



UNIVERSIDAD DE ORIENTE
NÚCLEO DE SUCRE
POSTGRADO EN BIOLOGÍA APLICADA

**FACTORES DE PATOGENICIDAD Y RESISTENCIA ANTIMICROBIANA DE
CEPAS DE *Aeromonas* spp. AISLADAS DE VEGETALES COMESTIBLES**

MAYELYS DEL VALLE GONZÁLEZ PÉREZ

TRABAJO DE GRADO PRESENTADO COMO REQUISITO PARCIAL PARA
OPTAR AL TÍTULO DE MAGISTER SCIENTIARUM EN BIOLOGÍA APLICADA
MENCION MICROBIOLOGÍA

CUMANÁ, JULIO DE 2014

**FACTORES DE PATOGENICIDAD Y RESISTENCIA ANTIMICROBIANA DE
CEPAS DE *Aeromonas* spp. AISLADAS DE VEGETALES COMESTIBLES**

APROBADO POR:

Dra. Luz Bettina Villalobos de B.

Asesora

Dra. Yasmina Araque

Jurado Principal

Dra. Militza Guzmán

Jurado Principal

INDICE

DEDICATORIA	i
AGRADECIMIENTO	ii
LISTA DE TABLAS	iii
LISTA DE FIGURAS	iv
RESUMEN	v
INTRODUCCIÓN	1
METODOLOGÍA	7
Aislamiento e identificación de cepas de <i>Aeromonas hydrophila</i> a partir de vegetales:7	
Agar Tiosulfato Citrato Bilis Sacarosa (TCBS).....	7
Agar Tripticasa de Soya (TSA).....	7
Tinción de Gram.	7
Prueba de la oxidasa.	8
Prueba de la catalasa.....	8
Prueba de oxidación y fermentación (O/F).....	9
Prueba Voges Proskauer (VP).	9
Prueba del lugol.	10
Prueba inositol.	10
Determinación de la presencia de los genes <i>aerA</i> , <i>aspA</i> , <i>satA</i> , <i>lipA</i> y <i>ahyB</i> :.....	11
Verificación de la presencia de factores de virulencia:	13
Hemolisina	13
Proteasas	13
Lipasas	14
Perfil de resistencia a antibióticos de las cepas de <i>Aeromonas</i> identificadas.	14

RESULTADOS Y DISCUSIÓN	15
Presencia de <i>Aeromonas hydrophila</i> en vegetales.....	15
Factores y genes de virulencia detectados en cepas de <i>Aeromonas hydrophila</i>	17
Perfil de resistencia frente antibióticos de <i>Aeromonas hydrophila</i> :	26
CONCLUSIONES	37
BIBLIOGRAFÍA.....	38
HOJA DE METADATOS	49

DEDICATORIA

A

Dios y a la virgencita del Valle por acompañarme, guiarme e iluminarme todos los días de mi vida.

 Mi madre por sus sabios consejos y por brindarme todo su apoyo.

 Mi esposo por toda su comprensión y por ser uno de mis pilares fundamentales en la realización de esta investigación.

 Mi pequeño Gabriel José que vino a llenar mi vida de alegrías, esperanzas y amor.

 Mis hermanos, cuñados y especialmente a mis sobrinos y primos por apoyarme ante las metas que me he trazado en la vida.

AGRADECIMIENTO

En esta oportunidad quiero agradecer a todas aquellas personas que con sus conocimientos y experiencias contribuyeron en la realización de esta investigación. Agradezco especialmente a mi asesora, Profesora Luz Bettina Villalobos, quien con paciencia y dedicación, cumplió como extraordinaria orientadora y guía en el presente trabajo.

A la Profesora Rosa Elena Martínez por su colaboración prestada en el laboratorio.

Al profesor Jesús Bastardo por su colaboración en la lectura del manuscrito, por sus valiosos consejos y palabras de estímulo.

A mis compañeros de estudio con quienes compartí momentos muy agradables.

A mis amigas por su apoyo incondicional especialmente Jessica, Milagros, Erika, Noris, Dairenes, Yurivys, Milagrito y Yolimar.

A los profesores del Postgrado en Biología Aplicada por todos sus conocimientos impartidos.

A mis dos madres Cumanesas Margarita Belizario y Luz Coronado, por brindarme su ayuda, su confianza, por sus consejos y por todo su cariño y amor. Las quiero mucho.

A todos ustedes muchas gracias.

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Secuencia de cebadores para la determinación de genes de patogenicidad en cepas de <i>Aeromonas hydrophila</i> aisladas de alimentos vegetales.	12
Tabla 2. Distribución de la frecuencia de <i>Aeromonas</i> en vegetales comestibles.....	16
Tabla 3. Combinaciones de las características fenotípicas y presencia de los genes <i>aerA</i> y <i>aspA</i> , en cepas de <i>A. hydrophila</i> aisladas a partir de vegetales comestibles.	18
Tabla 4. Frecuencia de aparición (%) de genes y factores de virulencia presentes en cepas de <i>A. hydrophila</i> aisladas de vegetales comestibles.	20
Tabla 5. Porcentajes de resistencia a antibióticos en cepas de <i>Aeromonas hydrophila</i> aisladas de vegetales. Los superíndices en los porcentajes representan el número de cepas resistentes.	28
Tabla 6. Combinaciones en el patrón de resistencia y sensibilidad antibiótica en cepas de <i>A. hydrophila</i> aisladas de vegetales.....	29

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Detección por PCR del gen *aerA*, codificante de aerolisina en cepas de *Aeromonas hydrophila*. M = marcador de peso molecular (pb), C1 = cepa control de *A. hydrophila* ATCC 49140 CVCM 581, C2 = cepa control de *A. sobria* EM-315k3 CVCM 869. Las puntas de flechas señalan el amplicón de 430 pares de bases (pb) indicativo de la presencia del gen en los controles y en diferentes aislados de vegetales (cebollín, lechuga y perejil). 21
- Figura 2. Detección por PCR del gen *aspA*, codificante de serina proteasa en cepas de *Aeromonas hydrophila*. M = marcador de peso molecular (pb), C1 = cepa control de *A. hydrophila* ATCC 49140 CVCM 581, C2 = cepa de *A. sobria* EM-315k3 CVCM 869. Las puntas de flechas señalan el amplicón de 350 pares de base (pb) indicativo de la presencia del gen en el control y en un aislado proveniente de lechuga. 21

RESUMEN

Aeromonas hydrophila es una bacteria actualmente considerada un patógeno emergente oportunista involucrada en enfermedades intestinales y extraintestinales. Genes codificantes de proteínas extracelulares como aerolisina/hemolisina y serina proteasa confieren a las cepas de esta especie características fenotípicas particulares, por lo que han sido ampliamente utilizadas como marcadores moleculares en la detección de factores de virulencia, que permiten la estimación de su potencial patógeno, además de otras enzimas como lipasas, proteasas y amilasas. Este microorganismo ha sido aislado de alimentos incluyendo vegetales, que pueden servir como potencial fuente de infecciones en humanos, además de vehículos para la dispersión de cepas resistentes a antibióticos. Se determinó la frecuencia de aparición de propiedades virulentas (actividad hemolítica, proteolítica y lipolítica) en 123 aislados de *A. hydrophila* provenientes de ocho tipos de vegetales frescos, comestibles, comercializados en Cumaná, Venezuela. Las cepas fueron aisladas en agar ampicilina-almidón por 24 h a 37°C, en condiciones anaerobias y positivas en la formación de halos frente a la presencia de lugol. Se realizó la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para la detección de los genes codificantes de aerolisina (*aerA*) y serina proteasa (*aspA*), además de pruebas de susceptibilidad a los antibióticos mediante la técnica de difusión en discos. Los porcentajes de aislados con actividad proteolítica (74,8%) y lipolítica (73,17%) fueron superiores a la actividad hemolítica (38,21%). Se confirmó la presencia del gen *aerA*⁺ en 16,27% de cepas aisladas de cebollín, lechuga y perejil, mientras que *aspA*⁺ solo se observó en un aislado de lechuga. Los genes *satA*, *lipA* y *ahyB*, no fueron evidenciados en las muestras analizadas. Las cepas de *A. hydrophila* fueron resistentes a Ampicilina-sulbactam, cefotaxime y aztreonam, con porcentajes de 56,9%; 49,6% y 48,8% respectivamente. Mientras que con imipenem se observó un 95,1% de sensibilidad, seguido de amikacina (91,1%), ciprofloxacina (81,3%) y tetraciclina (78,1%). Estos resultados muestran la presencia de cepas de *A. hydrophila* con potencial patógeno que pueden producir brotes de infección por consumo de vegetales contaminados, principalmente lechuga, además de la resistencia observada, por parte de diferentes aislados, frente a antibióticos de primera línea, lo que indica un riesgo significativo para la salud de los consumidores.

Palabras clave: *Aeromonas hydrophila*, vegetales, reacción en cadena de la polimerasa, factores de virulencia, resistencia/sensibilidad antibiótica.

INTRODUCCIÓN

Los miembros del género *Aeromonas* lo comprenden un grupo bacteriano Gram-negativo, anaerobios facultativos, no formadores de esporas, perteneciente a la familia Aeromonadaceae, que se encuentran ampliamente distribuidas en ambientes acuáticos (Daskalov, 2006), suelos, ambientes clínicos (Khajanchi *et al.*, 2010) y en alimentos de diferentes orígenes (Isonhood y Drake, 2002). Las Aeromonadaceae están subdivididas en los grupos de psicrófilos y mesófilos, dentro de éste último se encuentra una de las especies potencialmente patógenas en humanos, *A. hydrophila*, la cual ha sido señalada como una de las principales bacterias del grupo, causante de trastornos gastrointestinales como consecuencia del consumo de alimentos y aguas contaminadas (Blasco *et al.*, 2008).

Los miembros de esta especie se han considerado patógenos entéricos oportunistas a menudo involucrados en una serie de infecciones intestinales y extraintestinales, en estos últimos se incluyen, septicemia, mionecrosis, infecciones de heridas, tracto urinario, hepatobiliares, tejidos blandos, y en ocasiones meningitis y peritonitis (Adamski *et al.*, 2006; Igbinsosa *et al.*, 2012). Desde años recientes, su aislamiento ha sido progresivo en pacientes con la diarrea del viajero (Graevenitz, 2007) y su presencia en alimentos se considera un factor relevante, debido a su asociación con serios trastornos gastrointestinales en la población humana; que en pacientes inmunosuprimidos pueden causar infecciones más graves como fasciitis necrotizante (Abuhammour *et al.*, 2006; Janda y Abbott, 2010).

Aeromonas hydrophila es considerada un patógeno emergente (Seshadri *et al.*, 2006) y su capacidad para adherirse a diversidad de superficies, incluidas las celulares, permiten a muchas de sus cepas poseer amplio rango de virulencia y elevada capacidad invasiva, convirtiéndose en un grupo bacteriano potencial de causar infección al estar presentes en diferentes ambientes (Janda y Abbott, 2010), dentro de los que se incluyen los vegetales que crecen al ras de los suelos y que por falta de higiene durante su cosecha, transporte y

almacenamiento pueden estimular su crecimiento, ya que se ha demostrado que numerosas cepas de este grupo bacteriano pueden resistir y desarrollarse a bajas temperaturas y en ambientes anaeróbicos, indicando que las técnicas para conservación de alimento tales como refrigerado y empacado al vacío, no impiden su crecimiento (Ormen y Ostensvik, 2001). Además, muchos alimentos vegetales que generalmente son consumidos sin tratamiento térmico, y solo con los procedimientos mínimos de preparación para su consumo, no garantizan la inocuidad del alimento (McMahon y Wilson, 2001) lo que representa una situación de riesgo para infecciones con *Aeromonas* que podrían ser patógenas.

La presencia de este grupo bacteriano en vegetales comestibles ha despertado interés debido a que sirven de transporte y diseminación de factores de virulencia, los cuales se encuentran asociados a la ocurrencia de innumerables brotes epidémicos importantes alrededor del mundo, en los que muchos alimentos de frecuente consumo, han sido señalados como vehículos potenciales. Estos factores de virulencia, representan las condiciones, aunque no entendidas en totalidad, que confieren a las *Aeromonas* su carácter patogénico, debido a la presencia de variados sistemas de secreción en conjunto con estructuras flagelares, pilis y adhesinas que les permiten ingresar y mantenerse en el interior de células hospederas a las que causan daños mediante la elaboración de una gama de productos extracelulares de naturaleza proteica con actividad enterotóxica, citotóxica y citotónica. Tales daños, pueden ser ocasionados mediante la generación de poros en la membrana celular por acción de aerolisina/hemolisina codificada por el gen *aerA*; otras vías involucran la acción de enzimas con actividad proteasa, glicerofosfolípido-colesterol aciltransferasa y lipasa, codificadas por los genes *aspA*, *satA* y *lipA*, respectivamente (Gavin *et al.*, 2003). Los factores de virulencia codificados por estos genes, han sido ampliamente utilizados en la determinación del potencial de patogenicidad de distintas especies de *Aeromonas* aisladas del ambiente, muestras clínicas humanas y productos comestibles (Janda y Abbott, 2010; Kingombe *et al.*, 2010; Ottaviani *et al.* 2011).

Adicionalmente, muchas cepas patógenas de *A. hydrophila*, al igual que otras bacterias Gram negativas, presentan un sistema de secreción tipo tres (SST3), el cual le permite al patógeno inyectar proteínas efectoras bacterianas directamente al citoplasma (Vilches *et al.*, 2004); estas proteínas alteran directamente los procesos celulares de sus hospederos (Cornelis y van Gijsegem, 2000). Los genes codificantes de las proteínas que forman parte del SST3 se encuentran regulados a nivel transcripcional, controlados por un sistema integrado de señales ambientales, probablemente para asegurar el uso eficiente de su maquinaria energética. Vilches *et al.* (2009), señalan la función de las proteínas AexT y AxsA como sensores de señales externas para la inducción del SST3 en *A. hydrophila*, sugiriendo además la existencia de comunicación cruzada entre la expresión del SST3 y los factores de virulencia encontrados hasta ahora en la especie. Por su parte, Macnab (2004) diferenció la localización a nivel cromosomal de los genes del SST3 en *A. hydrophila* y no en plásmidos como ocurre en *A. salmonicida*, estableciendo además mayor presencia (80%) del mencionado sistema en aislados *A. hydrophila* y *A. veronii* que en *A. caviae* (13%).

