datos se aplicó la prueba de χ^2 (chi cuadrado) con un nivel de confiabilidad de 95% ($p < 0,05$). Para ello se empleó el software estadístico SPSS (Statistical Product and Service Solutions), versión 20.

Resultados

La Figura 1 muestra la positividad de las cepas de *Aeromonas* para los diferentes factores de virulencia analizados. Se observa que todos los factores fueron expresados en un porcentaje superior al 80%, predominando la positividad

para las enzimas DNAsa (100%) y gelatinasa (98,33%). Cabe destacar que la actividad de hemaglutinación de eritrocitos humanos, evidenciada en 98 de las 120 cepas estudiadas (81,66%), resultó resistente a manosa en la mayoría de los casos (85 cepas; 86,7%).

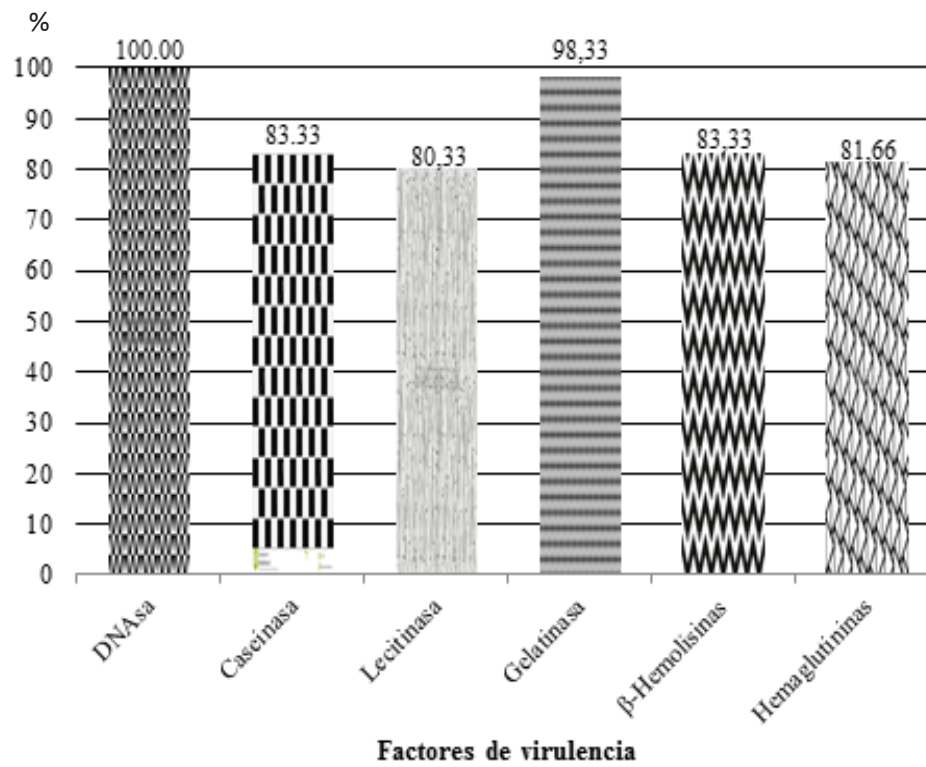


Figura 1. Positividad de las cepas de *Aeromonas* spp. para los diferentes factores de virulencia analizados.

Al analizar la distribución por especie, de la positividad para cada uno de los determinantes de virulencia (Gráfico 2), se observa que 4 de los 6 factores estudiados, caseinasa, gelatinasa, betahemolisinas y hemaglutininas, fueron expresados con mayor frecuencia por las cepas de *A. hydrophila*, aunque la diferencia entre especies sólo resultó significativa para la actividad de caseinasa (94,9% vs. 72,1%; $p < 0,05$). Como se evidenció en la figura 1, la enzima DNAsa fue expresada por la totalidad de las cepas de ambas especies. Únicamente la actividad de lecitinasa se expresó con mayor frecuencia en la especie *A. caviae* ($p > 0,05$). En cuanto a la actividad hemaglutinante, ésta

resultó predominantemente manosa-resistente en ambas especies de *Aeromonas* (88,9% en *A. hydrophila* y 84,0% en *A. caviae*; $p > 0,05$).

La figura 3 presenta el número de factores de virulencia expresado por las cepas de las dos especies de *Aeromonas* estudiadas. Aunque en general, la mayoría de las cepas estuvieron dotadas de la capacidad para expresar entre 4 y 6 de los factores estudiados, es importante resaltar que un 96,5% de las cepas de *A. hydrophila* resultaron positivas para 5 ó 6 de ellos, en comparación con sólo un 68,9% de las cepas de *A. caviae* con ese resultado. Esta diferencia entre las especies fue estadísticamente significativa ($p < 0,05$).

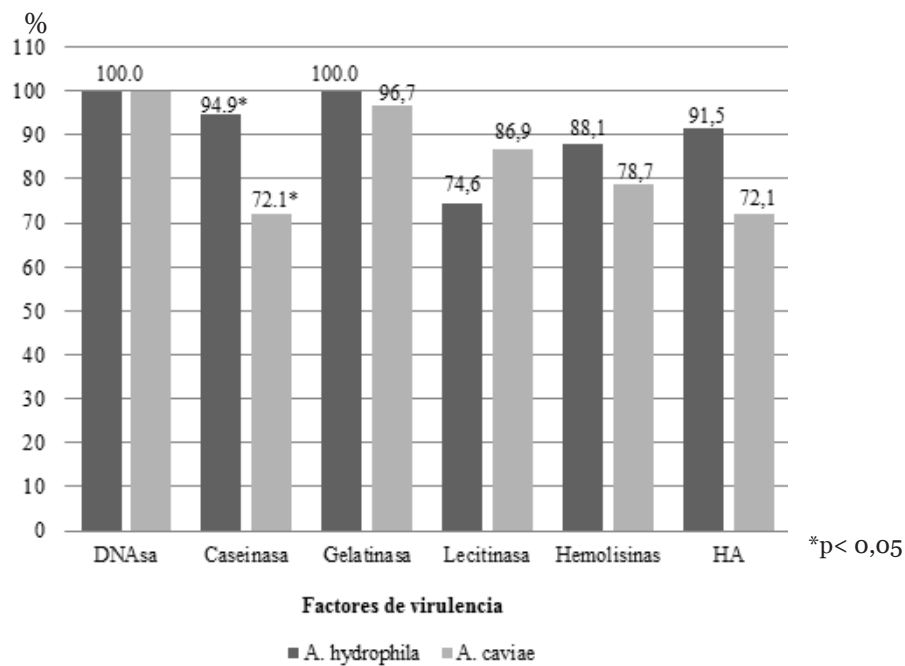


Figura 2. Expresión de los diferentes factores de virulencia por las especies *A. hydrophila* y *A. caviae*

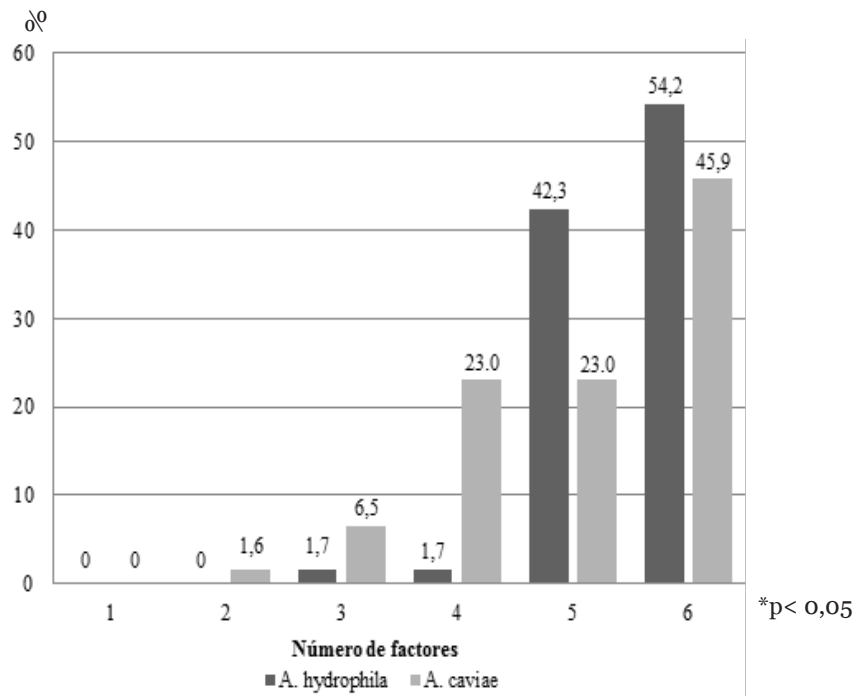


Figura 3. Número de factores de virulencia fenotípicos expresado por especie.