La distribución de los genes que codifican proteínas consideradas como factores de virulencia ha permitido catalogar a *A. hydrophila* como una especie genéticamente heterogénea que alberga ecotipos con variedades de potencial patogénico diferentes tanto en humanos como en otros animales. Tal diversidad intraespecífica, puede evidenciarse mediante características fenotípicas, las cuales permiten una evaluación indirecta de la presencia de genes codificantes de proteínas con funciones similares, representando una manera práctica para el reconocimiento de cepas de *A. hydrophila* con factores de virulencia. Por otro lado, la detección de genes de factores de virulencia representa un paso crucial en la determinación del potencial patogénico de *Aeromonas* spp. (Khajanchi *et al.*, 2010); siendo los codificantes de aerolisina (*aerA*)/hemolisina los comúnmente buscados (Singh *et al.*, 2008). A pesar de la cantidad de estudios realizados sobre la presencia del gen aerolisina/hemolisina en *Aeromonas* todavía no existe un panorama claro acerca de su incidencia dentro de una determinada especie o sobre un patrón diferencial entre las especies del género (Chacón *et al.*, 2003). Aunque el

evidente rol para desencadenar enfermedades gastrointestinales en humanos aún no ha sido aclarado, a menudo se aíslan *Aeromonas* a partir de pacientes con diarrea. Numerosos estudios han indicado sobre la asociación de estas bacterias con enfermedades diarreicas, principalmente en niños, pero la alta frecuencia de coinfecciones enteropatógenas, sumado a la amplia distribución ambiental, ha hecho difícil dilucidar sobre la etiología; adicionalmente, se ha sugerido que variaciones en la distribución genética entre *Aeromonas* aisladas, contribuyen a su potencial grado de virulencia (Albert *et al.*, 2000). La necesidad de conocer mejor a cerca de la distribución de los genes de virulencia en cepas patógenas ha sido reconocida en estudios previos (Tourlousse *et al.*, 2007; Miller *et al.*, 2008). Estos autores han expresado que la presencia de solo un gen que codifica un factor de virulencia en *Aeromonas* spp., puede conducir a una apreciación errónea del riesgo que implica su relación con la aparición de brotes de enfermedades por estas bacterias, debido a que muchos genes se distribuyen desigualmente en diversas cepas patógenas, otros son multifuncionales y algunos de ellos pueden encontrarse en cepas consideradas no patogénicas.

Un reciente estudio, demostró que aerolisina puede bloquear el proceso de regeneración o cicatrización en células de las paredes gastrointestinales (Bücker *et al.*, 2011). Normalmente, luego de generarse alguna lesión superficial en tejidos epiteliales gastrointestinales, ocurre un proceso de regeneración promovido por proteínas de unión a GTP (Rac1) dependientes de Ca^{+2} (Rao, *et al.*, 2008). La integridad de la actina así como de proteínas que mantienen la unión intercelular son esenciales para una rápida cicatrización (Russo *et al.*, 2005). La presencia de aerolisina genera desorganización en el citoesqueleto y en las proteínas de unión intercelular, impidiendo el avance del proceso de cicatrización (Günzel *et al.*, 2006). La aerolisina se une fuertemente a proteínas de anclaje del glicosilfosfatidilinositol (GPI) presente en la membrana plasmática de células hospederas, formando poros en la misma por construcción de un complejo heptamérico con organización β -barril. La presencia de estos poros por acción del patógeno genera desequilibrios en las concentraciones de iones Cl^- y Na^+ en células del epitelio gastrointestinal en humanos causando diarreas debido a la mala absorción o

por deterioro de la barrera epitelial originada por cambios estructurales a consecuencia de laxas uniones entre células (Bücker *et al.*, 2011).

Por otro lado, la resistencia antimicrobiana de patógenos entéricos representa un serio problema en países subdesarrollados debido a las significativas cifras de enfermedades gastrointestinales, y a la disminuida eficacia de gran número de antibióticos como consecuencia de sus inadecuados usos. Además, se han aislado bacterias fármaco-resistentes a partir de ambientes naturales que aparentemente no han sido expuestos a antibióticos (Huddelston *et al.*, 2006). La presencia de estos microorganismos en tales ambientes, constituye un riesgo para humanos y los ambientes en donde pueden actuar como reservorios de resistencia, contribuyendo al mantenimiento y dispersión de dichos genes (Goñi-Urriza *et al.*, 2000). La resistencia de *Aeromonas* a β -lactámicos y otros antibióticos (Vila *et al.*, 2003) representa gran relevancia debido a que se ha demostrado que estas bacterias pueden adquirir y transferir éstos genes a otros grupos bacterianos Gram negativos (Marchandin *et al.*, 2003).

El origen de la resistencia a los antibióticos en el ambiente, por parte de las bacterias, representa un factor relevante para la salud humana debido al incremento en la frecuencia de enfermedades zoonóticas, por lo que el estudio de sus patrones de resistencia permitiría mayor entendimiento en los mecanismos de disgregación de microorganismos patógenos emergentes (Allen *et al.*, 2010). En la literatura existen numerosos estudios para la determinación de los perfiles de resistencia/susceptibilidad antibiótica en cepas de *Aeromonas* aisladas en muestras de agua potable, productos cárnicos crudos de diversos orígenes, muestras clínicas, moluscos y peces cultivados; mientras que en aislados de vegetales la información es relativamente escasa (Peres-Palú *et al.*, 2006).

Considerando el incremento paulatino en la demanda de vegetales frescos o poco procesados como consecuencia de modificaciones en los hábitos alimentarios de gran parte de la población y tomando en cuenta los escasos estudios microbiológicos

aplicados a productos vegetales que se expenden en diversos establecimientos comerciales del territorio venezolano, a pesar de la creciente demanda, debido a su frecuente inclusión dentro de la dieta, se propuso realizar un estudio microbiológico con el fin de detectar la presencia de *A. hydrophila* en muestras de ocho tipos de vegetales que se expenden en establecimientos comerciales de la ciudad de Cumaná, para su caracterización fenotípica en cuanto a la presencia de genes de virulencia y para determinar el perfil de resistencia antimicrobiana del patógeno.

METODOLOGÍA

Aislamiento e identificación de cepas de *Aeromonas hydrophila* a partir de vegetales:

Se analizó un total de 240 muestras de vegetales frescos comercializados en la ciudad de Cumaná en tres experimentos independientes; 30 muestras de cada uno de los 8 vegetales: Acelga (*Beta vulgaris* var. *Cicla*), ajo porro (*Allium porrum*), cebollín (*Allium schoenoprasum*), celery (*Apium graveolens* var. *dulce*), lechuga (*Lactuca sativa*), Espinaca (*Spinacia oleracea*), cilantro (*Corinadrum sativum*) y perejil (*Petroselinum sativum*). Se homogeneizaron 10 gramos de cada muestra en 90 mL de agua peptonada alcalina pH 8,6; se incubó a 37°C por 24 horas. Transcurrido este período se inocularon, para el aislamiento, placas con agar ampicilina almidón, las cuales se incubaron por 24 horas a 37°C. Las colonias típicas de este género fueron identificadas mediante la aplicación de pruebas bioquímicas recomendadas por Abbott *et al.* (2003).

Agar Tiosulfato Citrato Bilis Sacarosa (TCBS).

En esta prueba se siguieron las recomendaciones de Kay *et al.* (1985), empleando el medio TCBS (Difco), preparado a pH 8,6±0,2.

Agar Tripticasa de Soya (TSA).

En esta prueba se siguieron las recomendaciones de Gerhardt *et al.* (1994) pero empleando NaCl a concentraciones de 3 y 6%. Es un medio que favorece el desarrollo y el aislamiento de una gran variedad de microorganismos aerobios, anaerobios facultativos y estrictos. Es una prueba que se usa para constatar el crecimiento de Vibrios al 6% de NaCl, mientras que algunas especies de *Aeromonas* sólo son capaces de crecer en 3% de NaCl.

Tinción de Gram.

La tinción de Gram es un tipo de tinción diferencial empleada en microbiología para la visualización de bacterias. Debe su nombre al bacteriólogo danés Christian Gram, que

desarrolló la técnica en 1884. Esta técnica se realizó como la describe Gerhardt *et al.* (1994), la cual permite referirse tanto a la morfología celular bacteriana como para poder realizar una primera aproximación a la diferenciación bacteriana, considerándose Bacteria Gram positiva a las bacterias que se visualizan de color moradas y Bacteria Gram negativa a las que se visualizan de color rosa o rojo.

- a) Cristal Violeta. Para teñir las células bacterianas. Composición: cristal violeta 20 g; oxalato de amonio 8,0 g; etanol 200 ml y agua desionizada 800 ml.
- b) Lugol. Actuó como mordiente. Composición: yoduro 3,30 g; yoduro de potasio 6,60 g y etanol 100 ml.
- c) Safranina. Colorante de contraste. Composición: safranina 2,50 g y etanol 100 ml.
- d) Alcohol acetona (1:1). Se utilizó para decolorar. Composición: etanol 500 ml y acetona 500 ml.

Prueba de la oxidasa.

Siguiendo las recomendaciones de Hunt *et al.* (1981), se utilizaron discos de oxidasa reactivos comerciales. La prueba se realizó tomando con un palillo de madera una muestra bacteriana a partir de una colonia aislada proveniente de cultivos de 24 h. La muestra se puso en contacto con el disco y luego de un lapso no mayor a 30 segundos se observó una coloración morada indicativo de una reacción positiva. Los resultados contrarios (negativos), permitieron descartar a géneros pertenecientes a la familia Enterobacteriaceae.

Prueba de la catalasa.

Esta prueba fue realizada siguiendo las recomendaciones expuestas por Gerhardt *et al.* (1994), para comprobar la presencia de la enzima catalasa. Las muestras bacterianas a partir de cada colonia aislada fueron colocadas en una gota de peróxido de hidrógeno, previamente servida en un portaobjeto. La generación inmediata de burbujeo representó

el indicativo de la producción de oxígeno por acción de la enzima, tomándose este resultado como positivo.

Prueba de oxidación y fermentación (O/F).

Esta prueba se realizó en Medio Basal O/F (Difco) suplementado con glucosa 1%, siguiendo las recomendaciones de Hugh y Leifson (1953). Para la preparación de 1000 ml de medio (ajustado a pH 7,1) se emplearon 2 g de peptona; 5 g de NaCl; 10 g de D-glucosa; 0,03 g de azul de bromotimol; 3 g de agar y 0,3 g de fosfato dipotásico. En la ejecución de esta prueba se usaron dos tubos para cada una de las cepas probadas. Uno de éstos representó la condición aeróbica, en la cual se permitió la entrada de oxígeno al medio, durante el periodo de incubación, mientras que la condición anaeróbica se obtuvo mediante la adición de 1,5ml de aceite mineral estéril sobre el medio, además del cierre hermético del tubo luego de la inoculación bacteriana. Ambas condiciones fueron incubadas durante 24 h para la posterior visualización de los resultados. Una coloración verdosa en ambos tubos se interpretó como: negativo o no sacarolítico debido a que la glucosa no fue metabolizada, mientras que ambos tubos amarillos se interpretó como: fermentador facultativo (F). En los casos donde los aislados sometidos a condición aeróbica mostraron el color amarillo y su contraparte sometida a anaerobiosis se tornó verde, fue indicativo de metabolismo oxidativo (O).

Prueba Voges Proskauer (VP).

Es particularmente útil para la clasificación de enterobacterias. En el medio de cultivo, la polipeptona aporta los nutrientes necesarios para el desarrollo bacteriano, y la glucosa es el hidrato de carbono fermentable. La glucosa puede ser metabolizada por los microorganismos, a través de distintas vías metabólicas. Según la vía utilizada, se originarán productos finales ácidos (ácido láctico, ácido acético, ácido fórmico), o productos finales neutros (acetil metil carbinol). Esta diferencia en el metabolismo bacteriano, podría ser reconocida por la adición de α -naftol e hidróxido de potasio para evidenciar la presencia de productos finales neutros. Voges y Proskauer, describieron una coloración rojiza que aparecía después de adicionar hidróxido de potasio (KOH) a

los cultivos de ciertos microorganismos en medio con glucosa. Esta coloración es atribuida a la oxidación del acetilmetil carbinol a diacetilo el cual reacciona con la peptona del medio. La siembra se realizó por inoculación directa, a partir del cultivo en estudio, luego se incubó 48 h y posteriormente se procedió al revelado agregando 0,6 ml de α -naftol (0,05g/ml en alcohol isopropílico) y 0,2 ml de KOH (10%) a 2,5 ml del cultivo. Seguidamente el tubo se agitó, dejándose a temperatura ambiente durante 10-15 min para observar el cambio de coloración de la superficie del medio a una coloración rojiza, indicativo de un resultado positivo

Prueba del lugol.

Esta prueba se emplea para identificar polisacáridos. El almidón en contacto con el reactivo de lugol (composición: disolución de yodo 3,3 g y yoduro potásico 6,6 g disueltos en 100 ml de etanol) toma un color violeta característico. La coloración generada por el lugol se atribuye a la introducción del yodo entre las espiras. La identificación de cepas de *Aeromonas* spp., fue posible debido a la aparición de halos, luego de adicionar gotas de lugol sobre colonias amarillas en crecimiento (Palumbo *et al.*, 1985).

Prueba inositol.

Para identificar la capacidad de fermentar el inositol, se siguieron las recomendaciones propuestas por Gerhardt *et al.* (1994). El inositol es el carbohidrato de prueba y su fermentación se manifiesta por un cambio de color del indicador rojo fenol, que cambia de rojo a amarillo. La producción de gas se observa en la campana Durham por la formación de burbujas. La composición para preparar 1000 ml de medio a pH $7,4 \pm 0,2$ fue: 5,0 g de cloruro de sodio; 5,0 g de inositol; 10,0 g de peptona de caseína y 0,018 g de rojo fenol. La prueba se realizó inoculando los tubos que contenían el medio de cultivo con las cepas aisladas de los vegetales; se incubaron por 24 h y transcurrido ese tiempo se procedió a realizar la lectura. El resultado positivo indicativo de fermentación del carbohidrato se evidenció por el cambio de color rojo a amarillo.

Determinación de la presencia de los genes *aerA*, *aspA*, *satA*, *lipA* y *ahyB*:

La caracterización molecular se realizó en las cepas que resultaron positivas a la identificación de características bioquímicas aplicadas para la identificación de *Aeromonas hydrophila*. Para la realización de estos análisis, se procedió a la extracción del ADN total de las muestras, de acuerdo al método propuesto por Rivas *et al.* (2007). Éste consistió en suspender 5 colonias de cada una de las cepas en 150 μ L de Triton al 1% en buffer TE 1X, seguidamente se llevó a ebullición por 15 minutos, a fin de lisar por calor las membranas, finalmente se centrifugó a 10000 rpm durante 5 minutos, tomando el sobrenadante como templado de ADN. Posteriormente se realizó una electroforesis en gel de agarosa preparada al 1,5% (con buffer TBE 1X y 3 μ L de bromuro de etidio), corrida a 80 voltios por 15 minutos, utilizando como vehículo de transmisión de corriente buffer TBE 1X, a fin de constatar la presencia de ADN.

Una vez extraído el ADN y realizada la electroforesis, se procedió a la identificación de los genes *aerA*, *aspA*, *satA*, *lipA* y *ahyB*, codificantes para aerolisina/hemolisina, serina-proteasa, glicerofosfolípido-colesterol aciltransferasa, lipasa y elastasa, respectivamente, usando como cebadores los observados en la tabla 1.

Tabla 1. Secuencia de cebadores para la determinación de genes de patogenicidad en cepas de *Aeromonas hydrophila* aisladas de alimentos vegetales.