DISCUSIÓN

La importancia de las especies de *Aeromonas* como patógenos emergentes, causantes de cuadros clínicos intestinales de severidad variada así como de infecciones extraintestinales, se ha incrementado durante las últimas décadas (29). Esta realidad es particularmente evidente en el estado Zulia, donde estos microorganismos han llegado a desplazar en frecuencia a los patógenos entéricos convencionales (11,12). La amplia distribución de las *Aeromonas* en el ambiente y en múltiples tipos de alimentos (30), su capacidad para sobrevivir a algunas modalidades de conservación, tratamiento y saneamiento de los productos de consumo humano (31,32), y los reportes epidemiológicos que vinculan la aparición de brotes localizados y autolimitados de diarrea aguda al consumo de productos alimentarios contaminados con estos agentes (33), motivaron la realización del presente estudio, con la finalidad de conocer si las cepas de *Aeromonas* aisladas de alimentos, poseen un potencial de patogenicidad similar al descrito en las cepas provenientes de infecciones humanas.

En algunas especies del género se ha identificado un gran número de moléculas estructurales y enzimas extracelulares que parecen desempeñar un papel importante en la patogenia de las infecciones intestinales (34) y sistémicas (35). Entre los factores de virulencia asociados a enteropatogenicidad se incluyen productos extracelulares como hemolisinas, citotoxinas, proteasas, lipasas, endotoxinas, enterotoxinas, además de moléculas estructurales como hemaglutininas y adhesinas (36,37). Se han realizado numerosos estudios para identificar y caracterizar esos determinantes de virulencia. Las evidencias reunidas hasta ahora relacionan la producción de tales factores con un mayor potencial de patogenicidad en la cepa infectante (34), aun cuando el papel preciso de cada uno de ellos no ha sido completamente dilucidado (38).

En este estudio, que analizó cepas de *A. hydrophila* y *A. caviae* aisladas de vegetales tipo hoja, los resultados globales coinciden con lo reportado en cepas provenientes de muestras clínicas intestinales y sistémicas, así como también en muestras de aguas y alimentos,

en el sentido de que la mayoría de los factores de virulencia fueron expresados con una alta frecuencia (39-41). La variabilidad evidenciada entre los diferentes estudios para cada factor en particular, podría guardar relación con la presión selectiva a la que se encuentran sometidas las cepas en los diversos ecosistemas de cada área geográfica.

Aun cuando todos los factores fueron expresados por más del 80% de las cepas, los resultados más altos correspondieron a la actividad de nucleasa y gelatinasa con cifras iguales o cercanas al 100%. Un predominio en la expresión de actividad de nucleasa ha sido reportado también en cepas clínicas de *Aeromonas* (100% en cepas provenientes de pacientes septicémicos y 88,9% en enfermedad diarreica aguda) (40,42), así como en cepas obtenidas de muestras de agua potable (94%) (41) y alimentos (87%) (25). A pesar de que se considera a *A. hydrophila* como la principal especie productora de nucleasas, y algunos estudios reflejan una menor expresión de estas enzimas en *A. caviae* (25,43), en este estudio ambas especies presentaron un comportamiento similar en cuanto a este factor de virulencia en particular.

En las especies de *Aeromonas* se han descrito al menos tres enzimas con actividad DNAsa, pero no se ha determinado fehacientemente la posible función que éstas desempeñan en la patogenia. Sin embargo en otros géneros bacterianos como *Streptococcus*, las nucleasas extracelulares son consideradas de gran importancia para el establecimiento y desarrollo de la infección (44). Es posible que la DNAsa participe en la invasión celular, y que al igual que otros factores de virulencia producidos por las especies de *Aeromonas*, cumpla una función importante como enzima nutricional, contribuyendo a proporcionarle a la bacteria una fuente de compuestos ricos en carbono y nitrógeno (41).

Aeromonas produce al menos tres tipos de proteasas, capaces de degradar diferentes compuestos como albúmina, fibrina, gelatina, caseína y elastina (4,44). La expresión de enzimas proteolíticas resultó marcadamente frecuente en las cepas de *Aeromonas* provenientes de vegetales (98% y 83% de positividad para gelatinasa y caseinasa, respectivamente). Las cepas clínicas

han demostrado también presentar actividad proteolítica de tipo gelatinasa con una elevada frecuencia (84% en cepas sistémicas, 61-100% en cepas enteropatógenas) (35,45). En cepas de efluentes de aguas de desecho tratadas en África, todas las cepas resultaron productoras de proteasas con actividad de caseinasa y 88% resultaron positivas para gelatinasa (46). En Colombia, el 96% de las cepas aisladas del agua de consumo evidenciaron actividad proteolítica de tipo caseinasa, en comparación con sólo un 63% en las cepas provenientes de pescado (25,41). Se ha sugerido que las enzimas proteolíticas excretadas por *Aeromonas* spp. desempeñan un papel importante en la invasividad y en el establecimiento y mantenimiento de la infección, porque además de proporcionar nutrientes para la proliferación celular, contribuyen a la evasión inicial de las defensas del hospedador, jugando un papel clave en la evolución de las infecciones humanas a nivel de piel y tejidos blandos (6,38,44).

Es importante resaltar que, en esta investigación, sólo la expresión de actividad caseinolítica resultó diferente entre las especies *A. hydrophila* y *A. caviae*, siendo inferior en esta última (95 vs. 72%, $p < 0,05$), aunque la actividad de gelatinasa fue la segunda más frecuente en *A. caviae* (96,7%) luego de la actividad de nucleasa. Resultados similares para actividad caseinolítica, aunque de menor rango, se reportan en las cepas de *Aeromonas* obtenidas de pescado: 50% en *A. hydrophila* y 0% en *A. caviae* (25). En cepas ambientales de *A. hydrophila* se describe una actividad menor para ambas enzimas que las obtenidas en el presente estudio (55% para caseinasa y 0% para gelatinasa) (47). Por otra parte, se ha reportado actividad de gelatinasa y caseinasa en el 50-100% de las cepas tanto de *A. hydrophila* como de *A. caviae* aisladas de pacientes con diarrea, pero con resultados variables para las dos proteasas y las dos especies en cada estudio (43,45,47). Los resultados demuestran la necesidad de realizar las comparaciones entre los diferentes estudios de una manera muy estricta, tomando en cuenta los sustratos específicos de acción para cada enzima, debido a las implicaciones que cada una tiene para la virulencia de la cepa. Por ejemplo, se ha demostrado que una proteasa secretada por *A. hydrophila*, que posee una alta actividad

elastolítica, y que no pudo ser evaluada en el presente estudio, debe ser considerada como un verdadero factor de virulencia para esta especie (38). La caseinasa, por su parte, parece tener un rol en la activación de otras enzimas patogénicas como la hemolisina (48).

En relación a la producción de lipasas, en este estudio se evaluó la actividad de la fosfolipasa C con actividad de lecitinasa, la cual ha sido señalada como un verdadero factor de virulencia para las *Aeromonas* mesófilas, con un importante efecto citotóxico (49). Las fosfolipasas bacterianas están involucradas en diferentes procesos patogénicos, actúan como hidrolasas sobre los lípidos de las membranas celulares y frecuentemente se asocian a la producción de daño intestinal (2,45,49). En estudios previos se ha reconocido a la *A. hydrophila* como una importante productora de lipasas (45). En esta investigación, las dos especies analizadas produjeron lecitinasa en un elevado porcentaje, que resultó ligeramente mayor en *A. caviae* (86,9 versus 74,6%, $p > 0,05$). Cabrera y cols. reportan hallazgos similares en cepas aisladas de muestras clínicas (75% en *A. hydrophila* vs 100% en *A. caviae* (35). En pacientes cubanos con enfermedad diarreica aguda, donde se obtuvo un predominio de aislamiento de *A. caviae*, la proporción de cepas productoras de lecitinasa alcanzó un 83,3% (40). Los resultados del presente estudio y los reportes de otros autores corroboran que la lecitinasa parece ser expresada por todas las especies de *Aeromonas* (50).

Entre los factores de virulencia analizados, la actividad hemolítica parece estar muy relacionada con la enterotoxigenicidad de las *Aeromonas*. En algunas especies se ha descrito la presencia de los genes *aer* y *hlyA*, responsables de la producción de las toxinas aerolisinas y hemolisinas, respectivamente. La aerolisina es uno de los principales factores de virulencia en cuadros de gastroenteritis, favoreciendo la invasión de las células epiteliales (46). Las cepas de las dos especies aquí analizadas demostraron una alta capacidad para hemolizar los eritrocitos de carnero (superior al 75%). Las cifras reportadas tanto en muestras ambientales como en muestras clínicas son muy diversas, pero la tendencia es a resultar similar para ambas especies o superior en *A. hydrophila*: en cepas aisladas de pescado aproximadamente

50% para ambas especies (25), en muestras de aguas desde 16% hasta 67% (46-47), en algunos estudios con cepas clínicas, entre 96 y 100% para ambas especies (35,51,52). En reportes posteriores, los resultados para β -hemolisinas en cepas de pacientes con enfermedad diarreica varían desde 20% en Italia, 24% en Cuba y Brasil, 38% en nuestro país, 81% en otro trabajo cubano, hasta cerca del 100% en Sur África (40,47,52-55). En Venezuela, Longa y cols. reportan mayor frecuencia de actividad hemolítica en *A. hydrophila* que en *A. caviae* (56% vs 26%) (55). Resultados similares se reportan en Brasil para la presencia del gen *aer* (45). Algunos autores han evidenciado una fuerte correlación entre la actividad de hemolisina y la producción de enterotoxinas, por lo que se ha considerado este hallazgo como una prueba del poder enteropatógeno tanto de *A. hydrophila* como de *A. caviae* (35,51,52,56).