Cebador	Secuencia	Producto (pb)
<i>aerA</i>	aer-f: 5`-CCTATGGCCTGAGCGAGAAG-3`	430
	aer-r: 5`-CCAGTTCCAGTCCCACCACT-3`	
<i>aspA</i>	Serina-f: 5`-CACCGAAGTATTGGGTCAGG-3`	350
	Serina-r: 5`-GGTCATGCGTAACTCTGGT-3`	
<i>satA</i>	GCAT-f: 5`-CTCCTGGAATCCCAAGTATCAG-3`	237
	GCAT-r: 5`-GGCAGGTTGAACAGCAGTATCT-3`	
<i>lipA</i>	lip-f: 5`-CATCTGGTGCCGCTCAAG-3`	247
	lip-r: 5`-GT(G)CCGAACCAGTCGGAGAA-3`	
<i>ahyB</i>	Elast-f: 5`-ACACGGTCAAGGAGATCAAC-3`	513
	Elast-r: 5`-CGCTGGTGTTGGCCAGCAGG-3`	

pb = pares de bases

Soler *et al.* (2002)

Las reacciones de PCR se realizaron en un volumen total de 25 µL: 2,5 µL de cada iniciador, 5 µL de agua libre de endonucleasas, 12,5 µL master mix y 2,5 µL templado de ADN. Las condiciones de amplificación para *aerA* fueron: 3 min a 95 °C, 35 ciclos de 94 °C por 1 min, 56 °C por 1 min y 72 °C por 1 min, y una extensión final de 5 min a 72 °C. Para la amplificación de *aspA* y *satA*, se inició con 3 min a 95 °C, 35 ciclos de 94 °C por 1 min, 60 °C por 1 min y 72 °C por 1 min, con extensión final de 5 min a 72 °C, mientras que en los genes *lipA* y *ahyB*, las condiciones fueron: 1 ciclo a 94 °C por 5 min para la desnaturalización inicial, 35 ciclos a 94 °C por 5 min para la desnaturalización, 58 °C por 30 s para la hibridación de los iniciadores, 72 °C por 45 s para la extensión y 1 ciclo a 72 °C por 10 min para la extensión final.

La amplificación se efectuó en un termociclador Gene Amp Perkim Elmer Applied Biosystems 9700 y los amplicones fueron visualizados por electroforesis en gel de

agarosa preparada al 1,5% (con buffer TBE 1X y 3 μ L de bromuro de etidio). La corrida electroforética se realizó a 80 voltios por 1 hora y 30 minutos, utilizando como vehículo de transmisión de corriente buffer TBE 1X. Se utilizó un marcador de peso molecular de 100-1500 pb. Los productos fueron fotografiados en el fotodocumentador Gel Doc (Biorad) (Eisenstein, 1990). La cepa *A. hydrophila* ATCC 49140 CVCM 581 fue empleada como control positivo para la detección de los genes *aerA*, *aspA*, *Sata* y *lipa*, mientras que una segunda cepa de *A. sobria* EM-315k3 CVCM 869 sirvió como control para los genes *aerA*, *Sata* y *ahyB*.

Verificación de la presencia de factores de virulencia:

Hemolisina

La actividad hemolítica de los aislados se evaluó después de 48 horas de incubación a 37°C en agar tripticasa de soya (TSA), suplementado con sangre humana 5% V/V, siguiendo las recomendaciones de Lanyí (1987). La presencia de zonas claras alrededor de las colonias, previamente descritas como halos producto de actividad hemolítica, fue considerada como positiva (Lanyí, 1987; Michelim *et al.*, 2005), siempre y cuando el índice de actividad hemolítica fuera inferior a 0,8 cm. Dicho índice se calculó dividiendo el diámetro de la colonia entre la sumatoria del diámetro de la colonia y el diámetro total del halo, tal como lo establecen Blanco *et al.* (2007).

Proteasas

La actividad proteolítica se midió por inoculación de los aislados sobre el medio TSA modificado (TSAM), el cual contenía (g.l^{-1}): 40 TSA; 7,5 de gelatina y 20 de agar). Las muestras se incubaron a 37°C por 20 h, y transcurrido el tiempo de incubación las placas fueron inundadas con una solución saturada de sulfato de amonio $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ al 60% para precipitar las proteínas en el medio, siendo los aislados clasificados de acuerdo a la talla del halo de proteína hidrolizada. Halos con longitud igual o mayor a un centímetro, calculado a partir del borde de la colonia, fueron considerados como actividad proteasa positiva (Michelim *et al.*, 2005, Naseer *et al.*, 2013).

Lipasas

La actividad lipolítica fue evaluada por siembra de los aislados sobre agar tween 20 (T20), el cual contenía (g.l⁻¹): 10 peptona; 5 NaCl; 0,1 CaCl₂ y 20,1 de agar T20, este último adicionado luego de autoclavarse. Los aislados se incubaron en placas de Petri a 37°C por 72 horas. La actividad lipasa se detectó por la aparición de zonas claras o halos, generados por la precipitación de T20 alrededor de la siembra bacteriana; halos con longitud igual o mayor a un centímetro, calculado a partir del borde de las colonias, fueron considerandos como actividad lipasa positiva (Michelim *et al.*, 2005, Naseer *et al.*, 2013).

Perfil de resistencia a antibióticos de las cepas de *Aeromonas* identificadas.

La resistencia antimicrobiana se realizó mediante el método de difusión en disco (Bauer *et al.*, 1966). Para ello se emplearon cultivos frescos en los que se impregnó un hisopo estéril con la colonia seleccionada, presente en el agar ampicilina-almidón (Palumbo *et al.*, 1985); este hisopo luego fue extendido en una placa de agar Müeller-Hinton, pasándolo tres veces por toda la superficie del agar para asegurar la distribución uniforme del inóculo. Tres (3) minutos luego de extender sobre el agar las respectivas colonias, se procedió a colocar los siguientes discos de antibióticos: Ampicilina/Sulbactam (SAM); Imipenem (IPM); Aztreonam (ATM); Amikacin (AN); Cefotaxima (CTX); Cefoxitina (FOX); Ceftazidima (CAZ); Ceftriaxona (CRO); Tetraciclina (TE); Ciprofloxacina (CIP); Trimetoprim-Sulfametoxazol (STX) y Cloranfenicol (C).

Las placas fueron invertidas e incubadas a 37°C por 24 h y transcurrido el tiempo recomendado, se procedió a realizar la lectura de las zonas de inhibición alrededor del disco, mediante plantillas milimetradas. Las medidas de las zonas de inhibición se correlacionaron con las tablas interpretativas “estándar” publicadas por el Manual M45-A2 del Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2010), las cuales suministran un correlativo interpretativo (susceptible, intermedio y resistente).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Presencia de *Aeromonas hydrophila* en vegetales.

En la tabla 2, se reporta 33,05% de positividad para *Aeromonas* en las muestras de vegetales analizados, siendo lechuga (54,4%) y céleri (48,89%) los vegetales con mayor número de aislamiento de *Aeromonas*, mientras que en espinaca, se observó un 18,89%. Estos resultados concuerdan con los trabajos de McMahon y Wilson (2001) e Igbinsa *et al.* (2006) quienes reportaron 34 y 35%, respectivamente, de este grupo bacteriano en vegetales.

En la totalidad de las muestras analizadas se logró identificar un 51,68% de cepas como *A. hydrophila*. Al observar de manera específica, el tipo de vegetal (Tabla 2), se pudo evidenciar el predominio de *A. hydrophila*, con porcentajes que variaron entre 60%, correspondiente a los aislados obtenidos a partir de ajo porro, y 47,06% para el caso de espinaca. Este último porcentaje, al igual que el proveniente de muestras de céleri, son cercanos a los presentados por Callister y Agger (1987) quienes reportaron 48% de *A. hydrophila* cuando analizaron muestras de lechuga, céleri, perejil y espinaca entre otros.

A pesar de que el mayor número de cepas de *A. hydrophila* fueron obtenidas de lechuga, este número representó 51,02% del total de *Aeromonas* aisladas en dicho vegetal, en contraste con las 12 cepas (60,0%) provenientes de ajo porro. Sin embargo, al estimar los porcentajes de aislamiento en función al número total de *A. hydrophila*, las 25 cepas procedentes de lechuga representaron 20,33%, mientras que las 8 originarias de espinaca, representaron 6,5%. Las diferencias en cuanto a las proporciones de *A. hydrophila* con respecto a otras especies del mismo género, e inclusive, de la misma especie entre los vegetales analizados, permite sugerir sobre la variabilidad en poblaciones de *Aeromonas*, posiblemente atribuido a su capacidad de adherencia a las superficies de las hojas de distintos vegetales (Elhariry, 2011). Por otro lado, la incidencia de *A. hydrophila* es superior a la reportada por Dhiraputra *et al.* (2005), quienes examinaron el índice de contaminación bacteriana en vegetales, dentro de los

que se incluían lechuga, perejil y céleri en el hospital de Bangkok, Thailandia, en donde detectaron 3,5% de *Aeromonas* spp.; mientras que Ginestrea *et al.* (2005) reportaron, con respecto a su total de muestras analizadas, 17,33; 6 y 1,33% de *Aeromonas* spp. en cilantro, lechuga y perejil, respectivamente; con una incidencia de 27,03% por *A. hydrophila*.

Tabla 2. Distribución de la frecuencia de *Aeromonas* en vegetales comestibles.

Vegetal	N° muestras positivas (%)	N° <i>A. hydrophila</i> (%)	
		(% en función a MP)	(% en función a <i>A. hydrophila</i>)
Acelga	90/18 (20,0)	10 (55,56)	10 (8,13)
Ajo porro	90/20 (22,22)	12 (60,0)	12 (9,76)
Cebollín	90/25 (27,78)	13 (52,0)	13 (10,57)
Celery	90/44 (48,89)	21 (47,73)	21 (17,07)
Cilantro	90/28 (31,11)	15 (53,57)	15 (12,2)
Espinaca	90/17 (18,89)	8 (47,06)	8 (6,5)
Lechuga	90/49 (54,4)	25 (51,02)	25 (20,33)
Perejil	90/37 (41,11)	19 (51,35)	19 (15,45)
Total	720/238 (33,05)	123 (51,68)	123 (100)

MP = Muestras positivas para *Aeromonas* spp.

En otro trabajo, Monge *et al.* (1998) reportaron 52% de *Aeromonas* spp. en lechuga. La elevada frecuencia de *A. hydrophila* en los vegetales analizados, y principalmente en lechuga, permite sugerir sobre el riesgo que puede generar la falta de higiene durante la cosecha, en los mecanismos de distribución y almacenamiento de este grupo de alimentos. Por otro lado, también podría considerarse el tratamiento del cultivo de vegetales durante el período de siembra, en el que se pueden sustituir fertilizantes químicos por compost a base de estiércol de ganado o de aves, lo que incrementa la carga bacteriana e incluyendo patógenos (Nguz *et al.*, 2005) y que sumado a la posible carga de *Aeromonas* presente en el agua utilizada durante el lavado (Dhiraputra *et al.*, 2005), además de un ineficiente proceso de lavado antes de su consumo, representan un riesgo para la salud humana.

Factores y genes de virulencia detectados en cepas de *Aeromonas hydrophila*.

Dentro de los factores de virulencia que han sido considerados, evidencia del potencial patogénico de *A. hydrophila*, se incluyen la producción de exotoxinas como hemolisinas, proteasas, lipasas y otras proteínas de superficie que permiten su adhesión a tejidos (Gavin *et al.*, 2003; Khajanchi *et al.*, 2010 y Singh, *et al.*, 2010).

Los 123 aislados de *A. hydrophila*, mostraron una variabilidad de 14 combinaciones basados en la actividad hemolítica, proteolítica, lipolítica y presencia de los genes *aerA* y *aspA* (Tabla 3). Las cepas aisladas de lechuga y céleri fueron las que presentaron el mayor número de combinaciones, con un total de 8 y 7 respectivamente, mientras que las aisladas de acelga, ajo porro y espinaca presentaron menor variabilidad (3 combinaciones). Solo un aislado, de lechuga específicamente, resultó positivo a las cinco variables. 17,1% presentó, tres características fenotípicas correspondientes a la presencia de factores de virulencia, siendo más común en las cepas obtenidas a partir de ajo porro con 5,7%; mientras que 14,6% resultaron positivas en al menos un factor. Por otro lado, 5,7% resultó positivo en la presencia del gen *aerA*, sin embargo, fueron negativas en actividad hemolítica, lo cual puede ser atribuido, a posibles cambios en la secuencia del gen *aerA*, en los que se han reportado considerables modificaciones mutacionales que afectan el dominio responsable del fenotipo hemolítico (Singh *et al.*, 2010; Chopra *et al.*, 1993).

La represión y/o expresión de una o más proteínas consideradas como factores de virulencia varía significativamente a nivel intraespecífico e incluso entre clones de una cepa bacteriana, esas variaciones obedecen a la capacidad de *Aeromonas* para reprimir y/o expresar genes en respuesta a factores ambientales, fenómeno conocido como autoinducción o “*quorum sensing*” (Elhariry, 2011).

Tabla 3. Combinaciones de las características fenotípicas y presencia de los genes *aerA* y *aspA*, en cepas de *A. hydrophila* aisladas a partir de vegetales comestibles.

N° de aislados	Gen <i>aerA</i>	Gen <i>aspA</i>	Hem	Prot	Lip	Vegetal (N° aislado)
48	-	-	-	+	+	Acelga (5) Ajo porro (1) Cebollín (7) Céleri (5) Cilantro (6) Espinaca (2) Lechuga (10) Perejil (12)
21	-	-	+	+	+	Ajo porro (7) Céleri (4) Espinaca (4) Lechuga (3) Perejil (3)
9	-	-	-	-	+	Céleri (3) Cilantro (3) Lechuga (3)
9	-	-	+	+	-	Acelga (4) Cebollín (2) Lechuga (3)
6	-	-	-	-	-	Ajo porro (4) Lechuga (2)
5	+	-	+	-	-	Perejil (2) Cebollín (1) Espinaca (2)
5	-	-	-	+	-	Céleri (5)
5	-	-	+	-	-	Céleri (2) Cilantro (3)
4	+	-	-	+	+	Céleri (1) Cilantro (1) Perejil (2)
3	+	-	+	+	-	Acelga (1) Cilantro (2)
3	+	-	-	-	+	Céleri (1) Lechuga (2)
3	+	-	+	-	+	Cebollín (3)
1	+	-	+	+	+	Lechuga (1)
1	+	+	+	+	+	Lechuga (1)

aerA y *aspA* = genes codificantes de aerolisina y serina proteasa, respectivamente. Actividad hemolítica (Hem), proteolítica (Prot) y lipolítica (Lip).

También se ha observado en *Aeromonas* la expresión de múltiples factores de virulencia, controlados por un único factor transcripcional, en el que se ha evidenciado elevada

demanda de transcripción de ARNr en múltiples copias de operones de ARNr, sugiriendo un fuerte y eficiente proceso transcripcional como estrategia adaptativa frente a condiciones ambientales. Inactivación de estos operones, generan descontrol de las concentraciones del factor de transcripción IF3, desencadenando deficiencias de ribosomas. Debido al rol central de ARNr en la síntesis de ribosomas, es posible que el número de operones ARNr determinen la rapidez y variabilidad con la que *A. hydrophila* pueda sintetizar ribosomas, en respuesta a cambios favorables o desfavorables en las condiciones de crecimiento. El número de copias de operones ARNr, el cual varía entre 1 y 15 en el genoma bacteriano, refleja una estrategia ecológica, caracterizada por rápida respuesta frente a señales externas (Jangid *et al.*, 2012). Estas señales pueden tener relación con las características de los sustratos colonizados por *A. hydrophila* (Elhariry, 2011), en este caso, superficie de los vegetales.

Tomando en cuenta la frecuencia de aparición de factores y genes de virulencia, se pudo evidenciar amplia variación en la detección de aislados con actividad hemolítica (n = 47), proteolítica (n = 92) y lipolítica (n = 90) entre los vegetales evaluados, los cuales representaron 38,21; 74,8 y 73,17%, respectivamente (Tabla 4). El número de cepas aisladas con actividad hemolítica difiere de las reportadas por Nagar *et al.* (2011) quienes encontraron 60%, obteniendo los más bajos porcentajes de aislamiento a partir de vegetales (2,5%), mientras que Alcides *et al.* (2003), reportaron 48,5% de actividad hemolítica en cepas de *Aeromonas* spp. aisladas de perejil y berro.

El 74,8% de actividad proteolítica detectada, deja en evidencia la capacidad que pueden tener los aislados de *A. hydrophila* para el establecimiento y mantenimiento de infecciones, incluyendo al hombre, mediante la degradación, de sustratos como elastina, fibrina y albúmina (Castro-Escarpulli *et al.*, 2002). Los aislados de lechuga y espinaca representaron el mayor (14,63%) y menor (4,88%) porcentaje de cepas con fenotipo proteolítico, respectivamente. Estos resultados difieren de los reportados por Alcides *et al.* (2003) quienes encontraron 100% de actividad proteasa en *Aeromonas* spp. aisladas de vegetales. La actividad proteolítica de las cepas aisladas puede ser atribuida a un

grupo de proteínas extracelulares secretadas por *A. hydrophila* de las cuales serinas proteasas y las metaloproteasas han sido catalogadas con gran actividad (Cascón *et al.*, 2000; Esteve *et al.*, 2004).

Con relación a la producción de lipasas (Tabla 4), 73,17% de las cepas de *A. hydrophila* evaluadas expresaron actividad lipolítica, la cual puede afectar la integridad de la membrana plasmática de células del hospedero (Soler *et al.*, 2002). Adicionalmente, se conoce que éstas interactúan con los leucocitos humanos y que modificaciones en la secuencia de los genes que las codifican reducen los efectos letales en modelos animales probados (Guerra *et al.*, 2007); *A. hydrophila* ha sido reconocida como una importante productora de lipasas, y la mayoría de las cepas aisladas de los vegetales analizados, no son la excepción. Este fenotipo puede ser atribuido a la presencia de alguna de las superfamilias de proteínas con actividad lipolítica comúnmente encontradas en *A. hydrophila*; las llamadas H3 y las no H3, según Sinhg *et al.* (2010) quienes encontraron 100% de *A. hydrophila* con este fenotipo.

Tabla 4. Frecuencia de aparición (%) de genes y factores de virulencia presentes en cepas de *A. hydrophila* aisladas de vegetales comestibles.

Vegetal	N°de aislados(%)	<i>aerA</i>	<i>aspA</i>	Hem	Prot	Lip
Acelga	10 (8,13)	1 (0,81)	---	5 (4,07)	10 (8,13)	5 (4,07)
Ajo porro	12 (9,76)	---	---	7 (5,69)	8 (6,5)	8 (6,5)
Cebollín	13 (10,57)	4 (3,25)	---	6 (4,88)	9 (7,32)	10 (8,13)
Céleri	21 (17,07)	2 (1,63)	---	6 (4,88)	15 (12,2)	14 (11,38)
Cilantro	15 (12,2)	3 (2,45)	---	5 (4,07)	9 (7,32)	10 (8,13)
Espinaca	8 (6,5)	2 (1,63)	---	6 (4,88)	6 (4,88)	6 (4,88)
Lechuga	25 (20,33)	4 (3,25)	1 (0,81)	8 (6,5)	18 (14,63)	20 (16,27)
Perejil	19 (15,45)	4 (3,25)	---	5 (4,07)	17 (13,81)	17 (13,81)
Total	123 (100)	20 (16,27)	1 (0,81)	47 (38,21)	92 (74,8)	90 (73,17)

aerA y *aspA* = genes codificantes de aerolisina y serina proteasa, respectivamente. Hem = actividad hemolítica, Prot = actividad proteolítica y Lip = actividad lipolítica.

La amplificación del gen *aerA*, fue evidente mediante la presencia de un amplicón con aproximadamente 430 pb (Figura 1), en concordancia con lo señalado por Chacón *et al.* (2003) quienes señalan a este producto como el gen codificante de la hemolisina; esta

banda se observó en 20 cepas, representando el 16,27% del total de aislados (Tabla 4) y siendo más frecuente en muestras de cebollín, lechuga y perejil, con porcentajes de 3,25.

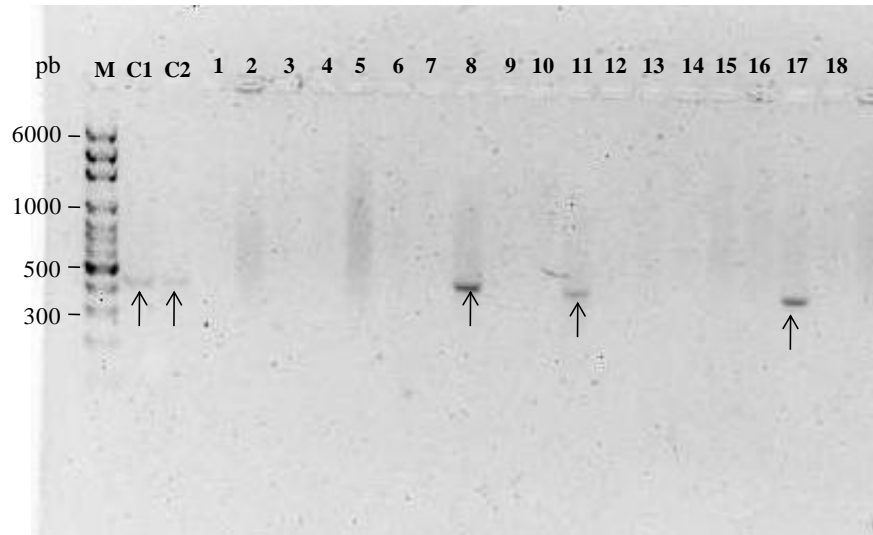


Figura 1. Detección por PCR del gen *aerA*, codificante de aerolisina en cepas de *Aeromonas hydrophila*. M = marcador de peso molecular (pb), C1 = cepa control de *A. hydrophila* ATCC 49140 CVCM 581, C2 = cepa control de *A. sobria* EM-315k3 CVCM 869. Las puntas de flechas señalan el amplicón de 430 pares de bases (pb) indicativo de la presencia del gen en los controles y en diferentes aislados de vegetales (cebollín, lechuga y perejil).

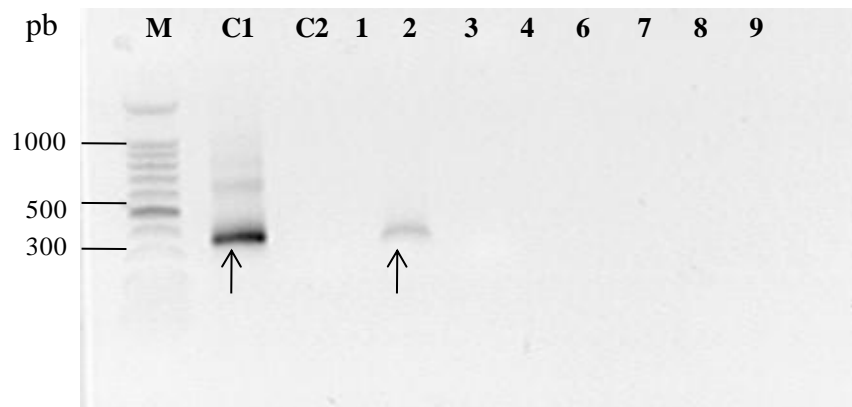


Figura 2. Detección por PCR del gen *aspA*, codificante de serina proteasa en cepas de *Aeromonas hydrophila*. M = marcador de peso molecular (pb), C1 = cepa control de *A. hydrophila* ATCC 49140 CVCM 581, C2 = cepa de *A. sobria* EM-315k3 CVCM 869. Las

puntas de flechas señalan el amplicón de 350 pares de base (pb) indicativo de la presencia del gen en el control y en un aislado proveniente de lechuga.

En el caso del gen *aspA*, solo fue evidenciado en uno de los aislados de lechuga, representando 0,81% (Figura 2), mientras que los genes *satA*, *lipA* y *ahyB*, no fueron evidenciados en ninguna de las muestras analizadas y tampoco en sus respectivas cepas controles, lo que permite sugerir, principalmente, algún defecto en el diseño de los cebadores.

En lo referido al gen *aerA* estos resultados fueron similares a los presentados por Nagar *et al.* (2011) quienes reportaron la presencia de *aerA* en 22,7% de sus muestras, mientras que Chacón *et al.* (2003) encontraron la presencia del gen en todas las cepas de *A. hydrophila* analizadas. La discrepancia, con respecto a este último autor, a pesar de utilizar la misma secuencia del iniciador en ambos trabajos, permite sugerir, en primer término, que el grado de patogenicidad de las cepas de *A. hydrophila* está en función de la presencia de uno o más factores de virulencia. Y que la presencia de este gen en particular, puede variar de acuerdo al origen de las cepas, concordando con lo expuesto por Mateos *et al.* (1993) quienes demostraron las diferencias en la producción de citotoxinas de *A. hydrophila* aisladas del ambiente y de muestras clínicas. Se ha demostrado que diferentes condiciones ecológicas, variaciones temporales o espaciales pueden influir en la transferencia horizontal de genes entre bacterias (Martino *et al.*, 2011), sin embargo, la estimación de la tasa de recombinación, representa en la actualidad una tarea difícil debido a las diferencias en los esquemas de muestreos y métodos analíticos empleados (Didelot y Maiden, 2010). Adicionalmente, Szczuka y Kaznoski (2007), establecen que las adaptaciones de microorganismos a ambientes muy específicos, conlleva a cambios en la expresión de genes, lo cual permite su supervivencia.

Los aislados con el gen *aerA*, representaron 42,55% (datos no mostrados) respecto a las cepas con actividad hemolítica. Esta diferencia puede tener su fundamento en la existencia de genes diferentes a *aerA*, que también posean actividad hemolítica y que sean generadores de este fenotipo en el 57,45% restante.

Estudios previos han demostrado que la actividad hemotoxigénica de *A. hydrophila* es originada por más de una proteína codificada por genes diferentes a *aerA*, entre los que se encuentran *act*, *ahh1*, *asa1* o *hly* (Soler *et al.*, 2002; Wang *et al.*, 2003; Sen y Rodgers, 2004). Castilho *et al.* (2009) reportaron la presencia de *hly* y *aerA* en 85 y 78,7%, respectivamente, en *A. hydrophila* aisladas de alimentos y muestras ambientales, sugiriendo que el porcentaje de hemólisis por la acción de algunos de estos genes varía en función del origen de la cepa. Por otro lado, la detección de solo un aislado con presencia del gen *aspA* contrasta con los elevados porcentajes de actividad proteolítica observados en las cepas de este estudio, tal comportamiento permite sugerir la existencia de genes codificantes de otro tipo de proteasas en *Aeromonas*; entre ellas se puede mencionar las metaloproteasas (Takahashi *et al.* 2013), la cual ha sido señalada como activador de aerolisina (Song *et al.*, 2004). Por su parte, Yu y Chu (2011) y Puthuchearry *et al.* (2012) reportaron 89 y 77%, respectivamente, de actividad proteolítica en sus aislados de *Aeromonas* spp.

Farmer *et al.* (2006) expresaron que la producción de factores de virulencia es variable dentro de las especies de *Aeromonas*, considerándose a *A. hydrophila* como una de las que los producen con mayor frecuencia. Tal variabilidad fue observada en este estudio mediante la permutación de cada uno de los factores, lo cual permitió evidenciar la existencia de subgrupos dentro de la especie “fenoespecies” en función de los perfiles de cada cepa, con predominancia de un 39% del perfil, caracterizado por la presencia de actividad proteolítica y lipolítica, principalmente en perejil y lechuga. Esta observación está acorde con lo expuesto por Kuhn *et al.* (1997) quienes además de reportar diferentes cepas de *Aeromonas*, mencionan la existencia de un grupo dominante. Khajanchi *et al.* (2010) también infieren sobre esta idea, señalando además la posibilidad de que estos grupos dominantes sean generadores de enfermedades en humanos en comparación con cepas de la misma especie, aislada de otros ambientes. Es posible que la presencia de genes específicos de factores de virulencia represente evidencia de que cada uno de los subgrupos encontrados utilicen mecanismos diferentes en la colonización y adherencia a

células hospederas específicas (Aguilera-Arreola *et al.*, 2005). Adicionalmente, se sugiere que la posible variabilidad fenotípica de *A. hydrophila*, tenga relación con la confusión taxonómica, reportada en numerosas investigaciones, a pesar de los esfuerzos realizados (Martino *et al.*, 2011).

La presencia de los genes *sata* y *lipA* están involucrados en el desequilibrio de la estabilidad de la membrana plasmática (Pemberton *et al.*, 1997), mientras que *ahyB*, hidroliza la elastina del tejido conectivo del hospedero, posibilitando la infección e incrementando su severidad, por lo que son fundamentales en el establecimiento y patogenicidad de *Aeromonas* spp. Chacón *et al.* (2003) diseñaron el iniciador de *sata* empleado en esta investigación para la detección del mencionado gen, el cual fue empleado con el propósito de evitar confusiones durante el aislamiento e identificación de *Aeromonas* con especies del género *Vibrio* o *Plesiomonas*. Estos autores, propusieron en función de sus resultados, que dicho gen estaba presente en prácticamente todas las especies de *Aeromonas*, incluyendo especies representativas del género; sin embargo, Beaz-Hidalgo *et al.* (2010), empleando la misma sonda, lograron detectar 75,6% del gen en sus cepas aisladas; por su parte Nagar *et al.* (2011) reportaron un 50% del gen *ahyB* en *A. hydrophila* y un 20% en *A. veroni* var. *sobria* y Ye *et al.* (2013) encontraron un 35% de *ahyB* en cepas de *A. hydrophila* a partir de pescados, razón que pudiera explicar la ausencia en la detección del mencionado gen. Por otro lado, la completa ausencia de elastasa también fue evidenciada en las cepas de *Aeromonas* aisladas por Nawaz *et al.* (2010).

En concordancia con estudios anteriores y que han sido previamente señalados, en esta investigación se evidenció heterogeneidad en la distribución de los genes de virulencia analizados (Tabla 4). De acuerdo a Yi *et al.*, (2013), estas variaciones, también pueden estar relacionadas con el origen geográfico de las cepas, en este caso la procedencia de los vegetales, incidiendo en los diferentes genotipos detectados a nivel de especie.