Tanto en las cepas de *Aeromonas* de origen clínico como en las de procedencia ambiental se ha descrito la presencia de dos tipos de fimbrias, unas cortas rígidas que suelen encontrarse en número elevado sobre la superficie celular y otras largas, onduladas y flexibles, más escasas. Estas últimas se consideran hemaglutininas y juegan un papel importante en la adhesión bacteriana a las células epiteliales, en la formación de biofilm y en la motilidad (57). Al igual que se describe en las cepas enteropatógenas de *Escherichia coli*, las fimbrias con actividad hemaglutinante pueden ser inhibidas en presencia de algunos carbohidratos como manosa, fructosa o galactosa. La hemaglutinación mediada por fimbrias manosa-resistentes parece estar más relacionada con enteropatógenidad (58).

Varios reportes sugieren que las cepas enterotoxigénicas de *Aeromonas* son también potentes productoras de hemaglutininas, así que esta actividad, conjuntamente con la actividad hemolítica, podría servir como un indicador de la enterotoxigenicidad de las cepas que afectan al humano (52), pero al igual que la propiedad hemolítica, ésta presenta resultados divergentes entre los estudios, en cuanto a frecuencia, especie que la expresa y procedencia de la cepa. En el caso específico de las cepas aisladas de vegetales, la frecuencia de hemaglutinación resultó elevada en ambas especies y al parecer, mediada fundamentalmente por

fimbrias manosa-resistentes. En aislamientos fecales y provenientes de agua, las cifras de hemaglutinación oscilan en un amplio rango (30-96%), y se describe predominantemente del tipo manosa-sensible (39,40,52,55). En cuanto a las especies, se ha reportado una frecuencia igualmente elevada (mayor al 90%) de actividad hemaglutinante en las tres principales especies enteropatógenas aisladas de heces diarreicas, muestras de agua y otras fuentes ambientales (59); mientras que en hemocultivos las cepas de *A. caviae* exhibieron esa propiedad con una frecuencia muy superior a la observada en *A. hydrophila* (100 vs 25%). La hemaglutinación resistente a manosa parece ser un atributo muy acentuado en las cepas de procedencia ambiental (28,56).

Finalmente, las cepas de *Aeromonas* pertenecientes a las dos especies analizadas en el presente estudio, expresaron como mínimo dos de los factores de virulencia investigados, y la mayoría de ellas exhibió actividad para 5 o 6 factores, lo que indica que estas cepas poseen el potencial suficiente para causar daño en un hospedador susceptible. Estos resultados concuerdan con diversos estudios que han demostrado al menos un factor de virulencia detectable en las diferentes especies de *Aeromonas* procedentes de muestras de pacientes con diarrea o sepsis, así como de agua y alimentos (55,56). El hallazgo de la expresión fenotípica de un número significativamente mayor de factores en la especie *A. hydrophila*, en comparación con *A. caviae*, refleja la tendencia general de múltiples reportes (41,56).

En conclusión las cepas de *Aeromonas hydrophila* y *A. caviae* provenientes de vegetales tipo hoja expendidos en mercados populares de Maracaibo, exhibieron una alta frecuencia y variedad de marcadores fenotípicos de virulencia, algunos de ellos altamente relacionados con la patogenicidad de estos microorganismos en el hospedador humano. Aunque es necesario reconocer, que en este estudio, no se evaluaron factores directamente asociados a enteropatógenidad, como la producción de enterotoxinas y citotoxinas, la elevada proporción de cepas con actividad de hemolisina, proteasas y hemaglutininas, tres factores de virulencia que en diversos estudios han presentado una fuerte correlación con la enterotoxigenicidad, sugiere, que estas

cepas poseen el potencial necesario para desencadenar infecciones intestinales en el consumidor. De igual forma, la expresión de un número elevado de factores de virulencia por las cepas de *Aeromonas* analizadas, permite atribuirles un potencial de patogenicidad similar al descrito en las cepas procedentes de infecciones humanas. Los resultados sugieren que los vegetales tipo hoja expendidos en la región, vehiculizan bacterias con un potencial patogénico suficiente como para representar un riesgo importante para la salud del consumidor.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Sinha S, Shimada T, Ramamurthy T, Bhattacharya SK, Yamasaki S, Takeda Y, Nair GB. Prevalence, serotype distribution, antibiotic susceptibility and genetic profiles of mesophilic *Aeromonas* species isolated from hospitalized diarrhoeal cases in Kolkata, India. *J Med Microbiol* 2004; 53:527-34.
2. Bravo L., Fernández A., González D., Ramírez M, Águila A., Cabrera N. Martínez I, Fernández C, Sánchez L. y Cruz Y. Caracterización fenotípica de cepas de *Aeromonas* aisladas de pacientes con enfermedad diarreica aguda. *Rev Cubana Med Trop* 2011; 63: 76-80.
3. Praveen PK, Debnath C, Shekhar S, Dalai N, Ganguly S. Incidence of *Aeromonas* spp. infection in fish and chicken meat and its related public health hazards: A review. *Vet World* 2016; 9:6-11.
4. Janda JM, Abbott SL. The genus *Aeromonas*: Taxonomy, pathogenicity, and infection. *Clin Microbiol Rev* 2010; 23: 35-73.
5. Soler L, Figueras MJ, Chacón MR, Vila J, Marco F, Martínez-Murcia AJ, Guarro J. Potential virulence and antimicrobial susceptibility of *Aeromonas popoffi* recovered from fresh water and seawater. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2002; 32: 243-247.
6. González-Serrano CJ, Santos JA, García-López ML, Otero A. Virulence markers in *Aeromonas hydrophila* and *Aeromonas veronii* biovar *sobria* isolates from freshwater fish and from a diarrhoea case. *J App Microbiol* 2002; 93: 414-9.
7. Galindo CL, Chopra AK. *Aeromonas* and *Plesiomonas* species. En: Doyle MP, Beuch LR, editors. *Food microbiology: fundamentals and frontiers*. Washington, D.C: ASM Press; 2007: 1-56.
8. Taneja N, Khurana S, Trehan A, Marwaha RK, Sharma M. An outbreak of hospital acquired diarrhea due to *Aeromonas* *sobria*. *Indian Pediatr* 2004; 41:912-6.
9. Nzeako B, Okafor N. Bacterial enteropathogens and factors associated with seasonal episodes of gastroenteritis in Nsukka, Nigeria. *Br J Biomed Sci* 2002; 59:76-9.
10. Buchanan, R. L. The new pathogens. An update of selected examples. *Assoc Food Drug Off Q Bull* 1984;48: 142- 55.
11. Rincón G, Ginestre M, Harris B, Romero S, Martínez A. Frecuencia de bacterias enteropatógenas en niños menores de cinco años. *Kasmera* 2002; 30: 33-41.
12. Bonilla X, Perozo A. Boletín de Etiología y Resistencia Bacteriana. Centro de Referencia Bacteriológica. Servicio Autónomo Hospital Universitario de Maracaibo. 14^{ta} Edición. Mayo 2015. Maracaibo-Venezuela.
13. Levy A, Salazar J, Mata M, Sandra L, Paz A, Valero K, Hernández I, Fuenmayor A. Bacterias enteropatógenas en la comunidad étnica Añu de la Laguna de Sinamaica, estado Zulia, Venezuela. *Rev Soc Ven Microbiol* 2009; 29:84-90.
14. Altwegg M, Steigerwalt AG, Altwegg-Bissig J, Lüthy-Hottenstein J, Brenner DJ. Biochemical identification of *Aeromonas* genospecies isolated from humans. *J Clin Microbiol* 1990; 28: 258-64.
15. Havelaar, A.H., Schets, F.M., van Silfhout, A., Jansen, W.H., Wieten, G. and van der Kooij, D. Typing of *Aeromonas* strains from patients with diarrhoea and from drinking water. *J App Bact* 1992; 72: 435-444.
16. Khun I, Albert MJ, Ansaruzzaman M, Bhuiyan NA, Alabi SA, Islam MS, Neogi PK, Huys G, Janssen P, Kersters K, Mollby R. Characterization of *Aeromonas* spp. Isolated from humans with diarrhea,