Es evidente que la producción de tan amplia variedad de factores de virulencia se encuentra asociada a su potencial para causar enfermedades graves en seres humanos. Sin embargo, los genes codificantes de dichos factores podrían ser expresados diferencialmente en *A. hydrophila* en función de las condiciones ambientales (Khajanchi *et al.*, 2010), representada por los diferentes tratamientos durante la producción, almacenamiento y distribución de los vegetales hasta manos del consumidor. Por otro lado, es posible que el efecto patogénico de la citada especie se encuentre asociado con la presencia de más de un factor de virulencia. Albert *et al.* (2000) revelan que la patogenicidad de *Aeromonas* spp. se incrementó a consecuencia del sinergismo generado por la presencia de más de un gen de virulencia; concluyendo que la interacción de los genes *alt* y *ast* originó diarreas graves, mientras que en presencia de *alt* solo, se observaron diarreas menos graves. A pesar del importante rol de las enterotoxinas como factores de virulencia en los casos de gastroenteritis, su presencia de manera aislada, tal como ocurrió con el 15,45% de los aislados, puede no ser suficiente en la generación de enfermedades, como lo reportan Sen y Rodgers (2004).

Aunque los vegetales analizados están destinados a servir como alimento, estos representan en parte, la calidad microbiológica de los ambientes con los que han estado en contacto previo. Entre ellos se incluyen, principalmente, los sistemas de riego para cultivos, en los que se ha demostrado la existencia de poblaciones de *Aeromonas* en el agua utilizada para riego (Pianetti *et al.*, 2004; McEgan *et al.*, 2008) y la inadecuada aplicación de normas de higiene durante el tratamiento de estos productos para su almacenamiento y distribución (Gadaga *et al.*, 2008).

La mayor frecuencia de factores de virulencia detectados en los aislados provenientes de las muestras de lechuga, puede ser atribuida a la mayor abundancia de la especie bacteriana sobre este sustrato vegetal. A pesar de que la relación exacta entre la presencia de genes de virulencia y la capacidad de una cepa determinada para causar enfermedad en humanos no está bien dilucidada, los resultados obtenidos en este estudio, representan motivo de advertencia, debido a que 79,7% de los aislados, poseen

más de un gen factor de virulencia (Tabla 3), representando un posible riesgo para la salud humana; principalmente, si se toma en cuenta que el vegetal con mayor número de aislados con genes patógenos se consume comúnmente sin tratamiento de cocción.

Perfil de resistencia frente antibióticos de *Aeromonas hydrophila*:

En la tabla 5 se observa que, de las 123 cepas obtenidas a partir de muestras vegetales 56,9% (n=70); 49,6% (n=61) y 48,8% (n=60) fueron resistentes a ampicilina-sulbactam, cefotaxima y aztreonam, respectivamente; 46,3% (n=57) a cefoxitin; 45,5% (n=56) a ceftriaxona; 38,2% (n=47) a trimetoprim-sulfametoxazol; 35,8% (n=44) a ceftazidima; 17,9% (n=22) a tetraciclina y 13% (n=16) a cloranfenicol; mientras que los menores porcentajes se apreciaron solo en presencia de antimicrobianos como imipenem (4,9% n=6), amikacina (6,5% n=8) y ciprofloxacina (8,9% n=11). Por otro lado, de acuerdo a la estimación de porcentajes en función del número de cepas resistentes para cada antibiótico (Tabla 5), se puede visualizar que los aislados de lechuga muestran los máximos valores de resistencia, por lo menos, frente a 83% de los antibióticos empleados.

En la tabla 6 se muestran un total de 68 antibiogramas observados luego de los antibiogramas realizados a 123 cepas de *A. hydrophila*, allí se aprecia la presencia de 22 (17,9%) aislados sensibles a todos los antimicrobianos. Un 16,3%; 7,3% y 3,3% demostraron tener resistencia por lo menos frente a 1; 2 ó 3 respectivamente, mientras que otro 16,3% presentó resistencia a 7 antibióticos. El número de cepas resistentes a 8, 9 y 10 tipos de antibióticos fue de 8 (6,5%) 5 (4,1) y 2 (1,6%) respectivamente, destacándose un aislado, procedente de cilantro, resistente a todos los antibióticos probados.

Las cepas del género *Aeromonas* y particularmente la especie *A. hydrophila* aisladas de ambientes clínicos, acuáticos, terrestres y alimentos han sido sometidas a numerosos estudios de resistencia antibiótica. Estas investigaciones han arribado a conclusiones de forma generalizada sobre la resistencia a penicilinas (ampicilina, carbenecilina y

ticarcilina) y algunas cefalosporinas de primera generación, así como su sensibilidad a los aminoglucósidos, tetraciclina, cloranfenicol, trimetoprim-sulfametoxazol quinolonas y cefalosporinas de segunda y tercera generación (Ghenghesh *et al.*, 2001; Guerra *et al.*, 2007; Awan *et al.*, 2009; Askhedikar y Chhabra, 2010).

Tabla 5. Porcentajes de resistencia a antibióticos en cepas de *Aeromonas hydrophila* aisladas de vegetales. Los superíndices en los porcentajes representan el número de cepas resistentes.

Vegetales	Antibióticos (µg/disco)											
	SAM ₍₂₀₎	IPM ₍₁₀₎	ATM ₍₂₀₎	AN ₍₂₀₎	CTX ₍₂₀₎	FOX ₍₂₀₎	CAZ ₍₂₀₎	CRO ₍₂₀₎	TE ₍₂₀₎	CIP ₍₅₎	SXT ₍₂₅₎	C ₍₂₀₎
Acelga	7,1 ⁵	16,7 ¹	8,3 ⁵	--	8,2 ⁵	10,5 ⁶	6,8 ³	8,9 ⁵	13,6 ³	--	8,5 ⁴	--
Ajo porro	8,6 ⁶	--	15 ⁹	--	9,8 ⁶	8,8 ⁵	9,1 ⁴	10,7 ⁶	4,5 ¹	--	10,6 ⁵	18,8 ³
Cebollín	12,9 ⁹	--	11,7 ⁷	12,5 ¹	8,2 ⁵	8,8 ⁵	6,8 ³	8,9 ⁵	9,1 ²	9,1 ¹	4,3 ²	--
Céleri	20 ¹⁴	--	11,7 ⁷	12,5 ¹	18 ¹¹	17,5 ¹⁰	15,1 ⁷	14,3 ⁸	18,2 ⁴	18,2 ₂	21,3 ¹⁰	18,8 ³
Cilantro	12,9 ⁹	16,7 ¹	10 ⁶	12,5 ¹	14,8 ⁹	12,3 ⁷	6,8 ³	16,1 ⁹	27,3 ⁶	27,3 ³	12,8 ⁶	18,8 ³
Espinaca	8,6 ⁶	16,7 ¹	11,7 ⁷	12,5 ¹	9,8 ⁶	10,5 ⁶	11,4 ⁵	10,7 ⁶	9,1 ²	18,2 ²	12,8 ⁶	18,8 ³
Lechuga	18,6 ¹³	--	21,7 ¹³	50 ⁴	18 ¹¹	19,3 ¹¹	25 ¹¹	17,9 ¹⁰	18,2 ⁴	27,3 ³	21,3 ¹⁰	18,8 ³
Perejil	11,4 ⁸	50 ³	10 ⁶	--	13,1 ⁸	12,3 ⁷	18,2 ⁸	12,5 ⁷	--	--	8,5 ⁴	6,3 ¹
Res. Total	56,9 ⁷⁰	4,9 ⁶	48,8 ⁶⁰	6,5 ⁸	49,6 ⁶¹	46,3 ⁵⁷	35,8 ⁴⁴	45,5 ⁵⁶	17,9 ²²	8,9 ¹¹	38,2 ⁴⁷	13,0 ¹⁶

Res. = Resistencia. SAM = ampicilina/sulbactam, IPM = imipenem, ATM = aztreonam, AN = amikacina, CTX = cefotaxima, FOX = cefoxitina, CAZ = ceftazidima, CRO = Ceftriaxone, TE = tetraciclina, CIP = ciprofloxacina, SXT = trimetoprim/sulfametoxazol y C = cloranfenicol.

Tabla 6. Combinaciones en el patrón de resistencia y sensibilidad antibiótica en cepas de *A. hydrophila* aisladas de vegetales.

N° de aislados	SAM	IPM	ATM	AN	CTX	FOX	CAZ	CRO	TE	CIP	SXT	C	Vegetal (N° aislados)
22	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	Acelga (2) Ajo porro (3) Cebollín (3) Céleri (3) Cilantro (4) Lechuga (4) Perejil (3)
4	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	I	Acelga (1) Cilantro (1) Lechuga (2)
3	S	S	S	S	S	S	I	S	S	S	S	S	Perejil (3)
1	I	S	S	S	S	S	S	S	I	S	S	S	Perejil (1)
4	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	Céleri (3) Lechuga (1)
2	R	S	S	S	S	S	I	S	S	S	S	S	Cebollín (2) Acelga (1)
5	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	Espinaca (1) Lechuga (3) Ajo porro (3)
5	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	Cebollín (1) Lechuga (1)
1	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	Acelga (1)
1	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	Perejil (1)
1	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	I	Cilantro (1)
1	I	S	S	S	S	S	R	S	I	S	S	S	Perejil (1)

Tabla 6. Continuación

N° de aislados	SAM	IPM	ATM	AN	CTX	FOX	CAZ	CRO	TE	CIP	SXT	C	Vegetal (N° aislados)
2	S	S	S	S	S	R	R	S	S	S	S	S	Céleri (1)
													Lechuga (1)
1	S	R	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	Perejil (1)
1	R	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	Lechuga (1)
1	S	S	S	R	S	R	S	S	S	S	S	I	Lechuga (1)
1	R	S	S	S	S	S	I	S	R	S	S	S	Cebollín (1)
1	I	S	S	S	S	R	R	S	I	S	S	S	Perejil (1)
1	I	S	S	S	R	R	I	S	S	S	S	S	Céleri (1)
1	I	S	S	R	R	S	I	S	S	S	S	S	Céleri (1)
1	S	S	R	R	S	S	R	S	S	S	S	S	Espinaca (1)
1	R	S	S	S	R	S	R	S	S	S	S	S	Perejil (1)
1	R	S	R	S	S	S	S	S	S	I	R	S	Cebollín (1)
1	R	S	S	S	R	S	I	R	S	S	S	S	Cilantro (1)
3	R	S	R	S	S	S	R	S	S	I	R	S	Céleri (3)
2	R	S	R	I	R	R	I	R	S	S	S	S	Cebollín (2)
1	R	S	S	I	R	R	I	R	S	S	S	S	Céleri (1)
1	R	S	I	S	R	R	I	R	S	S	S	S	Cilantro (1)
3	R	S	R	S	R	R	R	R	S	S	R	S	Perejil (2)
													Lechuga (1)
1	R	S	R	S	R	R	R	R	S	S	R	I	Lechuga (1)
2	R	S	R	S	R	R	I	R	R	S	R	I	Acelga (1)
													Cilantro (1)
2	R	S	R	S	R	R	R	R	S	S	S	I	Ajo porro (1)
													Lechuga (1)
													Ajo porro (1)
3	R	S	R	S	R	R	R	R	S	S	R	S	Lechuga (1)
													Céleri (1)

Tabla 6. Continuación

N° de aislados	SAM	IPM	ATM	AN	CTX	FOX	CAZ	CRO	TE	CIP	SXT	C	Vegetal (N° aislados)
2	R	S	R	S	R	R	I	R	R	I	R	R	Ajo porro (1) Lechuga (1)
1	R	S	R	S	R	R	S	R	S	S	R	S	Ajo porro (1)
1	R	S	R	S	R	S	S	S	R	S	R	R	Célerly (1)
1	R	S	R	S	R	R	R	R	R	I	R	R	Espinaca (1)
1	R	S	R	R	R	R	R	R	S	S	S	S	Cebollín (1)
1	R	S	R	S	R	R	R	R	R	I	R	I	Acelga (1)
1	R	S	S	S	R	R	R	R	R	R	R	S	Célerly (1)
1	R	S	R	S	R	S	I	R	R	S	R	I	Lechuga (1)
1	R	S	I	S	R	R	R	R	R	S	R	S	Célerly (1)
2	R	R	R	S	R	R	I	R	S	S	S	I	Acelga (1) Perejil (1)
1	R	S	I	S	R	R	I	R	S	R	S	S	Cilantro (1)
1	R	S	I	S	R	R	S	R	R	S	R	S	Célerly (1)
1	R	S	S	S	R	S	R	R	S	S	R	S	Perejil (1)
1	R	S	R	S	R	S	I	R	R	R	R	I	Cilantro (1)
2	R	S	R	R	R	R	R	R	S	S	R	I	Lechuga (2)
2	R	S	R	S	R	R	I	R	I	S	R	R	Célerly (2)
2	R	S	R	S	R	R	I	R	S	I	R	I	Espinaca (2)
1	R	S	R	S	R	R	I	R	S	S	S	I	Perejil (1)
2	R	S	R	S	R	R	I	R	R	S	R	I	Acelga (1) Cilantro (1)
1	R	S	R	S	R	S	R	R	S	S	R	R	Ajo porro (1)
1	I	S	S	S	R	R	I	R	S	R	S	S	Célerly (1)
1	R	S	R	S	R	R	R	R	S	S	S	I	Cebollín (1)
1	R	S	R	S	R	R	R	R	S	I	R	I	Acelga (1)
1	R	S	R	S	R	R	I	R	R	R	R	R	Lechuga (1)

Tabla 6. Continuación

N° de aislados	SAM	IPM	ATM	AN	CTX	FOX	CAZ	CRO	TE	CIP	SXT	C	Vegetal (N° aislados)
1	R	S	R	S	R	R	R	R	R	S	R	R	Cilantro (1)
1	R	S	R	R	R	S	S	S	S	R	R	S	Lechuga (1)
2	R	S	R	S	R	R	R	R	S	S	R	R	Ajo porro (1)
													Cilantro (1)
1	R	R	R	S	R	R	R	S	S	S	S	S	Perejil (1)
1	R	S	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R	Lechuga (1)
1	R	S	R	S	R	R	I	R	S	S	R	R	Perejil (1)
1	R	S	R	S	R	R	I	R	S	R	R	I	Espinaca (1)
1	R	S	R	S	R	R	R	R	S	R	R	R	Espinaca (1)
1	R	S	R	S	R	R	R	R	R	R	R	I	Cebollín (1)
1	R	R	R	S	R	R	R	R	R	I	R	R	Espinaca (1)
1	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	Cilantro (1)

SAM = ampicilina/sulbactam, IPM = imipenen, ATM = aztreonam, AN = amikacina, CTX = cefotaxima, FOX = cefoxitina, CAZ = ceftazidima, CRO = Ceftriaxone, TE = tetraciclina, CIP = ciprofloxacina, SXT = trimetoprim/sulfametoxazol y C = cloranfenicol.

Muchos estudios concuerdan con la idea de que los patrones de resistencia representan una herramienta fundamental capaz de permitir la caracterización fenotípica de cepas e identificación de especies, para una adecuada selección de terapia antibiótica en el área clínica (Awan *et al.* 2009).