- from healthy controls, and from surface water in Bangladesh. *J Clin Microbiol* 1997; 35:369-73.
17. Borrell N, Figueras M, Guarro J. Phenotypic identification of *Aeromonas* genome species from clinical and environmental sources. *Canadian J Microbiol* 1998; 44:103-8.
 18. Ramírez Y., Castillo A., Mariño M., Salazar D., Mesa I., Cabrera M. Resistencia antimicrobiana de *Aeromonas* aisladas en pacientes pediátricos con enfermedad diarreica aguda. 8th Cuban Congress on Microbiology and Parasitology, 5th National Congress on Tropical Medicine and 5th International Symposium on HIV/aids infection in Cuba. Mayo -Octubre 2011.
 19. Beuchat L. Surface decontamination of fruits and vegetables eaten raw: a review. Food Safety Unit, WHO. Series: Report WHO/FSF/FOS 198.2. 1998. Disponible en: http://www.who.int/foodsafety/publications/fs_manangement/en/surface_decon.pdf
 20. Acevedo L., Mendoza C. y Oyon R. Coliformes totales, fecales y algunas enterobacterias, *Staphylococcus* sp y hongos en ensaladas para perro calientes en la ciudad de Maracay, Venezuela. *ALAN* 2001; 51: 366-370.
 21. Rincón V., Gresleida; Ginestre P., Messaria; Romero A., Sonia; Castellano G., Maribel; Ávila R., Yeiny. Calidad microbiológica y bacterias enteropatógenas en vegetales tipo hoja. *Kasmera* 2010; 38: 97-105.
 22. Cova G., Rosa A. Aislamiento y susceptibilidad antimicrobiana de *Aeromonas* spp. en vegetales frescos que se utilizan para la preparación de comida rápida en puestos ambulantes de alimentos en la ciudad de Cumaná, estado Sucre. Universidad de Oriente Núcleo de Sucre; 2012.
 23. Abbott S., Cheung W. and Janda M. The Genus *Aeromonas*: Biochemical characteristics, atypical reactions, and phenotypic identification schemes". *J Clin Microbiol* 2003; 41: 2348-57.
 24. McFaddin JF. Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia clínica. Baltimore: William and Wilkins; 2002.
 25. Suárez W, Herrera F. Determinación de factores de virulencia en cepas de *Aeromonas* spp., aisladas a partir de pescado. *Rev. MVZ Córdoba* 2012; 17:2846-51.
 26. Boiko AV. Pathogenicity factors of various Vibrios and *Aeromonas*. *Zh Microbiol Epidemiol Immunobiol* 2000; 79:104-8.
 27. Robinson J. Comparison of direct plating with the use of enrichment culture of isolating of *Aeromonas* spp from faeces. *J Med Microbiol*.1986; 22:315-7.
 28. Nishikawa Y, Kimura T, Kishi T. Mannose-resistant adhesion of motile *Aeromonas* to INT407 cells and the differences among isolates from humans, food and water. *Epidemiol Infect.*1991; 107:171-9.
 29. Alhazmi MI. Isolation of *Aeromonas* spp. from Food Products: Emerging *Aeromonas* Infections and Their Significance in Public Health. *J AOAC Int.* 2015; 98:927-9.
 30. Merino S, Rubires X, Knochel S, Tomas JM. Emerging pathogens: *Aeromonas* spp. *Int J Food Microbiol.* 1995; 28:157-68.
 31. Jahid IK, Ha SD. Inactivation kinetics of various chemical disinfectants on *Aeromonas hydrophila* planktonic cells and biofilms. *Foodborne Pathog Dis.* 2014; 11:346-53.
 32. Berrang ME, Brackett RE, Beuchat LR. Growth of *Aeromonas hydrophila* on fresh vegetables stored under a controlled atmosphere. *Appl Environ Microbiol.*1989; 55:2167-71.
 33. Isonhood JH, Drake M. *Aeromonas* species in foods . *J Food Prot.* 2002; 65:575-82.
 34. Escarpulli G, Figueras M J, Aguilera-Arreola G, Soler L, Fernandez-Rendon E, Aparicio GO, Guarro J, Chacon MR. Characterization of *Aeromonas* spp. isolated from frozen fish intended for human consumption in Mexico. *Int Food Microbiol* 2003; 4: 41-9.
 35. 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: 19-23.
36. Chopra AK, Houston CW. Enterotoxins in *Aeromonas*-associated gastroenteritis. Microbes Infect. 1991; 1:1129-1137.
 37. Chopra AK, Peterson JW, Ju X, Xu D, Coppenhaver DH, Houston CW. Molecular and biochemical characterization of a heat-labile cytotoxic enterotoxin from *Aeromonas hydrophila*. Microb Pathog 1996; 21:357-377.
 38. Casco A, Yugueros J, Temprano A, Sánchez M, Herranz C, Luengo JM, Naharro G. A major secreted elastase is essential for pathogenicity of *Aeromonas hydrophila*. Infect Immun 2000; 68:3233-41.
 39. Burke V, Robinson J, Cooper M, Beaman J, Partridge K, Peterson D, Gracey M. Biotyping and virulence factors in clinical and environmental isolates of *Aeromonas* species. App Environ Microbiol 1984; 47: 1146-9.
 40. Bravo L, Fernández A, Ledo J, Ramírez M, Aguila A, Núñez FA, Cabrera LE, Cruz Y. Caracterización fenotípica y factores de virulencia en cepas de *Aeromonas* aisladas de pacientes con enfermedad diarreica aguda en Cuba. Rev Chil Infect 2011; 28: 159-65.
 41. Herrera F, Santos J. Marcadores fenotípicos de virulencia en cepas de *Aeromonas* aisladas a partir de agua para consumo humano en Pamplona, Colombia. Ciencia y Tecnología Alimentaria. 2012; 10:87-95.
 42. Vadivelu J, Puthuchery SD, Phipps M, Chee YW. Possible virulence factors involved in bacteraemia caused by *Aeromonas hydrophila*. J Med Microbiol 1995; 42:171-4.
 43. Castro-Escarpullí 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: 11-3.
 44. Castro-Escarpullí G, Aguilera-Arreola M, Giono S, Hernández-Rodríguez C, Rodríguez M, Soler L, et al. El género *Aeromonas*. ¿Un patógeno importante en México? Enf Infecc Micro 2002; 22:206-216.
 45. Guerra MF, Fadanelli R, Figueiro M, Schreiner F, Delamare AP, Wollheim C, Costa SP, Echeverrigaray S. *Aeromonas* associated diarrhea diseases in south Brazil: prevalence, virulence factors and antimicrobial resistance. Braz J Microbiol 2007; 38:638-643.
 46. Olaniran AO, Nzimande SBT, Mkize NG. Antimicrobial resistance and virulence signatures of *Listeria* and *Aeromonas* species recovered from treated wastewater effluent and receiving surface water in Durban, South Africa". BMC Microbiology 2015; 15:234.
 47. 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.
 48. Titball RW, Bell A, Munn CB. Role of caseinase from *Aeromonas salmonicida* in activation of hemolysin. Infect Immun 1985; 49:756-9.
 49. Merino S, Aguilar A, Noguerras 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: 4008-4013.
 50. Janda JM. Biochemical and exoenzymatic properties of *Aeromonas* species. Diagn Microbiol Infect Dis. 1985; 3:223-232.
 51. Deodhar LP, Saraswathi K, Varudkar A. *Aeromonas* spp. and their association with human diarrheal disease. J Clin Microbiol 1991; 8: 53-6.
 52. Obi CL, Ramalivhana J, Samie A, Igumbor EO. Prevalence, Pathogenesis, Antibiotic Susceptibility Profiles, and In-vitro Activity of Selected Medicinal Plants Against *Aeromonas* Isolates from Stool Samples of Patients in the Venda Region of South Africa. J Health Popul Nut 2007; 25:428-435.
 53. Martins LM, Marquez RF, Yano T. Incidence of toxic *Aeromonas* isolated from food and human infection. FEMS