En este estudio, las diferentes cepas aisladas presentaron variables porcentajes de resistencia frente a los antibióticos empleados. El porcentaje de resistencia de las cepas para cefoxitina fue 46,3%, trimetoprim-sulfametoxazol 38,2%, tetraciclina 17,9% e imipenem 4,9%, siendo similar al reportado por Goñi-Urriza *et al.* (2000) en muestras de agua de ríos europeos. Sin embargo, el porcentaje de resistencia obtenido con cefotaxima fue 49,6%, el cual contrasta con los encontrados por los autores antes mencionados.

En otro trabajo, Guz y Kozinska (2004) no reportan resistencia frente a cloranfenicol de sus aislados de *A. hydrophila*, mientras que en este estudio se encontró un 13% de cepas resistentes. Por su parte, Peres-Palú *et al.* (2006) obtuvieron 88,5% y 7,7% de resistencia a ampicilina-sulbactam y tetraciclina, respectivamente en *A. hydrophila* aisladas de lechuga, resaltando además 100% de sensibilidad encontrado en estas cepas frente a imipenem, amikacina y ciprofloxacina. Sin embargo, en el presente estudio, el 4,9%; 6,5% y 8,9% fueron respectivamente, resistentes a los tres antibióticos mencionados (Tabla 5).

En el caso del 6,5% de cepas resistentes a amikacina antes señaladas, este porcentaje es considerablemente bajo con respecto a lo reportado por Boehme *et al.* (2004). Por otro lado, Guerra *et al.* (2007), Yucel *et al.* (2005) no encontraron cepas de *A. hydrophila* resistentes a amikacina y ciprofloxacina. De igual forma, De Oliveira-Scoaris *et al.* (2008), en su estudio, no reportan resistencia a amikacina en sus cepas de *A. hydrophila* aisladas de aguas para consumo humano. Y en un trabajo más reciente, Ramalivhana *et al.* (2009) encontraron hasta 30% de resistencia a amikacina y ningún aislado de *A. hydrophila* resistente a imipenem, mientras que Ghenghesh *et al.* (2008) mencionan

100% de sensibilidad a ciprofloxacina en cepas aisladas de alimentos y advierten el aislamiento de 51% de cepas de *Aeromonas* spp. resistentes a este último antibiótico en muestras clínicas.

Existen trabajos donde se han encontrado mayores porcentajes de resistencia a los reportados en esta investigación, y hasta 100% de cepas resistentes a ampicilina-sulbactam y otros del grupo de las penicilinas, estas diferencias pueden ser atribuidas a la procedencia de las cepas, es posible que muchas de éstas no hayan estado en contacto con otras poblaciones bacterianas que presenten resistencia a cualquiera de los antibióticos utilizados. En la literatura existe discrepancia en cuanto a la capacidad de resistencia en numerosas cepas de especies bacterianas. Sin embargo, algunos autores han observado un incremento en las probabilidades de multiresistencia a antimicrobianos en cepas de especies aisladas de ambientes clínicos en comparación con las aisladas de otros ambientes dentro de los que se incluyen los vegetales (Peres-Palú *et al.*, 2006).

La elevada proporción de cepas resistentes a la acción del beta-lactámico ampicilina-sulbactam también se ha observado en otros estudios de bacterias Gram-negativas asociadas a alimentos de origen vegetal (Hamilton-Miller y Shah, 2001; Boehme *et al.*, 2004). Esa resistencia ha sido considerada un factor innato o intrínseco, en ciertos géneros bacterianos (Boehme *et al.*, 2004), razón por la cual para determinados estudios, la detección de resistencia a ampicilina ha perdido relevancia. Sin embargo, Bezanson *et al.* (2008) establecen la importancia en la determinación de la resistencia al mencionado antibiótico, debido a que cuando estimaron la dosis mínima inhibitoria de crecimiento en sus cepas resistentes a ampicilina, encontraron valores más altos de los esperados como resistencia intrínseca producida en ausencia de alguna presión selectiva. Adicionalmente, encontraron que el factor de resistencia a ampicilina estaba asociado a plásmidos autotransmisibles, sugiriendo que dicha resistencia, pudo haber sido adquirida mediante propagación dentro de una población bacteriana por transferencia horizontal.

La resistencia observada a antibióticos en las cepas estudiadas podría atribuirse en parte al hecho de que bacterias provenientes de algún tipo de ambiente en particular comparten unidades de intercambio genético llamadas mobilomas que forman parte del genoma flotante bacteriano, que incluyen secuencias de inserción (IS), secuencias de inserciones comunes (ISCR), transposones, islas genómicas, integrones y plásmidos R, concordantes con la universalidad del material genético lo cual incrementa las probabilidades de la propagación de genes de resistencia (Boehme *et al.*, 2004). En el caso particular de las β -lactamasas, estudios previos han demostrado que su diversidad es el resultado de una evolución antigua que les ha permitido diversificarse (Song *et al.*, 2005). Debido a ese origen antiguo y amplia distribución, es común detectar genes de resistencia en muestras aisladas de reservorios ambientales, diseminados por la microbiota patógena luego de la introducción de nuevos antibióticos β -lactámicos en el área clínica y agrícola (Aminov y Mackie, 2007). El amplio intercambio genético, probablemente bidireccional, entre bacterias de diversos ambientes estaría siendo demostrado por la evidencia de que muchas especies bacterianas aisladas de diversas zonas, comparten ampliamente los mismos determinantes genéticos de resistencia a antibióticos (van-Elsa y Bailey, 2002). El mecanismo de transferencia horizontal de resistencia fue evidenciado por Bezanson *et al.* (2008) en muestras de lechuga; igualmente, Peres-Palú *et al.* (2006) encontraron tres plásmidos en cepas de *A. hydrophila* aisladas de lechuga, relacionando la presencia de uno de éstos, con resistencia a tetraciclina.

A manera de recomendación, adicional a las rigurosas normas, que deben ejecutarse para el lavado de los vegetales, antes de su consumo, se sugiere realizar el corte de estos alimentos en el momento de su consumo, debido a que se ha demostrado que el número de incisiones en la superficie de los vegetales, facilita el proceso de infiltración e incrementa el área de superficie de crecimiento bacteriano y contaminación. La humedad en las superficies de corte y en la de los utensilios utilizados para el procesamiento proporciona las condiciones adecuadas para el crecimiento bacteriano en seis o siete veces más que la carga microbiana presente durante la adquisición del

producto (Brackett, 1994). Este fenómeno, ocurre inclusive en fábricas dedicadas a la trituration y preparación de vegetales empacados listos para consumo (Garg *et al.*, 1990).

Aunque el ambiente constituye el hábitat principal para *A. hydrophila*, la especie ha sido caracterizada como un patógeno oportunista de seres humanos, particularmente en el caso de personas con un sistema inmunitario comprometido u otras enfermedades subyacentes (Sprecher, 2005 y Monaghan *et al.*, 2008). Boehme *et al.* (2004) establece que alimentos de origen vegetal, no son tan estudiados como los de origen animal representando, los primeros, un mecanismo ideal para el transporte de estas bacterias junto con numerosos genes de resistencia antibiótica. Simultáneamente, la demanda en el consumo de vegetales ha tenido un continuo crecimiento en la cantidad y diversidad de productos disponibles para los consumidores. Por lo tanto, su detección en los alimentos analizados, de los cuales algunos son ingeridos sin tratamiento térmico o desinfección adecuada, deja en evidencia el potencial mecanismo de entrada a seres humanos. Adicionalmente, el hecho de que la mayoría de los aislados obtenidos presenten genes de virulencia y de resistencia a antibióticos debe ser motivo para la toma de conciencia al momento de preparar este tipo de alimentos.

La presencia de *A. hydrophila* combinada a la creciente demanda en el consumo de vegetales, alerta sobre el posible consumo de alimentos colonizados con bacterias patógenas oportunistas y trabajos de investigación como el realizado aportan evidencia de esto y además coadyuvan en la prevención de enfermedades alertando sobre el uso de medidas higiénicas y buenas prácticas de manufacturación.

CONCLUSIONES

Se aislaron 123 cepas de *A. hydrophila* y 115 de *Aeromonas* spp. lo que representa un total de 33,1% del género presente en 240 muestras de vegetales, provenientes de distintos centros de distribución y comercialización en Cumaná.

Las cepas de *A. hydrophila* fueron más frecuentes en *Lactuca sativa*, y *Apium graveolens* var. *dulce* con porcentajes de 20,3 y 17,07, respectivamente.

El gen de patogenicidad *aerA*, estuvo presente en 16,27% de las cepas de *A. hydrophila*, siendo más frecuente en muestras de *Allium schoenoprasum*, *Lactuca sativa* y *Petroselinum sativum* (3,25%).

El gen *aspA*, codificante de la serina proteasa solo se encontró en una cepa (0,81%) aislada de *Lactuca sativa*, mientras que los genes *satA*, *lipA* y *ahyB*, no fueron evidenciados en las muestras analizadas

Los antibióticos que mostraron menos eficacia sobre las cepas de *A. hydrophila* fueron ampicilina-sulbactam, cefotaxima y aztreonam, con porcentajes de 56,9%; 49,6% y 48,8% respectivamente. Mientras que con imipenem se observó un 95,1% de sensibilidad, seguido de amikacina (91,1%), ciprofloxacina (81,3%) y tetraciclina (78,1%).

Fenotípicamente, las cepas de *A. hydrophila* presentaron 38,21; 73,17 y 74,8% de actividad hemolítica, lipolítica y proteolítica, respectivamente; siendo las cepas aisladas de *Lactuca sativa*, las que presentaron con mayor frecuencia estos factores de virulencia.

BIBLIOGRAFÍA

Abbott, S.; Cheung, W. y Janda, M. 2003. The Genus *Aeromonas*: Biochemical characteristics, atypical reactions, and phenotypic identification schemes. *Journal of Clinical Microbiology*, 41: 2348-57.

Abuhammour, W.; Hasan, R. A. y Rogers, D. 2006. Necrotizing fasciitis caused by *Aeromonas hydrophila* in an immunocompetent child. *Pediatric Emergency Care*, 22: 48-51.

Adamski, J.; Koivuranta, M y Leppänen, E. 2006. Fatal case of myonecrosis and septicaemia caused by *Aeromonas hydrophila* in Finland. *Scandinavian Journal of Infectious Diseases*, 38: 1117-1119.

Aguilera-Arreola, M. G.; Hernández-Rodríguez, C.; Zúñiga, G.; Figueras, M. J, y Castro-Escarpulli, G. 2005. *Aeromonas hydrophila* clinical and environmental ecotypes as revealed by genetic diversity and virulence genes. *FEMS Microbiology Letter*, 242: 231-240.

Albert, M. J.; Ansaruzzaman, M.; Talukder, K .A.; Chopra, A. K.; Kuhn, I.; Rahman, M.; Faruque, A .S. G.; Islam, M .S.; Sack, R. B. y Mollby, R. 2000. Prevalence of enterotoxin genes in *Aeromonas* spp. isolated from children with diarrhea, healthy controls, and the environment. *Journal of Clinical Microbiology*, 38: 3785-3790.

Alcides, A. P.; Guimaraes, M. S. y Ferreira, M. C. S. 2003. Occurrence of *Aeromonas* in parsley and watercress sold in street-markets of Rio de Janeiro, Brazil. *Journal of Food Quality*, 26: 75-86.

Allen, H. K.; Donato, J.; Wang, H. H.; Cloud-Hansen, K. A.; Davies, J. y Handelsman, J. 2010. Call of the wild: antibiotic resistance genes in natural environments. *Nature Reviews Microbiology*, 8(4): 251-259.

Aminov, R. I. y Mackie, R. I. 2007. Evolution and ecology of antibiotic resistance genes. *FEMS Microbiology Letter*, 271: 147-161.

Askhedikar, M. y Chhabra, D. 2010. Multiple drug resistance in *Aeromonas hydrophila* isolates of fish. *Veterinary World*, 3(2): 76-77.

Awan, M. B.; Maqbool, A.; Bari, A. y Krovacek, K. 2009. Antibiotic susceptibility profile of *Aeromonas* spp. Isolates from food in Abu Dhabi, United Arab Emirates. *New Microbiologica*, 32: 17-23

Bauer, A.; Kirby, J. y Turck, M. 1966. Antibiotics susceptibility testing by standardized single disk method. *American Journal of Clinical Pathology*, 45: 493-496.

Beaz-Hidalgo, R.; Alperi, A.; Buján, N.; Romalde, J. L. y Figueras, M. J. 2010. Comparison of phenotypical and genetic identification of *Aeromonas* strains isolated from diseased fish. *Systematic and Applied Microbiology*, 33: 149-153.

Bezanson, G. S.; MacInnis, R.; Potter, G. y Hughes, T. 2008. Presence and potential for horizontal transfer of antibiotic resistance in oxidase-positive bacteria populating raw salad vegetables. *International Journal of Food Microbiology*, 127: 37-42

Blanco, C; Silva, E.; Pereira C.; Pozzatti, P.; Alves, L.; Santurio, J.M.; Hartz, S. 2007. Enzymatic and hemolytic activities of *Candida dubliniensis* strains. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*. 49(4): 203-206.

Blasco, M. D.; Esteve, C. y Alcaide, E. 2008. Multiresistant waterborne pathogens isolated from water reservoirs and cooling systems. *Journal of Applied Microbiology*, 105(2): 469-475.

Boehme, S.; Werner, G.; Klare, I.; Reissbrodt, R. y Witte, W. 2004. Occurrence of antibiotic-resistant enterobacteria in agricultural foodstuffs. *Molecular and Nutritional Food Research*, 48: 522-531.

Brackett, R. E. 1994. Microbiological spoilage and pathogens in minimally processed refrigerated fruits and vegetables. In: *Minimally Processed Refrigerated Fruits and Vegetables* (edited by Wiley, R. C.). Pp. 269-312. New York: Chapman & Hall.

Bücker, R.; Krug, S. M.; Rosenthal, R.; Günzel, D.; Fromm, A.; Zeitz, M.; Chakraborty, T.; Fromm, M.; Epple, H. J y Schulzke, J. D. 2011. Aerolysin From *Aeromonas hydrophila* Perturbs Tight Junction Integrity and Cell Lesion Repair in Intestinal Epithelial HT-29/B6 Cells. *The Journal of Infectious Diseases*, 204: 1283-1292.

Callister, S y Agger, W. 1987. Enumeration and characterization of *Aeromonas hydrophila* and *Aeromonas caviae* isolated from grocery store produce. *Applied and Environmental Microbiology*, 53: 249-53.

Cascón, A.; Fregenda, J.; Allen, M.; Yugueros, J.; Temprano, A. y Hernanz, C. 2000. Cloning, characterization and insertional inactivation of a major extracellular serine protease gene with elastolytic activity for *Aeromonas hydrophila*. *Journal of Fish Disease*, 23: 49-59.

Castilho, M.; Castro, T.; Araújo, V.; Trajano, R.; Santos, P.; Pimenta, P.; Lucheze, K.; Melo, J. T.; Gonçalves, A. M.; Nogueira, R. T.; De Luna, M. G. y Freitas-Almeida, A. C. 2009. High frequency of hemolytic and cytotoxic activity in *Aeromonas* spp. isolated from clinical, food and environmental in Rio de Janeiro, Brazil. *Antonie van Leeuwenhoek*, 96: 53-61.

Castro-Escarpulli, G.; Aguilera-Arreola, M.; Giono-Cerezo, S.; Hernández-Rodríguez, C.; Rodríguez-Chacón, M.; Soler-Falgás, L.; Aparicio-Ozores, G. y Figueras-Salvat, M. J. 2002. El género *Aeromonas*. ¿Un patógeno importante en México?. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología*, 22(4): 206-216.

Ceylan, E.; Berktaş, M. y Agaoglu, Z. 2008. The occurrence and antibiotic resistance of motile *Aeromonas* in livestock. *Tropical Animal Health and Production*, 41: 199-204.

Chacón, M. R.; Figueras, M. J.; Castro-Escarpulli, G.; Soler, L. y Guarro, J. 2003. Distribution of virulence genes in clinical and environmental isolates of *Aeromonas* spp. *Antonie van Leeuwenhoek* 84: 269-278.

Chopra, A. K.; Houston, C. W.; Peterson, J. W. y Jin G. F. 1993. Cloning, expression and sequence analysis of a cytolytic enterotoxin gene from *Aeromonas hydrophila*. *Canadian Journal of Microbiology*, 39: 513-523.

Cornelis, G. R. y van Gijsegem, F. 2000. Assembly and function of type III secretory systems. *Annual Review of Microbiology*, 54: 735-774.

Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). 2010. Methods for Antimicrobial Dilution and Disk Susceptibility Testing of Infrequently Isolated or Fastidious Bacteria; Approved Guideline-Second Edition. CLSI document M45-A2.

Daskalov, H. 2006. The importance of *Aeromonas hydrophila* in food safety. *Food Control*, 17(6): 474-483.

De Oliveira Scoaris, D.; Colacite, J.; Nakamura, C.; Ueda-Nakamura, T.; de Abreu Filho, B. y Dias Filho, B. 2008. Virulence and antibiotic susceptibility of *Aeromonas* spp. isolated from drinking water. *Antonie van Leeuwenhoek*, 93: 111-122.

Dhiraputra, C.; Tiensasitorn, C.; Techachaiwiwat, W.; Jirapanakorn, N.; Kachintorn, N. y Danchaivijitr, S. 2005. Bacterial contamination of vegetables served in hospitals. *Journal of the Medical Association of Thailand*, 88: S42-8.

Didelot, X. y Maiden, M. C. 2010. Impact of recombination on bacterial evolution. *Trends in Microbiology*, 18: 315-322.

Eisenstein, B. 1990. The polymerase chain reaction. A new method of using molecular genetics for medical diagnosis. *New England Journal Medical*, 322: 178-183.

Elhariry, H. M. 2011. Biofilm formation by *Aeromonas hydrophila* on green-leafy vegetables: cabbage and lettuce. *Foodborne Pathogens and Disease*, 8: 125-131.

Esteve, C. y Birkbeck, T. H. 2004. Secretion of haemolysins and proteases by *Aeromonas hydrophila* EO63: separation and characterization of the serine protease (caseinase) and the metalloprotease (elastase). *Journal of Applied Microbiology*, 96: 994-1001.

Farmer, J. J.; Arduino, M. J. y Hickman-Brenner, F. W. 2006. The genera *Aeromonas* and *Plesiomonas*. *Prokaryotes*, 6: 564-596.

Gadaga, T. H.; Samende, B. K.; Musuna, C. y Chibanda, D. 2008. The microbiological quality of informally vended foods in Harare, Zimbabwe. *Food Control*, 19: 829-832.

Garg, N.; Churey, J. J. y Splittstoesser, D. F. 1990. Effect of processing conditions on the microflora of fresh-cut vegetables. *Journal of Food Protection*, 53: 701-703.

Gavin, R.; Merino, S. y Tomas, J. M. 2003. Molecular mechanisms of bacterial pathogenesis from an emerging pathogen: *Aeromonas* spp. *Recent Research Developments in Infection and Immunity*, 1: 337-354.

Gerhardt, P.; Murray, R. G. E.; Wood, W. A. y Krieg, N. R. 1994. Methods for General and Molecular Bacteriology. American Society for Microbiology. Washington DC; 791 pp.

Ghenghesh, K. S.; El-Ghodban, A.; Dkakni, R.; Abeid, S.; Altomi, A.; Tarhuni, A. y Marialigeti, K. 2001. Prevalence, species differentiation, haemolytic activity, and antibiotic susceptibility of *Aeromonas* in untreated well water. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 96: 169-73.

Ghenghesh, K. S.; Ahmed, S. F.; El-Khalek, R. A.; Al-Gendy, A. y Klena J. 2008. *Aeromonas*-Associated Infections in Developing Countries. *Journal of Infections Developing Countries*, 2(2): 81-98.

Ginestrea, M.; Rincón, G.; Romero, S.; Harris, B.; Castellano, M. y Colina, G. 2005. Especies de *Aeromonas* en vegetales frescos que se expenden en un mercado popular de Maracaibo. *Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología*, 25(2): 45-53.

Goñii-Urriza, M.; Pineau, L.; Capdepuuy, M.; Roques, C.; Caumette, P. y Quentin, C. 2000. Antimicrobial resistance of mesophilic *Aeromonas* spp. isolated from two European rivers. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 46(2): 297-301.

Graevenitz, A. V. 2007. The role of *Aeromonas* in diarrhea: a review. *Infection*, 35(2): 59-64.

Guerra, I.; Fadanelli, R.; Figueiró, M.; Schreiner, F.; Delamare, A. P.; Wollheim, C.; Costa, S. O. y Echeverrigaray, S. 2007. *Aeromonas* associated diarrhoeal disease in south Brazil: Prevalence, virulence factors and antibiotic resistance. *Brazilian Journal of Microbiology*, 38: 638-643.

Günzel, D.; Florian, P.; Richter, J. F.; Troeger, H.; Schulzke, J. D.; Fromm, M. y Gitter, A. H. 2006. Restitution of single-cell defects in the mouse colon epithelium differs from that of cultured cells. *American Journal of Physiology - Regulatory - Integrative and Comparative Physiology*, 290: 1496-507.

Guz, L. y Kozinska, A. 2004. Antibiotic susceptibility of *Aeromonas hydrophila* and *Aeromonas sobria* isolated from farmed carp (*Cyprinus carpio* L.). *Bulletin of the Veterinary Institute in Pulawy*, 48(4): 391-395.

Hamilton, J. M. y Shah, S. 2001. Identity and antibiotic susceptibility of enterobacterial flora of salad vegetables. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 18: 81-83.

Huddelston, J. R.; Zak, J. C.; y Jeter, R. M. 2006. Antimicrobial susceptibilities of *Aeromonas* spp. isolated from environmental sources. *Applied Environmental Microbiology*, 72: 7036-7042.

Hugh, R. y Leifson, E. 1953. The taxonomic significance of fermentative versus oxidative metabolism of carbohydrates by various Gram negative bacteria. *Journal of Bacteriology*, 66: 24-26.

Hunt, L. K.; Overmant, T. L. y Otero, R. B. 1981. Rapid oxidase method for testing oxidase-variable *Aeromonas hydrophila* strains. *Journal of Clinical Microbiol*, 13(6): 1117-1118.

Igbinosa, O. E.; Odjardare, E. E.; Akpor, O. B.; Aiyegoro, O. A. y Ogunmwonyi, I. H. 2006. Incidence and prevalence of *Aeromonas* species from retail food: public health implications. *Science Focus*, 12(2): 19-22.

Igbinosa, I.; Igumbor, E. U.; Aghdasi, F.; Tom, M. y Okoh, A. I. 2012. Emerging *Aeromonas* Species Infections and Their Significance in Public Health. *The Scientific World Journal*, 2012: 1-13.

Isonhood, J. H. y Drake, I. 2002. *Aeromonas* species in foods. *Journal of Food Protection*, 65: 575-582.

Janda, J. M. y Abbott, S. L. 2010. The genus *Aeromonas*: taxonomy, pathogenicity, and infection. *Clinical Microbiology Reviews*, 23: 35-73.

Jangid, K.; Parameswaran, P. y Shouche, Y. S. 2012. A Variant Quorum Sensing System in *Aeromonas veronii* MTCC 3249. *Sensors*, 12: 3814-3830.

Kay, B. A.; Guerrero C. E. y Sack, R. B. 1985. Media for the isolation of *Aeromonas hydrophila*. *Journal of Clinical Microbiology*, 22(5): 888-890.

Khajanchi, B. K.; Fadl, A. A.; Borchardt, M. A.; Berg, R. L.; Horneman, A. J.; Stemper, M. E.; Joseph, S. W.; Moyer, N. P.; Sha, J. y Chopra, A. K. 2010. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Joseph%20SW%5Bauth%5DDistribution> of Virulence Factors and Molecular Fingerprinting of *Aeromonas* Species Isolates from Water and Clinical Samples: Suggestive Evidence of Water-to-Human Transmission. *Applied and Environmental Microbiology*, 76(7): 2313-2325.

Kingombe, C. I.; D'Aoust, J. Y.; Huys, G.; Hofmann, L.; Rao, M. y Kwan, J., 2010. Multiplex PCR method for detection of three *Aeromonas* enterotoxin genes. *Applied and Environment Microbiology*, 76: 425-433.

Kuhn, I.; Allestam, G.; Huys, G.; Janssen, P.; Kersters, K.; Krovacek, K. y Stenström, T. A. 1997. Diversity, persistence, and virulence of *Aeromonas* strains isolated from drinking water distribution systems in Sweden. *Applied and Environmental Microbiology*, 63: 2708-2715.

Lanyí, B. 1987. Classical and rapid identification methods for medically important bacteria. *Methods Microbiol.* 19: 1-67.

Macnab, R. M. 2004. Type III flagellar protein export and flagellar assembly. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1694: 207-217

Martino, M. E.; Fasolato, L.; Montemurro, F.; Rosteghin, M.; Manfrin, A.; Patarnello, T.; Novelli, E. y Cardazzo, B. 2011. Determination of Microbial Diversity of *Aeromonas* Strains on the Basis of Multilocus Sequence Typing, Phenotype, and Presence of Putative Virulence Genes. *Applied and Environmental Microbiology*, 77(14): 4986-5000.

Marchandin, H.; Godreuil, S.; Darbas, H.; Jean-Pierre, H.; Jumas-Bilak, E.; Chanal, C. y Bonnet, R. 2003. Extended-spectrum β - lactamase TEM-24 in an *Aeromonas* clinical strain: acquisition from the prevalent *Enterobacter aerogenes* clone in France. *Antimicrob Agents Chemother*, 47: 3994-3995.

Mateos, D.; Anguita, J.; Naharro, G. y Paniagua, C. 1993. Influence of growth temperature on the production of extracellular virulence factors and pathogenicity of environmental and human strains of *Aeromonas hydrophila*. *Journal of Applied Bacteriology*, 74(2): 111-118.

McEgan, R.; Lee, S.; Schumacher, B. y Warriner, K. 2008. Composite versus single sampling of spent irrigation water to assess the microbiological status of sprouting mung bean beds. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 88(9): 1549-1553.

McMahon, M. A. y Wilson, I. G. 2001. The occurrence of enteric pathogens and *Aeromonas* species in organic vegetables. *International Journal of Food Microbiology*, 70(1-2): 155-162.

Michelim, L.; Lahude, M.; Araújo, P.; Giovanaz, D.; Müller, G.; Delamare, A.; Da costa, S. y Echeverrigaray, S. 2005. Pathogenicity factors and antimicrobial resistance of *Staphylococcus epidermidis* associated with nosocomial infections occurring in intensive care units. *Brazilian Journal of Microbiology*, 36: 17-23.

Miller, S. M.; Tourlousse, D. M.; Stedtfeld, R. D.; Baushke, S. W.; Herzog, A. B.; Wick, L. M.; Rouillard, J. M.; Gulari, E.; Tiedje, J. M. y Hashsham, S. A. 2008. In situ-synthesized virulence and marker gene biochip for detection of bacterial pathogens in water. *Applied and Environmental Microbiology*, 74(7): 2200-2209.

Monaghan, S. F.; Anjaria, D.; Mohr, A. y Livingston, D. H. 2008. Necrotizing Fasciitis and Sepsis Caused by *Aeromonas hydrophila* after Crush Injury of the Lower Extremity. *Surgical Infections*, 9(4): 459-467.

Monge R, Arias M, Utzinger D. 1998. Presence of citotoxic *Aeromonas* and *Plesiomonas shigelloides* in fresh vegetables. *Revista Biomédica*, 9: 176-80.

Nagar, V.; Shashidhar, R. y Bandekar, J. R. 2011. Prevalence, Characterization, and Antimicrobial Resistance of *Aeromonas* Strains from Various Retail Food Products in Mumbai, India. *Journal of Food Science*, 76(7): 486-492.

Nasser, A.; Zabta, K.S.; Samina, B. y Muhammad Y. 2013. Funtion and phylogenetic characterization of rhizospheric bacteria associated with GM and Non GM Maize. *Pakistan Journal of Botany*. 45(5): 1781-1788.

Nawaz, M.; Khan, S. A.; Khan, A. A.; Sung, K.; Tran, Q.; Kerdahi, K. y Steele, R. 2010. Detection and characterization of virulence genes and integrons in *Aeromonas veronii* isolated from catfish. *Food Microbiology*, 27: 327-331

Nguz, K.; Shindano, J.; Samapundo, S. y Huyghebaert, A. 2005. Microbiological evaluation of fresh-cut organic vegetables produced in Zambia. *Food Control*, 16: 623-628.

Ormen, O. y Ostensvik, O. 2001. The occurrence of aerolysin-positive *Aeromonas* spp. and their cytotoxicity in Norwegian water sources. *Journal of Applied Microbiology*, 90: 797-802.

Ottaviani, D.; Parlani, C.; Citterio, B.; Masini, L.; Leoni, F.; Canonico, C.; Sabatini, L.; Bruscolini, F. y Pianetti, A. 2011. Putative virulence properties of *Aeromonas* strains isolated from food, environmental and clinical sources in Italy: a comparative study. *International Journal of Food and Microbiology*, 144: 538-545.

Palumbo, S. A.; Maxino, F.; Williams, A. C.; Buchanan, R. L. y Thayer, D. W. 1985. Starch-Ampicillin agar for the quantitative detection of *Aeromonas hydrophila*. *Applied and Environmental Microbiology*, 50(4): 1027-1030.

Pemberton, J. M.; Kidd, S. P. y Schmidt, R. 1997. Secreted enzymes of *Aeromonas*. *FEMS Microbiology Letters*, 152: 1-10.

Peres-Palú, A.; Martins-Gomes, L.; Lemos-Miguel, M. A.; Teruzkin-Balassiano, I.; Penna-Queiroz, M. L.; Freitas-Almeida, A. y Soares de Oliveira, S. 2006. Antimicrobial resistance in food and clinical *Aeromonas* isolates. *Food Microbiology*, 23: 504-509.

Pianietti, A.; Sabatini, L.; Bruscolini, F.; Chiaverini, F. y Cecchetti, G. 2004. Faecal contamination indicators, *Salmonella*, *Vibrio* and *Aeromonas* in water used for the irrigation of agricultural products. *Epidemiology and Infection*, 132(2): 231-238.

Puthucheary, S. D.; Puah, S. M. y Chua, K. H. 2012. Molecular characterization of clinical isolates of *Aeromonas* species from Malaysia. *PLoS ONE*, 7(2): e30205.