- Immunol Med Microbiol 2002; 32: 237-242.
54. Bravo L, San German S, Monte R, Castillo A, Ramírez M, García B. Marcadores fenotípicos en cepas de *Aeromonas* aisladas en Cuba de niños con enfermedad diarreica aguda. Rev Cub Med Trop 1995; 47: 114-117.
 55. Longa A, Vizcaya L, Nieves B, Bravo L, Morier L, Pérez-Schael I, Cabrera L. 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; 57:85-91.
 56. Tequianes-Bravo L, Pérez-González DA, González-Malváez MM, Flores-Pimentel M, Marroquin-Segura, R. Aislamiento de *Aeromonas* productoras de aerolisina y enterotoxina, en muestras de agua potable en la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza y otras dependencias de la Universidad Nacional Autónoma de México. Bioquímica 2005; 30:23-29.
 57. Tomás JM. The Main *Aeromonas* Pathogenic Factors, ISRN Microbiology, vol. 2012, Article ID 256261, 22 pages, 2012. doi:10.5402/2012/256261
 58. Evans DJ Jr., Evans DG, Dupont HL. Hemagglutination patterns of enterotoxigenic and enteropathogenic *Escherichia coli* determined with human, bovine, chicken, and guinea pig erythrocytes in the presence and absence of mannose. Infect Immun 1979; 23:336-46.
 59. Elbashir EM, Millership SA. Hemagglutinating activity of *Aeromonas* spp. from different sources; attempted use as a typing system. Epidem. Inf. 1989; 102: 221-229.