Ramalivhana, J. N.; Obi, C. L. y Moyo, S. R. 2009 Antimicrobial susceptibility testing of *Aeromonas hydrophila* isolated from Limpopo Province, SouthAfrica using VITEK 2 system, Micro Scan WalkAway, disk diffusion and E-test method. *African Journal of Microbiology Research*, 3(12): 903-913.

Rao, J. N.; Liu, S. V.; Zou, T.; Liu, L.; Xiao, L.; Zhang, X.; Bellavance, E.; Yuan J. X. y Wang, J. Y. 2008. Rac1 promotes intestinal epithelial restitution by increasing Ca²⁺ influx through interaction with phospholipase C (gamma) 1 after wounding. *American Journal of Physiology and Cellular Physiology*, 295: 1499-509.

Rivas, M.; Leotta, G. y Chinen, I. 2007. Manual de procedimientos diagnósticos y caracterización de *Escherichia coli* O157 productor de toxina Shiga a partir de alimentos. Centro regional de referencia del WHO Global Salm Surv para América del Sur. 139 pp.

Russo, J. M.; Florian, P.; Shen, L.; Graham, W. V.; Tretiakova, M. S.; Gitter, A. H.; Mrsny, R. J. y Turner J. R. 2005. Distinct temporal-spatial roles for rho kinase and myosin light chain kinase in epithelial purse-string wound closure. *Gastroenterology*, 128: 987-1001.

Sen, K. y Rodgers, M. 2004. Distribution of six virulence factors in *Aeromonas* species isolated from US drinking water utilities: a PCR identification. *Journal of Applied Microbiology*, 97: 1077-1086.

Seshadri, R.; Joseph, S.; Chopra, A.; Sha, J.; Shaw, J.; Graf, J.; Haft, D.; Wu, M.; Ren, Q.; Rosovitz, M.; Madupu, R.; Tallon, L.; Kim, M.; Jin, S.; Vuong, H.; Stine, O. C.; Ali, A.; Horneman, A. y Heidelberg, J. 2006. Genome Sequence of *Aeromonas hydrophila* ATCC 7966: Jack of All Trades. *Journal of Bacteriology*, 188(23): 8272-8282

Singh, V.; Rathore, G.; Kapoor, D.; Mishra, B. N. y Lakra, W. S. 2008. Detection of aerolysin gene in *Aeromonas hydrophila* isolated from fish and pond water. *Indian Journal of Microbiology*, 48(4): 453-458.

Singh, V.; Chaudhary, D. K.; Mani, I.; Somvanshi, P.; Gaurav, R. G. y Sood, N. 2010. Molecular identification and codon optimization analysis of major virulence encoding genes of *Aeromonas hydrophila*. *African Journal of Microbiol Research*, 4(10): 952-957.

Soler, L.; Figueras, M. J.; Chacón, M. R.; Vila, J.; Marco, F.; Martínez-Murcia, A. J. y Guarro, J. 2002. Potential virulence and antimicrobial susceptibility of *Aeromonas popoffii* recovered from freshwater and seawater. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, 32: 243-247.

Song, T.; Toma, C.; Nakasone, N. e Iwanaga, M. 2004. Aerolysin is activated by metalloprotease in *Aeromonas veronii* biovar. *Journal Medical Microbiology*, 53(6): 477-482.

Song, J. S.; Jeon, J. H.; Lee, J. H.; Jeong, S. H.; Jeong, B. C.; Kim, S. J.; Lee, J. H. y Lee, S. H. 2005. Molecular characterization of TEM-type beta-lactamases identified in cold-seep sediments of EdisonSeamount (south of Lihir Island, Papua New Guinea). *Journal of Microbiology*, 43: 172-178.

Sprecher, H. 2005. Sepsis due to extended-spectrum β -lactamase producing *Aeromonas hydrophila* in a pediatric patient with diarrhea and pneumonia. *Clinical Infectious Diseases*, 41: 421-2.

Szczuka, E. y Kaznoski, A. 2007. Characterization of *A. veronii* by standardized cellular protein electrophoretic patters. *Folia Microbiologica*, 52(1): 65-69.

Takahashi, E.; Kobayashi, H.; Yamanaka, H.; Nakanishi, M.; Tateishi, A.; Abe, T.; Arimoto, S.; Negishi, T. y Okamoto, K. 2013. Analysis of carboxy terminal domain of metalloprotease of elastolytic *Aeromonas hydrophila*. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 36(7): 1174-1182.

Tourlousse, D. M.; Stedtfeld, R. D.; Baushke, S. W.; Wick, L. M. y Hashsham, S. A. 2007. Virulence factor activity relationships: Challenges and development approaches. *Water Environment Research*, 79(3): 246-259.

Van-Elsas, J. y Bailey, M. J. The ecology of transfer of mobile genetic elements. *FEMS Microbiology Ecology*, 42: 187-97

Vila, J.; Ruiz, J.; Gallardo, J.; Vargas, M.; Soler, L.; Figueras, M. J. y Gascón, J. (2003). *Aeromonas* spp. and traveler's diarrhea: clinical features and antimicrobial resistance. *Emerging Infectious Diseases*, 9(5): 552-555.

Vilches, S.; Jiménez, N.; Tomás, J. M. y Merino, S. 2009. *Aeromonas hydrophila* AH-3 Type III Secretion System Expression and Regulatory Network. *Applied and Environmental Microbiology*, 75(19): 6382-6392.

Wang, G.; Clifford, C. G.; Liu, C.; Pucknell, C.; Munro, C. K.; Kruk, T. M.; Caldeira, R.; Woodward, D. L. y Rodgers, F. G. 2003. Detection and characterization of a hemolysin gene in *Aeromonas hydrophila* and *Aeromonas sobria* by multiplex PCR. *Journal of Clinical Microbiology*, 41: 1048-54.

Ye, Y. W.; Fan, T. F.; Li, J. F.; Lu, J. F.; Jiang, H.; Hu, W. y Jiang, Q. H. 2013. Characterization of *Aeromonas hydrophila* from hemorrhagic diseased freshwater fishes in Anhui Province, China. *International Food Research Journal*, 20(3): 1449-1452.

Yi, S. W.; You, M. J.; Cho, H. S.; Lee, C. S.; Kwon, J. K. y Shin, G. W. 2013. Molecular characterization of *Aeromonas* species isolated from farmed eels (*Anguilla japonica*). *Veterinary Microbiology*, 164: 195-200.

Yu, C. P. y Chu, K. H. 2011. Molecular quantification of virulence gene-containing *Aeromonas* in water samples collected from different drinking water treatment processes. *Environmental Monitoring and Assessment*, 176: 225-238

Yucel, N.; Aslim, B. y Beyatli, Y. 2005. Prevalence and resistance to antibiotics for *Aeromonas* species isolated from retail fish in Turkey. *Journal of Food Quality*, 28: 313-324.

HOJA DE METADATOS

Hoja de Metadatos para Tesis y Trabajos de Ascenso – 1/6

Título	Factores De Patogenicidad Y Resistencia Antimicrobiana De Cepas DE <i>Aeromonas</i> spp. Aisladas De Vegetales Comestibles
Subtítulo	

Autor(es)

Apellidos y Nombres	Código CVLAC / e-mail	
González Pérez Mayelys del Valle	CVLAC	13056820
	e-mail	mayelysg@hotmail.com
	e-mail	
	CVLAC	
	e-mail	
	e-mail	
	CVLAC	
	e-mail	
	e-mail	
	CVLAC	
	e-mail	
	e-mail	

Palabras o frases claves:

<i>Aeromonas hydrophila</i> , vegetales, reacción en cadena de la polimerasa, factores de virulencia, resistencia/sensibilidad antibiótica
--

Hoja de Metadatos para Tesis y Trabajos de Ascenso – 2/6

Líneas y sublíneas de investigación:

Área	Subárea
Post Grado en Biología Aplicada	Microbiología

Resumen (abstract):

Aeromonas hydrophila es una bacteria actualmente considerada un patógeno emergente oportunista involucrada en enfermedades intestinales y extraintestinales. Genes codificantes de proteínas extracelulares como aerolisina/hemolisina y serina proteasa confieren a las cepas de esta especie características fenotípicas particulares, por lo que han sido ampliamente utilizadas como marcadores moleculares en la detección de factores de virulencia, que permiten la estimación de su potencial patógeno, además de otras enzimas como lipasas, proteasas y amilasas. Este microorganismo ha sido aislado de alimentos incluyendo vegetales, que pueden servir como potencial fuente de infecciones en humanos, además de vehículos para la dispersión de cepas resistentes a antibióticos. Se determinó la frecuencia de aparición de propiedades virulentas (actividad hemolítica, proteolítica y lipolítica) en 123 aislados de *A. hydrophila* provenientes de ocho tipos de vegetales frescos, comestibles, comercializados en Cumaná, Venezuela. Las cepas fueron aisladas en agar ampicilina-almidón por 24 h a 37°C, en condiciones anaerobias y positivas en la formación de halos frente a la presencia de lugol. Se realizó la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para la detección de los genes codificantes de aerolisina (*aerA*) y serina proteasa (*aspA*), además de pruebas de susceptibilidad a los antibióticos mediante la técnica de difusión en discos. Los porcentajes de aislados con actividad proteolítica (74,8%) y lipolítica (73,17%) fueron superiores a la actividad hemolítica (38,21%). Se confirmó la presencia del gen *aerA*⁺ en 16,27% de cepas aisladas de cebollín, lechuga y perejil, mientras que *aspA*⁺ solo se observó en un aislado de lechuga. Los genes *sataA*, *lipA* y *ahyB*, no fueron evidenciados en las muestras analizadas. Las cepas de *A. hydrophila* fueron resistentes a Ampicilina-sulbactam, cefotaxime y aztreonam, con porcentajes de 56,9%; 49,6% y 48,8% respectivamente. Mientras que con imipenem se observó un 95,1% de sensibilidad, seguido de amikacina (91,1%), ciprofloxacina (81,3%) y tetraciclina (78,1%). Estos resultados muestran la presencia de cepas de *A. hydrophila* con potencial patógeno que pueden producir brotes de infección por consumo de vegetales contaminados, principalmente lechuga, además de la resistencia observada, por parte de diferentes aislados, frente a antibióticos de primera línea, lo que indica un riesgo significativo para la salud de los consumidores.

Hoja de Metadatos para Tesis y Trabajos de Ascenso – 3/6

Contribuidores:

Apellidos y Nombres	ROL/ Código CVLAC / e-mail	
Villalobos Luz Bettina	ROL	CA <input type="checkbox"/> A <input checked="" type="checkbox"/> S <input type="checkbox"/> T <input type="checkbox"/> U <input type="checkbox"/> JU <input type="checkbox"/>
	CVLAC	5162987
	e-mail	lbvillalobosb@yahoo.com
	e-mail	
Araque Yasmina	ROL	CA <input type="checkbox"/> A <input type="checkbox"/> S <input type="checkbox"/> T <input type="checkbox"/> U <input type="checkbox"/> JU <input checked="" type="checkbox"/>
	CVLAC	8000717
	e-mail	yamasi40@gmail.com
	e-mail	
Guzmán Militza	ROL	CA <input type="checkbox"/> A <input type="checkbox"/> S <input type="checkbox"/> T <input type="checkbox"/> U <input type="checkbox"/> JU <input checked="" type="checkbox"/>
	CVLAC	8954225
	e-mail	militzaguz@yahoo.es
	e-mail	
	ROL	CA <input type="checkbox"/> A <input type="checkbox"/> S <input type="checkbox"/> T <input type="checkbox"/> U <input type="checkbox"/> JU <input checked="" type="checkbox"/>
	CVLAC	
	e-mail	
	e-mail	

Fecha de discusión y aprobación:

Año Mes Día

2014	01	24
------	----	----

Lenguaje: spa

Hoja de Metadatos para Tesis y Trabajos de Ascenso – 4/6

Archivo(s):

Nombre de archivo	Tipo MIME
P.G-gonzalezm.doc	Aplication/Word

Alcance:

Espacial: **Nacional** **(Opcional)**

Temporal: **Temporal** **(Opcional)**

Título o Grado asociado con el trabajo: Magíster Scientiarum en Biología Aplicada,
Mención Microbiología

Nivel Asociado con el Trabajo: Magíster Scientiarum

Área de Estudio: Microbiología

Institución(es) que garantiza(n) el Título o grado: Universidad de Oriente, Núcleo de
Sucre

Hoja de Metadatos para Tesis y Trabajos de Ascenso – 5/6



UNIVERSIDAD DE ORIENTE
CONSEJO UNIVERSITARIO
RECTORADO

CU Nº 0975

Cumaná, 04 AGO 2009

Ciudadano
Prof. JESÚS MARTÍNEZ YÉPEZ
Vicerrector Académico
Universidad de Oriente
Su Despacho

Estimado Profesor Martínez:

Cumplo en notificarle que el Consejo Universitario, en Reunión Ordinaria celebrada en Centro de Convenciones de Cantaura, los días 28 y 29 de julio de 2009, conoció el punto de agenda "SOLICITUD DE AUTORIZACIÓN PARA PUBLICAR TODA LA PRODUCCIÓN INTELECTUAL DE LA UNIVERSIDAD DE ORIENTE EN EL REPOSITORIO INSTITUCIONAL DE LA UDO, SEGÚN VRAC Nº 696/2009".

Leído el oficio SIBI - 139/2009 de fecha 09-07-2009, suscrita por el Dr. Abul K. Bashirullah, Director de Bibliotecas, este Cuerpo Colegiado decidió, por unanimidad, autorizar la publicación de toda la producción intelectual de la Universidad de Oriente en el Repositorio en cuestión.

UNIVERSIDAD DE ORIENTE
SISTEMA DE BIBLIOTECA
RECIBIDO POR *Mazley*
FECHA 05/08/09 HORA 5:30

Comunicación que hago a usted a los fines consiguientes.

Cordialmente,

Juan A. Bolanos Cunele
JUAN A. BOLANOS CUNELE
Secretario



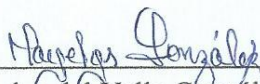
C.C: Rectora, Vicerrectora Administrativa, Decanos de los Núcleos, Coordinador General de Administración, Director de Personal, Dirección de Finanzas, Dirección de Presupuesto, Contraloría Interna, Consultoría Jurídica, Director de Bibliotecas, Dirección de Publicaciones, Dirección de Computación, Coordinación de Teleinformática, Coordinación General de Postgrado.

JABC/YGC/maruja

Apartado Correos 094 / Telfs: 4008042 - 4008044 / 8008045 Telefax: 4008043 / Cumaná - Venezuela

Hoja de Metadatos para Tesis y Trabajos de Ascenso – 6/6

Artículo 41 del REGLAMENTO DE TRABAJO DE PREGRADO (vigente a partir del II Semestre de 2009, según comunicación CU-034-2009): “los Trabajos de Grado son de la exclusiva propiedad de la Universidad de Oriente, y solo podrán ser utilizados para otros fines con el consentimiento del consejo de núcleo respectivo, quien deberá participarlo previamente al Consejo Universitario para su autorización ”



Mayelys del Valle González Pérez
Autor



Dra. Luz Bettina Villalobos de B.
Asesor